

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Th. Hünig

**Untersuchung der regulatorischen Funktion von KLRG1+CD4+ Lymphozyten  
der Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu  
Würzburg

vorgelegt von  
Julia Katharina Tietze  
aus Göttingen

Würzburg, Januar 2006



**Referent:**

Priv.-Doz. Dr. Thomas Hanke

**Koreferent:**

Prof. Dr. Thomas Hünig

**Dekan:**

Prof. Dr. Georg Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung:**

20.07.2006

**Die Promovendin ist Ärztin**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<i>Regulatorische T-Zellen</i>	
<b>1.1. Einführung</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Kontrollmechanismen des Immunsystems</b>	<b>3</b>
1.2.1. Deletion im Thymus	3
1.2.2. Induktion von Anergie	3
<b>1.3. Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen</b>	<b>4</b>
1.3.1. Suche nach einer spezifischen regulatorischen T-Zell Population	4
1.3.2. Charakterisierung von CD25+CD4+ regulatorischen T-Zellen	5
1.3.3. Weitere Population von regulatorischen T-Zellen	8
<b>1.4. Induzierbare regulatorische T-Zellen</b>	<b>11</b>
1.4.1. Anergie Zellen als regulatorische Immunzellen	11
1.4.2. Regulatorische T-Zellen 1 und Th3 Zellen	12
<b>1.5. Bildungsort und Vorkommen der regulatorischen T-Zellen</b>	<b>12</b>
<b>1.6. Die Rolle von Zytokinen für die Funktion von regulatorischen T-Zellen</b>	<b>14</b>
<i>Teil 2: KLRG1</i>	
<b>1.7. Aufbau des Moleküls KLRG1</b>	<b>17</b>
<b>1.8. Expressionsprofile</b>	<b>18</b>
<b>1.9. Inhibitorische Rezeptoren</b>	<b>19</b>
<b>1.10. KLRG1 Expression auf T-Zellen</b>	<b>20</b>
<b>1.11. Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>21</b>

<b>2. MATERIAL</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Versuchstiere</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Standardlösungen und Puffer</b>	<b>23</b>
<b>2.3. Chemikalien</b>	<b>23</b>
<b>2.4. Serologische Reagenzien</b>	<b>24</b>
<b>2.5. Geräte</b>	<b>25</b>
<b>2.6. Gebrauchsmaterialien</b>	<b>26</b>
<b>3. METHODEN</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Gewinnung von Zellen</b>	<b>28</b>
3.1.1. Organentnahme	28
3.1.2. Aufbereitung der Organe	30
<b>3.2. Hämolysen</b>	<b>31</b>
3.2.1. Flash-Lysis	31
3.2.2. Lyse mittels Saponin	31
<b>3.3. Anreicherungsverfahren von Lymphozyten</b>	<b>31</b>
3.3.1. Nylonwollpassage	31
3.3.2. Magnetische Anreicherungsverfahren	33
SA-Beads-Sortierung	33
MACS-Säulenpassage	33
3.3.3. Zell-Sortierung	35
3.3.4. Bestimmung der Lebendzellzahl	35

<b>3.4. Zellkultur</b>	<b>36</b>
3.4.1. Zellkultur zur Analyse der Zytokinproduktion	36
Stimulation durch plattengebundenen Anti-TZR	36
Restimulation durch PMA/Ionomycin und Brefeldin A	36
3.4.2. Herstellung von Antigen präsentierenden Zellen	37
Proliferationshemmung durch Mitomycin C	37
Proliferationshemmung durch Bestrahlung	37
3.4.3. Zellkultur nach Anreicherung durch Zell-Sortierung	38
Stimulation durch plattengebundenen Anti-TZR, IL-2 oder Anti-CD28	38
Stimulation durch APZ und gelösten Anti-TZR	38
3.4.4. Herstellung von LAK-Zellen	39
3.4.5. Plasmazellkultur für die Antikörperproduktion	39
<b>3.5. Proliferationstest</b>	<b>39</b>
3.5.1. Nachweis der Proliferation mittels [ <sup>3</sup> H] Thymidineinbau	39
3.5.2. Nachweis der Proliferation mittels CSFE-Färbung	40
<b>3.6. Aufreinigung von Antikörpern</b>	<b>40</b>
<b>3.7. FITC-Kopplung monoklonaler Antikörper</b>	<b>41</b>
<b>3.8. Protokoll zum Einfrieren der Zellen</b>	<b>42</b>
<b>3.9. Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie</b>	<b>42</b>
3.9.1. Färbungen auf Oberflächenmarker	43
3.9.2. Intrazelluläre Färbungen	43
<b>3.10. Durchflusszytometrie</b>	<b>45</b>

<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Phänotypische Analyse von KLRG1+CD4+ Zellen aus C57BL/6 bzw. BALB/c Mäusen</b>	<b>47</b>
4.1.1. CD4-positiver Mauslymphozyten exprimieren KLRG1 auf ihrer Oberfläche	48
4.1.2. Untersuchung des T-Zell-Rezeptor V $\beta$ -Repertoires der KLRG1+CD4+ Zellpopulation	49
4.1.3. Überprüfung des Anteils der NKT-Zellen unter den KLRG1+CD4+ Zellen	49
4.1.4. Oberflächenfärbung der KLRG1+CD4+ Zellen auf bekannte Marker für regulatorische Zellen	51
4.1.5. Weitere Oberflächenfärbungen der KLRG1+CD4+ Zellpopulation	53
4.1.6. KLRG1 Expression in der Ontogenie	56
4.1.7. KLRG1 Expression auf den verschiedenen lymphatischen Organen der C57BL/6 Maus	58
<b>4.2. Zytokin-Produktion von KLRG1+CD4+ Zellen in 48 h Kultur</b>	<b>61</b>
<b>4.3. Regulatorische Funktion von KLRG1+CD4+ Zellen</b>	<b>64</b>
4.3.1. Proliferationsversuche	64
4.3.2. Annexinfärbung	66
4.3.3. Co-Kulturen	67
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>71</b>
<b>5.1. Der Phänotyp der KLRG1+CD4+ Zellen</b>	<b>72</b>
<b>5.2. Organfärbungen</b>	<b>74</b>
5.2.1. Thymus	74
5.2.2. KLRG1+CD4+ Zellen in weiteren lymphatischen Organen	77
5.2.3. Die Verteilung von KLRG1 auf den T-Helferzellen in der Ontogenie	78

<b>5.3. Zytokinversuche</b>	<b>78</b>
<b>5.4. Proliferationsassay</b>	<b>80</b>
<b>5.5. Theorien zum Funktionsmechanismus KLRG1+CD4+ Zellen</b>	<b>82</b>
5.5.1. Spekulationen über den Wirkmechanismus der Treg Zellen	82
5.5.2. Wirkung von KLRG1	83
<b>5.6. Vorschläge für zukünftige Untersuchungen</b>	<b>85</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>87</b>
<b>7. LITERATUR</b>	<b>88</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>103</b>



# **Einleitung**

## **1.1. Einführung**

Das Immunsystem der Säugetiere ist ein hochkomplexes Organ, dessen Aufgabe darin besteht, das Individuum vor der Unzahl an Pathogenen zu schützen, die sich in der uns umgebenden Umwelt befinden. Die dabei von ihm verwendeten Mechanismen sind äußerst effizient im Vernichten der den Organismus belastenden, Krankheit verursachenden Erreger.

Im Einzelnen besteht das Immunsystem aus dem ontogenetisch älteren, unspezifischen, und dem spezifischen Teil. Zur unspezifischen Abwehr werden die Fresszellen, wie Granulozyten oder Makrophagen, gezählt, zur spezifischen Abwehr dienen B- und T-Lymphozyten. Die spezifische Abwehr kann Keime gezielt erkennen und abtöten bzw. zur Tötung durch andere Zellen markieren. Die beteiligten T-Zellen müssen durch Wechselwirkung ihres T-Zell-Rezeptors mit zellfremden, von Antigen präsentierenden Zellen gezeigten Proteinen in Kombination mit Zytokinen, membranständigen oder Zell-Zell-Interaktionsmolekülen aktiviert werden. Zu den Antigen präsentierenden Zellen gehören B-Lymphozyten, Makrophagen und spezialisierte Antigen präsentierende Zellen wie Dendritische Zellen. T-Zellen werden im Thymus geprägt, und schon dort differenzieren sich die zwei Hauptklassen der CD4+ (T-Helferzellen) und CD8+ (T-Killerzellen oder zytotoxische T-Lymphozyten, CTL). Durch die Aktivierung gewinnt der CTL die Fähigkeit, infizierte oder fremde Zellen durch Einleitung von Lyse (z. B. über den Perforin-Pathway) oder Apoptose (z. B. über CD95) zu zerstören. T-Helferzellen können zu zwei verschiedenen Untergruppen differenzieren: Nämlich zu den Th1 und Th2 Zellen. Nach Stimulierung über Antigen und beispielsweise IL-12 sezernieren Th1 Zellen IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$ , was primär die zelluläre Abwehr stimuliert. Th2 Zellen scheiden nach ihrer Stimulation IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 aus, die im Knochenmark gebildete B-Zellen zur Antikörperproduktion aktivieren.

10% der peripheren Blutlymphozyten sind weder B- noch T-Zellen, sondern so genannte Natural Killer Cells oder NK-Zellen. Diese Zellen entstehen aus den gleichen Vorläufern wie T-Zellen im Knochenmark, reifen aber nicht im Thymus und sind nur in

den sekundären Lymphorganen, Blut und Milz, aber selten im Thymus anzutreffen. Sie erkennen ihre Zielzellen u.a. durch deren Beladung mit Antikörpern, die sie mittels CD16, ein Rezeptor für den Fc-Part der Immunglobuline, identifizieren können. Sie töten diese Zellen mittels des Perforin/Granzymwegens oder auch über und CD95L. Sie sind also quasi die „Vollstrecker der B-Zellen“ [Janeway and Travers, 1997]. Eine weitere Zellpopulation sind die NKT-Zellen. Diese Zellen haben ein begrenztes T-Zell-Rezeptorrepertoire aus einer invarianten  $\alpha$  Kette ( $V\alpha 14/-J\alpha 281$ ) verbunden mit polyclonalen  $V\beta 8$ ,  $V\beta 7$  und  $V\beta 2$  Ketten, mit dem sie CD1d-präsentiertes  $\alpha$ -Galaktosylceramid erkennen können. Sie produzieren bei Stimulation ihres T-Zell-Rezeptors große Mengen von IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$ , [Arase et al., 1993] [Arase et al., 1996] [Zlotnik et al., 1992], aktivieren dadurch Makrophagen und NK-Zellen, CD8+ Zellen und induzieren CD4+ Zellen. Auch verfügen sie über eine direkte Zytotoxizität [Taniguchi et al., 2003]. Diese Zellen scheinen ebenfalls eine Rolle in der Entstehung und auch Verhinderung von Autoimmunerkrankungen zu spielen.

Die tödliche Potenz des Immunsystems, so überlebensnotwendig sie ist, kann allerdings auch zu massiven Schäden und sogar zum Tod des Organismus führen, wenn die Immunzellen zu heftig auf Keime reagieren oder sich sogar gegen Anteile des Körpers selbst richten. Beispielsweise werden die bei Leishmaniose und auch bei Tuberkulose auftretenden Nekrosen nicht nur durch das pathologische Agens, sondern auch durch das eigene Immunsystem verursacht. Lebensbedrohliche allergische Überreaktionen werden ebenfalls durch Fehlsteuerung der immunologischen Antwort ausgelöst. Immunkompetente Zellen können sich direkt gegen körpereigene Strukturen oder Zellen richten, wie z.B. bei Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose, Sklerodermie oder Lupus Erythematodes. Diese Fehlsteuerungen des Immunsystems treten recht häufig auf, wie die hohe und in jüngster Zeit sogar noch zunehmende Anzahl von diagnostizierten Autoimmunkrankheiten verdeutlicht. Die Ursache sowie die auslösenden Faktoren dieser Reaktionen liegen nach wie vor noch weitgehend im Dunklen.

Ende der sechziger Jahre entdeckte man, dass T-Lymphozyten auch als Helferzellen für B-Lymphozyten wirken und kurz darauf wurde erstmals vorgeschlagen, dass T-Zellen nicht nur als aktivierende, sondern möglicherweise auch als hemmende, die Immunantwort unterdrückende Mediatoren wirken könnten [Gershon et al., 1970].

Und tatsächlich kristallisierten sich in den darauf folgenden Jahren und Jahrzehnten immer mehr Untergruppen der T-Zellen heraus, deren vermutlich wichtigste Aufgabe es ist, regulatorisch auf andere Immunzellen einzuwirken. Im Folgenden wird auf verschiedene T-zellvermittelte regulatorische Mechanismen näher eingegangen.

## **1.2. Kontrollmechanismen des Immunsystems**

### ***1.2.1. Deletion im Thymus***

Es ist eine allgemein akzeptierte Ansicht, dass der Thymus in der Entwicklung der T-Zellen die so genannte zentrale Toleranz bewirkt, indem dort die auf Selbstantigen ansprechenden unreifen Thymozyten durch Anregen zur Apoptose eliminiert werden [von Boehmer et al., 1990] [Kappler JW et al., 1987].

### ***1.2.2. Induktion von Anergie***

Nicht alle sich im Organismus befindlichen Peptide werden im Thymus präsentiert und somit werden auch nicht alle potentiell autoreaktiven T-Zellen erkannt und eliminiert [für einen Übersichtsartikel siehe Kyewski et al., 2004]. Diese quasi nicht erkannten autoreaktiven Zellen reagieren aber nicht automatisch mit Selbstantigenen, was der peripheren Toleranz zu verdanken ist. Diese kann auf verschiedene Weise zustande kommen, wie durch 1. Ignoranz [Ohashi et al., 1991], 2. Deletion [Rocha B and von Boehmer H, 1991] und 3. T-Zell Anergie [Rocha B et al., 1995], die bei T-Zell-Rezeptor Antigenbindung ohne co-stimulatorisches Signal auftritt. Anergie ist als Zustand definiert, in dem ein lebensfähiger T-Lymphozyt auf Antigenstimulation oder andere stimulierende Bedingungen keine funktionalen Antworten wie Proliferation oder IL-2 Produktion mehr zeigt [Schwartz et al., 1996].

Als 4. Mechanismus ist, wie in den letzten Jahren deutlich wurde, die aktive Unterdrückung bzw. Regulation der potenziell autoreaktiven Zellen von T-Zellen für die periphere T-Zell-Toleranz von herausragender Bedeutung.

### **1.3. Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen**

#### ***1.3.1. Suche nach einer spezifischen regulatorischen T-Zell Population***

Die Beobachtung, dass Lymphopenie häufig mit der Entwicklung einer Autoimmunkrankheit verbunden ist, lässt sich nicht mit Anergie und Depletion als einzige regulatorische Mechanismen erklären. Das Immunsystem muss also noch über andere Möglichkeiten zur Regulation verfügen.

Thymektomie in der Entwicklungsphase der T-Zellen führt bei Mäusen zu organspezifischen Autoimmunkrankheiten, ein seit Jahrzehnten bekannter Effekt. Schon 1969 beobachteten Nishizuka and Sakakura, dass im Alter von wenigen Tagen thymektomierte weibliche Mäuse aufgrund einer daraufhin ausbrechenden Oophoritis unfruchtbar wurden. Weitere Untersuchungen belegten, dass der Ausbruch der Autoimmunkrankheit bei den am 3. Tag thymektomierten Mäusen (3dTx) mit der Gabe einer Suspension von Thymozyten mehr als 7 Tage alter Mäuse oder einer Suspension von Milz- oder Lymphknotenzellen verhindert werden kann, wohingegen Milzzellen von genau 7 Tagen alten gesunden Tieren, Knochenmarkszellen oder auch Milzzellen von 3dTx Mäusen nicht in der Lage waren, den Empfänger zu schützen [für einen Übersichtsartikel siehe Shevach 2000].

Ein anderes Modell zeigt, dass auch hoch dosierte fraktionierte Bestrahlung von Lymphgewebe organspezifische Autoimmunkrankheiten induzieren kann. Es lässt sich ausschließen, dass die Strahlenschäden an den Organen diese Erkrankungen verursachen, da gezielter Strahlenschutz derselben die Erkrankung nicht verhindern kann.

Im Gegensatz dazu kann der Ausbruch der Erkrankung durch die Gabe von Zellen aus Milz, Thymus oder Knochenmark von erwachsenen Mäusen in den ersten 2 Wochen nach Ende der Bestrahlung verhindert werden [Sakaguchi et al., 1994].

Den ersten Fortschritt bei der weiteren Charakterisierung der Beschaffenheit der postulierten regulatorischen T-Zellen erzielten Sakaguchi et al., indem sie zeigten, dass die Entfernung einer bestimmten T-Zellpopulation aus gesunden Tieren zu einer autoreaktiven Reaktion der übrigen Zellen führt. Die aus Mäusen gewonnenen T-Zellen wurden in die Gruppe der hoch exprimierenden "CD5high" und in die Gruppe der niedrig exprimierenden "CD5low" eingeteilt, wobei die Applikation der "CD5low"

Zellen zur Autoimmunkrankheit führte, die Gabe von den "CD5high" Zellen die Krankheit aber verhindern konnte [Sakaguchi et al., 1982]. Allerdings tragen nahezu alle T-Zellen CD5 auf ihrer Oberfläche, so dass die Expression von "CD5high" die regulatorischen T-Zellen nicht ausreichend klassifiziert.

Weitere Untersuchungen der regulatorischen T-Zellen offenbarten, dass die sich in der Ratte befindlichen CD4<sup>+</sup> Zellen, die zusätzlich "OX-22low" exprimieren, in der Lage sind, eine durch Gabe von "OX-22high" Zellen in am 3. Lebenstag thymektomierten Ratten induzierte Graft versus Host Krankheit zu verhindern. Ein ähnliches Resultat konnte auch im Maussystem beobachtet werden. Die Injektion von "CD45RBhigh" Zellen in immundefiziente SCID Mäuse führt zu einer chronisch intestinalen Entzündung, wohingegen die alleinige Gabe von "CD45RBlow" Zellen oder auch die ungetrennten Zellen keine Erkrankung verursachen. "CD45RBhigh" Zellen produzieren IL-2 und IFN- $\gamma$ , aber kaum IL-4, wohingegen "CD45RBlow" Zellen IL-4, aber weniger IL-2 und IFN- $\gamma$  bilden [Powrie and Mason, 1990].

Der Co-Transfer der "CD45RBlow" mit den "CD45high" Zellen kann den Ausbruch der Krankheit vollständig verhindern [Powrie et al., 1993].

Bei der Suche nach einem Marker, der zu der Ausprägung von CD45 konträr ist, aber homolog zu CD5 exprimiert wird, stieß die Arbeitsgruppe um Sakaguchi auf CD25. Die Injektion von CD25 exprimierenden CD4<sup>+</sup>Zellen depletierten T-Helferzellen führte zu Autoimmunerkrankungen, die Rückgabe der CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen kann den Ausbruch der Erkrankung verhindern [Sakaguchi et al., 1995]. Die CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen gelten heute als die Hauptgruppe der natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen.

### ***1.3.2. Charakterisierung von CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Treg)***

CD25 ist die  $\alpha$  Kette des IL-2 Rezeptors. Der IL-2 Rezeptor besteht aus drei Ketten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Diese  $\beta$  und  $\gamma$  Kette befinden sich auch z. T. auf ruhenden T-Zellen und können zusammen IL-2 mit niedriger Affinität binden. Die Verbindung aller drei Ketten entsteht ein Rezeptor mit hoher Affinität zu IL-2. Erst durch TZR-Bindung und Co-Stimulation über CD28 oder Zytokine wie IL-1 oder TNF- $\alpha$  wird die Expression von CD25 induziert [Nelson et al., 1998] [Plaetinck et al., 1990], dessen Expression als Kennzeichen für aktivierte Zellen in der Immunantwort gilt. Etwa 5-10% der CD4<sup>+</sup> Zellen in sekundären lymphoiden Organen oder im Blut exprimieren CD25.

Die CD25+CD4+ Zellen sind erstmals von Sakaguchi et al. als eine auf die Regulation von autoreaktiven Zellen spezialisierte Population beschrieben worden [Sakaguchi et al., 1995].

Der Phänotyp der aus der Milz von 3 Monaten alten Mäusen isolierten CD25+CD4+ Zellen wird durch folgende Oberflächenmarker gekennzeichnet: Nur wenige von ihnen exprimieren ein hohes Niveau von IL-2R $\beta$ , die Mehrheit mit über 90% sind "CD44high", etwa 70% sind "CD62low" (L-Selectin), etwa 25% "CD69high" und alle CD25+ Zellen sind "CD45RBnegativ" [Sakaguchi et al., 1995]. 60% der CD25+ Zellen sind CD38+, eine Population, die ebenfalls regulatorische Fähigkeiten hat [Read et al., 1998]. Im variablen Teil der V $\alpha$ V $\beta$  Kette des T-Zell-Rezeptor-Repertoire konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den CD25+ und CD25- Populationen der CD4+ Zellen festgestellt werden [Takahashi et al., 1998], also besitzen regulatorische T-Zellen ein polyklonales T-Zell-Rezeptor Repertoire. Ein signifikanter Teil von ihnen exprimiert auch CTLA-4 (Cytolytic T-Lymphocyte-associated Antigen 4), dessen Ausprägung für die regulatorische Funktion der CD25+CD4+ Zellen offenbar von großer Bedeutung ist. So nimmt eine Blockade von CTLA-4 den CD25+ Zellen die Fähigkeit, Colitis zu verhindern und induziert sogar Gastritis in normalen Mäusen [Read et al., 2000] [Takahashi et al., 2000].

Das von CTLA-4 ausgelöste Signal hemmt die IL-2 Produktion, die Differenzierung von T-Zellen und das Voranschreiten des Zellzyklusses. CTLA-4 ist auf naiven T-Zellen nur schwach exprimiert, steigt aber dramatisch an, wenn die Zellen aktiviert werden [Perkins et al., 1996]. Die Notwendigkeit des CTLA-4 für die Selbsttoleranz wurde mehrfach demonstriert [Karandikar et al., 1996] [Eagar et al., 2002] [Waterhouse et al., 1995].

Zur funktionellen Analyse der regulatorischen Funktion der Treg-Zellen dienten verschiedenen in vitro Modelle.

CD25+CD4+ Zellen verhalten sich in den in vitro Kulturen unter TZR-Stimulierung anerg. Die Zellen reagieren auch nicht, wenn ein co-stimulatorisches Signal wie Anti-CD28 hinzugegeben wird [Thornton et al., 1998]. In einem anderen Modell konnte eine leichte proliferative Antwort in der Gegenwart von Anti-CD28 beobachtet werden [Takahashi T, 1998]. Die supprimierende Wirkung auf andere CD4+ Zellen beruht insbesondere auf einer Hemmung der IL-2 Produktion in diesen Zellen und kann durch

die Gabe von IL-2 bei plattengebundenen Anti-CD3 oder durch die Zugabe von Anti-CD28 überwunden werden.

CD25+CD4+ Zellen benötigen für ihre Aktivierung ihr spezifisches Antigen. Erst wenn sie aktiviert sind, ist die Suppression der Responder-Zellen Antigen-unabhängig [Thornton et al., 2000]. Die regulierten Zellen werden nicht getötet. Treg-Zellen hemmen die Aktivierung anderer T-Zellen entweder direkt durch Zellkontakt abhängige Mechanismen [Takahashi et al., 1998] [Thornton et al., 1998] [Thornton et al., 2000] oder durch Reduktion der Aktivität der Antigen präsentierenden Zellen [Cederborn et al., 2000] [Vendetti et al., 2000]. Die Gabe von Antikörpern gegen die als regulatorisch wirksam bekannten Zytokine IL-10, IL-4 und TGF- $\beta$  zeigt in vitro keine Einschränkung der Wirkung [Thornton et al., 2000]. In vivo konnte allerdings die Notwendigkeit dieser Zytokine belegt werden [Asseman et al., 1999] [Maloy et al., 2003].

CD25+CD4+ Zellen regulieren auch zur IL-2 Produktion unfähige CD4+ Zellen. Dies bedeutet, dass sie nicht nur über die Hemmung der IL-2 Synthese wirken können [Wolf et al., 2001].

In vitro Versuche ergaben allerdings, dass die regulierende Wirkung von CD25+CD4+ Zellen IL-2 abhängig ist. So führt eine selektive Blockade des IL-2 Rezeptors auf den T-Zellen zu einer vollständigen Aufhebung der Suppression der Responder-Zellen. Eine Vermutung ist, dass die zur IL-2 Produktion unfähigen regulatorischen T-Zellen einen Teil ihrer regulatorischen Funktion durch die Aufnahme des von den Responder-Zellen produzierten IL-2 ausüben [De La Rosa et al., 2004].

Durch die Entdeckung, dass der Ausfall des Transkriptionsfaktor Foxp3 (forkhead box P3) zu auto-agressiver Immunproliferation führt, wurde Foxp3 als weiter Marker für regulatorischen T-Zellen etabliert. Foxp3 wird regelmäßig auf CD25+CD4+ Zellen exprimiert [Hori et al., 2003] [Khattri et al., 2003] [Fontenot et al., 2003]. Foxp3 ist ein Mitglied der "forkhead-winged" Helix Familie von Transkriptionsfaktoren. Es ist in die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen involviert. So führt die retrovirale Übertragung dieses Gens in naive T-Zellen zur Verwandlung in CD25+ regulatorische T-Zellen. Eine Mutation im Foxp3 Gen wurde als Ursache für die Autoimmunerkrankungen in „scurfy“ Mäusen sowie des IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked) erkannt [Schubert et al., 2001] [Benett et al., 2001].

Die Expression dieses Transkriptionsfaktors in CD25+CD4+ Zellen erfolgt bereits auf unreifen Thymozyten, wenn das TZR-Signal durch MHC-Peptid sich in einem mittleren Niveau zwischen positiver und negativer Selektion befindet [Fontenot et al., 2003].

Die Aktivierung von CD25-CD4+ T-Zellen führt im Maussystem zu keiner Ausprägung von Foxp3 und auch andere regulatorische T-Zellen wie CD4+NK1.1+ sind Foxp3 negativ [Fontenot et al., 2003]. Beim Menschen wurde jedoch beschrieben, dass auch bei aktivierten konventionellen CD4+ T-Zellen Foxp3 induziert wird [Morgan et al., 2005].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass „natürliche“ Treg-Zellen in der Maus durch die Marker CD4+CD25+ CLTLA 4+ Foxp3+ gut definiert sind.

Die CD25+CD4+ Zellen verhindern zwar eine autoimmune Reaktion, auf der anderen Seite können sie aber auch die Tumorabwehr behindern. So führte eine Behandlung mit Antikörpern gegen CD25 in Mäusen zu einer Toleranz gegen eine große Anzahl von verschiedenen Tumoren, wie Myelomen, Leukämien, Fibrosarkomen oder Melanomen [Shimizu et al., 1999] [Onizuka et al., 1999] [Sutmuller et al., 2001].

Die Ausprägung von CD25 wird durch IL-2 geregelt, und demzufolge haben IL-2 defiziente Mäuse eine stark verminderte Anzahl von CD25+CD4+ T-Zellen [Papiernik et al., 1998]. IL-2 defiziente Mäuse entwickeln ein lymphoproliferatives und autoimmunes Syndrom, das durch den Transfer von CD25+CD4+ Zellen verhindert werden kann, obwohl diese Zellen selbst kein IL-2 produzieren [Wolf et al., 2001].

CD25+CD4+ Zellen des Menschen können möglicherweise naive CD4+ Zellen direkt zu Suppressor-Zellen ausbilden, die dann allerdings nicht zellkontaktabhängig, sondern zytokinvermittelt entweder über TGF- $\beta$  oder über IL-10 regulieren [Jonuleit et al., 2002] [Diekman et al., 2002].

### ***1.3.3. Weitere Populationen von regulatorischen T-Zellen***

Obwohl CD25+ Zellen die am besten untersuchte Untergruppe der regulatorischen T-Zellen ist, gibt es daneben auch andere Populationen, für die ebenfalls eine regulatorische Funktion nachgewiesen werden konnte.

Beispielsweise verhindern in bestimmten Modellsystemen auch CD25-CD4+ Zellen die Abstoßung von Transplantaten, die CD25+CD4+ Zellen sind bei der Vermittlung von Toleranz nur potenter [Graca et al., 2002].

Die orale Gabe eines beliebigen Antigens an Mäuse führt zur Ausbildung von antigenspezifischen T-Zellen in den Peyer'schen Plaques. Diese haben den Phänotyp von aktivierten T-Zellen und von Memoryzellen, produzieren kein IL-4 oder IL-10 und nur wenig IFN- $\gamma$ . Interessanterweise sind diese Zellen nach mehrfacher Teilung innerhalb von 48h in der Lage, in naiven Mäusen Toleranz zu erzeugen. In Bezug auf die Expression von CD25 ist diese Zellpopulation heterogen, aber sowohl die CD25+ als auch die CD25- Zellen sind in der Lage, die Toleranz zu transferieren [Hauet-Broere et al., 2003].

Die erste nachgewiesene Untergruppe der CD4+ Zellen mit einem regulatorischen Potenzial sind die "CD45RBlow" Zellen [Powrie et al., 1990]. Stephens und Mason zeigten in der Ratte, dass durch Thymektomie und Bestrahlung verursachter Diabetes zwar nur von den CD25+CD4+ Thymozyten geheilt werden konnte, aber die aus der lymphatischen Peripherie wie Milz oder Lymphknoten gewonnenen von Thymuszellen gereinigten CD25-CD45RC-CD4+ Zellen ebenso wie ihr CD25+ Gegenpart in der Lage sind, den Ausbruch des Diabetes zu verhindern [Stephens and Mason, 2000]. Auch im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass die "CD25-CD45RBlow" Zellen regulatorische Zellen enthalten, da sie den Ausbruch der von naiven Zellen verursachten „wasting disease“ in Mäusen unterdrücken können [Annacker et al., 2001].

In der Ratte kennzeichnet RT6, ein Mitglied der Familie der Ektoenzyme, eine Untergruppe der CD4+ T-Zellen, die die Entwicklung von Diabetes in BB Ratten inhibieren kann [Waite et al., 1996].

CD38 ist ein Mitglied in einer Familie von bifunktionalen Ektoenzymen. Dieses Typ II Membran Glycoprotein katalysiert die Umwandlung von Nicotinamid Adenosin Diphosphat Ribose (NAD+) zu cADP- Ribose (cADPR) [Howard et al., 1993]. In der Maus wird CD38 auf einem weiten Spektrum von hämatopoetischen Zellen exprimiert, aber nur etwa 20% der CD4+ T-Zellen aus der Milz tragen es auf ihrer Oberfläche. Etwa 50% der CD38+CD4+ T-Zellen exprimieren auch CD25. Die Expression von CD38 teilt die Population der "CD45RBlow" Zellen in zwei etwa gleich große Gruppen, von denen nur die "CD38+CD45RBlow" Zellen die Eigenschaften von regulatorischen Zellen aufweisen. So zeigen die "CD38-CD45RBlow" Zellen auf Anti-CD3 Stimulation eine massive proliferative Antwort, wohingegen die "CD38+CD45RBlow" Zellen inert bleiben. Die "CD38+CD45RBlow" Population kann die "CD38-CD45RBlow"

Responder-Zellen in einer Co-Kultur in ihrer Proliferation und ihrer Zytokinproduktion hemmen. Um die supprimierende Wirkung auszuüben, ist die Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors und der Zell-Zellkontakt zu den zu regulierenden Zellen vonnöten [Read et al., 1998].

In einem anderen Modell findet sich eine Population von regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter den naiven "CD62L<sup>high</sup>" Zellen. Nicht übergewichtige zu Diabetes neigende (Nonobese Diabetic (NOD)) Mäuse entwickeln einen Diabetes, der in vielen Punkten mit dem menschlichen Diabetes übereinstimmt. Die Erkrankung wird von CD4<sup>+</sup> und von CD8<sup>+</sup> Zellen verursacht, wobei die Zellen in die  $\beta$ -Inselzellen des Pankreas einwandern. Im Alter von 12 Wochen, wenn die überwiegende Mehrheit der Inselzellen zerstört ist, bricht der Diabetes aus. Der Zeitraum zwischen der Insulinitis und dem Ausbruch des Diabetes ergibt sich aus dem Wechselspiel der Effektor- und der regulatorischen Zellen [Delovitch et al, 1997].

Effektorzellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie Diabetes auf immundefiziente Mäuse übertragen können, sie haben den Phänotyp von aktivierten bzw. Gedächtnis T-Zellen: "CD62L<sup>low</sup>" and "CD45RB<sup>low</sup>" [Lepault et al., 1995] [Shimada et al., 1996]. Zu den in diesem System wirksamen regulatorischen Zellen gehören reife CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Thymozyten [Herbelin et al., 1998] sowie TZR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- Thymozyten [Hammond et al., 1998]. Sie können die Übertragung des Diabetes verhindern. Die sich in nicht manipulierten NOD Mäusen befindlichen "CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup>" Zellen aus der Milz wirken ebenfalls dem Ausbruch der Krankheit in immundefizienten NOD Empfängern effizient entgegen [Lepault et al., 2000].

Ebenfalls regulatorische T-Zellen sind  $\alpha_E\beta_7$  (CD103) exprimierende T-Zellen.  $\alpha_E\beta_7$  ist ein Integrin, das ursprünglich als Marker für T-Zellen beschrieben wurde, die sich in der Darmwand oder anderen epithelialen Kompartimenten wie Haut befinden [Kilshaw et al., 1991]. Es exprimieren über 95% der intestinalen intraepidermalen T-Zellen  $\alpha_E\beta_7$ . Der Ligand für  $\alpha_E\beta_7$  ist das auf epithelialen Zellen exprimierte E-Cadherin [Cepek et al., 1994].  $\alpha_E\beta_7$  ist auf 2-6% der CD4<sup>+</sup> Zellen der peripheren lymphatischen Organe der Maus exprimiert. Diese Zellen tragen zusätzlich noch zu 70% CD25, CD38, CD44 und zu 18% intrazelluläres CLTA-4 in hoher Ausprägung. Die Co-Kulturen und in vivo Versuche offenbarten, dass die CD25<sup>+</sup> $\alpha_E\beta_7$ +CD4<sup>+</sup> T-Zellen am stärksten regulatorisch wirksam sind, aber auch die CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie die CD25<sup>-</sup> $\alpha_E\beta_7$ +CD4<sup>+</sup> T-

Zellen über ein regulatorisches Potenzial verfügen und somit eine  $\alpha\epsilon\beta_7$  Expression zur Differenzierung einer neuen Subpopulation von regulatorischen T-Zellen dient [Lehmann et al., 2001].

Nach A. Banz et al. [2003] ist im lymphatischen Gewebe des Gastrointestinaltrakts die Unterpopulation der  $\alpha_E\beta_7+CD25+CD4+$  Zelle in der Lage Autoimmunerkrankungen des Darms in vivo zu kontrollieren sowie in vitro die IL-10 Produktion zu regulieren.

Ein anderer Marker für regulatorische T-Zellen ist GITR (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor, auch bekannt als TNFR18), der auf frisch isolierten  $CD25+CD4+$  Zellen exprimiert wird. Interaktionen mit seinem natürlichen auf Makrophagen und Dendritischen Zellen vorkommenden Liganden oder mit Antikörpern gegen den Marker selbst unterbinden die von  $CD25+CD4+$  Zellen ausgeübte Regulation. Sowohl die  $CD25+CD4+GITR+$  als auch die  $CD25-CD4+GITR+$  T-Zellen verhindern die durch "CD45RBhigh" Zellen verursachte Colitis [Uraushihara et al., 2003].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine Vielzahl von "natürlichen" regulatorischen T-Zell-Populationen beschrieben wurden, von denen ein Großteil mit den am besten charakterisierten  $CD25+CD4+$  Zellen zumindest teilweise überlappend ist.

## **1.4. Induzierbare regulatorische T-Zellen**

### ***1.4.1. Anergie Zellen als regulatorische Immunzellen***

Anergie Zellen haben das Potenzial, die Proliferation von anderen T-Zellen zu verhindern, womit sie ebenfalls den regulatorischen T-Zellen zugeordnet werden [Lombardi et al., 1994] [Taams et al, 1998]. In anderen Modellen allerdings fehlte ihre regulatorische Funktion [Whitacre et al., 1991]. Eine mögliche Erklärung für diese etwas widersprüchlichen Ergebnisse könnte neben den Unterschieden in den Versuchsprotokollen im Grad der Anergie liegen. Es gibt unterschiedliche Level für Anergie, die von der Menge des ohne Co-Stimulation präsentierten Antigens abhängt [Taams et al., 1999].

Bemerkenswert bleibt die Tatsache, dass anerge Zellen *in vitro* hergestellt werden können, und dass anerge Zellen ein regulatorisches Potenzial besitzen. Somit besteht die Möglichkeit regulatorische Zellen gezielt und antigenspezifisch zu erzeugen.

Für die Wirkung und Induktion von anergen Zellen spielt IL-10 eine entscheidene Rolle: Zum einen produzieren die durch permanente Antigenstimulation anergischen Zellen IL-10 [Buer et al., 1998] zum anderen kann permanente IL-10 Gabe Anergie induzieren [Groux et al., 1996].

#### ***1.4.2. Regulatorische T-Zellen 1 und Th3 Zellen***

Das oben beschriebene Ergebnis verhalf zur Beschreibung einer weiteren Hauptpopulation von regulatorischen T-Zellen, die sowohl im Menschen als auch in der Maus vorkommen, die sogenannten regulatorischen T-Zellen 1 (Tr1). Sie können künstlich erzeugt werden. Stimuliert man CD4<sup>+</sup> Zellen in der Gegenwart von IL-10, bildet sich diese Population an Zellen, die sich dadurch auszeichnen, dass sie sich nicht teilen, kein IL-2 oder IL-4 sezernieren, aber ein hohes Niveau an IL-10 Produktion haben und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* regulativ wirken [Groux et al., 1997]. Die Differenzierung aus Nabelschnurblut gewonnener menschlicher naiver T-Zellen zu Tr1 Zellen ist sowohl IL-10 als auch IFN- $\alpha$  abhängig [Levings et al., 2001].

IL-10 anergisierte Zellen besitzen regulatorische Aktivität und supprimieren die Proliferation von T-Zellen mit derselben Peptidspezifität durch einen Zell-Zell Kontakt abhängigen Mechanismus [Steinbrink et al., 2002].

Die IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen exprimieren kein Foxp3; ein weiterer Hinweis dafür, dass diese Population von regulatorischen T-Zellen einen anderen Ursprung als die CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen hat. *In vitro* haben die Tr1 Zellen und die CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen eine vergleichbare Effizienz in der Supprimierung der Proliferation von CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen, die Tr1 Population reguliert ebenso wie die CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen das Wachstum der Responderzellen unabhängig von IL-10, Tr1 Zellen produzieren wenig oder kein IL-2 und der regulatorische Effekt kann mit der exogenen Gabe von IL-2 aufgehoben werden [Vieira et al., 2004]. Die Funktion der Tr1 Population *in vivo* ist allerdings IL-10 abhängig [Barrat et al., 2002].

Der Wirkungsmechanismus der Tr1 Zellen ist nicht vollständig geklärt, es wurde gezeigt, dass sie sowohl durch Zell-Zell Kontakt wirken wie auch durch die Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$ . Diese Zytokine vermitteln die Suppression von pathologischen

Immunantworten, können allerdings auch wichtige Reaktionen auf Tumorantigene oder Pathogene verhindern [Roncarolo et al., 2003].

Die Tr1 Zellen erweisen sich kompetenter als andere regulatorische Populationen in der Verhinderung von intestinalen Entzündungen, da nur die Tr1 Zellen die durch die Gabe von anti-IL-10 verursachte Entzündung heilen konnten, wohingegen "CD45RBlow" oder auch CD25+CD4+ Zellen keine Wirkung hatten [Foussat et al., 2003].

Das Besondere an diesen regulatorischen T-Zellen ist die Tatsache, dass sie antigenspezifisch sind und somit möglicherweise gezielt therapeutisch nutzbar sein werden [Mills et al., 2004].

Analog führt die Stimulation von T-Zellen in der Gegenwart von TGF- $\beta$  zu einer höheren TGF- $\beta$  Produktion [Seder et al., 1998]. Anergische/regulatorische durch orale Toleranz induzierte T-Zellen produzieren zusätzlich zu den Th2 Zytokinen TGF- $\beta$ , wirken dadurch regulatorisch auf andere Zellen und werden auch als Th3 Zellen bezeichnet [Weiner, 2001].

CD25+CD4+ Zellen sind also nicht die einzigen T-Zellen mit regulatorischer Funktion, und es ist sehr wahrscheinlich, dass in Zukunft noch weitere Untergruppen identifiziert werden [Jonuleit et al., 2003].

### **1.5. Bildungsort und Vorkommen der regulatorischen T-Zellen**

Es gibt viele Hinweise dafür, dass der Thymus eine entscheidende Rolle bei der Produktion von natürlichen CD25+CD4+ regulatorischen T-Zellen spielt, einer davon ist das Auftreten von Autoimmunkrankheiten nach Thymektomie. So ist die Bildung von CD25+CD4+ regulatorischen T-Zellen möglicherweise sogar eine der Hauptaufgaben des Thymus [Seddon and Mason, 2000]. Gewebespezifische regulatorische T-Zellen werden durch Interaktionen mit häufig exprimierten Gewebeantigenen im Thymus selektioniert, aber sie benötigen das Wiedererkennen ihres Antigens in der Peripherie, um zu überleben [Seddon and Mason, 1999].

Es gibt auch Hinweise dafür, dass die aus dem Thymus stammenden CD4+ regulatorischen T-Zellen in der Peripherie gewebespezifische junge Thymozyten in der Gegenwart von Antigen zu regulatorischen T-Zellen ausbilden [Modigliani et al., 1996] [Qin et al., 1993].

Da die Gabe von peripheren Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten und sogar Knochenmark von erwachsenen Mäusen zur Hemmung des Ausbruchs von Autoimmunkrankheiten führt, befinden sich regulatorische T-Zellen sicher auch in der Peripherie [Sakaguchi et al., 1994]; sie sind thymusabgeleitet.

Nach Thymektomie an Autoimmundiabetes erkrankte Ratten konnten wie erwähnt sowohl durch CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Thymozyten aber auch durch CD25<sup>-</sup>CD45RC<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen und ihren CD25<sup>+</sup> Gegenpart geheilt werden, die aus der Peripherie stammen und von Thymozyten gereinigt sind [Stephens and Mason, 2000]. Dies ist ein weiterer Hinweis für eine außerhalb des Thymus stattfindende Differenzierung der regulatorischen T-Zellen. Andere regulatorische Marker wie CD38 werden sogar gar nicht erst im Thymus exprimiert.

Derzeit wird angenommen, dass natürliche CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen im Thymus entstehen, während insbesondere Tr1 Zellen in der Peripherie aus CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen differenzieren können.

### **1.6. Die Rolle von Zytokinen für die Funktion von regulatorischen T-Zellen**

Die Beteiligung von Zytokinen an regulatorischen Effekten konnte in unterschiedlichen Modellen nachgewiesen werden. Mehrere Zytokine können sowohl die normale als auch die autoimmune Immunantwort regulieren. TGF- $\beta$ , IL-10 und IL-4 werden als inhibitorische Moleküle angesehen. IL-10 und TGF- $\beta$  hemmen die Th1 und die Th2 modulierte Immunantwort in vivo. IFN- $\gamma$  hemmt insbesondere die Th2 Zell Antwort.

IL-2 spielt für die Funktion der regulatorischen T-Zellen eine wichtige, allerdings noch nicht völlig verstandene Rolle. Mäuse mit einem entweder durch anti-IL-2 oder genetisch verursachten IL-2 Mangel entwickeln Autoimmunkrankheiten und haben eine verminderte Anzahl von CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen [Setoguchi et al., 2005] bzw. keine CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen [Papiernik et al., 1998]. Allerdings können auch ungetrennte Wildtyp CD4<sup>+</sup> Zellen die T-Zellen der IL-2 defizienten Mäuse supprimieren, sie scheinen dafür einen anderen Mechanismus zu nutzen als die CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen [Wolf et al., 2001].

IL-2 wird für die Entwicklung der CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> im Thymus benötigt [Malek et al., 2002], es wird von CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen selbst aber nicht synthetisiert [Thornton et

al., 1998]. Das Zytokin ist für die regulatorische Aktivität der CD25+CD4+ Zellen nicht notwendig. So regulieren in IL-2 Mangel Mutanten transferierte CD25+CD4+ Zellen Autoimmunerkrankungen [Malek et al., 2002] [Almeida et al., 2002]. Im Gegenteil verhindert die externe Zugabe von IL-2 in vitro die regulatorische Wirkung der Treg-Zellen [Thornton et al., 1998] [für einen Übersichtsartikel siehe Bach, 2003].

Die Bedeutung von IL-2 für die anderen Subgruppen von Treg-Zellen ist noch unklar, da diese Zellen in IL-2 defizienten Mäusen nicht regulierend wirken ist ihre Entwicklung und/oder Funktion wahrscheinlich ebenfalls IL-2 abhängig. Es existieren aber auch in IL-2 defizienten Mäusen zur Regulation potente Treg-Zellen [Furtado et al., 2002].

In vitro konnte gezeigt werden, dass trotz neutralisierender Antikörper gegen die Zytokine IL-4, TNF- $\beta$  und IL-10 keine Einschränkung der inhibitorischen Aktivität der regulatorischen T-Zellen zu erkennen war [Thornton and Shevach, 2000]. Auch CD25+CD4+ Lymphozyten aus TNF- $\beta$  Knockout-Mäusen zeigen in vitro keine Einschränkungen ihrer regulatorischen Kapazität [Piccirillo et al., 2002].

In verschiedenen in vivo Experimenten wurde jedoch die Notwendigkeit dieser Zytokine für die regulatorische Funktion belegt:

Neutralisierende Antikörper gegen IL-4 behindern die regulatorischen T-Zellen dabei, Ratten vor einer Autoimmunthyreoiditis zu schützen [Seddon and Mason, 1999].

IL-10 defiziente Mäuse entwickeln schwere Enzephalomyelitiden, wohingegen transgene Mäuse, die vermehrt IL-10 exprimieren, vor dieser Erkrankung gefeit sind [Maloy et al., 2003]. IL-10 dient zur Aufrechterhaltung der T-Zell Toleranz [Seewaldt et al., 2002], sowie für die durch CD45RB<sup>low</sup> sowie CD25+CD4+ Zellen vermittelte Toleranz von Alloantigenen [Hara et al., 2001].

CD25-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Produktion von verschiedenen auch proinflammatorischen Zytokinen auf die Stimulation mit bakteriellen Superantigenen. Diese Überproduktion kann nur durch Transplantation von CD25+CD4+ Zellen verhindert werden, die nicht von IL-10 knockout Mäusen stammten [Pontoux et al., 2002].

Im Mausmodell spielen IL-10 und TGF- $\beta$ , aber nicht IL-4 eine große Rolle bei der Prävention entzündlicher Darmerkrankungen durch die "CD45RB<sup>low</sup>" regulatorischen T-Zellen [Asseman et al., 1999] [Powrie et al., 1996] [Read et al., 2000].

TGF- $\beta$  schützt vor Ausbruch einer Autoimmunthyreodits [Seddon and Mason, 1999]. In NOD Mäusen konnte der durch den Transfer von CD25+CD62L+CD4+ T-Zellen ausgeübte Schutz vor dieser Erkrankung von gegen TGF- $\beta$  gerichtete Antikörper verhindert werden. Dieser Effekt konnte aber nicht bei Gabe von IL-4 oder IL-10 spezifischen Antikörpern beobachtet werden [für einen Übersichtsartikel siehe Crispin et al., 2004].

Die immunsuppressiven Eigenschaften von IL-10 und TGF- $\beta$  sind sehr wahrscheinlich auch durch die Fähigkeit dieser Zytokine zu erklären, die Funktion der Antigen-präsentierenden Zellen zu hemmen [Ding et al, 1992] [Fiorentino et al., 1991] [Takeuchi et al., 1998] sowie direkt proliferationshemmend auf T-Zellen zu wirken [Letterio et al, 1998] [Moore et al., 2001].

Man kann also von unterschiedlichen Mechanismen der von den regulatorischen T-Zellen bewirkten Suppression ausgehen.

## Teil 2

### **KLRG1**

#### **1.7. Aufbau des Moleküls KLRG1**

KLRG1 steht für „Killer cell lectin-like receptor G1“. Sein ursprünglicher Name war „mast cell function-associated antigen (MAFA)“, da es erstmals auf der RBL-2H3, einer Ratten-Mastzelllinie des Mucosatyps, beschrieben wurde [Ortega Soto et al., 1988]. Entdeckt wurde es dadurch, dass die Gabe eines anti-RBL-2H3 Antikörpers zur Hemmung der Sekretion bei FcεRI Stimulation führte. FcεRI ist ein gegen die Fc-Anteile von IgE gerichteter Rezeptor. Über molekulares Klonieren der cDNA wurde offenbart, dass es sich bei diesem neu entdeckten Antigen um ein 188 Aminosäuren langes, membrangebundenes Typ II Glycoprotein handelt, das eine extrazelluläre Kohlenhydraterkennungsdomäne aufweist, die homolog zu denen der Superfamilie der Calcium abhängigen (C-Typ) animalischen Lectine ist [Guthmann et al., 1995]. Weitere Typ II Rezeptoren der C-Typ Lectine sind z.B. das NK-Zell Antigen Ly-49 [Chan PY and Takei F, 1989] [Yokoyama et al., 1989] oder der frühe T-Zell Aktivierungsmarker CD69 [Ziegler et al., 1993]. MAFA kommt sowohl als monomer- als auch disulfidverbundenes homodimeres Glykoprotein vor, wobei das letztere eine molekulare Masse von 58-70 kDalton hat. Es besitzt neben der extrazellulären eine intrazelluläre Domäne, den sogenannten „cytoplasmatischen Schwanz“, der ein Motiv enthält (SIYSTL), das eine offensichtliche Verwandtschaft mit dem „immunoreceptor tyrosine- based inhibitory motif“ (ITIM) aufweist [Guthmann et al., 1995].

ITIMs sind in der intracytoplasmatischen Domäne von transmembranen Rezeptoren lokalisierte Aminosäuresequenzen, die klassischerweise aus 6 übereinstimmenden Aminosäuren bestehen [Vely et al., 1997]. Eine große Familie von immunologischen inhibitorischen Rezeptoren wird durch die ITIMs charakterisiert. Die Phosphorylierung von Tyrosinresten in ITIM führt zur Bindung von Effektormolekülen, die eine Src homologe Domäne (SH2) enthalten und ein inhibitorisches Signal an die Zelle senden. Zu diesen Effektormolekülen gehören die Tyrosinphosphatase der hämatopoetischen Zellen SHP-1 [Matthews et al., 1992], die Tyrosinphosphatase SHP-2 [Tamir et al. 2000] und die Inositolphosphatase SHIP [Rohrschneider et al., 2000].

Die ITIM-Hemmung zellulären Aktivierens betrifft den ersten Schritt der Aktivierungskaskade. Alle nachfolgenden Reaktionen werden verhindert, wie die Calciummobilisation, die Zytokinausschüttung, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Proliferation der Zellen [für einen Übersichtsartikel siehe: Ravetch und Lanier, 2000].

MAFA-Stimulierung führt in den RBL-2H3 Zellen zu einer zeitabhängigen Verstärkung der Tyrosin-Phosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit des Fc $\epsilon$ RI Rezeptors, was wiederum zu einer verstärkten Bindung und verstärkten Phosphorylierung eines Mitglieds der Familie der Tyrosinkinase namens Lyn führt [Rong and Pecht 1996]. Lyn bindet an die SH2 Domäne von SHP-2 [Xu and Pecht, nicht veröffentlicht] und SHP-2 dephosphoryliert Syk, das für die weiterführende Kaskade von großer Bedeutung ist.

Es wurde auch gezeigt, dass an das phosphorylierte ITIM von Mafa SHP-1, SHP-2 und SHIP binden kann [Taylor et al., 1995] [Zhang et al., 1996] [für einen Übersichtsartikel siehe Abramson et al., 2002].

### **1.8. Expressionsprofile**

Das Vorkommen des membrangebundenen Glycoproteins MAFA variiert je nach Organismus. So ist es in der Ratte als ein für Mastzellen spezifisches Antigen beschrieben worden [Bocek et al., 1997]. Im Menschen wurde MAFA nicht auf Mastzellen, jedoch auf basophilen Granulozyten, [Geller-Bernstein et al., 1994] NK-Zellen und einer Monozyten ähnlichen Zelllinie namens U937 exprimiert [Butcher et al., 1998].

Färbungen mit einem neu entwickelten gegen NK-Zellen gerichteten Antikörper, 2F1 genannt, der das MAFA homologe Antigen auf Mäusen erkennt, zeigen, dass sich MAFA bei Mäusen vorrangig auf Natürlichen Killerzellen [Hanke et al., 1998] sowie auch auf Effektor CD8<sup>+</sup> T-Zellen befindet [Blaser et al., 1998]. Es sind 40-50% der NK-Zellen MAFA<sup>+</sup> und etwa 1-3% CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren MAFA. Diese Zellen sind Effektor- oder Memory-Zellen [Beyersdorf et al., 2001]. Interessanterweise wird MAFA in der Maus überhaupt nicht von Mastzellen exprimiert. Ein kleiner Anteil der

konventionellen T-Zellen, etwa 1% von ihnen, darunter auch CD4 Zellen, können mit 2F1 angefärbt werden [Corral et al., 2000].

Die Genloci von MAFA in der Maus auf Chromosom 6 und im Menschen auf Chromosom 12 liegt ganz in der Nähe der Genloci der NK-Zellkomplexe, zusammen mit Genen, die andere C-Typ Lectin-Rezeptoren codieren [Brown et al., 1997] [Renedo et al., 1997].

MAFA wurde in anbetracht der Tatsache, dass es sich auch auf anderen Zellen als Mastzellen befindet, nach einem Vorschlag der "Human Gene Nomenclature Database" umgetauft zu „Killer Cell Lectin-like Receptor G1“ also KLRG1.

Auch im Menschen befindet sich KLRG1 auf T-Zellen. 44% der CD8+ und 10% der CD4+ humanen Blutlymphozyten exprimieren KLRG1. Alle KLRG1+ Lymphozyten sind Antigen erfahren, können Zytokine sezernieren, aber proliferieren nicht nach Stimulation mit Antigen [Voehringer et al., 2002].

Der Ligand für das sich auf den NK-Zellen befindliche KLRG1 konnte bislang nicht gefunden werden. Interessanterweise wird die Expression von KLRG1 auf NK-Zellen über MHC I reguliert. So führte eine erhöhte Expression des MHC Klasse I Moleküls ebenfalls zu einer erhöhten Expression des KLRG1, wohingegen in MHC I defizienten Mäusen der KLRG1 vermindert exprimiert wird [Corral et al., 2000].

Zusammenfassend ist KLRG1 strukturell den Killer-Zell inhibitorischen Rezeptoren zuzuordnen.

### **1.9. Inhibitorische Rezeptoren**

Inhibitorischen Rezeptoren befinden sich auf der Oberfläche von hämatopoetischen Zellen und regulieren immunkompetente Zellen durch Wechselwirkung mit spezifischen Liganden [Raulet et al., 1995]. Inhibitorischen Rezeptoren von NK Zellen erkennen MHC I Moleküle. Es gibt von dieser Art drei Familien: Dazu gehören zum einen die CD94/NKG2 Rezeptoren, die sich sowohl beim Menschen als auch in der Maus befinden [Vance et al., 1998], und zum anderen die nur auf der Maus vorkommenden Ly49 Rezeptoren, von denen 8 inhibitorische und 2 stimulatorische bekannt sind. Als dritte Gruppe existieren die Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren der im Menschen exprimierten „killer cell inhibitory receptors“ oder KIRs [Long et al.,

1996], die ein funktionelles Homolog zu den Ly49 Rezeptoren darstellen. Die genannten Rezeptoren besitzen alle ein cytoplasmatisches ITIM.

KIRs sind z.T. auch auf T-Zellen ausgeprägt und üben dort ebenfalls inhibitorische Funktionen aus. Der auf T-Zellen befindlichen KIR führt zu einer Hemmung der T-Zellaktivität [Ferrini et al., 1994] [Phillips et al., 1995]. Es zeigte sich sogar, dass die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen, die durch das Erkennen von auf MHC Klasse II Molekülen zustande gekommen war, auch durch die gleichzeitige Bindung von KIR an hemmende Klasse I Allele inhibiert werden kann.

Für die KIR+ T-Zellen gilt, dass sie sich vorrangig unter der Population der CD8+ T-Zellen, aber auch unter den CD4+ T-Zellen und sogar unter den  $\gamma\delta$ TZR+ Zellen befinden. Diese Zellen sind CD28- und haben aufgrund einer hohen Expression von CD44, CD29 und CD57 sowie keiner Ausprägung von CD45RA den Phänotyp von Gedächtniszellen. Sie sind weder im Blut noch im Thymus von Feten noch im Nabelschnurblut nachzuweisen [D'Andrea et Lanier, 1998]. Die KIR Expression kann durch IL-15 induziert werden [für einen Übersichtsartikel siehe Ponte et al., 1998].

Zum V $\beta$  Repertoire des T-Zell-Rezeptors dieser Zellen waren die Vorergebnisse nicht ganz eindeutig: Die Versuche von Mingari et al. [1996] ergaben, dass sie ein oligoklonales Repertoire besitzen, was darauf hindeuten würde, dass KIR-T-Zellen wahrscheinlich erst nach chronischer Antigenexposition entstehen. Sie erhielten diese Ergebnisse allerdings durch in vitro Kulturen. Hingegen kamen D'Andrea et Lanier [1998] bei einer Analyse der Zellen ex vivo aus Blut zu anderen Ergebnisse: Diese Zellen hatten ein polyklonales Repertoire.

### **1.10. KLRG1 Expression auf T-Zellen**

KLRG1 wird in der Maus auf kleinen Untergruppen von CD8+ und auf CD4+ Zellen exprimiert [Corral et al., 2000]. Die KLRG1+CD8+ Population sind in der überwiegenden Mehrheit Memory-Zellen, aber ein Teil von ihnen sind auch Effektor-Zellen. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Co-Vernetzung von KLRG1, zu einer Minderung des Einstroms von Calcium in die Zelle führt, ein überzeugender Hinweis auf die inhibitorische Funktion des Rezeptors [Beyersdorf et al., 2001].

### **1.11. Zielsetzung dieser Arbeit**

Wir und andere [Corral et al., 2000] konnten erstmals zeigen, dass sich der NK-Zell Rezeptor KLRG1 auch auf CD4<sup>+</sup> Zellen der Maus befindet. Die Parallelen zu anderen inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zellen legten nahe, dass KLRG1 wie z.B. die KIRs, ebenfalls regulierend auf die Funktion der CD4<sup>+</sup> Zellen einwirkt. Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob die KLRG1+CD4<sup>+</sup> Zellen über ein mögliches regulatorisches Potenzial gegenüber anderen CD4<sup>+</sup> T-Zellen verfügen und damit eine Untergruppe der regulatorischen T-Zellen bilden. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde der Phänotyp, die Expression, die Zytokinproduktion sowie das suppressorische Verhalten von KLRG1+CD4<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Hierzu war es zunächst notwendig, die Zellen auf die gleichzeitige Expression verschiedener Oberflächenmarker zu prüfen, wozu eine 4-Farben FACS-Färbung etabliert wurde. Weiterhin war es von Interesse, die Verteilung der KLRG1+CD4<sup>+</sup> Zellen im lymphatischen System zu beurteilen. Die Zytokinproduktion nach Stimulation und auch das regulatorische Potenzial der KLRG1+CD4<sup>+</sup> Zellen auf KLRG1-CD4<sup>+</sup> Zellen in Zell-Kulturen sollte zusätzlich zur Lösung der o.g. Fragestellung ermittelt werden.

## **2. Materialien**

### **2.1. Versuchstiere**

Inzuchtstämme der folgenden Quellen wurden verwendet:

C57BL/6 Mäuse	Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
BALB/c Mäuse	Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
C57BL/6 Mäuse KLRG1 transgen	Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, AG Hanke

### **2.2. Standardlösungen und Puffer**

BSS (Balanced Salt Solution I, II)

BSS I: 50 g Glucose	BSS II:
3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,25 g CaCl <sub>2</sub>
11,9 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 g KCl
0,5 g Phenolrot	320g NaCl
ad 5 l H <sub>2</sub> O bidest	10 g MgCl <sub>2</sub>
ad 5l H <sub>2</sub> O bidest	10 g MgSO <sub>4</sub>

125 ml BSS I und 125 ml BSS II mischen  
und mit H<sub>2</sub>O ad 1000 ml auffüllen

BSS/BSA

0,2% BSA (Bovine Serum Albumin) in  
BSS

BSS/BSA/Azid

0,02% NaN<sub>3</sub> in BSS/BSA

PBS (Phosphate Buffered Saline)

0,05 g MgCl<sub>2</sub>, 8g NaCl, 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
0,2 KCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1000 ml H<sub>2</sub>O  
bidest

PBS/Azid

0,02% NaN<sub>3</sub> in PBS

PBS/BSA/Azid	0,2% BSA, 0,02% NaN <sub>3</sub> in PBS
Fixierlösung	PBS + 2% Formaldehyd
RPMI+	RMPI-, je 100 ml supplementiert mit 5 ml FCS, 1 ml, Na-Pyruvat, 1 ml nicht-essentielle Aminosäuren, 1 ml Penicillin-Streptomycin 2 ml 2-Mercaptoethanol, 29,2 mg Glutamin, Gibco, Eggenstein
MACS- Puffer	PBS ohne CaCl <sub>2</sub> , ohne MgCl <sub>2</sub> , 2 mM EDTA, 0,5% BSA
Trypanblau	0,04% in PBS/Azid
Einfrierpuffer	40% RMPI + 50% FcS, 10% DMSO

### **2.3. Chemikalien**

BSA (bovine serum albumin)	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
<sup>3</sup> H Thymidin (spezifische Aktivität 5 Ci/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig
Trypanblau	Sigma, Steinheim
Formaldehyd (37%)	Ferak, Berlin
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma, Steinheim
Biotylin	Sigma, Steinheim
Saponin	Sigma, Steinheim
Brefeldin A	Sigma, Steinheim
PMA (Phorbol 12-myristate 13 acetate)	Sigma, Steinheim
Ionomycin	Sigma, Steinheim
Heparin	Sigma, Steinheim
Natriumazid	Ferak, Berlin
NaCl	Roth, Karlsruhe
(Na) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Ferak, Berlin
NaHCO <sub>3</sub>	Ferak, Berlin

NaOH	Ferak, Berlin
Betaplate Scint	Wallac Oy , Turku, Finnland
EDTA (Ethylenediamine- tetraaceticacid 2Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> )	Ferak, Berlin
HCL	Merck, Darmstadt

#### **2.4. Serologische Reagenzien**

Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Normales Hamster IgG	Sigma, Steinheim
Fluorescein (FITC)-konjugiertes Anti-Syrian –Hamster-IgG (H+L)	Jackson laboratories, Bar Harbor, Maine USA
APC konjugiertes Anti-Maus-CD4	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FITC konjugiertes Anti-Maus-CD4	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
PE (Phycoerythrin) konjugiertes Anti-Maus-CD4	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Biotin konjugiertes Anti-Maus-CD3	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FITC konjugiertes Anti-Maus-CD3	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FITC konjugiertes Anti-Maus-CD38	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
PE konjugiertes Anti-Maus-CD38	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FITC konjugiertes Anti-Maus-CD25	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
PE konjugiertes Anti-Maus-CD25	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FITC konjugiertes Anti-Maus-CD45RB	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
PE konjugiertes Anti-Maus-NK1.1	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FITC konjugiertes Anti-Maus-Ly6C	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FITC konjugiertes Anti-Maus-CD8	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
PE konjugiertes Anti-Maus-CD4	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Biotin konjugiertes Anti-Maus CD62L	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelber

FITC konjugiertes Anti-Maus CD69	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FITC konjugiertes Anti-Maus CD44	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Biotin konjugiertes Anti-Maus CD122	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FITC Anti-Maus V $\beta$ TZR Screening Panel V $\beta$ 2 bis V $\beta$ 17	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
PE konjugiertes Anti-Maus IL-10	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
PE konjugiertes Anti-Maus IFN- $\gamma$	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin-Cychrom	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin- Tricolor	CALTAG, Burlingen
Anti-FITC-Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PE-konjugiertes Anti-Maus-IgDb	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Biotin konjugiertes 10/78	Labor Hünig
FITC konjugiertes Anti-Ratten-IgG	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
PE konjugiertes Anti-Ratten-IgG	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Biotin konjugiertes 2F1	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Biotin konjugiertes 2F1	eigene Herstellung
FITC konjugiertes 2F1	eigene Herstellung
Unkonjugierter 2F1 Überstand	eigene Herstellung
24G2	eigene Herstellung

## **2.5. Geräte**

Neubauerauszählplatte	Marienfeld
8 fache Multikanalpipette 300, Eppendorf	A. Hartenstein, Würzburg
Mikroskop	Leica DMLS, Herne
Accu-jet, brand	A. Hartenstein, Würzburg,
Wasserbad	Hartenstein, Würzburg
Megafuge 1,0R	Heraeus, Hanau
FACS Calibur	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FACS-Scan	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
FACS-Vantage	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg

Digitaltimer	A. Hartenstein, Würzburg
Mikrowelle	Micromat, AEG
Harvester	Tomtec, Hamden, CT, USA
Vortex Genie 2	Bender & Hobein Ag, Zürich, Schweiz
Light box	Wallac Oy, Turku, Finnland
Waage	A. Hartenstein, Würzburg
Brutschrank	Heraus, Heinse & Ziller, Würzburg

## **2.6. Gebrauchsmaterialien**

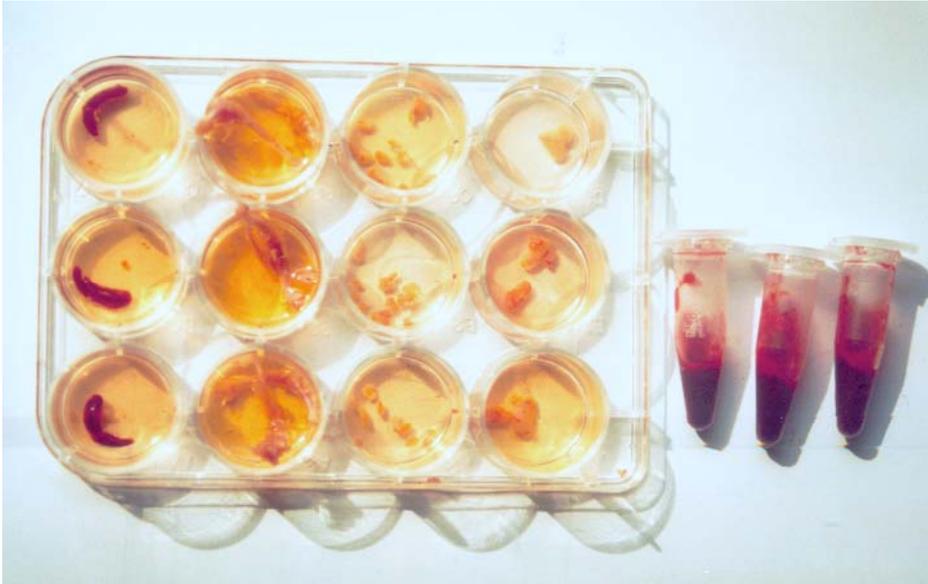
Cell-Quest Software	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
PP-Test tubes, Cellstar ( Zentrifugenröhrchen steril 15 ml)	Greiner bio one, Frickenhausen
PP-Test tubes, Cellstar ( Zentrifugenröhrchen steril 50 ml)	Greiner bio one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen steril 15 ml,	NUNC Brand Products, Naperville, IL, USA
Reaktionsgefäße (Eppendorfcaps)	A. Hartenstein, Würzburg
Macs-Separation columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Sterilfilter, Rotrand	Schleicher und Schüll, Dassel
Einwegspritzen 1 ml	Dispomed, Gelnhausen
Einwegspritze für Infusionspumpen	Dispomed, Gelnhausen
Einwegspritze, 2 ml	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Einwegspritzen, 5 ml,10 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen 26 GA, Microlance 3	BD Biosciences, Pharmingen, Heidelberg
Kanülen, 20 GA, 22 GA	Neobject, Dispomed, Gelnhausen
24 well Kulturplatte, Flachboden	Corning costar, Corning NY, USA
96 well Kulturplatte, Flach- und V-Boden	Corning costar, Corning NY, USA
96 well V-Platten, unsteril mit Deckel	A. Hartenstein, Würzburg
5 ml, 10 ml, 25 ml Pipetten	Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen, Typ Eppendorf,	A. Hartenstein, Würzburg

blau 100-1000 µl, gelb 1-100 µl,	
Kristall 0,5-10 µl	
Zellsieb 70 µm Nylon	BD Bioscience, Bedford, MA, USA
Kulturflaschen, 250 ml	Cellstar, Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kulturflaschen 50 ml, Nunc	Brand Products, Roskilde, Dänemark
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Nylonwolle	A. Hartenstein, Würzburg
Handschuhe	Kimberly-Clark, Roswell, GA, USA
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Probentasche	Wallac Oy, Turku, Finnland
Bedruckte Filtermatten	Wallac Oy, Turku, Finnland
(Glassfiberfilter 102*258)	
Protein G Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen

## 3. Methoden

### 3.1. Gewinnung von Zellen

#### *3.1.1. Organentnahme*



**Abb. 3.1. Präparierte Organe.** Ganz links befinden sich die Milzen, daneben das sich noch in den Knochen befindliche Knochenmark, dann folgen die Lymphknoten und daneben erkennt man die Thymi. In den Eppendorfcaps befindet sich das Blut.

Die zu untersuchenden Organe werden aus mit CO<sub>2</sub> getöteten Mäusen entnommen und in BSS auf Eis zwischengelagert [Abb. 3.1.]. Neugeborene Mäuse werden durch das Abtrennen des Kopfes vom Rumpf getötet, da eine Tötung unter Verwendung von CO<sub>2</sub> nicht zuverlässig ist.

**Milz:** Die Milz wird nach Lagerung der Maus auf die rechte Seite und Entfernung des darüber liegenden Fells entnommen. Bei einer mit anderen Organen kombinierter Entnahme kann der Vorgang auch leicht bei der auf dem Rücken liegenden Maus durchgeführt werden. Die Entfernung sollte allerdings erst nach der Blutentnahme, nach der Lymphknotenexzision sowie nach der Thymusentnahme geschehen.

**Lymphknoten:** Der mit seitlich fixierten Beinen auf dem Rücken liegenden Maus wird das Fell von ventral her sorgsam abgezogen, so dass die komplette Bauchseite inklusive Halsbereich, Axillen und Oberschenkel frei liegen. Das abgezogene Fell wird seitlich mit Hilfe von Stecknadeln festgesteckt. Der so präparierten Maus entnimmt man die Lymphknoten der Halsregion, der Leiste und der Axilla. Als nächsten Schritt spaltet man das Peritoneum und entnimmt alle intestinalen Lymphknoten entlang des Darmes. Bei der Entnahme der Lymphknoten ist sorgfältig darauf zu achten, das umgebende Fettgewebe weitestgehend zu entfernen.

**Blut:** Die Blutentnahme erfolgt bei der toten Maus nach der zur Lymphknotenentnahme identischen Präparation. Man entnimmt es durch Punktion des Herzens oder der davon abgehenden großen Gefäße mit einer auf eine Spritze aufgesetzten 23G Kanüle, wobei das aufgesogene Blut in mit 1 ml Heparin angefüllte Eppendorfcaps gefüllt wird. Auch besteht die Möglichkeit die Arteria axillaris zu durchtrennen, das Blut sich in der durch die vorhergehende Präparation gebildete Hautfalte sammeln zu lassen und anschließend mit einer 1 ml Spritze abzusaugen. Die Blutentnahme sollte immer zügig nach dem Stillstand des Herzen beginnen, da es bei Kreislaufstillstand recht bald gerinnt.

**Thymus:** Den Thymus entnimmt man möglichst, ohne ihn mit Blut in Kontakt treten zu lassen, durch Abheben an der Wurzel. Dazu fasst man diese mit der Pinzette oberhalb des Herzen, nachdem die Maus wie zur Lymphknotenentnahme präpariert wurde.

**Knochenmark:** Das Knochenmark entfernt man aus den langen Röhrenknochen der Maus. Die dafür am besten geeigneten Knochen sind Femur und Tibia. Sie werden von Fell und Muskulatur gesäubert und anschließend an beiden Enden aufgeschnitten. Unter zu Hilfenahme einer Kanüle (23 G) und 2 ml Spritze wird das Knochenmark mit BSS aus der Markhöhle entnommen in ein mit wenigen Millilitern BSS gefülltes Uhrglasschälchen gespritzt [Abb. 3.2.]



**Abb. 3.2. Knochenmarkspräparation.** Hier ist die Extraktion des Knochenmarks aus der Tibia einer Maus mit Hilfe einer Kanüle und Spritze zu sehen.

### **3.1.2. Aufbereitung der Organe**

#### **Thymus, Lymphknoten, Milz und Knochenmark**

Die Organe werden durch ein feinmaschiges Stahlsieb gerieben und mit etwa 6 ml BSS gespült [Abb. 3.3.], dabei können sie je nach Verlauf des weiteren Experimentes gepoolt werden, so dass man drei verschiedene Chargen erhält. Anschließend werden sie mit einer Pasteurpipette in Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1600 Umdrehungen 5 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Der Überschuss wird abgesaugt und verworfen.



**Abb. 3.3. Aufbereitung der Milz.** Die Milzen werden mit dem Ende des Stempels einer Spritze durch ein Zellsieb gerieben und anschließend zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wird.

## **3.2. Hämolyse**

### ***3.2.1. Flash-Lysis***

Die so vorbereiteten Milzzellen müssen noch von den Erythrozyten befreit werden. Dazu benötigt man pro Milz je 3 ml destilliertes H<sub>2</sub>O sowie 3 ml 1,8% NaCl Lösung.

Die bei 4 °C, mit 1600 Umdrehungen, 5 min lang zentrifugierten Milzzellen werden auf einem Vortex resuspendiert und das destillierte Wasser zugefügt, was zur Lyse der Erythrozyten führt. Zur Suspension folgt nach 2-3 Sekunden, nachdem man die Zellen gut durchmischt hat, die Zugabe der 1,8%igen NaCl-Lösung, wodurch die physiologische Osmolarität wiederhergestellt wird. Die Röhren sollten nun 3-4 min auf Eis stehen gelassen werden, da sich die Überreste der Erythrozyten auf dem Boden absetzen. Die Lösung wird abpipettiert und zentrifugiert. Der Bodensatz wird verworfen.

Milzen von 0-3 Tage alten Mäusen werden der Flash-Lysis nicht zugeführt.

### ***3.2.2. Lyse mittels Saponin***

In 50 µl Heparin aufgenommenes Blut wird in eine 96-well-V-Platte überführt und nach dem jeweiligen Protokoll gefärbt. Nach der Färbung werden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer, der zu 0,3% Saponin enthält, resuspendiert. Dadurch wird die Zellmembran porös und die empfindlicheren Erythrozyten lysiert. Die Lymphozyten sind stabiler. Die Zellen werden 2-3 Mal mit Hilfe der Multikanalpipette durchmischt und anschließend 2 Mal mit FACS-Puffer gewaschen, um die durch das Saponin entstanden Poren in der Membran der Lymphozyten zu schließen. Die Zellen werden nun zur FACS-Analyse gebracht.

## **3.3. Anreicherungsverfahren von Lymphozyten**

### ***3.3.1. Nylonwollpassage***

Zur Anreicherung von T-Lymphozyten aus Milz oder Lymphknoten nutzt man das unterschiedliche Adhärenzverhalten der Zellen an Nylonfasern [Eisen et al., 1972]. Makrophagen, B-Zellen und andere akzessorische Zellen haben eine höhere Adhärenz

an diese Fasern als T-Zellen und NK-Zellen. Da diese Bindung ein aktiver Prozess ist, benötigt man während dieses Vorgangs eine Temperatur von 37 °C.

10 ml Spritzen oder je nach zu filtrierender Zellzahl auch größere Spritzen werden pro Milz (entspricht etwa  $10^8$  Zellen) mit 0,6 g sorgfältig auseinandergezupfter Nylonwolle gefüllt. Je nachdem, ob die gereinigten Lymphozyten direkt gefärbt oder aber in Kultur genommen werden, ist die Nylonwollpassage unsteril oder unter sterilen Kautelen durchzuführen. Bei sterilem Vorgehen wird die Wolle am Tag vorher in den Spritzen autoklaviert. Bevor die Zellen auf die Wolle gegeben werden, muss sie gewaschen werden. Dazu durchtränkt man die Wolle luftblasenfrei mit BSS + 5% FCS, das im Wasserbad auf 37 °C erwärmt worden ist, bis keinerlei trockene Stellen mehr vorhanden sind und lässt die Flüssigkeit durch den aufgesetzten Dreiwegehahn ablaufen. Man füllt die Spritze etwa 3 Mal bis zum Anschlag und lässt die Flüssigkeit bis zum Wollansatz herablaufen. Darauf wird der Hahn zuge dreht, da die Nylonwolle nie trocken werden darf. Die zuvor gewonnene Zellsuspension wird mit BSS/FCS auf  $\frac{1}{3}$  des Nylonwollvolumens (4,5 ml) aufgefüllt, also 1,5 ml pro Milz, und auf die Wolle gegeben. Vorsichtig lässt man 1,5 ml ab und füllt wieder 1,5 ml hinzu, um anschließend abermals 1,5 ml abzulassen. Die Zellen befinden sich nun im mittleren Drittel der Nylonwolle. Der Hahn wird geschlossen und noch etwas 1,5 ml Puffer hinzugegeben. Die Spritze wird mit Alufolie abgedeckt und zum Inkubieren für 55 min in den 37 °C warmen Wärmeschrank gestellt.

Nach der Inkubation lässt man den Inhalt der Spritze in ein Zentrifugenröhrchen tropfen, wobei die Tropfgeschwindigkeit Einfluss auf die erreichte Reinheit der gewonnenen Zellen hat: Je geringer die Tropfgeschwindigkeit desto höher ist der Prozentsatz der T-Zellen in der Zellsuspension, allerdings geht eine geringe Tropfgeschwindigkeit mit einem höheren Zellverlust einher. Eine Tropfgeschwindigkeit von 1 ml pro min gilt als optimal. Die Zellen werden so lange gespült, bis man etwa das dreifache Nylonwollvolumen im Zentrifugenröhrchen hat. Man verliert durch diese Behandlung ca. 90% der B-Zellen und 35% der T-Zellen.

Die gewonnenen Zellen werden zentrifugiert, gezählt und je nach Bedarf mit 1-5 ml FACS-Puffer, 0,02% Azid + 0,1% BSA in PBS oder RPMI/FCS Medium verdünnt. Das Azid hemmt die Cytochromoxidase der Endoxidation und verhindert somit ein Wachstum sowie eine Transformation der Zelle.

### **3.3.2. Magnetische Anreicherungsverfahren**

#### ***SA-Beads-Sortierung***

Von Erythrozyten befreite Lymphzellen werden mit 2F1 Überstand und anschließend mit Anti-Hamster-IgG-Bio gefärbt. Als Kontrollfärbung färbt man mit 24G2, Anti-Hamster-IgG-Bio und Streptavidin-PE. Der für die Färbung und das Waschen verwendete Puffer ist reines BSS. Die Zellen werden in einer Konzentration von  $10^8$  Zellen pro ml aufgenommen und die Streptavidin-Beads in der Menge von 10  $\mu$ l pro  $10^7$  Zellen hinzugegeben. Die Inkubationszeit beträgt 15 min.

Die mit einem ferromagnetischen Stahldrahtgeflecht gefüllte Säule wird vor der Eluation mit dem dreifachen Säulenvolumen mit BSS/BSA gespült, mit einem Dreiwegehahn und einer 21G Kanüle versehen und am Magneten befestigt. Die Zellen werden hinzugegeben und das Eluat aufgefangen. Daraufhin wird die Säule vom Magneten entfernt, Puffer hinzugegeben und die im Draht verbliebenen Zellen mit einer auf den Dreiwegehahn aufgesetzten Spritze unter Zug abgesogen. Diese Fraktion enthält die angereicherten Zellen.

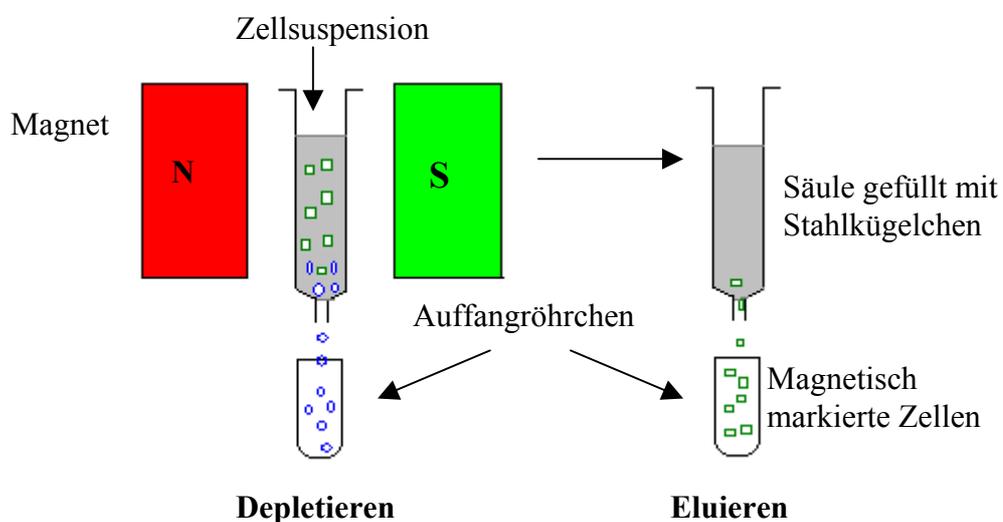
#### ***MACS-Säulenpassage***

Zur Anreicherung von KLRG1+ Zellen wird das magnetische Zelltrennungssystem MACS verwendet [Abb. 3.4.] [Miltenyi et al., 1990].

Für diese aufwändigen Versuche, denen noch eine weitere Aufreinigung durch Zell-Sorting folgt, benötigt man die Milzen von 25 BALB/c Mäusen. Die erste Aufreinigung der Zellen erfolgt durch Nylonwollpassage. Anschließend werden die Lymphozyten mit einem Filter gereinigt und gezählt. Sie werden mit 24G2, 2F1, Anti-Hamster-IgG-FITC und Hamster IgG in BSS/BSA gefärbt. Die gefärbten Zellen werden 1-2 Mal mit MACS-Puffer gewaschen und auf die Konzentration von  $10^7/100 \mu$ l verdünnt. Dazu gibt man 10  $\mu$ l Anti-FITC-Micro-Beads auf 90  $\mu$ l Puffer. Anti-FITC-Micro-Beads sind sehr kleine, supermagnetische Partikel, die mit einem gegen FITC gerichteten Antikörper verbunden sind. Sie machen die mit FITC angefärbten Zellen magnetisch. Die Inkubationszeit beträgt 15 min auf Eis. Anschließend werden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen. Die MACS-Säule wird im Magnet befestigt und mit 500  $\mu$ l MACS-Puffer gespült. Sie enthält eine aus ferromagnetischen Stahlpartikeln bestehende Matrix. Mit einer Säule können maximal  $10^7$  positive Zellen bzw.  $2 \cdot 10^8$  insgesamt ( $10^8$  Zellen

in 500 µl Puffer) aufgereinigt werden. Die vorbereiteten Zellen werden auf die am Magneten befestigte Säule gegeben. Die durchlaufenden Zellen werden als negative Fraktion in einer sogenannten Collection-Tube gesammelt. Die Trennung spezifisch markierter Zellen von unmarkierten Zellen erfolgt im Hochgradienten-Magnetfeld, das durch Insertion der Säulenmatrix in das Magnetfeld des leistungsstarken Magneten erzeugt wird. Die Säule wird dreimal mit 500 µl Puffer gespült. Daraufhin entfernt man die Säule vom Magneten, setzt sie auf eine neue Collection-Tube, füllt sie mit 1 ml MACS-Puffer und drückt sie mit Hilfe des Spritzenkolbens aus. Die sich nun in der Collection-Tube befindlichen Zellen sind die positiven, angereicherten Zellen, in meinem Fall also die 2F1 positive Fraktion. Falls noch eine weitere Anreicherung dieser Zellen erwünscht ist, kann man diese Fraktion erneut durch eine Säule schicken. Der gesamte Vorgang angefangen mit der Milzentnahme erfolgt unter sterilen Kautelen.

### Magnetische Zellsortierung



**Abb. 3.4. Magnetische Zellsortierung.** Die mit Antikörpern markierten Zellen werden über eine mit Stahlkügelchen gefüllte Säule gegeben, die sich in einem Magnetfeld befindet. Dadurch werden die magnetisch markierten Zellen zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen ungehindert passieren können. Nach Entfernung des Magnetfeldes, können die angereicherten Zellen problemlos eluiert werden.

### **3.3.3. Zell-Sortierung**

Die durch die MACS-Säulenpassage auf KLRG1+ Zellen und KLRG1- angereicherten Zellen werden noch auf CD4 und CD38 Expression gefärbt, wobei Anti-CD4-Bio und Streptavidin-Cychrom bzw. Streptavidin-Tricolor sowie Anti-CD38-PE verwendet werden. Die so präparierten Zellen werden unter Verwendung eines Zellsorters noch weiter aufgereinigt.

Bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung wird die Zellsuspension mit Druckluft unter Anreicherung mit Trägerflüssigkeit durch eine Düse gepresst und nachfolgend mit einem Laser bestrahlt. Die Zellen können aufgrund des Streulichtes und der von den fluoreszierenden Antikörpern emittierten Strahlung eingeordnet werden. Anschließend fliegen sie zum sogenannten Abrisspunkt, an dem der Flüssigkeitsstrahl in Tröpfchen aufspaltet, die jeweils eine Zelle enthalten. Gehört nun die in einem Tropfen enthaltene Zelle zu der anzureichernden Zellpopulation, wird der Tropfen kurz vor dem Abriss des Strahls mit Ladung versehen, indem kurzfristig der gesamte Flüssigkeitsstrahl aufgeladen wird. Das geladene Tröpfchen wird dann durch ein elektrisches Feld geleitet und von den geladenen Ablenkplatten direkt in das jeweilige Auffangröhrchen geführt.

Für meine Zwecke wurden die Zellen im ersten Teil der Versuchsreihe nur in zwei Fraktionen, die Fraktion der KLRG1+ und der KLRG1-CD4+ Zellen, sortiert. Im zweiten Teil der Experimente wurden die Zellen in drei Fraktionen geteilt: Die KLRG1-CD38-CD4+ Zellen (A), die KLRG1-CD38+CD4+ Zellen (B) und die Fraktion der KLRG1+CD38+CD4+ Zellen (C). Die erreichten Reinheiten betragen für die Fraktion A zwischen 96 und 99% und für die Fraktion B 85 -92%. Die Reinheit der Fraktion C lag zwischen 75 und 85%.

Diese Zellen wurden anschließend in Kultur genommen.

### **3.3.4. Bestimmung der Lebendzellzahl**

Um die Anzahl der gewonnenen Zellen zu ermitteln, entnimmt man 10 µl der Zellsuspension und mischt sie mit 90 µl einer Trypanblaulösung in einem Well der 96 Spitzboden Well Platte, um eine Verdünnung von 1:10 zu erhalten. Diese Zellen werden dann auf eine Neubauer- Zählplatte gegeben und unter dem Mikroskop gezählt, wobei die Zellzahl in einem 4\*4 Kästchen großen Quadrat bestimmt wird.

*Berechnung der Zellzahl:* Ausgezählte Zellen \* 10<sup>4</sup> \* Verdünnungsfaktor = Zellen/ml

### **3.4. Zellkultur**

#### ***3.4.1. Zellkultur zur Analyse der Zytokinproduktion***

##### **Stimulation durch plattengebundenen Anti-TZR**

24 Well Flachbodenplatten werden über Nacht mit Hamster IgG in der Konzentration von 40 µg/ml im Kühlschrank oder 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert; dadurch erreicht man eine Bindung des IgG an den Boden der Platte. Die nichtgebundenen Immunglobuline können nach der Inkubation abpipettiert und wieder verwendet werden. Im nächsten Schritt werden die Platten 2-3 Mal mit BSS gewaschen und anschließend mit einer Glaspipette, die mit einer gelben Pipettenspitze versehen worden ist, vorsichtig abgesaugt, wobei die am Boden gebundenen Immunglobuline nicht berührt werden dürfen. Es folgt die Gabe von Anti-TZR H57 in der Konzentration von 5 µg/ml. H57 ist ein aus dem Hamster stammender gegen den T-Zell-Rezeptor gerichteter Antikörper, der zu der Hälfte der Näpfe hinzugefügt wird. Die Platte wird nun 20 min lang im Kühlschrank inkubiert und dreimal mit BSS gewaschen. Von der gereinigten und auf die Konzentration von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml verdünnten Milzzellenlösung fügt man 1,5 ml pro Well hinzu. Die Stimulationszeit beträgt 48 h im Brutschrank bei 37 °C.

##### **Restimulation durch PMA/Ionomycin und Brefeldin A**

Zur Kultur gibt man 4 h vor Ablauf der 48 h Inkubationszeit PMA (50ng/ml) und Ionomycin (1µmol/ml), es wird zu der Hälfte der Näpfe, die mit Anti-TZR stimulierte Zellen enthalten und zu der Hälfte der Näpfe mit den unstimulierten Zellen hinzugefügt. Diese Substanzen dienen zur Restimulation, also zur intrazellulären Produktion von Zytokinen. (Vorsicht: cancerogen und toxisch).

PMA (Phorbol-12-Myristat-13-acetat) ist ein Phorbolester. Phorbolester haben die Fähigkeit die Proteinkinase C zu aktivieren [Castagna et al., 1981]. PMA ist der am häufigsten benutzte Phorbolester. Er bindet und aktiviert die Proteinkinase C, hat noch viele andere Effekt in Zellen und Geweben und ist ein sehr potenter Promoter von Hauttumoren der Maus [Blumberg PM, 1980 und 1981]. Ionomycin verstärkt die stimulierende Wirkung von PMA noch, da es die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch Entleerung der inneren Speicher ins Zytoplasma erhöht [Morgan et al., 1994].

Nach 2 h fügt man Brefeldin A in einer Konzentration von 10 µg/ml zu allen Näpfen hinzu. Brefeldin A ist ein Metabolit des Pilzes *Euphenicillium brefeldianum* und hemmt spezifisch und reversibel den Proteintransport vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat. Es inhibiert außerdem die Sekretion und die Anreicherung von Vesikeln, Trans- und Endocytose sowie die Antigenpräsentation [Klausner et al., 1992] [Pelham et al., 1991]. Es ist eine Substanz, die die Vesikelverschmelzung mit der Zellmembran verhindert und somit die produzierten Zytokine intrazellulär konserviert. Die Zytokinproduktion wird mittels intrazellulärer Färbung nach Saponin-Lyse bestimmt.

### **3.4.2. Herstellung von Antigen präsentierenden Zellen**

#### **Proliferationshemmung durch Mitomycin C**

Aus den Milzen von BALB/c Mäusen gewonnene Lymphozyten werden durch Flash-Lysis von den Erythrozyten befreit. Die Zellen werden 1-2 Mal mit BSS gewaschen und auf eine Konzentration von  $10^7$ /ml verdünnt. Mitomycin-C wird auf 1:10 verdünnt und zu den Zellen gegeben. Mitomycin C ist ein von den *Streptomyces caespitosus* gewonnener Stoff. Es ist ein Antibiotikum, das die DNS alkyliert. Daraus resultieren ein DNS-Kettenbruch und eine Querverbindung von komplementären DNS-Strängen. Dadurch wird die DNS-Synthese verhindert und auch die RNS-Polymerase inhibiert. Die mit Mitomycin behandelten Zellen sind unfähig zu proliferieren.

Die Inkubationszeit beträgt 30 min bei 37 °C. Zwischenzeitlich müssen die Zellen gut durchmischt werden. Anschließend werden sie 3 Mal mit BSS/BSA gewaschen und in RMPI+ Medium in der für die Kultur gewünschten Konzentration aufgenommen.

#### **Proliferationshemmung durch Bestrahlung**

Milzen von 2 BALB/c Mäusen werden aufbereitet und die Erythrozyten durch Flash-Lysis entfernt. Die Zellen werden mit BSS gewaschen und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Es folgt die Bestrahlung der Zellen mit 25 Gray. Die radioaktive, energiereiche Strahlung führt zu DNS-Strangbrüchen, wodurch die Synthese neuer DNS und auch die RNA-Synthese behindert werden. Die so behandelten Zellen sind zur Teilung unfähig. Sie werden anschließend auf die für die Kultur gewünschte Konzentration mit RMPI+ Medium verdünnt.

### **3.4.3. Zellkultur nach Anreicherung durch Zell-Sortierung**

Die nach den Zellsorten in zwei bzw. drei Gruppen angereicherten Zellen wurden auf unterschiedliche Art in Kultur genommen.

#### **Stimulation durch plattengebundenen Anti-TZR, IL-2 oder Anti-CD28**

96-Napf Flachbodenplatten werden über Nacht mit 100 µl Hamster-IgG in der Konzentration von 40 µg/ml inkubiert. Das Hamster-IgG wird repipettiert und wiederverwertet. Die Platte wird dreimal mit BSS gewaschen und mit Anti-TZR H57 in der Konzentration von 2 µg/ml 15 min lang im Kühlschrank inkubiert und ebenfalls dreimal mit BSS gewaschen. Die Zellen werden in einer Konzentration von entweder  $5 \cdot 10^4$ /ml oder  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml hinzugegeben. Eine zusätzliche Stimulation erfolgt durch 100 U/ml IL-2 oder durch 1 µg/ml Anti-CD28, die den Zellen untergemischt werden.

#### **Stimulation durch APZ und gelösten Anti-TZR**

100 µl Antigen präsentierende Zellen (APZ), die durch Bestrahlung mit 25 Gray oder durch Inkubation mit Mitomycin C zur Proliferation unfähig gemacht worden sind, werden auf eine 96 Napf-Flachbodenplatte gegeben und mit den von der Zell-Sortierung angereicherten Responderzellen vermischt, so dass die Endkonzentration der APZ  $5 \cdot 10^6$ /ml und die Endkonzentration der Responderzellen  $5 \cdot 10^4$ /ml oder  $2,5 \cdot 10^5$ /ml beträgt. Die Hälfte der Näpfe wird noch mit Anti-TZR in einer Endkonzentration von 2 µg/ml angereichert.

Die gesorteten Zellen teilen sich in zwei bzw. drei Gruppen: Zum einen die KLRG 1+ und die KLRG 1- CD4+ Zellen, zum anderen die CD4+CD38-KLRG1- Responder-Zellen (A), die CD4+CD38+KLRG1- Regulator-Zellen (B) und die CD4+CD38+KLRG1+ Regulator-Zellen (C).

Die angereicherten Zellen werden einzeln und in Co-Kultur kultiviert, wobei das Mischungsverhältnis von Responder zu Regulatorzellen jeweils 1:1 beträgt.

Die Zellsuspension wird 48 h lang kultiviert und die Proliferationsrate mittels [ $^3$ H] Thymidineinbau bestimmt.

#### **3.4.4. Herstellung von LAK-Zellen**

Milzzellen werden steril entnommen und mittels Flash-Lysis von den Erythrozyten befreit. Die Zellen werden in RMPI-Medium aufgenommen, mit 100 U/ml IL-2 angereichert und 3-4 Tage lang in einer 10 ml Kulturflasche bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

#### **3.4.5. Plasmazellkultur für die Antikörperproduktion**

Die bei -70 °C tiefgefrorenen 2F1 produzierenden Plasmazellhybridome werden im Wasserbad aufgetaut, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und langsam mit RMPI/Sc verdünnt. Man gibt solange jeweils 1 ml des Mediums unter sanftem Schütteln der Zellen hinzu, bis sich etwa 15 ml Suspension im Röhrchen befinden. Die Zellen werden 10 min lang bei 4 °C und 1200 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend werden sie in eine 10 ml Kulturflasche mit einer ausreichenden Menge RMPI/Sc Medium gefüllt und bei 37 °C in Kultur genommen. Bei Gelbfärbung des Mediums werden die Plasmazellen in eine größere Kulturflasche umgesiedelt.

### **3.5. Proliferationstest**

#### **3.5.1. Nachweis der Proliferation mittels [<sup>3</sup>H] Thymidin-Einbau**

Die durch den Sort angereicherten T-Zelluntergruppen werden in einer 96 Napf-Flachbodenplatte kultiviert. Die Versuchsansätze werden als Triplikate durchgeführt. Die Stimulationszeit beträgt drei Tage. Am ersten Tag werden die Zellen in Kultur genommen, am zweiten Tag entfernt man aus jedem Well 25 µl des Überstandes und fügt 25 µl in RMPI-Medium gelösten [<sup>3</sup>H] Thymidin hinzu. Dieser Vorgang wird „Pulsen“ genannt. Es folgt die etwa 16 h lange Einbauphase und am 3. Tag wird die Proliferationsrate mittels Harvester bestimmt. Die Zellen werden durch ein automatisches Erntegerät lysiert und die radioaktiv markierte DNA auf eine Glasfasermatte übertragen. Die Matte wird 3-4 min lang in der Mikrowelle getrocknet und anschließend in eine Plastikfolie eingeschweißt. Die Folie wird an einer Seite aufgeschnitten und mit etwa 15 ml Szintillationslösung, einem toxischen, blaugefärbten Aromaten, gefüllt, so dass die gesamte Matte von der Flüssigkeit durchfeuchtet, aber

nicht durchtränkt wird. Es folgt die Messung der radioaktiven Emission als Maß des [<sup>3</sup>H] Thymidin-Einbaus und damit der Proliferationsrate.

### ***3.5.2. Nachweis der Proliferation mittels CFSE-Färbung***

Die durch Hämolyse und Nylonwollpassage aufgereinigten T-Zellen werden in 2 Gruppen geteilt, wobei die eine Gruppe 5 min lang mit CFSE (10µmol/l) und die andere 10 min lang gefärbt und anschließend gewaschen wird. Daraufhin werden die Zellen in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^5$ /ml in Kultur genommen. Die Stimulation während der Kultur erfolgt nach demselben Schema wie zur Vorbereitung auf die intrazellulären Färbungen (s.o.). Nach 48 h Kultur werden die Zellen auf KLRG1 mittels 2F1 und Anti-Hamster-Bio sowie Streptavidin-Cychrom und auf CD4 mittels Anti-CD4-PE gefärbt. CFSE wird in der FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorter) in der ersten Fluoreszenz abgebildet.

### **3.6. Aufreinigung von Antikörpern**

Protein G Sepharose dient zur Bindung der Fc-Anteile des aufzureinigenden Antikörpers [Björck et al., 1984]. Die Sepharose liegt in einer 20%igen Ethanollösung vor. Um sie für die Antikörperaufreinigung vorzubereiten, wird eine Waschung mit 50 ml PBS durchgeführt, um das Ethanol zu entfernen. Das Waschen wird solange fortgesetzt, bis das Verhältnis von 75% abgesetztes Gel zu 25% Puffer erreicht wird. Bei der Wahl des Puffers muss darauf geachtet werden, dass er keine Inhaltsstoffe enthält, die zu einer Zunahme der Viskosität führen.

Als nächster Schritt folgt die Vorbereitung der Säule, indem sie mit Puffer gefüllt wird. Da Luft schädigend auf den Prozess wirkt, muss darauf geachtet werden, die Luft aus den toten Räumen der Säule zu entfernen. Die Säule wird mit ein paar Zentimetern des verbleibenden Restpuffers geschlossen. Die Sepharose wird nun in die Säule unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen gegossen und sofort wieder mit Puffer aufgefüllt. Die Säule wird an eine Pumpe mit der gewünschten Pumpgeschwindigkeit von 400 ml/h angeschlossen. Es muss immer etwas Flüssigkeit über dem Proteinpellet bleiben, da dieses keinesfalls austrocknen darf.

Nun fügt man den aus der Plasmazellkultur, in unserem Fall 2F1 Hybridzellen, gewonnenen Überstand hinzu.

Am nächsten Tag findet die Eluation statt. Zunächst erfolgt eine Waschung mit 50-100 ml PBS. Für die Eluation des IgG von der Protein G Sepharose 4 Fast Flow ist es nötig den pH-Wert auf etwa pH 3,0-2,5 abzusenken. Dazu benutzt man eine 0,1 molare Glycin-Lösung, deren pH Wert mit Hilfe von HCl eingestellt wurde. Man lässt das Eluat mit einer Tropfgeschwindigkeit von 10-12 Tropfen/min ab und fängt es zu Portionen zu je 500 µl in Eppendorfcaps auf, die mit je 50 µl 1M Tris-HCl mit dem pH Wert von 8 vorbereitet worden sind. Es ergeben sich etwa 15 Fraktionen, die mit Bio-Rad Proteinassay auf ihren Proteingehalt getestet werden. Dazu entnimmt man 10 µl Antikörperlösung und vermischt sie auf einer 96 Napf V-Bodenplatte mit 90 µl verdünnter Bio-Radlösung und beobachtet den Farbumschlag. Blaue Farbe bedeutet eine geringe Reinheit, wohingegen eine rote Färbung für eine hohe Reinheit steht.

Die nun nicht mehr benötigte Säule wird in 0,1 % PBS-Azid bei 4 °C gelagert.

Der Inhalt der Eppendorfcaps, in denen sich die Antikörper der höchsten Reinheitsstufe befinden, wird in einen Dialyseschlauch überführt, der danach an beiden Enden zugeknotet wird. Dieser Schlauch wird dann über 2 Tage in ein mit 4 l PBS gefülltes Gefäß gegeben. Unter kontinuierlichem Rühren und Auswechseln des Puffers nach jeweils 12 h werden die Antikörper dialysiert.

Danach entnimmt man mit einer Pasteurpipette aus dem geöffneten Schlauch die Antikörper, füllt sie in ein FACS-Röhrchen und prüft die Konzentration mit Hilfe des Photometers bei der Wellenlänge von 280 nm nach vorheriger Abgleichung mit einer 100 µl PBS Küvette ( $OD/1,4 \cdot \text{Verdünnung} = \text{mg/ml}$ ).

### **3.7. FITC-Kopplung monoklonaler Antikörper**

Die Antikörper werden in 0,1 M Bicarbonatpuffer mit dem pH Wert von 9,5 unter Zuhilfenahme der Sephadex/PD 10 Säulen umgepuffert. Man löst jeweils 10 mg Fluoresceinisothiocyanat (FITC) in 1 ml DMSO und gibt 10 µg dieser Lösung zu einem Milligramm Protein. Die Inkubationszeit beträgt 2 h bei Raumtemperatur, wobei die Mischung ständig geschüttelt und lichtgeschützt werden muss. Anschließend erfolgt ein

Wechsel des Puffers zu 0.1 % PBS-Azid. Zur Trennung des konjugierten Antikörpers vom unkonjugierten FITC-Überrest lässt man die Suspension über die Säule laufen und fängt das aufgereinigte Eluat zu je 500 µl in Eppendorfcaps auf.

### **3.8. Protokoll zum Einfrieren der Zellen**

Um die Plasmazellen länger zu konservieren, werden sie bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Dazu werden 50 ml Medium mit recht dichtem Zellbewuchs mit 1200 Umdrehungen bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min lang zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen mit 8 ml Einfriermedium (40% RMPI, 50% FcS und 10% DMSO) vermengt und je 1,5 ml in Kryoröhrchen überführt und gefroren.

### **3.9. Immunfluoreszenzfärbungen für die Durchflusszytometrie**

Die aufbereiteten Zellen werden in Portionen von  $10^6$  Zellen pro Well in einer 96 Well V-Platte gefärbt. Die zum Färben verwendete Menge an sättigender Antikörper/Pufferlösung beträgt 50 µl pro Well, die für die jeweilige Antikörperbindung benötigte Inkubationszeit liegt bei 10-15 min, anschließend erfolgt das Waschen. Dazu füllt man den Napf auf 200 µl mit FACS-Puffer auf und zentrifugiert 4 min lang mit 1600 Umdrehungen bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wird verworfen.

Die verwendeten Antikörper sind direkt oder indirekt mit Phycoerythrin (PE), Fluorescein Isothiocyanat (FITC), APC und Biotin konjugiert. Das Biotin wird durch die spätere Verbindung mit Streptavidin-Cychrom oder Streptavidin-Tri-Color angefärbt.

Bei Färbungen, in denen mit Biotin konjugierte Antikörper verwendet werden, müssen die Zellen dreimal gewaschen werden.

Die Färbungen erfolgen grundsätzlich auf Eis unter Lichtausschluss, um die Zellen sowie die lichtempfindlichen Farbstoffe zu schonen.

Nach Beendigung der Färbung können die Zellen direkt der FACS-Analyse zugeführt oder mit 1 % Formalinlösung fixiert und bis zur Auswertung maximal 48 h lang im Dunkeln aufbewahrt werden.

### **3.9.1. Färbungen auf Oberflächenmarker**

Ein typisches Färbeprotokoll für eine 4-Farben-Oberflächenfärbung (im vorliegenden Fall eine Färbung auf die gängigen Oberflächenmarker) sieht folgendermaßen aus:

1.	2.	3.	4.	5.	6.
24G2	2F1	Anti-Hamster-FITC	Hamster-IgG	Anti-CD25-Bio	Tri-Color/Anti-CD38-PE/ Anti-CD4-APC

24G2 dient zur Verminderung der unspezifischen Antikörperbindungen. 2F1 Überstand kommt aus einem aus unserer Arbeitsgruppe stammenden aus dem Hamster gewonnen Plasmazellklon und ist ein gegen KLRG1 gerichteter Antikörper. Anti-Hamster-FITC, ein gegen Hamster-Immunglobulin gerichteter Antikörper, bindet den ungefärbten 2F1 Antikörper und macht ihn dadurch für den Laser erkennbar. Hamster-IgG dient dazu, noch freie Enden des Anti-Hamster-FITC zu blocken, damit es nicht mit den nachfolgenden Antikörpern kreuzreagiert. Die weitere Färbung erfolgt mit Anti-CD25-Bio, ein gegen den Aktivitätsmarker CD25 gerichteter Antikörper und Streptavidin-Tricolor. Streptavidin und Biotin bilden einen sehr stabilen Komplex. CD4 wird mit Anti-CD4-APC und CD38 mit Anti-CD38-PE gefärbt.

### **3.9.2. Intrazelluläre Färbungen**

Nach Ablauf der 48 h dauernden Inkubationszeit für die Kultur (s.o.) werden alle Zellen in FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert, anschließend mit PBS gewaschen und auf eine 96 Well- Platte überführt.

Die Färbungen laufen nach folgendem Schema ab:

### Färbeschema für intrazelluläre Färbungen

A	Ha-IgG	Anti- TZR	PMA/ Ionomycin	Brefeldin
B	Ha-IgG	Anti- TZR	-	Brefeldin
C	Ha-IgG	-	PMA/ Ionomycin	Brefeldin
D	Ha-IgG	-	-	Brefeldin

	A/B/C/D			
1	24G2	2 F1-Bio/Anti-CD4 APC	Saponinlsg	Anti-IFN- $\gamma$ -PE
2	24G2	2 F1-Bio/ Anti-CD4 APC	Saponinlsg	Anti-IL-10-PE
3	24G2	2 F1-Bio/ Anti-CD4 APC	Saponinlsg	Ko-Pe
4	24G2	Ko- Bio/Anti-CD4 APC	Saponinlsg	Ko-Pe

Die Konzentrationen der Antikörper und der verwendete FACS-Puffer unterscheiden sich bis zum Zeitpunkt der Fixierung nicht von den bei normalen Färbungen verwendeten Konzentrationen. Allerdings wird die Inkubationszeit für die einzelnen Färbungen auf 15-20 min erhöht, da die Gabe der Saponinlösung eine Belastung für die Antigen-Antikörperbindung darstellt und man die Vorstellung hat, dass die Antigen-Antikörperbindung bei einer etwas längeren Inkubationszeit etwas intensiver und damit fester wird.

Vor der Saponin-Lyse erfolgt eine 20 min lange Fixierung bei Raumtemperatur mit 2% PBS-Formaldehytlösung.

Anschließend gibt man FACS-Puffer, der zu 0,5% Saponin enthält, in die Näpfe. Das Saponin führt zur Lyse der Zellmembran, die Inkubationszeit beträgt 10 min bei Raumtemperatur. Die Zellen werden zentrifugiert, mit Saponinlösung gewaschen und abermals zentrifugiert. Nun erfolgt die Färbung mit in Saponinlösung verdünntem Anti-IL-10-PE bzw. Anti-IFN- $\gamma$ -PE. Die Inkubationszeit liegt bei 30 min bei Raumtemperatur. Die Zellen werden 2 Mal mit Saponinlösung gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper aus dem Zytoplasma zu entfernen. Anschließend werden sie mit FACS-Puffer gewaschen, um die Poren in der Membran wieder zu verschließen.

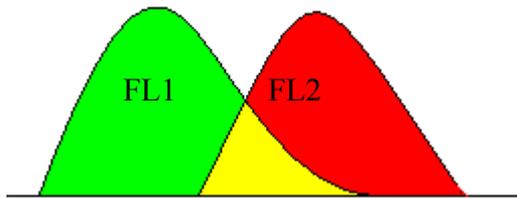
Die Zellen werden nun in FACS-Röhrchen überführt und am FACS-Gerät analysiert.

### **3.10. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse der Ausprägung der verschiedenen Oberflächenproteine auf den Lymphozyten. Die Färbungen erfolgen z.T. mit monoklonalen Antikörpern, die mit fluoreszierendem Farbstoff konjugiert worden sind und z.T. mit Antikörpern, die indirekt angefärbt werden.

Die gefärbten Zellen werden von der Kanüle des FACS (Fluorescence activated cell scanner) Gerätes angesogen und gleichzeitig mit FACS-Puffer verdünnt. Somit entsteht im Gerät selbst ein feiner Fluß von Pufferlösung mit den zu untersuchenden Zellen, die vom Laser einzeln angestrahlt werden. Der Laserstrahl bricht sich an der Zelle und ermöglicht damit das Sammeln von Informationen über deren Größe und Granularität, gleichzeitig wird der Farbstoff des konjugierten Antikörpers zur Fluoreszenz angeregt. Das in einem kleinen Winkel (3-10°) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC) bezeichnet, es steht in Bezug zur Zellgröße. Um 90° reflektiertes Licht wird als Seitwärtsstreulicht (SSC) bezeichnet und korreliert mit der Granularität der Zellen. Die Streustrahlung bzw. die reflektierten Lichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge werden von Photodetektoren erkannt und an den angeschlossenen Computer und das Programm Cell Quest zur Analyse weitergeleitet. Die verwendeten verschiedenen Farbstoffe fluoreszieren nach Anregung in unterschiedlichen Wellenlängen. So wird FITC (Florescein Isothiocyanat, grün) und auch CFSE in der ersten Fluoreszenz abgebildet. PE (Phycoerythrin, rot) erscheint in der zweiten, Cychrom (lila) und auch Tri-Color (grünblau) in der dritten und APC (dunkelblau) in der vierten Fluoreszenz. Die emittierte Strahlung wird mithilfe von drei Systemen aus Bandpassfiltern und Photoröhren in der Wellenlänge von 530 nm (Fluoreszenzkanal FL1), 585 nm (FL2) bzw. >650 nm (FL3) über den ersten Laser gemessen. Über einen zweiten Dioden-Laser kann die in der Wellenlänge von 670 nm befindliche vierte Fluoreszenz durch eine zweite Anregungswelle bestimmt werden. Da sich jedoch die Wellenlängen der emittierten Strahlung der einzelnen Farbstoffe teilweise überschneiden [Abb. 3.5.], ist es erforderlich, eine vorherige Abgleichung mit einzelnen Aliquots der jeweiligen Farbstoffe durchzuführen, um noch auswertbare Informationen bei zwei, drei oder gar vier gefärbten Antigenen pro Zelle zu erhalten .

Damit kann das optimale und spezifische Spektrum der Strahlung für den jeweiligen Antikörper ermittelt und als Maske gespeichert werden.



**Abb. 3.5. Emission der durch den Laser angeregten fluoreszierenden Farbstoffe.** Hier ist beispielhaft die Überschneidung der emittierten Strahlen in der ersten und zweiten Fluoreszenz abgebildet, die die Abgleichung mit Einzelaliquots erforderlich macht.

Mit der Durchflusszytometrie ist es also möglich, die Ausprägung von bis zu vier verschiedenen Antigenen auf einer Zelle gleichzeitig darzustellen.

## 4.0. Ergebnisse

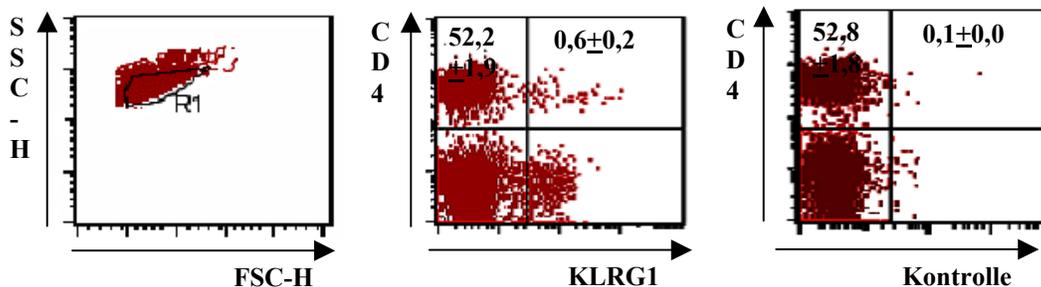
### 4.1. Phänotypische Analyse von KLRG1+CD4+ Zellen aus C57BL/6 bzw. BALB/c Mäusen

#### *4.1.1. CD4-positive Mauslymphozyten exprimieren KLRG1 auf ihrer Oberfläche*

Vor Beginn dieser Arbeit war die Expression von KLRG1 nur auf NK-Zellen und auf CD8 Zellen bekannt. Fortan wurden Phänotyp und Funktion der KLRG1+CD4+ Zellen untersucht.

Mit Hilfe indirekter und direkter Antikörperfärbungen wurden zunächst aus der Milz gewonnene Lymphozyten durch FACS-Analyse auf KLRG1 und auf CD4 Expression untersucht. Die Oberflächenfärbungen dieser Lymphozyten von C57BL/6 bzw. BALB/c Mäusen haben ergeben, dass 1-2% aller CD4+ Lymphozyten KLRG1 auf ihrer Oberfläche tragen.

Exemplarisch ist das Ergebnis einer Färbung der Lymphozyten 8 Wochen alter C57BL/6 Mäuse dargestellt [Abb. 4.1.].

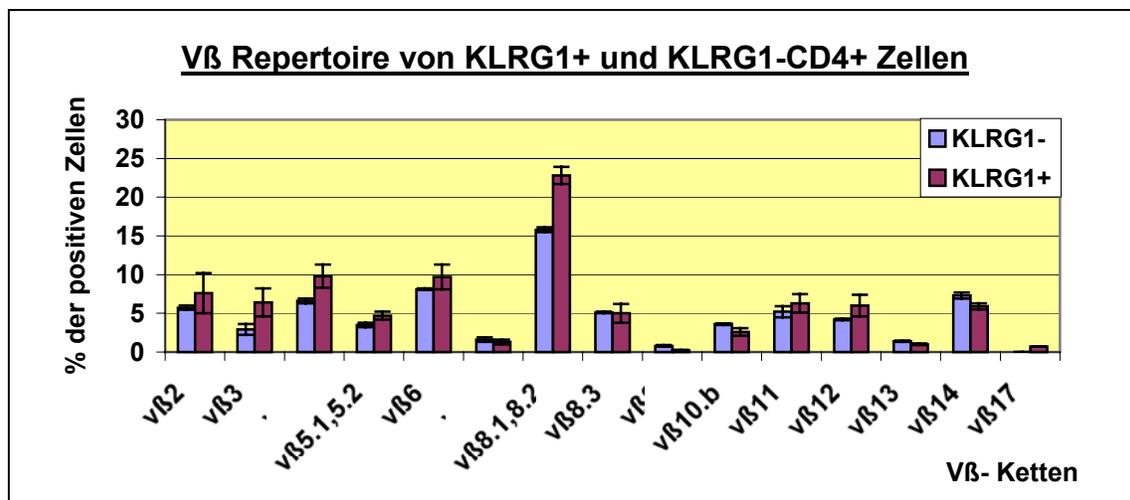


**Abb. 4.1. KLRG1 Expression auf CD4+ Lymphozyten bei C57BL/6 Mäusen.** Mauslymphozyten, gewonnen aus mit Nylonwolle aufgereinigten Milzen 8 Wochen alter C57BL/6 Mäuse, wurden direkt mit Anti-CD4 und indirekt mit 2F1 Überstand sowie mit Anti-Hamster-FITC gefärbt. Die Färbung zeigt deutlich, dass cirka 1-2% aller CD4 positiven Zellen auf ihrer Oberfläche KLRG1 exprimieren. Die Standardabweichung bezieht sich jeweils auf 3 untersuchte Tiere.

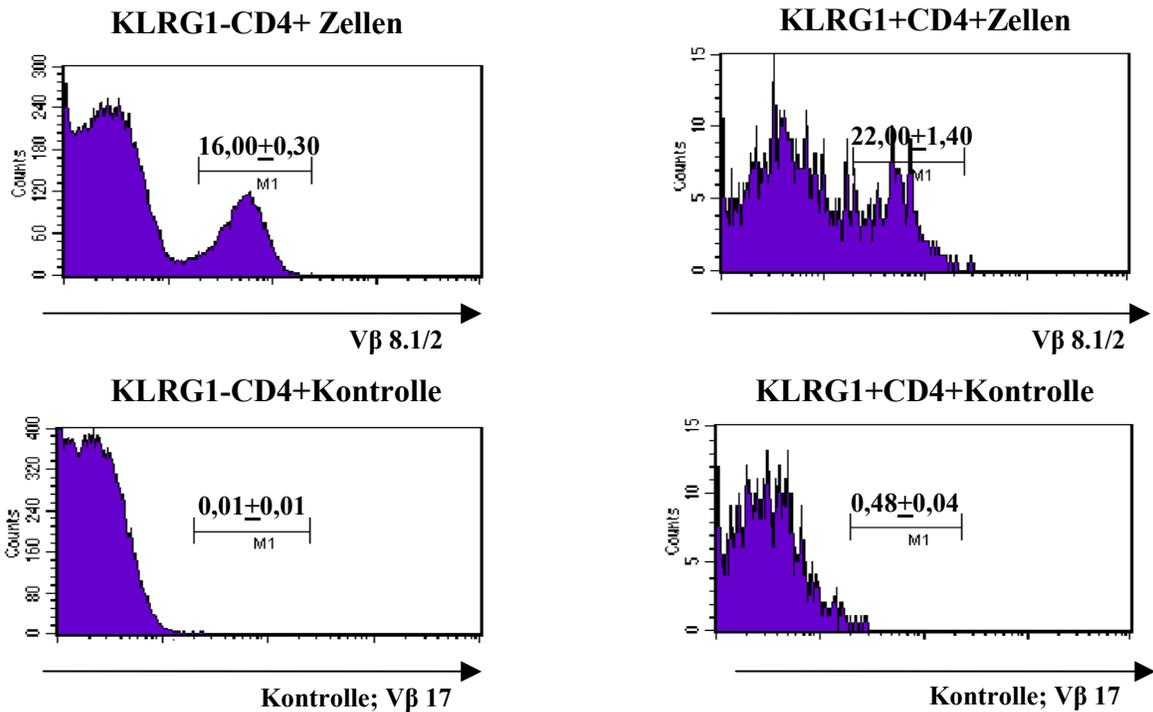
#### 4.1.2. Untersuchung des T-Zell-Rezeptor V $\beta$ -Repertoires der KLRG1+CD4+ Zellpopulation

Zur weiteren Klassifizierung wurden die KLRG1+CD4+Zellen auf die Variabilität der Ausprägung der  $\beta$ -Kette ihres T-Zell-Rezeptors getestet. Von besonderem Interesse war die Frage, ob diese Zellen ein oligoklonales oder polyklonales Repertoire besitzen. Ein oligoklonales Repertoire würde auf einen früheren Antigenkontakt der untersuchten CD4+ Zellen hindeuten, die daraufhin proliferiert und KLRG1 exprimiert hätten.

Das Ergebnis der Oberflächenfärbung [Abb. 4.2.] verdeutlicht, dass sich das Repertoire der KLRG1+ nicht wesentlich von KLRG1- T-Helferzellen unterscheidet. Es tritt allerdings eine Ausnahme auf: Die V $\beta$ -Kette 8.1/2 ist bei den KLRG1+CD4+ Zellen höher ausgeprägt als bei den konventionellen CD4+ Zellen [Abb. 4.3.].



**Abb. 4.2. Expression und Variabilität der V $\beta$ -Ketten des T-Zell-Rezeptors von KLRG1+ und KLRG1-CD4+ Lymphozyten.** Es wurden 6 gereinigte Milzen von 7 Wochen alten C57BL/6 Mäusen verwendet, wobei jeweils 2 Milzen einen Pool bildeten. Die Färbung erfolgte mit FITC-konjugiertem gegen die  $\beta$ -Kette des TZR gerichteten Antikörper, 2F1-Bio und Streptavidin-Cychrom, sowie mit PE-konjugiertem Anti-CD4. V $\beta$ 17 wird von C57BL/6 Mäusen nicht ausgebildet und diente somit als Kontrollfärbung. Das Diagramm zeigt alle Rezeptorenketten in Gegenüberstellung von KLRG1+ und KLRG1-CD4+ Zellen, die sich in ihrer Ausprägung kaum unterscheiden, abgesehen von einer vermehrten Ausprägung des Rezeptors V $\beta$ 8.1/2 auf den KLRG1+CD4+ Zellen.

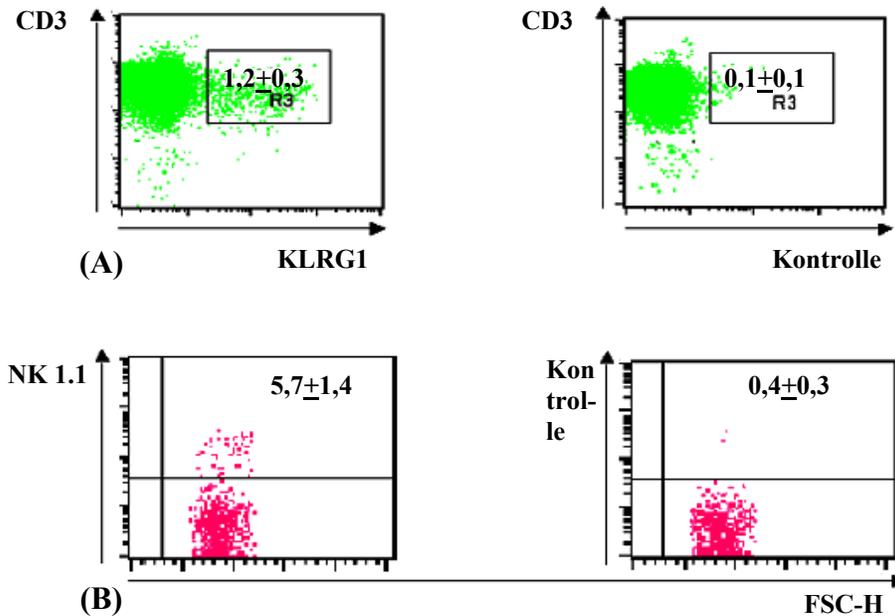


**Abb. 4.3. TZR  $\beta$ -Repertoire der CD4+ Zellen von 8 Wochen alten C57BL/6 Mäusen**  
 Die Lymphozyten der Milzen von sechs C57BL/6 Mäusen wurden aufgereinigt und mit Anti-TZR-FITC, Anti-CD4-PE und 2F1-Bio angefärbt. In der Abbildung erkennt man die höhere Expression des Typ 8.1/2 Rezeptors bei den CD4+KLRG1+. Der Rezeptor V $\beta$ 17 wird von C57BL/6 nicht ausgeprägt und dient somit als Kontrollfärbung.

#### 4.1.3. Überprüfung des Anteils der NKT-Zellen unter den KLRG1+CD4+ Zellen

Aufgrund der überproportionalen Expression von V $\beta$ 8.1/2 lag die Vermutung nahe, dass die Population der KLRG1+CD4 + Zellen zu einem hohen Prozentsatz aus NKT-Zellen besteht. NKT-Zellen sind erstmals in der Maus beschrieben worden. Sie tragen eine invariante T-Zell-Rezeptor  $\alpha$ -Kette (V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281), die vorrangig mit V $\beta$ 8 assoziiert ist [Bendelac et al., 1997]. Deshalb wurde der Anteil der NKT-Zellen unter den KLRG1+ Zellen bestimmt. Lymphozyten der Milz wurden mit einer 4-Farben-Oberflächenfärbung auf die gleichzeitige Expression von CD3, CD4, 2F1 und NK1.1. untersucht.

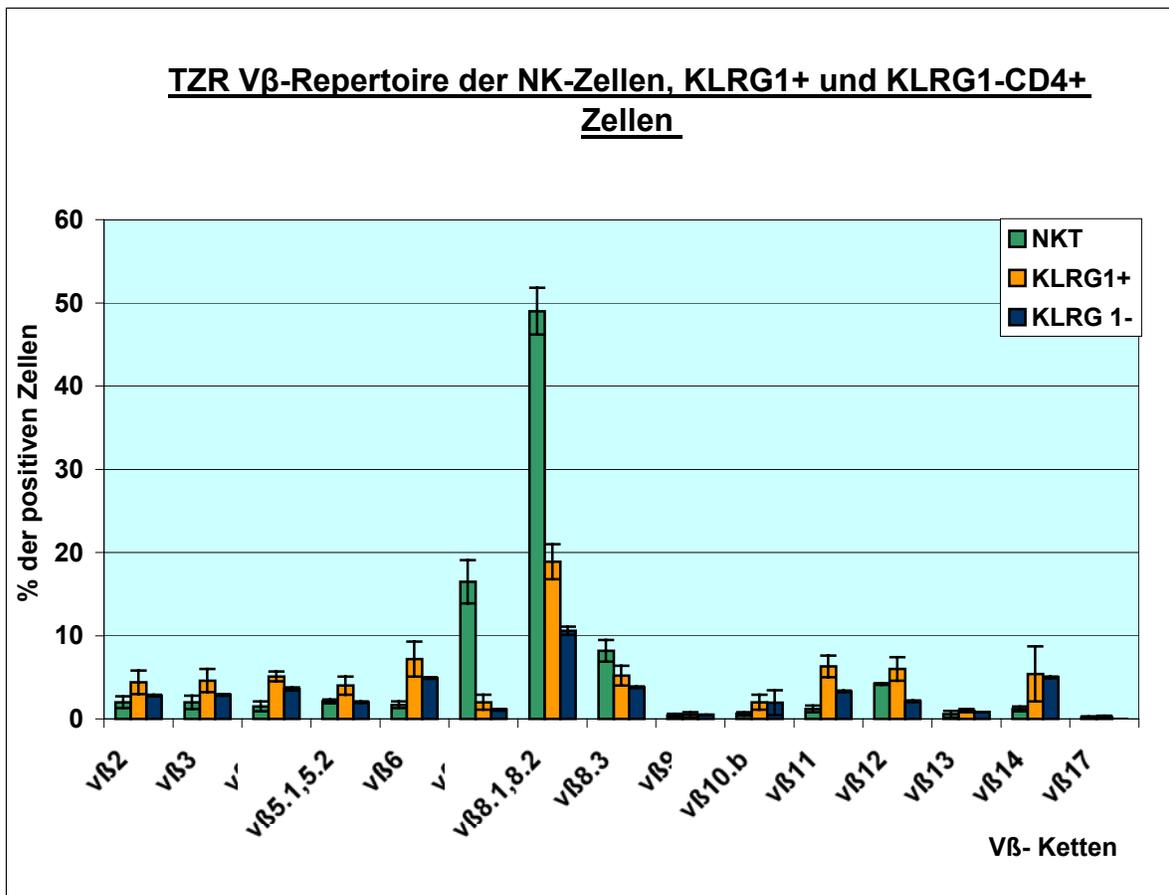
Die Färbung [Abb. 4.4.] ergab, dass nur etwa 5% der KLRG1+CD4+ Lymphozyten zu den NKT-Zellen gezählt werden können.



**Abb. 4.4. Färbung der KLRG1 positiven T-Helferzellen in Mauslymphozyten auf NK1.1, CD4 und CD3.**

Aus den aufgereinigten Milzen 8 Wochen alter C57BL/6 Mäuse gewonnene Lymphozyten wurden mit 4-Farbenfärbung auf CD4, KLRG1, CD3 und NK1.1 Expression gefärbt. (A) zeigt die Expression von CD3 und KLRG1 der auf CD4 gegaten Zellen. (B) stellt die NK1.1 Ausprägung auf der sich in der Region 3 befindlichen KLRG1+CD3+CD4+ Population dar. Das Ergebnis macht deutlich, dass nur etwa 5% der KLRG1+CD4+ Zellen zu den NKT-Zellen gerechnet werden können, und somit über 95% der KLRG1+CD4+ Zellen konventionelle T-Helferzellen sind.

Zur weiteren Abklärung des Anteils der NKT-Zellen unter den  $V\beta 8.1/2+$  KLRG1+CD4+ Zellen folgte eine 4-Farben-Färbung, bei der auf die gleichzeitige Ausprägung von NK1.1., KLRG1, das  $V\beta$ -Repertoire und CD4 gefärbt wurde [Abb. 4.5.]. Es zeigte sich, dass trotz der Elimination der NK1.1+ Zellen unter den KLRG1+ Zellen die höhere Ausprägung von der  $V\beta 8.1/2$  Kette nicht beeinflusst wurde. Die Bedeutung dieses Befundes ist derzeit noch unklar.

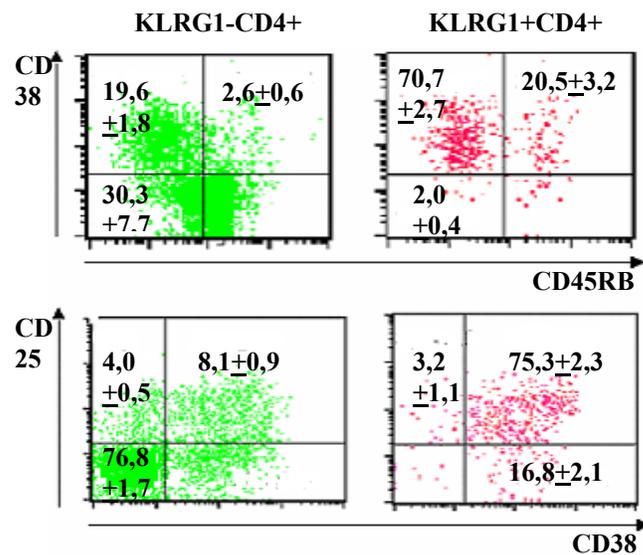


**Abb. 4.5. 4-Farben-Färbung des V $\beta$ -Repertoires von T-Helferzellen.** Die Lymphozyten wurden aus den nylonwollpassagierten Milzen dreier 8 Wochen alter C57BL/6 Mäuse gewonnen. Die Färbung erfolgte mit 2 F1 Überstand, Anti-Hamster-Bio, sowie Anti-NK.1.1.-PE, Anti-CD4-APC und Anti-V $\beta$ -FITC. Die dargestellten Zellpopulationen sind auf CD4 gated, wobei die Population der KLRG1+NK1.1+CD4+ Zellen zu klein war, um abgebildet zu werden. Man erkennt eine sehr hohe Ausprägung der V $\beta$ 8.1/2 Kette der NKT Zellen, die die der KLRG1+ um 50 % übertrifft. Allerdings ist die Ausprägung von V $\beta$  8.1/2 auf den KLRG1+CD4+ Zellen immer noch um etwa 6% höher als auf den KLRG1-CD4+ Zellen.

#### ***4.1.4. Oberflächenfärbung der KLRG1+CD4+ Zellen auf bekannte Marker für regulatorische Zellen***

Um die entdeckte Zellpopulation mit bekannten Untergruppen von CD4+ Zellen vergleichen zu können, erfolgten weitere Färbungen auf Oberflächenantigene, welche

bekanntermaßen Differenzierungsstadien, Aktivierungsstadien oder unterschiedliche Linien von CD4 Zellen kennzeichnen. Es ergab sich dabei eine deutliche Überschneidung mit Markern der bekannten Populationen der regulatorischen T- Zellen. So konnte mit der Oberflächenfärbung gezeigt werden, dass nahezu alle KLRG1+CD4+ Zellen ( $\geq 90\%$ ) auch den Marker für regulatorische Zellen CD38 [Read et al., 1998] auf ihrer Oberfläche tragen. Dies ist ein deutlicher Unterschied zu der Verteilung dieses Markers auf den übrigen CD4+ Zellen, der hier nur bei etwa 20% liegt. Auch die Expression von CD25, dem Marker für natürliche regulatorische Zellen [Sakaguchi et al., 1995] auf den KLRG1+CD4+ Zellen befindet sich mit über 70% weit über der durchschnittlichen Ausprägung von CD25 auf CD4+ Zellen, die bei 5-10% liegt. CD45RB ist ebenfalls auf KLRG1+CD4+ Zellen niedrig exprimiert, so sind etwa 70% der KLRG1+CD4+Zellen "CD45RBlow" [Abb. 4.6].



**Abb. 4.6. Färbung von KLRG1 und den bekannten Markern für regulatorische Zellen.** Die 4-Farbenfärbung, mit Anti-CD4-APC, indirekt mit 2F1 und Anti-Hamster-FITC bzw. Anti-Hamster-Bio, Anti-CD38-PE und Anti-CD25-Bio und Streptavidin-Tricolor, sowie Anti-CD45RB-FITC, zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Ausprägung der bekannten Marker für regulatorische Zellen und KLRG1.

#### **4.1.5. Weitere Oberflächenfärbungen der KLRG1+CD4+ Zellpopulation**

Zur genaueren Einordnung wurden noch weitere Oberflächenfärbungen vorgenommen. Die betrachteten Marker waren der Aktivierungsmarker CD69 [Testi et al., 1994], das Adhäsionsmolekül und der Memory-Zell Marker CD44 und CD62L, ein Leukozytenadhäsionsmolekül. Das letztgenannte Molekül vermittelt das Entlangrollen am Endothel und wird von Antigen unerfahrenen, also naiven T-Zellen exprimiert. [Marchesi et al., 1964] [Gowans et al., 1964]. Des Weiteren wurden Ly6C, ein Antigen, das die T-Zell-Aktivierung anzeigt [Ortega et al., 1986] und nur auf T-Zellen der Milz und Lymphknoten, aber des Thymus exprimiert wird [McCormack et al., 1993], sowie CD43 (Leukosialin, Sialophorin) untersucht. CD43 ist ein Molekül, das für die Regulation des ersten Kontaktes zwischen Zellen verantwortlich ist, sei er nun adhesiv oder repulsiv [Ostberg et al., 1998].

Ein Vergleich des Phänotyp der CD25+CD4+ Zellen aus Mäusen ergibt folgendes Bild: Nur wenige von ihnen exprimieren einen Anteil von IL-2R $\beta$ , die Mehrheit über 90% sind "CD44high", etwa 70% exprimieren ein niedriges Niveau von CD62 (L-Selectin), etwa 25% tragen CD69 in hoher Expression auf ihrer Oberfläche und alle CD25+Zellen sind CD45RBnegativ [Sakaguchi et al., 1995]. 60% der CD25+ Zellen sind CD38+, eine Population, die ebenfalls regulatorische Fähigkeiten hat [Read et al., 1998].

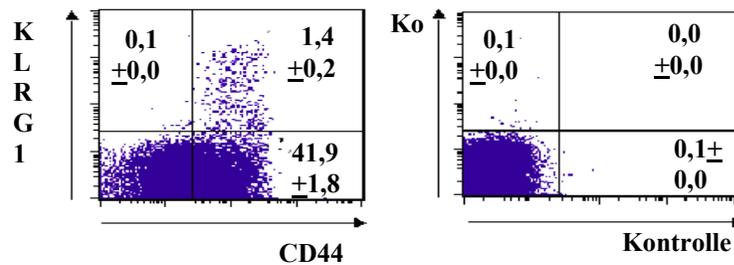
KLRG1+CD4+ Zellen exprimieren nahezu alle CD38 und sind zu einem Drittel "CD45RBhigh". In Bezug auf die Ausprägung von CD62L und von CD69 unterscheiden sich die beiden Zellpopulationen nicht voneinander.

Ins Auge fallend sind die Färbungen bezüglich der CD44 Expression: Ausnahmslos alle KLRG1 Zellen sind CD44+, was auf Antigenerfahrung schließen lässt [Abb. 4.7.]. Auch die Expression von CD43 ist mit >50% überdurchschnittlich hoch, während die Ausprägung der Aktivierungsmarker wie CD69 oder auch Ly6c nur geringfügig über der normalen CD4+ Population liegen.

Der Phänotyp von KLRG1+CD4+Zellen von C57BL/6 und BALB/c unterscheidet sich nicht hinsichtlich dieser Marker [Abb. 4.8.].

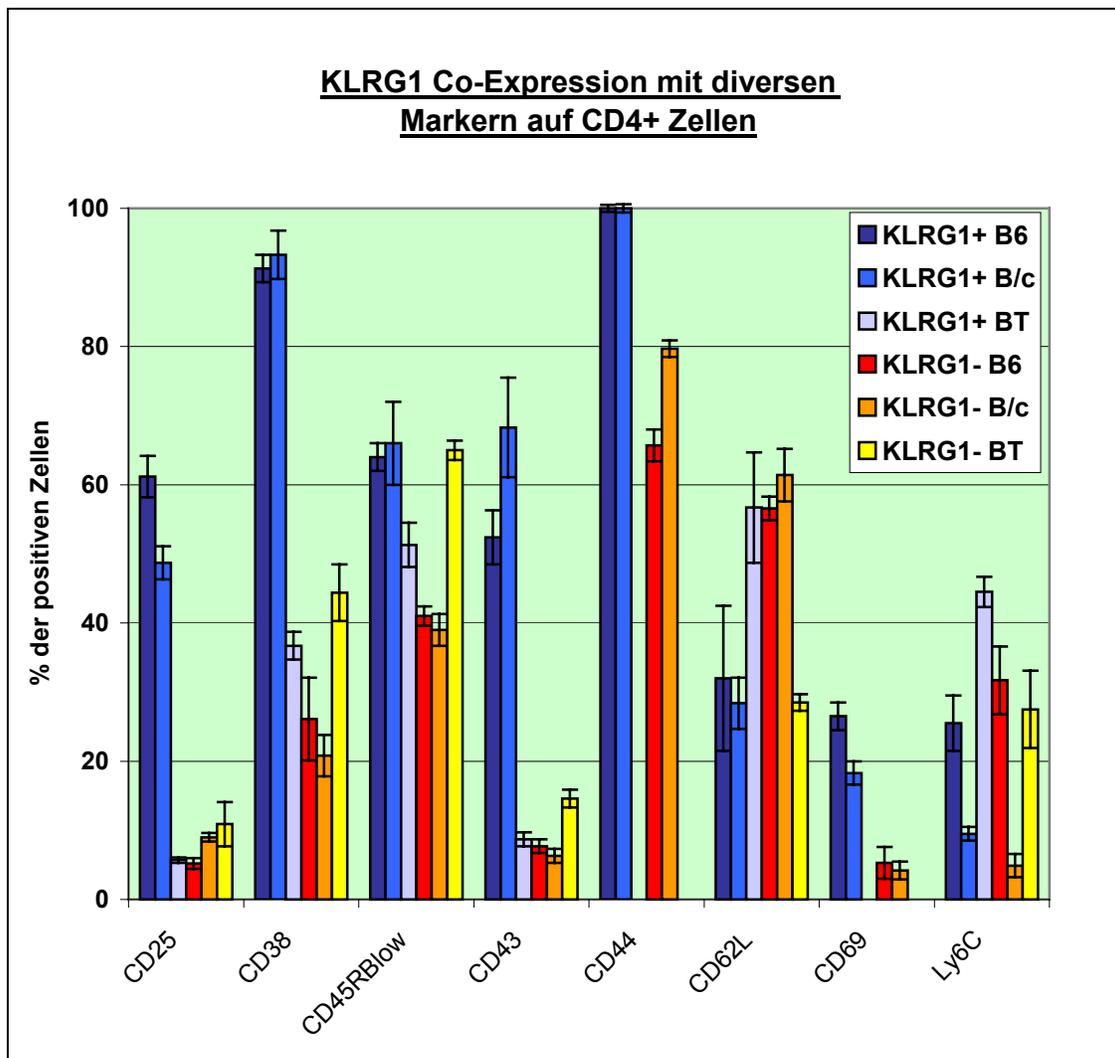
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle KLRG1+ positive Zellen Antigen erfahren sind und in Anbetracht der deutlichen, zusätzlichen Expression von regulatorischen Markern eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass KLRG1+ von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird.

Eine weitere Untersuchung sollte aufdecken, ob eine durch transgene Expression „erzwungene“ Ausprägung von KLRG1 Einfluss auf die Differenzierung von CD4 T-Zellen der Maus hat. Da sich die vorrangig KLRG1 positiven CD4+ Zellen der transgenen Mäuse hinsichtlich der Expression von CD25, CD38, CD44, CD45RBlow und weiteren untersuchten Markern von der unsortierten CD4+ Zellen aus Wildtyp Mäusen nicht unterscheiden, identifiziert KLRG1 Expression per se keinen regulatorischen Phänotyp [Abb. 4.9].



**Abb.4.7. Die Ausprägung von CD44 auf KLRG1+ CD4+ Zellen.**

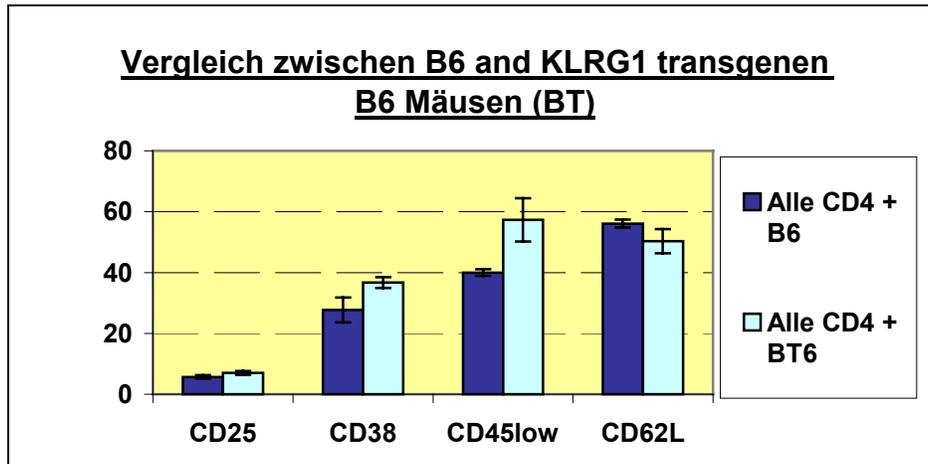
In dieser Abbildung erkennt man, dass nahezu alle KLRG1+CD4+ Zellen auf ihrer Oberfläche auch CD44 tragen, im Gegensatz zu den durchschnittlichen T-Helferzellen, die nur etwa um die 70% CD44 positiv sind.



**Abb. 4.8. Vergleich der Ausprägung der einzelnen Oberflächenmarker der CD4+ Lymphozyten verschiedener Mäusearten.** In dieser Abbildung sind die KLRG1+CD4+ und die KLRG1-CD4+ Lymphozyten von C57BL/6 Mäusen (B6) von BALB/c Mäusen (B/c) und KLRG1 transgenen C57BL/6 Mäusen (BT) im Vergleich dargestellt.

Die aufgereinigten Milzlymphozyten jeweils dreier 6,5 Wochen alter Tiere wurden indirekt mit 2F1 Überstand und anschließend mit Anti-Hamster-Bio und Streptavidin-Cychrom bzw. Anti-Hamster-FITC, mit Anti-CD4-FITC bzw. Anti-CD4-PE, Anti-CD43-FITC, Anti-Ly6c-FITC, CD25-Bio sowie Streptavidin-Cychrom, Anti-CD38-PE, Anti-CD45RB-FITC, Anti-CD62-Bio und SA-Cychrom nachgewiesen.

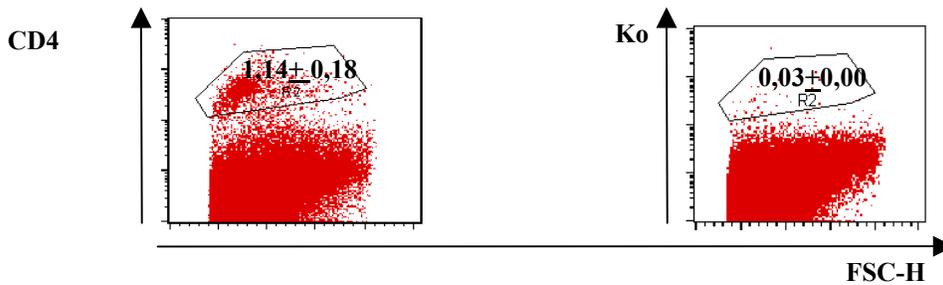
Die Ausprägung der verschiedenen Marker auf den KLRG1-CD4+ Zellen in allen drei untersuchten Mäusestämmen ist nahezu identisch. Weiterhin gleichen sich die KLRG1+CD4+ Zellen der C57BL/6 und der BALB/c Mäuse. Die Oberfläche der KLRG1+CD4+ Zellen der KLRG1 transgenen Mäuse entspricht allerdings eher konventionellen T-Helferzellen.



**Abb. 4.9. Vergleich zwischen den CD4+ Zellen von B6 Wildtyp Mäusen und KLRG1 transgenen B6 Mäusen.** Bei Betrachtung der Gesamtzahl der CD4+ Zellen von normalen C57BL/6 Mäusen und ihren KLRG1 transgenen Verwandten erkennt man keine wesentlichen Unterschiede der Oberflächenexpression der untersuchten Marker.

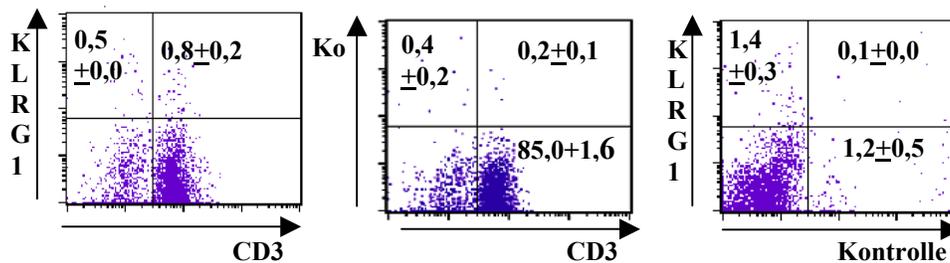
#### **4.1.6. KLRG1 Expression in der Ontogenie**

Thymektomie im Alter von 3-7 Tagen führt bei Mäusen zu einer Autoimmunkrankheit [Nishizuka et al., 1969]. Eine daraus abzuleitende Folgerung wäre es, dass sich autoreaktive Zellen erst nach dem 3. Lebenstag entwickeln, bzw. dass sich die regulatorischen T-Zellen erst nach dem 7. Lebenstag in der Peripherie verteilen. Demzufolge wurde die Ausprägung von KLRG1 in den unterschiedlichen Altersklassen der Mäuse untersucht. Die Milzen von 2 Tage alten sowie 3, 5, 7, 10 und 26 Wochen alten Mäusen wurden im Vergleich auf die jeweilige Expression von KLRG1 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass dieser Oberflächenmarkers auch auf T-Helfer-Zellen in der Milz von 2 Tage alten Mäusen vorhanden ist [Abb. 4.10.] [Abb.4.11.] und sich dessen Ausprägung im Lebenslauf einer C57BL/6 Maus nicht auffällig verändert [Abb. 4.12.]. Im Gegensatz zu Asano et al. [1996], aber in Konkordanz zu Sury-Payer et al. [1998] konnten auch CD25+CD4+ Zellen in der Milz der 2 Tage alten Mäuse nachgewiesen werden und weder für CD38 noch für CD25+CD4+ Zellen war eine große Schwankungsbreite in der Expression zu bemerken [Abb. 4.13.].

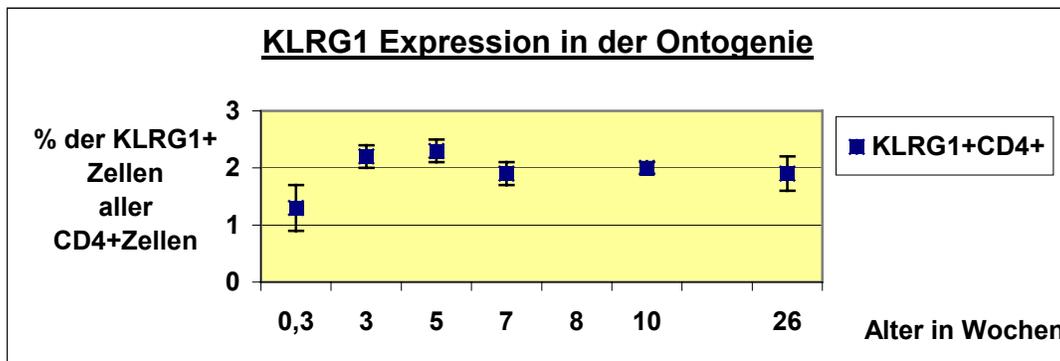


**Abb. 4.10. CD4 Expression auf den Milzzellen neugeborener Mäuse.**

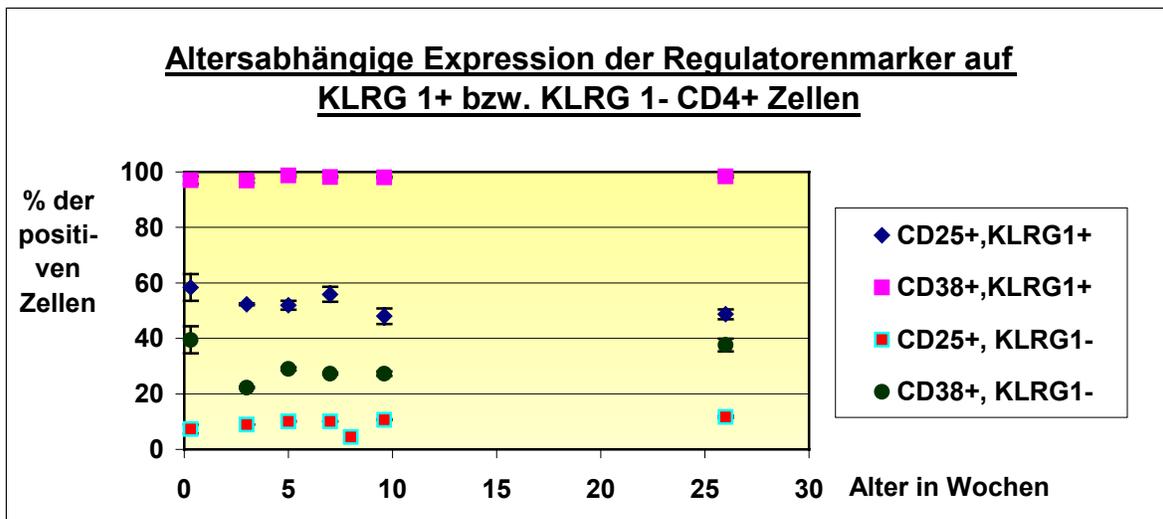
In diesem Versuch wurden die durch ein Sieb aufgereinigten Milzen von 9 zwei Tage alten Mäusen auf CD4, CD3 und KLRG1 gefärbt, wobei jeweils drei Pools aus je drei Milzen gebildet wurden. Es tragen etwa 1,1 % der Milzzellen CD4 auf ihrer Oberfläche.



**Abb. 4.11. KLRG1 Expression auf den CD4+ Milzzellen neugeborener C57BL/6 Mäuse.** Auf die CD4+ Zellen wurde gated und es zeigte sich, dass etwa 0,8% dieser Zellen KLRG1+ und CD3+ sind.



**Abb. 4.12. Statistische Auswertung der Verteilung von KLRG1 auf CD4+ Zellen in den verschiedenen Altersgruppen.** Man erkennt, dass die Schwankungen in der Expression im fortschreitenden Alter nicht signifikant sind. KLRG1 ist auf den CD4+ Milzzellen der angegebenen Alterspopulationen indirekt mit Anti-2F1 und CD4 mit Anti-CD4-PE angefärbt worden.



**Abb. 4.13. Vergleich der Expression verschiedener regulatorischer Marker auf unterschiedlich alten Mäusen.** Hier sind im Vergleich die KLRG1+ und KLRG1- Zellen, die die regulatorischen Marker CD25 und CD38 tragen und zu den CD4+ Zellen gehören, statistisch aufgetragen. Man erkennt, dass auch die anderen Marker für regulatorische T-Zellen keiner altersabhängigen Schwankung unterliegen. Die Oberflächenmarker sind mit Anti-CD38-PE, Anti-CD4-FITC und Anti-CD25-Bio gefärbt worden. Die Färbung auf KLRG1 erfolgte indirekt über 2F1 und Anti-Hamster-Bio bzw. Anti-Hamster-FITC.

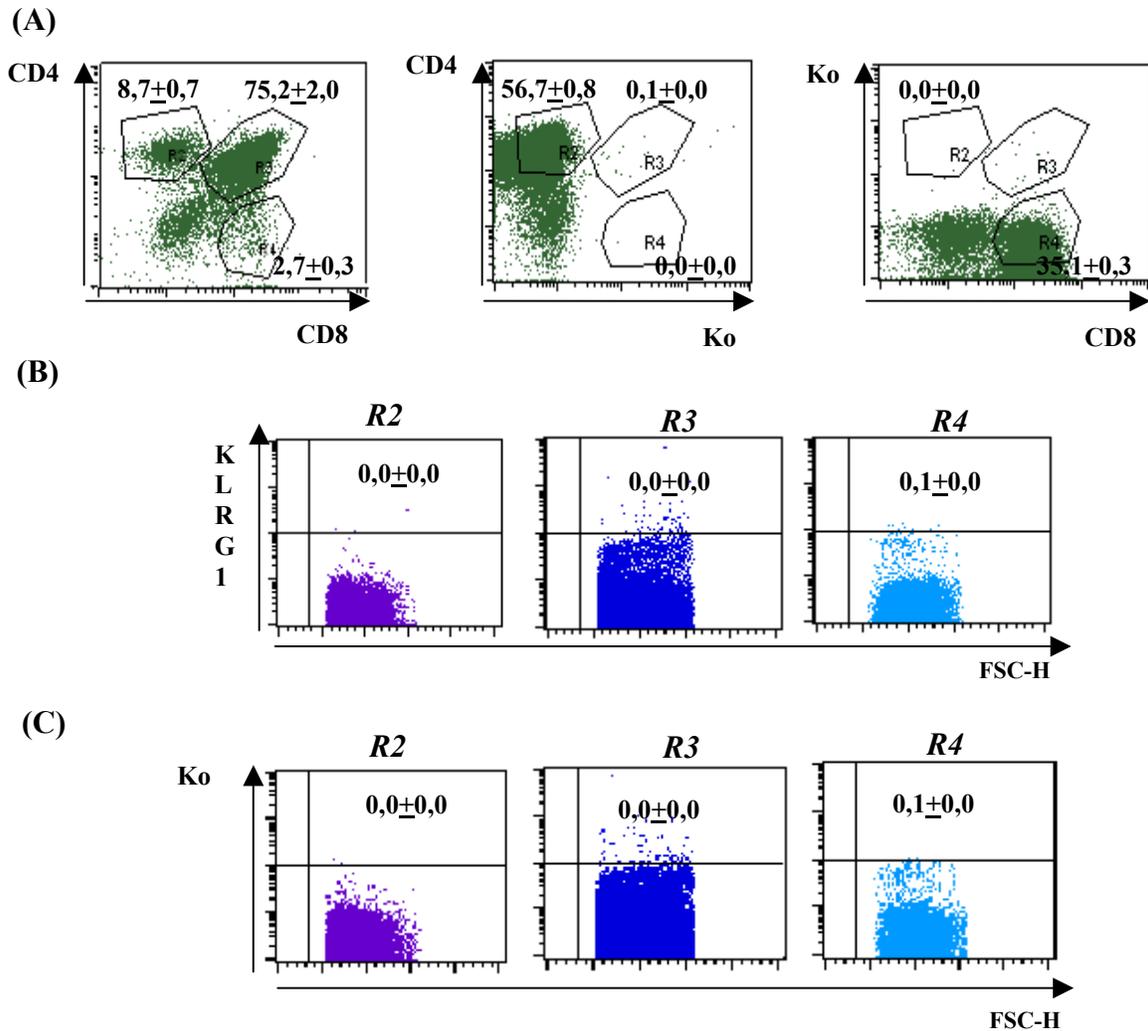
#### ***4.1.7. KLRG1 Expression auf den verschiedenen lymphatischen Organen der C57BL/6 Maus***

Die unterschiedlichen Kompartimente des Immunsystems nehmen unterschiedliche Stellungen in der Bildung sowie in der Funktion der Immunzellen ein. In diesem Experiment wurden die CD4 Zellen in Blut, Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Thymus auf ihre Ausprägung von KLRG1 auf ihrer Oberfläche untersucht.

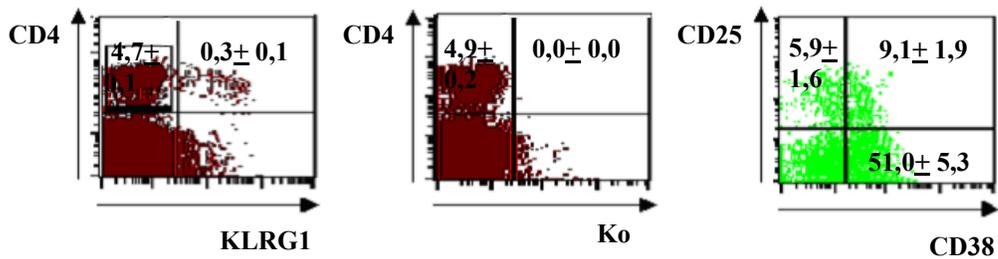
Interessanterweise wird KLRG1 auf T-Zellen erst in der Peripherie induziert, es ist zu keinem Zeitpunkt des Lebens der Maus im Thymus in der Durchflusszytometrie nachweisbar [Abb. 4.14.].

Im Knochenmark hingegen ist KLRG1 auf immerhin mehr als 4% der Zellen vertreten, wobei CD4 nur zu etwa 4,5% unter den Zellen des Knochenmarks zu finden ist. Diese Zellen unterscheiden sich im Phänotyp in Bezug auf die Ausprägung von CD25 und CD38 von den Milzlymphozyten [Abb. 4.15.].

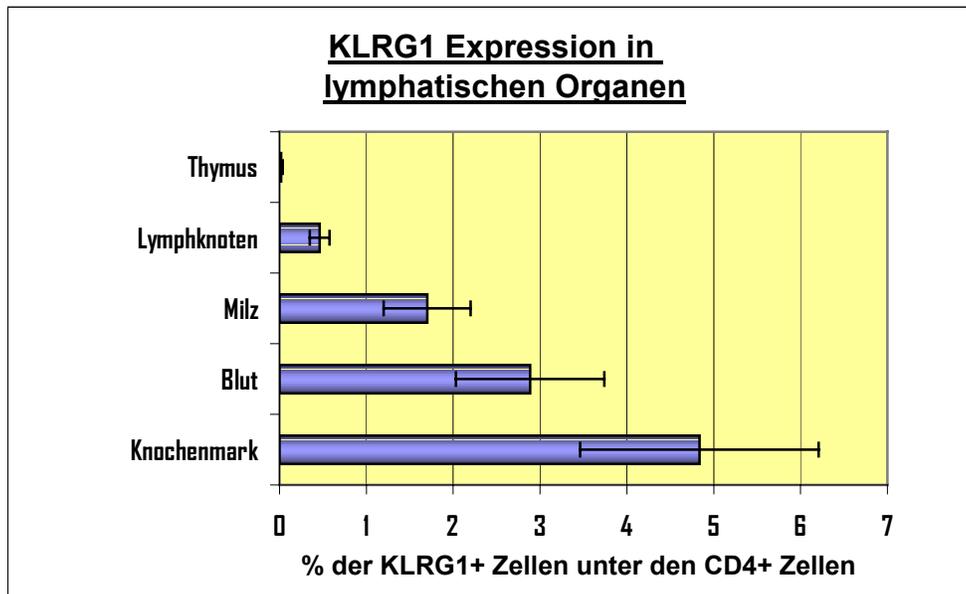
Die Lymphknoten enthalten KLRG1+CD4+ Zellen nur zu einem geringen Anteil [Abb. 4.1.16.]. Möglicherweise üben KLRG1+CD4+ Zellen ihre Hauptfunktion an einem anderen Ort aus. Im Blut befindet sich KLRG1 auf etwa 2% der CD4+ Zellen, es ist dort geringfügig höher ausgeprägt als in der Milz [Abb. 4.16].



**Abb. 4.14.** In diesem Versuch wurden die Thymi von neugeborenen Mäusen auf ihre KLRG1 Expression getestet. Die Thymi neugeborener Mäuse wurden exzidiert, gereinigt und mit Anti-CD4-PE, Anti-CD8-FITC sowie 2F1, Anti-Hamster-Bio und Streptavidin-Tricolor gefärbt sowie mit den jeweiligen Kontrollen gegengefärbt. Im Teil (A) der Abbildung ist CD4 gegen CD8 aufgetragen, wobei auf die einzeln und doppelt positiven Zellen (R2): CD4+, CD8-; (R3): CD4+, CD8+, (R4): CD4-, CD8+ gated wurde, und sie jeweils auf die KLRG1 Expression geprüft wurden (B). Es ergab sich, dass in keiner der untersuchten Zellpopulationen KLRG1 ausgeprägt wird. (C) stellt die Kontrollfärbung dar.



**Abb. 4.15.** Hier ist die Ausprägung der bekannten Regulatorenmarker ohne die KLRG1 positiven Zellen der CD4+Zellen aus dem Knochenmark abgebildet. Das Knochenmark wurde aus Femur und Tibia von neun sechs Wochen alten Mäusen gewonnen und in drei Gruppen zu je drei Tieren gepoolt Die Färbungen erfolgten mit APC konjugiertem Anti-CD4, Anti-CD38-FITC, Anti-CD25-PE und mit 2F1, Anti-Hamster-Bio und Streptavidin-Tricolor. In der linken Abbildung wurde auf die CD4+ Zellen gated. Man erkennt, dass die Expression von CD38 auf aus dem Knochenmark entnommen CD4+ Zellen geringer als auf Milzlymphozyten ist.



**Abb. 4.16. Statistische Auswertung von Organfärbungen.** Die zusammengefassten Ergebnisse aller durchgeführten Organfärbungen (n=5) zeigen die durchschnittliche Expression von KLRG1 auf CD4+ Lymphozyten. Man erkennt, dass die Ausprägung von KLRG1 auf den CD4+ Lymphozyten zwischen den verschiedenen lymphatischen Organen unterschiedlich ist, aber immer nur eine kleine Prozentzahl der CD4+ Zellen KLRG1 exprimiert.

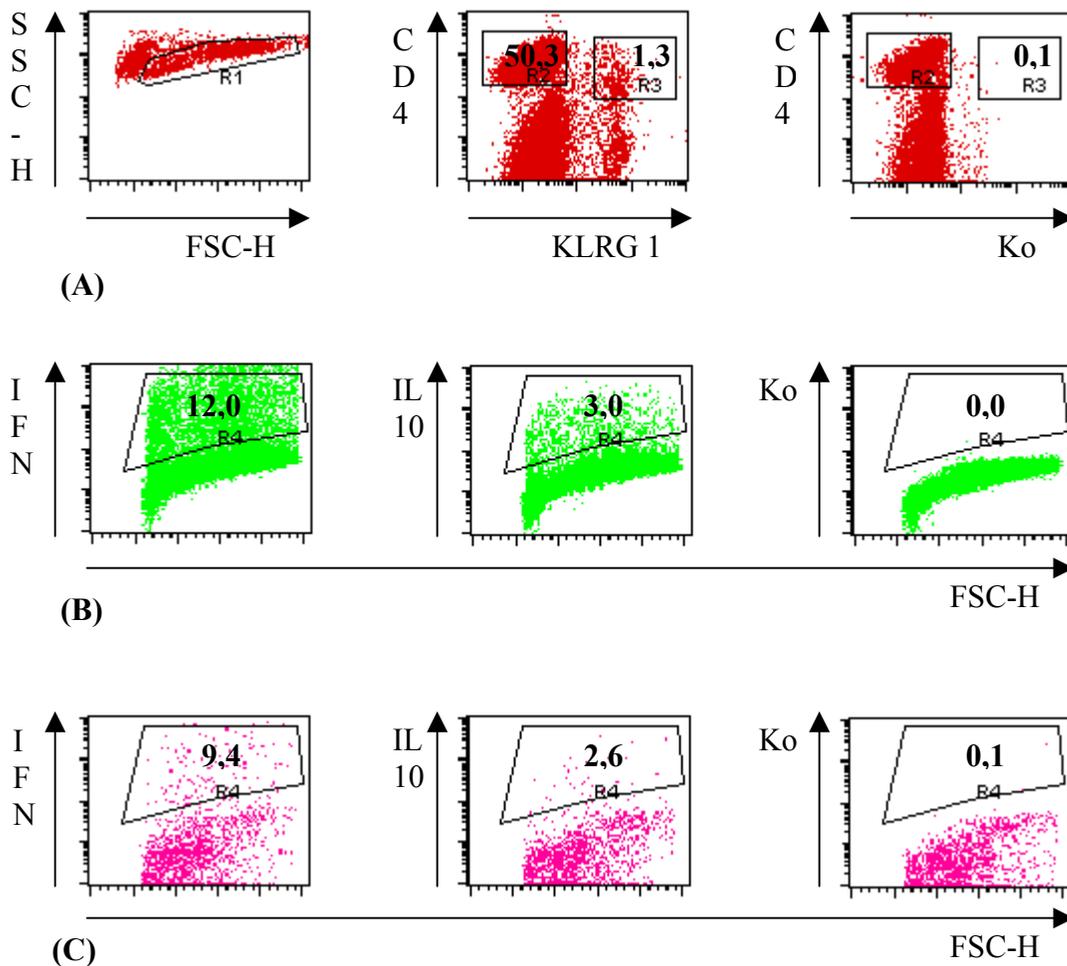
## **4.2. Zytokin-Produktion von KLRG1+CD4+ Zellen in 48 h Kultur**

Zur Aufklärung der Funktion der KLRG1+CD4+ Zellen wurde zunächst die Produktion von Leitzytokinen für Th1 bzw. regulatorische T-Zellen in vitro untersucht.

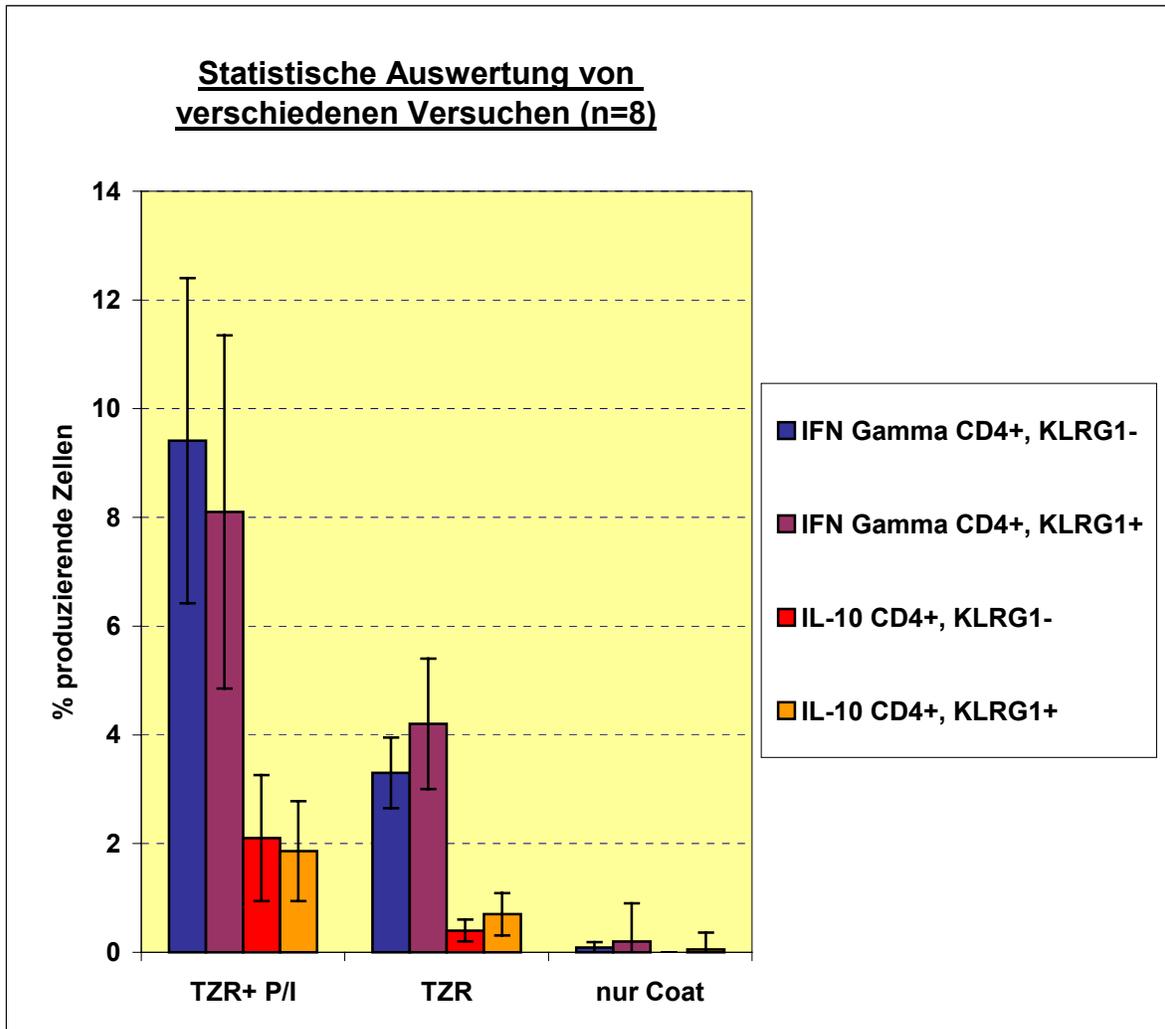
Milzzellen von 6-8 Wochen alten BALB/c Mäusen wurden steril mit Nylonwollpassage aufgereinigt und in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^5$ /ml auf einer zur Hälfte mit Anti-T-Zell-Rezeptor beschichteten Platte in Kultur genommen. Kurz vor dem Hinzufügen der Zellen folgte noch eine 30 min lange Inkubationszeit mit Anti-TZR H57. Nach 44 h wurden ein Teil der Zellen 4 h lang mit PMA/ Ionomycin restimuliert. 2 h vor Ablauf der Inkubationszeit wurde Brefeldin A zu allen mit Zellen gefüllten Näpfen hinzugegeben. Die Zellen wurden auf ihre intrazelluläre Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-10 als Leitzytokine für Th1 bzw. Th2 Zellen gefärbt [Romagnani, 2000].

Die mit Anti-TZR und PMA/ Ionomycin stimulierten Zellen produzierten nur zu rund 10 % IFN- $\gamma$  und nur zu 2% IL-10. Die ausschließlich mit Anti-TZR stimulierten Zellen zeigten eine noch geringere Produktion an Zytokinen. Nur etwa 4% (IFN) bzw. 1% (IL-10) der Zellen ließen sich intrazellulär mit den jeweiligen Antikörpern anfärben. Die nicht stimulierten Zellen produzierten keine nachweisbaren Mengen der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-10, was allerdings auch zu erwarten war [Abb. 4.17]

Das Ergebnis zeigt interessanterweise, dass sich das Zytokinprofil von KLRG1+ und KLRG1-T-Zellen in diesen Assays nicht unterscheidet [Abb. 4.18]. Offenbar sind KLRG1+CD4+ Zellen trotz ihres "regulatorischen T-Zell-Phänotyps" nicht in ihrer Fähigkeit, auch Th1 Zytokine zu bilden, eingeschränkt.



**Abb. 4.17. Produktion von IL-10 und IFN- $\gamma$  von mit Anti-TZR und PMA/ Ionomycin stimulierte Zellen.** Die Färbung erfolgte mit 2F1-FITC, Anti-CD4-APC, Anti-IFN- $\gamma$ -PE bzw. Anti-IL-10-PE. Im Teil (A) sind die Zellen nach der 48 stündigen Stimulation abgebildet. Auf die aktivierten Zellen wurde für die Auswertung der Zytokinproduktion gated. In diesem Gate wurden die Expression von KLRG1 und CD4 beurteilt und auf die Gruppe der KLRG1-CD4+ (B) und auf die Gruppe der KLRG1+CD4+ Zellen (C) gated. Im Teil (B) ist die Produktion von IFN- $\gamma$  bzw. IL-10 der KLRG1-CD4+ Zellen bzw. die Kontrollfärbung mit Ratten-IgG-PE und im Teil (C) die Zytokinproduktion der KLRG1+CD4+ Zellen abgebildet.



**Abb. 4.18. Statistische Darstellung der Ergebnisse mehrerer Stimulationsversuche (n=8).** Die Statistik verdeutlicht, dass unter Berücksichtigung der Standardabweichung in der Zytokinproduktion der KLRG1+CD4+ und der KLRG1-CD4+ Population keine signifikanten Unterschiede auftreten.

### **4.3. Regulatorische Funktion von KLRG1+CD4+ Zellen**

#### ***4.3.1. Proliferationsversuche***

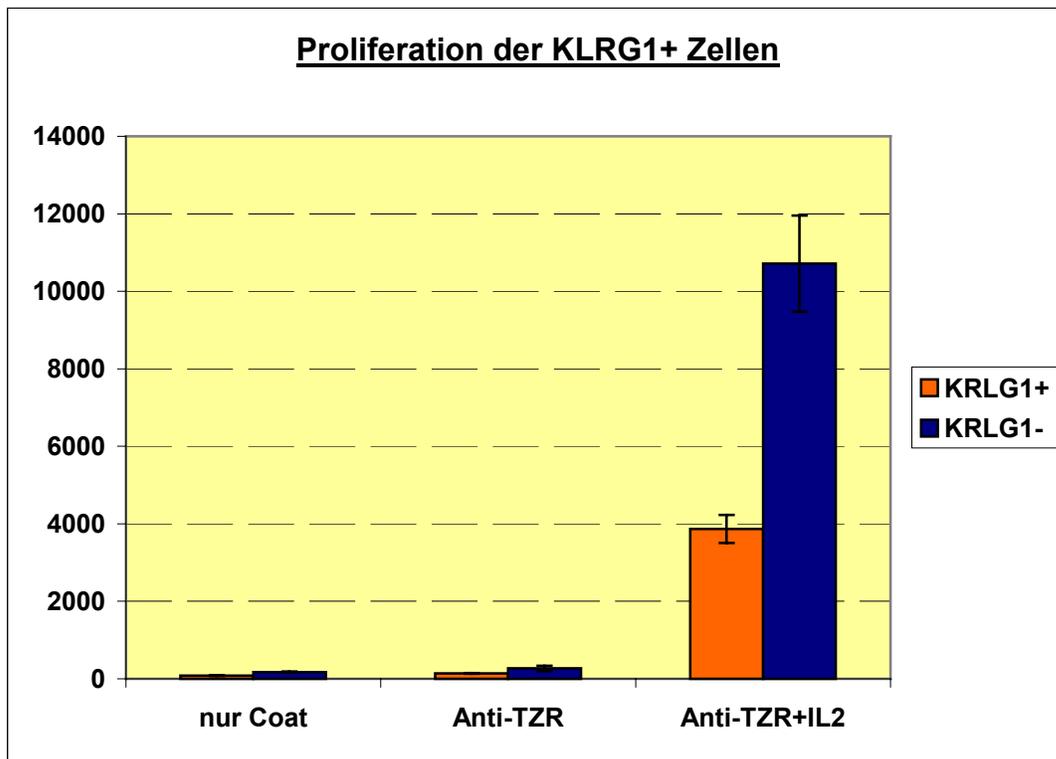
Aufgrund des Phänotyps war anzunehmen, dass es sich bei den KLRG1 exprimierenden CD4 Zellen zum Großteil um regulatorische T-Zellen handelt. Daraufhin wurden die KLRG1 Zellen in vitro auf ihre regulatorische Potenz getestet.

Als ersten Schritt wurde in verschiedenen Modellen untersucht, ob sich die KLRG1+CD4+ Zellen gegenüber TZR-Stimulation in vitro genauso inert und wachstumresistent erwiesen, wie die von Thornton [1998] und Read [1998] beschriebenen regulatorischen CD25+CD4+ bzw. CD38+CD4+ Zellen.

Für die Versuche wurden in der Regel Milzzellen von 25 BALB/c Mäusen im Alter von 6-8 Wochen benötigt. Nach der Aufreinigung erfolgte die Färbung, anschließend wurden sie sortiert und in Kultur genommen, wobei sie vorher noch auf ihre Reinheit getestet wurden.

In den ersten Untersuchungen wurde ausschließlich die Proliferation der gesorteten Zellen getestet. Diese Zellen wurden in die zwei Populationen der KLRG1+CD4+ und KLRG1-CD4+ aufgeteilt und anschließend in drei Versuchsreihen kultiviert. Ein Drittel der Zellen wurde mit IL-2 und plattengebundenem Anti-TZR stimuliert. Ein Drittel erhielt zur Stimulation nur plattengebundenen Anti-TZR und das letzte Drittel wurde nicht stimuliert. Die stimulierten Zellen proliferierten unwesentlich mehr als die unstimulierten Zellen [Abb.4.19.]. Die Zugabe von IL-2 führte zu einem stärkeren Wachstum, aber in jedem Ansatz proliferierten die KLRG1+CD4+ Zellen deutlich weniger als die KLRG1-CD4+ Vergleichspopulation.

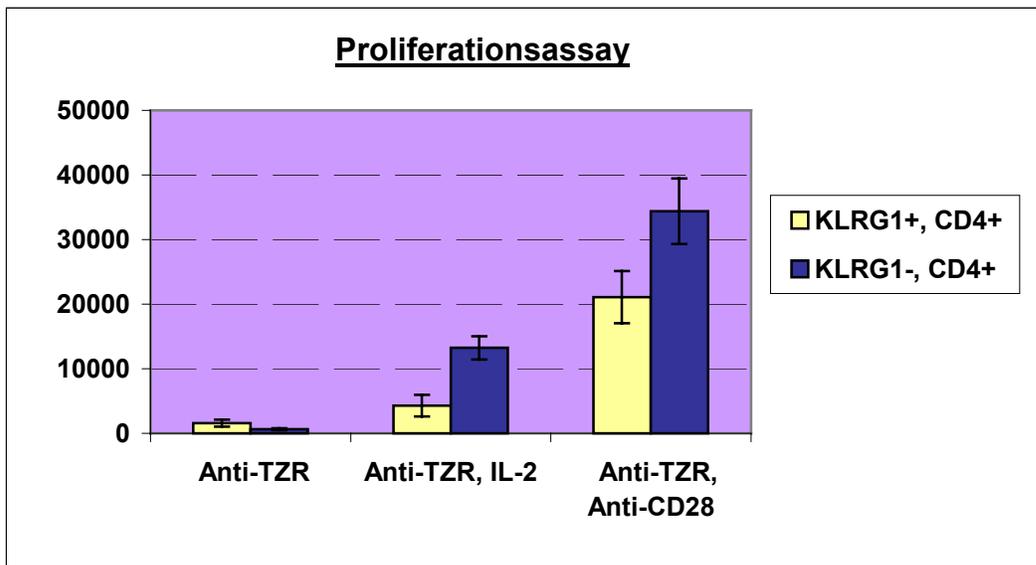
Die Ergebnisse sind im Einklang mit der oben beschriebenen Anergie „klassischer“ regulatorischer T-Zellen auf Anti-TZR-Stimulation.



**Abb. 4.19. Proliferation der KLRG1+ im Vergleich zu den KLRG1-CD4+Zellen (n=3)**  
 Gereinigte KLRG1+CD4+ Zellen wurden 48 h entweder nicht oder mit Anti-TZR (2 µg/ml, H57), z.T. in Kombination mit IL-2 (100U/ml) stimuliert. Die Konzentration der Zellen betrug  $4 \cdot 10^4$ /ml. Nach 24h wurde mit [<sup>3</sup>H]Thymidin gepulst. Die Zellen wurden 24 h später im β-Counter analysiert. Gezeigt ist das durchschnittliche Ergebnis dreier Versuche.

Als Nächstes wurde geprüft, ob sich eine zusätzliche Quervernetzung mit Anti-CD28 positiv auf das Wachstum der KLRG1+CD4+ Zellen auswirkt. Diese Quervernetzung übt in Kombination mit TZR-Stimulation einen starken Wachstumsreiz auf T-Zellen aus. Die KLRG1+CD4+ Zellen proliferierten tatsächlich stärker als unter IL-2 Stimulation, allerdings proliferierten sie weiterhin weniger als die KLRG1-CD4+ Vergleichspopulation. [Abb. 4.20.].

Dieses Ergebnis verdeutlicht im Vergleich zu den KLRG1-CD4+ Zellen die relative Inertheit der KLRG1+CD4+ Zellen gegenüber klassischer Kostimulation.



**Abb. 4.20. Proliferation von KLRG1+ im Vergleich zu KLRG1-CD4+ Zellen unter variierten Stimulationsbedingungen.** Die gesorteten KLRG1+ und KLRG1-CD4+ Zellen wurden mit einer Konzentration von  $4 \cdot 10^5$  für 48 h in Anwesenheit von Anti-TZR (2  $\mu\text{g/ml}$ , H57) und zusätzlich IL-2 (100 U/ml) bzw. Anti-CD28 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert.

#### 4.3.2. Annexinfärbung

Annexin V dient in der Durchflusszytometrie zum Identifizieren von prä-apoptischen und apoptotischen Zellen. Es bindet an Phosphatidylserin, ein negativ geladenes Lipid, das normalerweise auf die cytoplasmatische Seite der Plasmamembran beschränkt ist, sich aber im Falle der Apoptose nach außen verlagert [van Engeland et al., 1998].

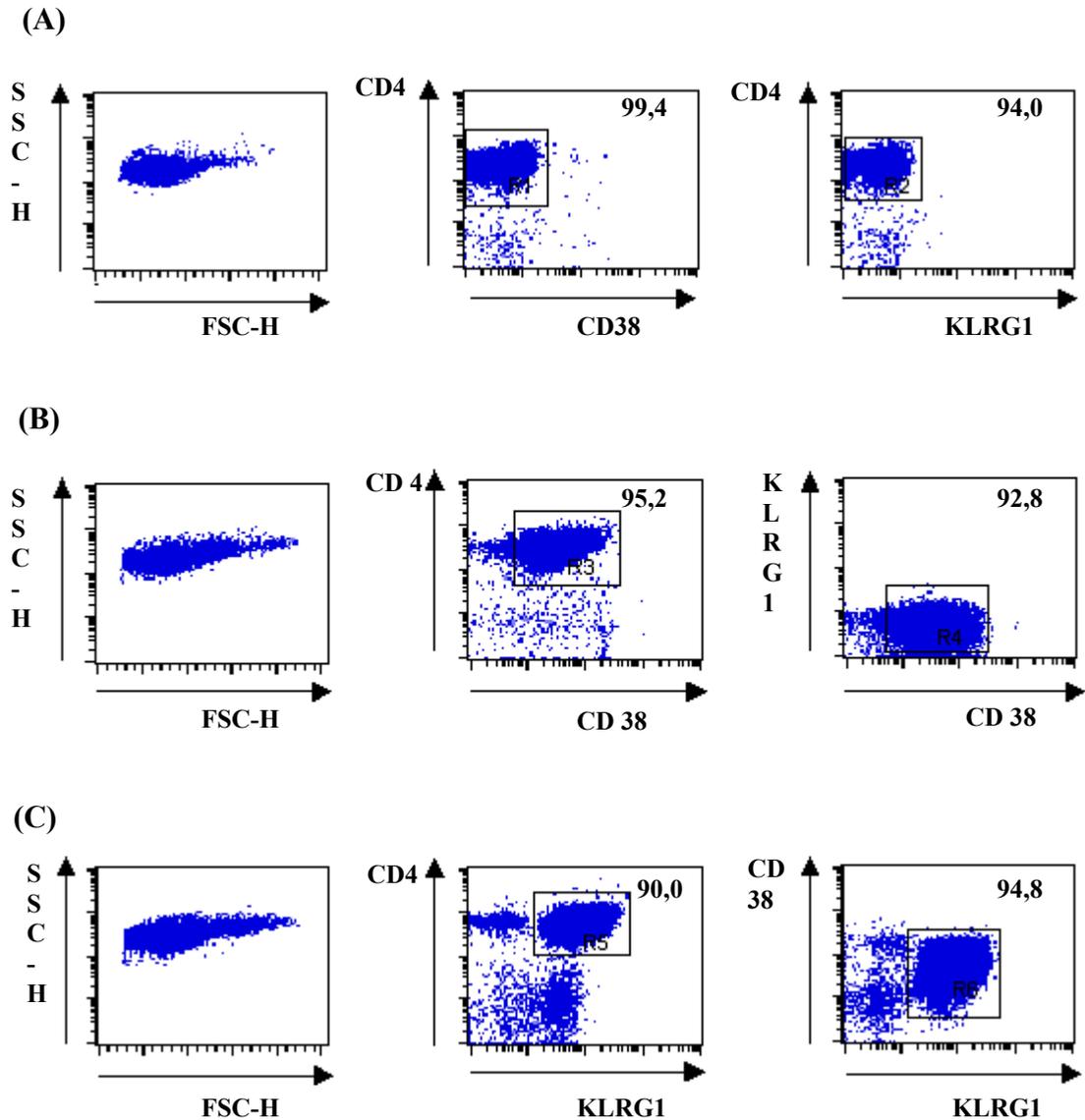
Die verminderte Proliferation der KLRG1+CD4+ Zellen gegenüber den KLRG1-CD4+ Zellen könnte mit einer erhöhten Sterberate der KLRG1+CD4+ Zellen erklärt werden. Aus diesem Grund wurden die Zellen nach 48 h Kultivierung, die z. T. unter Stimulation durch quervernetzten TZR und z. T. ohne Stimulation erfolgte, mit Annexin gefärbt. Die Färbung ergab, dass die KLRG1+CD4+ Lymphozyten weder mit noch ohne TZR-Stimulation Neigung zu Apoptose aufweisen (ohne Abb.). Demnach liegt der verminderten Proliferation von CD4+KLRG1+ Zellen auf antigene T-Zell-Rezeptor Stimulation keine verstärkte Apoptose zugrunde.

### **4.3.3. Co-Kulturen**

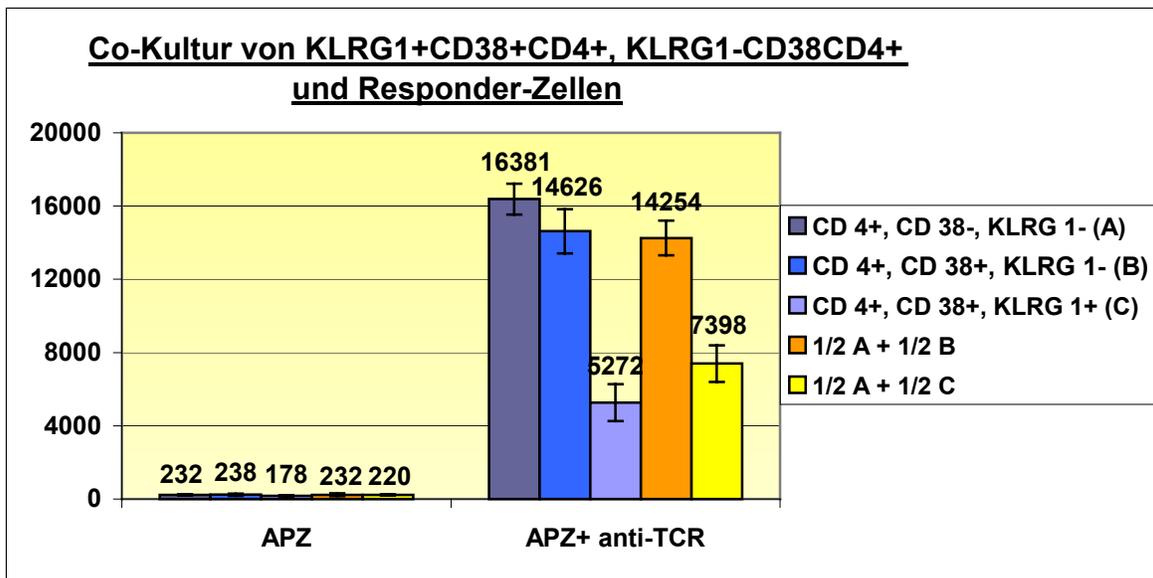
Die verminderte Proliferation von KLRG1+CD4+ Zellen ist noch kein Beweis, sondern nur ein Hinweis für ihr regulatorisches Potenzial. Um herauszufinden, ob KLRG1+CD4 Zellen in vitro suppressiv sind, wurden Co-Kulturen mit sortierten KLRG1+CD4+ als möglicher Suppressorzellen und KLRG1-CD4+ Zellen als Responder/Indikatorzellen angesetzt. Wie aus den Oberflächenfärbungen ersichtlich, tragen nahezu alle KLRG1+ Zellen auch CD38 auf ihrer Oberfläche. Die CD38+ Zellen sind als regulatorische T-Helferzellen beschrieben worden, und in den entsprechenden Versuchen zeigte sich ein Verhältnis von 1:1 von Indikator/Responder-Zellen zu Regulator-Zellen zur Regulation am wirkungsvollsten [Read et al., 1998].

Eine CD38-KLRG1+CD4+ Population existiert nicht, aber um einen Hinweis für die regulatorischen Fähigkeiten von KLRG1+CD4+ Zellen zu erhalten, wurde eine KLRG1-CD38+CD4+ Vergleichspopulation gebildet. In den folgenden Experimenten ließ sich belegen, dass die Inertheit und das regulative Potenzial der KLRG1+ Zellen über dem der ausschließlich CD38+CD4+ Zellen liegt. Daraus kann geschlossen werden, dass KLRG1 ein zusätzlicher Marker für funktionell potente regulatorische CD4 Zellen ist.

In Abb. 4.21. sowie Abb. 4.22. ist ein beispielhafter Versuch der Co-Kultur nach TZR-Stimulation dargestellt. Man erkennt, dass die Proliferation der KLRG1+ Zellen im Vergleich zu den KLRG1-CD38-CD4+ Zellen, aber auch im Vergleich zu den KLRG1-CD38+CD4+ Zellen, stark eingeschränkt ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die KLRG1+CD38+CD4+ Zellen stärker hemmend auf Indikator/Responderzellen wirken als KLRG1-CD38+CD4+ Zellen. So schränken die KLRG1+CD38+CD4+ Zellen das Indikator/Responderzellwachstum um 32% ein, die KLRG1-CD38+CD4+ Zellen erreichen dagegen in diesem Versuch nur eine etwa 10% Wachstumsminde rung der Indikator/Responderzellen.

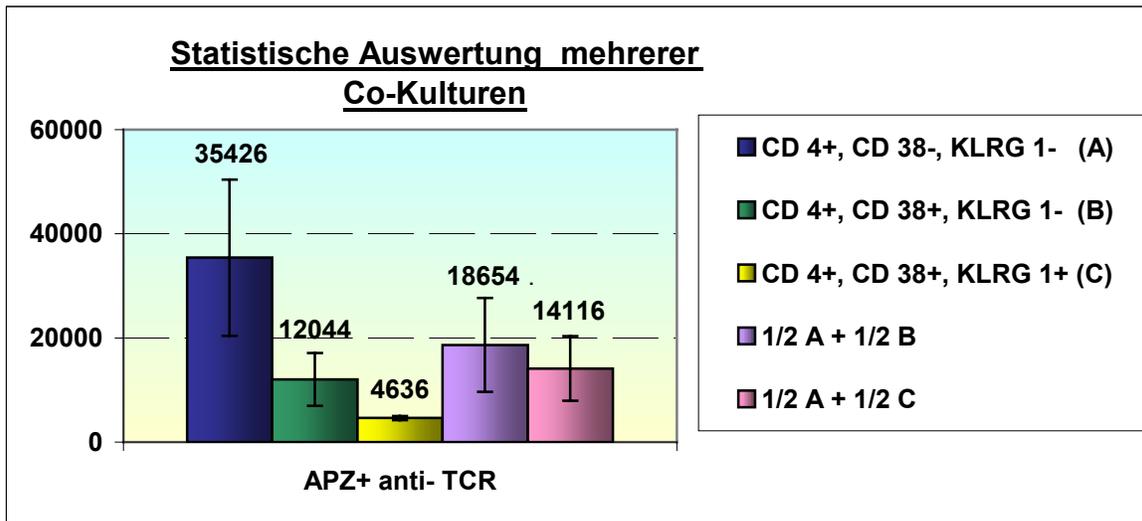


**Abb. 4.21. Reinheit der aus BALB/c Mäusen gewonnenen Zellpopulationen nach MACS-Säulen-Passage und nach der Anreicherung durch Zellsortierung.** (A) zeigt die Responderzellen, also die KLRG1-CD38-CD4<sup>+</sup> Population. (Ba) stellt die KLRG1-CD38+CD4<sup>+</sup> Regulatorzellen dar und (C) bildet die KLRG1+CD38+CD4<sup>+</sup> Regulatorpopulation ab. Durch das Zell-Sorting konnten die unterschiedlichen Zellpopulationen in diesem Fall in einer Reinheit von über 90% erhalten werden.

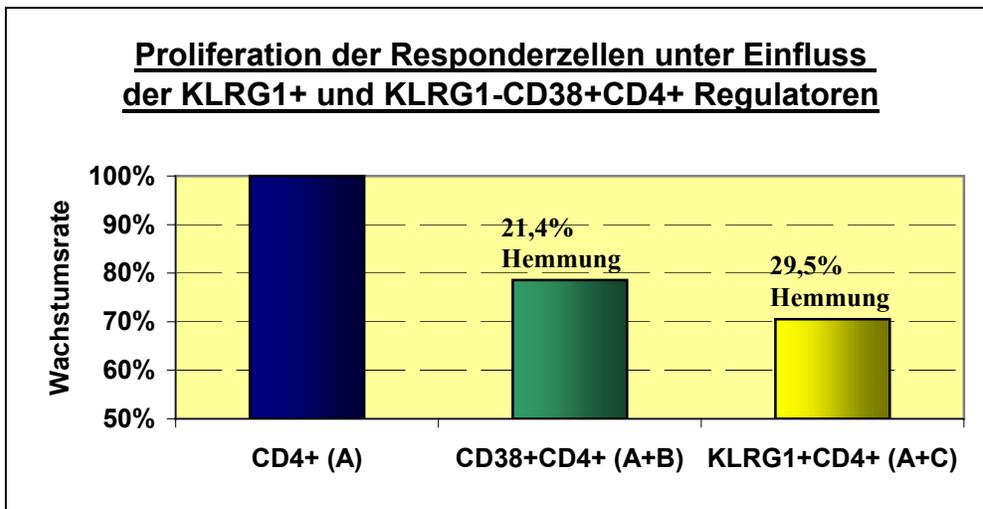


**Abb. 4.22. Darstellung des Ergebnisses der Stimulationsversuche der nach Abb. 4.21. gesorteten Populationen.** Die Zellen sind mit nicht T-Zell depletierten durch Bestrahlung (25 Gray) aber inaktivierten APZ und zur Hälfte noch zusätzlich mit 2 µg/ml Anti-TZR (H57) stimuliert worden. Man erkennt, dass keine Zellgruppe unter reiner APZ-Stimulation wächst, aber unter TZR Stimulation sind deutliche Proliferationseinschränkung und die Regulationsfähigkeit auf andere CD4+ Zellen durch die KLRG1+Zellen zu erkennen. Aus der Abbildung ist auch ersichtlich, dass die KLRG1+ Zellen das regulative Potenzial der KLRG1-CD38+ Zellen übertreffen.

Die Durchschnittswerte der Versuche zeigen, dass das regulative Potenzial der KLRG1+CD38+CD4+ Zellen über dem der KLRG1-CD38+CD4- Zellen lag und somit die Behauptung gefestigt werden kann, dass KLRG1 ein zusätzlicher vermutlich von einer Untergruppe der regulatorischen T-Zellen ausgebildeter Rezeptor ist. In Abb. 4.23 und in sind die zusammengefassten Ergebnisse der Regulationsversuche dargestellt. Die Einschränkung des Wachstums der CD4+ Responder-Zellen durch die KLRG1+CD38+CD4+ Population betrug 29,4% [Abb.4.24]. Dies ist eine bessere Regulationsfähigkeit als die der KLRG1-CD38+CD4+ Zellen, die ein um 21,5% reduziertes Wachstum der Responder-Zellen erreicht haben. Der Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen ist allerdings mit 9% nicht besonders groß, aber dennoch signifikant.



**Abb. 4.23. Statistische Auswertung mehrerer Co-Kulturen.** Hier sind die Co-Kulturversuche nach Sort (n=3) dargestellt, wobei die Konzentration der Zellen in Kultur bei  $1 \cdot 10^5$ /ml, die Menge der APZ bei  $5 \cdot 10^6$  und die Konzentration des Anti-TZR (H57) bei  $2 \mu\text{g/ml}$  lag. Man erkennt, dass die KLRG1+CD38+CD4+ Zellen über eine höhere regulative Kapazität verfügen als die KLRG1-CD38+CD4+ Zellen.



**Abb. 4.24. Prozentuale Darstellung der Hemmung.** Hier ist das prozentuale Wachstum der Responderzellen in den Co-Kulturen dargestellt. Man erkennt, dass das regulative Potenzial der KLRG1+ CD4+ Zellen (C), das der KLRG1- CD38+ CD4+ Zellen (B) etwa um 1/3 übertrifft. Einschränkend muss allerdings festgehalten werden, dass der Unterschied der regulatorischen Fähigkeit von etwa 8 % als nicht als besonders hoch einzustufen ist.

## **5. Diskussion**

Der Killer Cell Lectin-like Receptor G1 (KLRG1) ist ein auf natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) in Mäusen ausgeprägter Marker, der wie die meisten NK-Zell Marker [D'Andrea et Lanier, 1998] auch auf CD8+ T-Zellen [Beyersdorf et al., 2001] und, wie in dieser Arbeit belegt, auch auf CD4+ T-Zellen ausgeprägt ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass 1-2% der aus der Milz von Mäusen gewonnenen CD4+ Lymphozyten KLRG1 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die KLRG1+CD4+ Zellen haben eine hohe Konkordanz mit Markern für regulatorische Zellen. Es tragen etwa zwei Drittel der KLRG1+CD4+ Zellen CD25 und nahezu alle auch CD38 auf ihrer Oberfläche. Weiterhin exprimieren die KLRG1+CD4+ Zellen zu 100% CD44 und zu etwa 60% CD43. KLRG1+CD4 Zellen haben ein polyklonales T-Zell-Rezeptor-Repertoire mit einer leicht erhöhten Expression der V $\beta$ 8.1/2 Kette. Nur 4,5% der KLRG1+CD4+ Zellen tragen auch den NK-Zell-Marker NK1.1. auf ihrer Oberfläche. KLRG1+CD4+ Zellen sind nicht im Thymus der untersuchten Mäuse anzutreffen, befinden sich aber in unterschiedlichen Konzentrationen in allen weiteren untersuchten lymphatischen Kompartimenten.

Sie zeigen in Kultur ein gegenüber TZR-induzierter Proliferation anerges Verhalten und haben das Potenzial naive CD4+ Zellen zu supprimieren. Der Vergleich der KLRG1+CD38+CD4+ Zellen zu den KLRG1-CD38+CD4+ Zellen ergab, dass die KLRG1+CD38+ Population über ein größeres regulatorisches Potenzial als die KLRG1-CD38+CD4+ Population verfügen. Weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass auch KLRG1+CD25-CD4+ Zellen ebenfalls dazu befähigt sind, naive CD4+ Zellen zu regulieren (Hanke et al., unveröffentlichte Daten).

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen somit nahe, dass KLRG1+CD4+ Zellen in ihrer Funktion zu einer Untergruppe der regulatorischen T-Zellen gehören.

Die Existenz von regulatorischen T-Zellen ist eine nun schon allgemein akzeptierte und dokumentierte Tatsache. Allerdings liegen der Phänotyp, die Herkunft, die einzelnen Untergruppen und die genaue Funktion nach wie vor zumindest teilweise im Dunkeln.

## **5.1. Der Phänotyp der KLRG1+CD4+ Zellen**

Die Ausprägung von KLRG1+ auf den CD4+ Lymphozyten der Milz beträgt 1-2% [Abb. 4.1.].

Das T-Zell Rezeptor Repertoire der KLRG1+CD4+ Zellen ist polyklonal und entspricht weitgehend der Ausprägung der normalen CD4+ Zellen, bis auf eine überdurchschnittliche Expression von V $\beta$ 8.1/2 [Abb. 4.2.]. Diese Tatsache birgt aber per se keinen Hinweis auf die Zugehörigkeit oder Nichtzugehörigkeit dieser Zellen zu einer spezialisierten Untergruppe von CD4+ Zellen, zu denen die KLRG1+CD4+ aufgrund der Expression eines inhibitorischen Rezeptors möglicherweise gehören könnten. KIR-exprimierende CD4+ Zellen besitzen nach der ex vivo Analyse von D'Andrea et Lanier [1998] ebenfalls ein polyklonales Repertoire, wie auch die als Zellen mit regulatorischem Potenzial vorgeschriebenen CD25+ Zellen [Sakaguchi et al, 1995].

Es ist gezeigt worden, dass der T-Zell-Rezeptor der regulatorischen T-Zellen eine ungewöhnlich hohe Affinität hat, was unter anderem für die Selektion im Thymus von Bedeutung ist [Modigliani et al., 1996] [Apostolou et al., 2002].

Im Vergleich zu der naiven CD4+ Population ist die Ausprägung der Marker für regulatorische T-Zellen auf KLRG1+CD4+Zellen spezifisch höher als auf den KLRG1-CD4+ Zellen. Es konnte bislang nicht geklärt werden, ob sich die regulatorischen Marker gegenseitig induzieren bzw. ob eine Co-Expression der Marker eventuell auf einen gesonderten Aufgabenbereich dieser regulatorischen T-Zellen hindeuten könnte.

Die nahezu 100%ige Expression von CD38 auf den KLRG1+ Zellen in der Kombination mit 60%iger CD25+ Ausprägung und einem Anteil von etwa 70% "CD45RB<sup>low</sup>" Zellen ist signifikant höher als auf KLRG1-CD4+ Zellen [Abb. 4.6.]. Dies ist ein erster Hinweis auf eine mögliche Zugehörigkeit der KLRG1+CD4+ Zellen zu der Gruppe der regulatorischen T-Zellen.

Ins Auge springt auch die Ausprägung von CD44 auf etwa 100% der KLRG1+CD4+ Zellen [Abb. 4.7.]. CD44 ist ein Klasse I transmembranes Glycoprotein, das auf den meisten Wirbeltierzellen exprimiert wird. Es bindet extrazellulär vor allen an Hyaluronsäure, aber auch Kollagen, Fibronectin und Laminin sowie intrazellulär u.a. an

das Cytoskelett [Ponta et al., 2003]. CD44 ist also ein Rezeptor zur Adhäsion der Zelle. Hyaluronsäure wird insbesondere in Entzündungsherden vermehrt gebildet und daher reichern sich CD44+ Zellen insbesondere in Entzündungsgebieten an [Mikecz et al., 1995]. Eine hohe Expression von CD44 in Kombination mit einem "CD4RBlow" und CD62L-, CD25- und CD69- Phänotyp gilt als ein Kennzeichen für Memory-Zellen. CD44 Expression in Kombination mit CD69+ und CD25+ ist ein Kennzeichen für Effektor-Zellen [Sprent J. et al., 1994]. Durch die in dieser Arbeit gezeigte vollständige Expression von CD44 auf KLRG1+CD4+Zellen ist anzunehmen, dass alle KLRG1+CD4+ Zellen schon mit Antigen in Kontakt gestanden haben, also Antigen erfahren sind. KLRG1 scheint auf Lymphozyten erst sekundär nach Antigenkontakt induziert und durch fortwährende Antigenstimulation aufrechterhalten zu werden. So zeigten Thimme et al., dass repetitive und persistierende Antigen Stimulation die KLRG1 Expression auf virusspezifischen CD8+ T-Lymphozyten ansteigen lässt. Im Menschen befindet sich KLRG1 vorrangig auf CD8+ T-Zellen, die gegen zu chronischen Infektionen führende Viren gerichtet sind [Thimme et al., 2005].

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der wie hier gezeigt auf KLRG1+ Zellen häufig auftretende Marker CD43 [Abb. 4.8.]. CD43 wird auf über 60% der KLRG1+CD4+ Zellen exprimiert, was deutlich über der etwa 10%igen Ausprägung auf KLRG1-CD4+ Zellen liegt. CD43, auch als Leukosialin oder Sialophorin bezeichnet, ist ein Transmembran Typ I Protein, das wahrscheinlich für die Regulation des ersten Kontaktes zwischen Zellen verantwortlich ist, wobei der Kontakt sowohl adhäsiv als auch repulsiv sein kann [Ostberg et al., 1998]. CD43 ist auch in die Co-Stimulation von T-Zellen involviert und stimuliert T-Zellen sogar, wenn CD28 nicht vorhanden ist [Sperling et al., 1995]. Es zeigt eine dynamische Rolle in der Beeinflussung der Immunantwort, zum einen nämlich wirkt es aktivierend in Bezug auf die Co-Stimulation und der Hinführung der T-Zellen (hier CD8+) zum Ort des Geschehens, andererseits wirkt es auch inhibierend [Onami et al., 2002]. Weiterhin scheint es auf CD4+ Memory-Zellen das co-stimulatorische Signal zu unterstützen und dadurch verstärkende Funktion auf die TZR-getriggerte Aktivierung zu haben [Kyoizumi et al., 2004].

Die Expression und Funktion von CD43 auf regulatorischen T-Zellen ist bislang wenig untersucht worden. Somit ist die Funktion von CD43 auf KLRG1+CD4+ Zellen noch zu

diskutieren: Die von Co-Stimulation unabhängige stärkere Aktivierung der KLRG1+ T-Zellen durch CD43 ist als mögliche Funktion des CD43 auf den KLRG1+CD4+ Zellen unwahrscheinlich, da sie sonst in der Zellkultur nicht anerg reagieren würden.

Eher könnte das CD43 auf den KLRG1+CD4+ Zellen dazu dienen, engere Wechselwirkungen mit den Responderzellen einzugehen und so gezielter auf bestimmte Zellen einzuwirken. Eine Klärung dieser Frage wird zusätzlicher Experimente bedürfen. Die KLRG1+CD4+ Zellen sind in Bezug auf die Expression der jeweiligen Oberflächenmarker nicht eindeutig einer Gruppe zuzuordnen [Abb. 4.8.]. Der Phänotyp der KLRG1+ CD4+ Zellen und der CD25+CD4+ Zellen ist ähnlich (s. Einleitung), es gibt aber auch Unterschiede. So gehören nur etwa 60% der KLRG1+CD4+ zu den "CD45RBlow" Zellen, aber, wie bereits erwähnt, exprimieren alle CD44, und nahezu 100% der KLRG1+CD4+ Zellen tragen CD38 auf der Oberfläche.

Bemerkenswerterweise scheinen sich die KLRG1+CD4+, die aus für KLRG1 transgenen C57BL/6 Mäuse gewonnen wurden, von denen aus Wildtyp C57BL/6 Mäusen zu unterscheiden. Beide Zellpopulationen haben einen unterschiedlichen Phänotyp, die KLRG1+CD4+ Zelle einer transgenen Maus entspricht von der Ausprägung ihrer Oberflächenmoleküle eher einer gewöhnlichen CD4+ Zelle. Daraus folgt, dass die Oberflächenexpression von KLRG1 nicht ausreichend ist, um einen Treg Phänotyp hervorzurufen.

## **5.2. Organfärbungen**

### ***5.2.1. Thymus***

Nach verschiedenen Studien zu urteilen, bildet sich die Population der „natürlichen“ d.h. CD25+ regulatorischen T-Zellen im Thymus [Shevach EM, 2001]. Dies ist laut Seddon und Mason [2000] möglicherweise sogar eine der Hauptaufgaben des Thymus.

Die Thymektomie in der frühen Entwicklungsphase von Mäusen führt zu Autoimmunerkrankungen, was ein Hinweis für die Bildung zumindest einer Population der Toleranz induzierenden Immunzellen im Thymus bedeutet. Allerdings bleibt die Frage offen, warum Mäuse mit 1dTx und 7dTx keine Autoimmunoophoritits entwickeln [Nishizuka et al., 1969]. Eine mögliche Erklärung für die Gesundheit der 7dTx Mäuse, nämlich dass ihre regulatorischen/toleranzinduzierenden Zellen die Peripherie schon

erobert haben, wird mit der mangelnden Protektion vor der Autoimmunkrankheit durch die Gabe von Milzzellen, die aus 7 Tagen alten Mäusen entnommen wurden, entkräftet.

Eine andere Erklärung für diese Reaktion wäre, dass sich erst im Verlauf der ersten drei Lebenstage die auto-reaktiven Zellen bilden. Die auf diese Zellen regulatorisch wirkenden Zellen werden erst nach Kontakt mit autoreaktiven Zellen im Thymus entwickelt und wandern erst im höheren Alter in die Peripherie aus.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich KLRG1+CD4+ Zellen zu keinem Zeitpunkt des Lebens der geborenen Maus im Thymus nachweisen lassen, und auch dass CD38+ Zellen dort nicht vertreten sind. Dagegen gehören „natürliche“ regulatorische CD4+CD25+ Zellen im Thymus zu einer Gruppe von Zellen mit suppressiver Wirkung auf autoreaktive T-Zellen [für einen Übersichtsartikel siehe Shevach 2000].

Daraus lässt sich folgern, dass KLRG1 erst in der Peripherie auf CD4+ Zellen induziert wird, womit KLRG1+CD4+ Zellen also eine andere Herkunft haben, als die CD25+CD4+ Zellen. KLRG1+CD4+ Zellen könnten eine spezialisierte Untergruppe repräsentieren, die sich erst durch spezielle Bedingungen in der Peripherie bildet, zum anderen könnte es sich aber auch um eine völlig anderen Linie einer regulatorischen Zellpopulation handeln.

CD25+CD4+ Zellen sind genau wie CD38+ und KLRG1+CD4+ Zellen in den Milzen drei Tage alter Mäuse nachzuweisen. Dennoch sind Lymphozyten, die aus den Milzen 7 Tage alter Mäuse gewonnen wurden, nicht in der Lage eine Autoimmunoophoritis zu verhindern, die Transplantation des Thymus hingegen schon. Dafür lassen sich unterschiedliche Erklärungsansätze finden: Shevach [2000] versuchte dieses Ergebnis über die geringe Anzahl von regulatorischen T-Zellen in den Milzen zu erklären. Gegen diese Erklärung spricht aber, dass der prozentuale Anteil dieser Zellen im Laufe des Lebens konstant ist. So ist zwar die absolute Zahl von regulatorischen T-Zellen in der Milz von neugeborenen Mäusen sehr klein, aber auch die Gesamtmenge an T-Zellen insbesondere CD4+ Zellen ist extrem niedrig, so dass das Verhältnis der Responder- zu Regulator-Zellen im Vergleich zu erwachsenen Mäusen unverändert ist.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, dass die Zellentwicklung auch der regulatorischen Zellen stufenweise erfolgt und erst nach der Bildung von selbstreaktiven Zellen durch diese induziert wird. So ist es möglich, dass die

regulatorischen T-Zellen, die sich in verschiedenen Versuchen als anerg herauskristallisiert haben, erst eine Wechselwirkung mit selbstreaktiven Zellen und Thymuszellen benötigen, um aktiviert zu werden. Dieser Vorgang ist vergleichbar mit dem doppelten Signal, das eine naive T-Zelle in eine Effektor T-Zelle umwandelt. Damit könnte erklärt werden, dass sich regulatorische Zellen in der Peripherie befinden, aber nicht in der Lage sind, Autoimmunkrankheiten zu verhindern. Die Aktivierung muss in Verbindung mit der Ausbildung der Zellen im Thymus vom dritten bis zum siebten Tag stehen. Hier sind verschiedene Möglichkeiten zu diskutieren: Zum einen könnten Autoimmunoophoritis verursachende Zellen durch Modifikation im Thymus die regulatorischen Zellen aktivieren oder ausbilden, zum anderen könnten die regulatorischen T-Zellen erst durch eine Thymuspassage die Reife erlangen. In diesem Fall allerdings dürften weder CD38+ noch KLRG1+ Zellen zu den regulatorischen T-Zellen gehören, da sie zu keinem Zeitpunkt im Thymus anzutreffen sind. Ebenso wie KLRG1+Zellen zeigen auch CD38+CD4+ Zellen regulatorische Fähigkeiten [Read et al., 1998] [Abb. 4.23.], also ist die letztgenannte Variante eher unwahrscheinlich.

Eine andere Hypothese auch in Anbetracht des heterogenen Phänotypes der KLRG1+CD4+ Zellen ist die Vorstellung, dass die KLRG1+CD4+ Zellen ein Teil der in vivo induzierten regulatorischen T-Zellen sind. Sie würden damit zu einer Gruppe von spezialisierten regulatorischen Zellen gehören, die ein definiertes Repertoire an zu regulierenden Zielzellen hat. Alle KLRG1+CD4+ Zellen sind offenbar Antigen erfahren. Es ist denkbar, dass die KLRG1+CD4+ Zellen nur T-Zellen regulieren können, die ebenfalls Erfahrung mit diesem spezifischen Antigen gesammelt haben, und dass gegen andere Autoantigene gerichtete reaktive T-Zellen nicht zu den zu regulierenden Zielzellen gehören.

Es gibt verschiedene Typen von regulatorischen T-Zellen, die durch bestimmte Bedingungen in der Peripherie induziert werden können. So entsteht die Population der IL-10 und TNF- $\beta$  produzierenden Tr1 Zellen aus in Gegenwart von IL-10 aktivierten CD4-Zellen [Roncarolo et al., 2001]. Die regulatorischen Th3 Zellen entstehen ebenfalls in der Peripherie, sie werden induziert durch die orale Verabreichung von Antigenen und üben ihre regulatorische Funktion insbesondere durch die Produktion von TGF- $\beta$  aus [Weiner HL, 2001]. Da die Zytokinproduktion von ex vivo stimulierten

KLRG1+CD4+ Zellen jedoch keine Besonderheiten aufwies, ist derzeit unklar, ob sie den Tr1 Zellen, den Th3 Zellen oder keinen von beiden zuzuordnen sind.

Andere Modelle deuten darauf hin, dass neben der Bildung im Thymus sogar „natürliche“ CD25+ regulatorische T-Zellen auch in der Peripherie gebildet werden. So bilden sich in direkt nach der Geburt thymektomierten Mäusen CD25+CD4+ Zellen und erreichen nach 3 Monaten eine normale Anzahl [Asano et al., 2002]. Auch im Menschen gibt es Hinweise für eine durch Induktion von Anergie in der Peripherie entstehender, antigenspezifischer Subpopulation von CD25+CD4+ regulatorischen Zellen [Akbar et al., 2003].

### ***5.2.2. KLRG1+CD4+Zellen in weiteren lymphatischen Organen***

In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass man durch die Transplantation von Lymphknotengewebe, Milz und auch Knochenmark, das von älteren Mäusen gewonnen wurde, Autoimmunerkrankungen verhindern kann [Sakaguchi et al., 1994]. Auch im Blut, allerdings von Menschen, sind regulatorische Zellen beschrieben worden [Jonuleit et al., 2001] [Dieckmann et al., 2001] [Baecher-Allan et al., 2001] [Earle et al., 2005] und viele andere Publikationen. Die Arbeitsgruppe um Pircher konnte auch KLRG1 im Blut des Menschen nachweisen [Voehringer et al., 2002]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass KLRG1+CD4+ Zellen in allen genannten Kompartimenten der Maus vertreten sind.

Interessanterweise ist der Killer Cell Lectin-like Receptor G1 auf CD4+ Zellen im Knochenmark mehr als doppelt so häufig anzutreffen wie auf den T-Helferzellen in der Milz. Das könnte bedeuten, dass KLRG exprimierende T-Zellen präferentiell in das Knochenmark wandern. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da zum einem die transgene Expression von KLRG1 auf T-Zellen keine Anreicherung im Knochenmark bewirkt, zum anderen auch der adoptive Transfer von T-Zellen, die KLRG1 auf hohem Niveau exprimieren, nicht zu einem präferentiellen „Homing“ in das Knochenmark führt [Beyersdorf N und Hanke T, unveröffentlichte Daten]. Es ist also anzunehmen, dass der hohe Anteil an KLRG1+CD4+ Zellen dem vermehrten Auftreten von NKT-Zellen im Knochenmark zuzuschreiben ist, da ja ein Teil der NKT-Zellen auch KLRG1 auf der Oberfläche trägt. NKT-Zellen verteilen sich unterschiedlich in den verschiedenen Organen der Maus. So machen sie etwa 20-30% der T-Zellen in der

Leber aus und beteiligen sich zu 0,5-1% an der Menge der T-Zellen im Thymus und in der Milz. Im Knochenmark sind etwa 30% der T-Zellen NKT-Zellen [Zeng et al., 1999]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieser Punkt noch nicht ausreichend geklärt werden und sollte zukünftig durch weitergehende Färbungen untersucht werden.

### ***5.2.3. Die Verteilung von KLRG1+ auf den T-Helferzellen in der Ontogenie***

Die Ausprägung von KLRG1 ist in allen untersuchten Altersgruppen der Mäuse in der Milz nahezu konstant bei 1-2%. [Abb. 4.12.] Das könnte dafür sprechen, dass das Verhältnis von regulatorischen T-Zellen zu den Responder Zellen genetisch festgelegt ist und, um das immunologische Gleichgewicht zu wahren, lebenslang konstant bleibt.

## **5.3. Zytokinversuche**

IFN- $\gamma$  ist ein Typ 1 Zytokin, das sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunabwehr eine Schlüsselrolle innehat. Die Expression von IFN- $\gamma$  ist von einem komplexen Zusammenspiel mit akzessorischen Zellen (Makrophagen und dendritischen Zellen), T-Lymphozyten und NK-Zellen abhängig [Shtrichman et al., 2001]. IFN- $\gamma$  verstärkt die Immunantwort, indem es die Makrophagen stimuliert. Von Th1-Zellen produziertes IFN- $\gamma$  bewirkt eine Differenzierung von B-Zellen und induziert die IgG2a Synthese sowie die Th1-Zell Differenzierung. Zusätzlich aktiviert es neutrophile Granulozyten, die Expression von MHC-I und MHC-II sowie die T-Killer Zellen [Boehm et al., 1997]. Die Produktion von IFN- $\gamma$  wird von IL-12, IL-15 und IL-18 stimuliert und von IL-10 inhibiert. Die Induktion von IFN- $\gamma$  Expression ist zusätzlich durch die Aktivierung vom TZR-Komplex und der Interaktion von CD28 mit B7 Protein gesteuert [Walker et al., 1999].

Bei Auslösen von Autoimmunerkrankungen wurde ein Zusammenhang von IFN- $\gamma$  mit autoaggressiven Reaktionen beschrieben: Die Injektion von "CD45RB<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>" Zellen führt zu einer intestinalen Entzündung unter der Produktion hoher Mengen von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  [Powrie et al., 1994].

IL-10 ist ein potentes immunsuppressives Zytokin, das die Immunantwort supprimiert, indem es auf dendritische Zellen und andere Antigen präsentierende Zellen wirkt und deren Reifung verhindert [Moore et al., 2001]. In der Maus wird IL-10 vorrangig von

Th2 Zellen, B-Zellen, Antigen präsentierenden Zellen und regulatorischen Zellen sezerniert. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass IL-10 genau wie TGF- $\beta$  für den suppressiven Mechanismus von regulatorischen T-Zellen in vivo essentiell ist [für einen Übersichtsartikel siehe Powrie F., 2004].

IL-10 ist notwendig für die Toleranz eines alloantigenen Transplantates, da die Hemmung dieses Zytokins zur Abstoßung führt [Hara et al., 2001]. CD25+CD4+ T-Zellen sezernieren laut Asano et al., [1996] hohe Konzentrationen von TGF- $\beta$  und IL-10. In einer anderen Arbeit wird jedoch beschrieben, dass die IL-10 Produktion von CD25+CD4+ Zellen kaum nachweisbar ist [Thornton et al., 1998]. Dieses Resultat konnte von Suri-Payer et al., [1999] bestätigt werden. Sie zeigten, dass CD25+CD4+ Zellen nur eine geringfügige Menge von IL-10 sezernieren und ihr Wirkungsmechanismus in vitro Zytokin unabhängig ist [Suri-Payer et al., 1999]. In vivo Experimente bewiesen jedoch, dass IL-10 für die Funktion der Regulatorzellen erforderlich ist: CD25+CD4+ Zellen, die aus für IL-10 defizienten Mäusen stammen, wirken nicht proliferationshemmend [Annacker et al., 2001]. Auch in einem anderen Modell wurde die Notwendigkeit von IL-10 für die regulatorische Wirkung der Treg-Zellen deutlich: So kann die Verabreichung von Anti-IL-10 in erwachsenen Mäusen Colitis induzieren [Asseman et al., 2003].

Weiterhin wird durch IL-10 die Population der Tr1 Zellen induziert, die über dieses Zytokin auch ihre Wirkung entfalten [Groux et al., 1997].

Die in dieser Arbeit durchgeführte intrazelluläre Färbung der 48 h lang stimulierten KLRG1+CD4+ Zellen auf IFN- $\gamma$  und IL-10 Produktion ließ weder eine eindeutige Zuordnung zu den Th1 oder Th2 Zellen feststellen noch konnte ein signifikanter Unterschied in der intrazellulären Produktion von IFN- $\gamma$  oder IL-10 der KLRG1+CD4+ zu den KLRG1-CD4+ Zellen nachgewiesen werden [Abb. 4.18.].

Die absolute Menge des gebildeten IFN- $\gamma$  und IL-10 der restimulierten KLRG1+CD4+ Zellen hatte ein mit anderen als regulatorisch bekannten Zellen vergleichbares Niveau: Regulatorische "CD45RB<sup>low</sup>" T-Zellen, die mit PMA/Ionomycin stimuliert wurden, produzierten zu 15% IFN- $\gamma$  und zu 3% IL-10. CD25+ Zellen, je nachdem ob sie  $\alpha\epsilon$  positiv oder  $\alpha\epsilon$  negativ sind, sezernierten zu 2% bis 10% IL-10 sowie zu 0% bis 5% IFN- $\gamma$ .  $\alpha\epsilon$ +CD25-CD4+ Zellen produzieren zu 20% IFN- $\gamma$  und zu 6% IL-10 [Lehmann et al., 2002]. Von den 72 h lang mit APZ und Anti-CD3 stimulierten CD38+CD4+

Zellen produzieren 20% IL-10, ebenfalls 20% dieser Zellen beteiligen sich an der IFN- $\gamma$  Produktion [Read et al., 1998].

Die KLRG1+CD4+ Zellen produzieren im hier gezeigten Modell nach Restimulation mit PMA/Ionomycin zu etwa 8% IFN- $\gamma$  und zu etwa 2% IL-10.

Insgesamt zeigten aber alle kultivierten Zellen eine erstaunlich niedrige Zytokinproduktion. So produzierten auch die KLRG1-CD4+ Zellen, die als naive Zellen gelten, nach Restimulation nur zu etwa 9% IFN- $\gamma$ . Im Vergleich dazu sind 52,3% der naiven "CD45RB<sup>high</sup>" Zellen aus der Lamina propria nach 12 h Stimulation mit Anti-CD3 in der Lage IFN- $\gamma$  zu sezernieren [Asseman et al., 1999].

Das hier erhaltene Zytokinprofil der KLRG1+ Zellen schließt keineswegs eine Zugehörigkeit zu einer regulatorischen Zellpopulation aus, allerdings lässt die schwache Zytokinproduktion der naiven T-Zellen den Verdacht aufkommen, dass die Zellen insgesamt nicht ausreichend stimuliert worden sind.

Eine andere Erklärung bietet der von uns verwendete unterschiedliche Versuchsansatz. Er unterscheidet sich grundlegend von aus der Literatur bekannten Ansätzen, da bei uns die beiden Zellpopulationen nicht gesortet und dann einzeln kultiviert wurden, sondern unsortiert und gemeinsam in Kultur genommen wurden. Die KLRG1+CD4+ und die KLRG1-CD4+ Zellen konnten Wechselwirkungen miteinander eingehen und Einfluss auf das Ergebnis der Zytokinproduktion nehmen, so dass man einen zu Einzelkulturen differenten Wert erhält. Dieser Effekt kann bei der Analyse des Überstandes von 1:1 Co-Kulturen von Regulator und Responderzellen beobachtet werden. Das so ermittelte Zytokinprofil unterscheidet sich schon in diesem Verhältnis maßgeblich von den bekannten Daten der Einzelkulturen [Read et al., 1998].

#### **5.4. Proliferationsassays**

KLRG1+CD4+ Zellen zeigten im Einklang mit der Hypothese, dass es sich bei ihnen vorrangig um Treg handelt, in mit Anti-TZR stimulierten Kulturen ein anerges Verhalten, das auch durch die Gabe von IL-2 oder Anti-CD28 nicht völlig normalisiert werden konnte [Abb. 4.20.]. Die verminderte Proliferation der KLRG1+CD4+ Zellen

kann nicht durch ein vermehrtes Sterben der Zellen mit diesem Marker erklärt werden, da die Färbungen auf Apoptose negativ ausfielen.

In Co-Kulturen zeigten KLRG1+CD4+ Zellen ein regulatives Verhalten auf andere CD4+ Zellen. Hierbei stellte sich die Frage, ob dieses regulative Verhalten der KLRG1+CD4+ Zellen auf andere Proteine auf der Oberfläche der KLRG1+CD4+ Zellen zurückzuführen ist, die als Marker für regulative Fähigkeiten der positiven T-Zellen schon etabliert sind. So sind beinahe 100% der KLRG1+CD4+ Zellen CD38+ und über 60% tragen CD25 [Abb. 4.6.].

CD25 gilt als der Hauptmarker für die Population der natürlichen regulatorischen T-Zellen, was mit der großen Zahl der im Zusammenhang mit CD25 veröffentlichten Publikationen korreliert [für einen Übersichtsartikel siehe Taams et al., 2005].

CD38 wurde im Jahre 1998 als Oberflächenmarker beschrieben, der die "CD45RBlowCD4+" Zellen recht genau in zwei gleich große Gruppen der CD38+ und "CD38-CD45Rblow" Zellen teilt. Die "CD38+CD45RBlowCD4+" Population proliferiert deutlich weniger und produziert keine Zytokine, inhibiert aber die Zytokinproduktion von der "CD38-CD45Rblow CD4+" Responderpopulation. Sie bewirkt eine heilende Antwort auf eine Leishmanieninfektion und vermindert das Wachstum von "CD38-CD45Rblow" Zellen [Read et al., 1998]. CD38 wurde allerdings in der nachfolgenden Zeit als Marker für regulatorische T-Zellen vernachlässigt, da die im Modell gezeigten regulatorischen Fähigkeiten der CD38+ Zellen später ausschließlich den CD25+ Zellen unter den CD38+ Zellen zugeschrieben wurden.

Allerdings verdeutlicht eine genaue Analyse der Ergebnisse von Read et al., [1998], dass auch CD38+ ein Marker für eine Population von Treg-Zellen ist. Nur etwa 50% der CD38+ Zellen tragen CD25 und etwa die Hälfte der CD25+ Zellen sind CD38+. Auf den "CD45RBlow" Zellen befindet sich nur zu 50% CD38, während alle CD25+ Zellen "CD45RBlow" sind. Danach verteilen sich die CD25+ Zellen gleichmäßig unter den "CD45RBlow" Zellen, die CD38+ sind (A), und unter denen, die diesen Marker nicht tragen (B). Die Population A verhält sich anerg und regulativ, Population B nicht. Es bestehen große Unterschiede im Verhalten dieser beiden Zellpopulationen, unter anderem in der Zytokinproduktion und in der Reaktion auf Leishmanien. Falls CD25 tatsächlich der einzige regulative Marker ist, stellt sich die Frage, warum die CD25+ Zellen für das regulatorische Verhalten der Population A die Verantwortung tragen, es

in Population B aber nicht vermögen, ein ähnliches Verhalten zu bewirken. Wenn nun die regulatorischen Effekte ausschließlich den CD25<sup>+</sup>Zellen zuzuschreiben wären, dürfte aufgrund der ähnlichen Verteilung kein großer Unterschied im Verhalten der "CD38<sup>+</sup>CD45Rblow" und "CD38<sup>-</sup>CD45Rblow" Zellen bestehen. Daraus folgt, dass CD38<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Zellen regulatorisches Potenzial besitzen.

Zur Klärung, ob auch KLRG1 neben CD25 und CD38 ein eigenständiger Marker für regulatorische Zellen darstellt und eine Untergruppe der regulatorischen T-Zellen kennzeichnet, war es notwendig den Unterschied zwischen den KLRG1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und den KLRG1<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen herauszufinden, da keine KLRG1<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Vergleichspopulation existiert.

Sortierte KLRG1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen zeigen ein etwas stärker antiproliferatives Verhalten als die KLRG1<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Vergleichspopulation. Sie erlauben damit die Vermutung, dass KLRG1 ein eigenständiger Marker für eine regulatorische Funktion von CD4<sup>+</sup> Zellen ist. Das regulatorische Potenzial ist auch nicht auf die CD25<sup>+</sup> Zellen unter den KLRG1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen zurückzuführen, was bislang unveröffentlichte Ergebnisse zeigen.

## **5.5. Theorien zum Funktionsmechanismus der KLRG1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen**

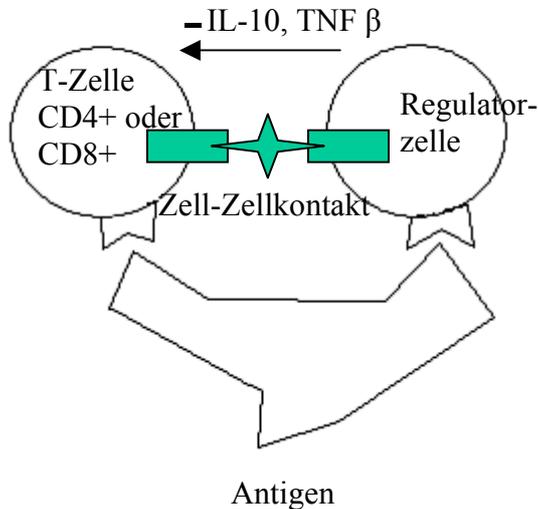
### ***5.5.1. Spekulationen über den Wirkmechanismus der Treg-Zellen***

Die regulatorischen T-Zellen wirken auf die Responderzellen entweder durch Produktion von IL-10 und TNF- $\beta$  oder durch Zell-Zellwechselwirkungen regulativ. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht vollständig geklärt.

Die Treg-Zellen haben einen polyklonalen T-Zell-Rezeptor. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass die Treg-Zellen ebenso wie die Responderzellen viele verschiedene Antigene erkennen können mit ggf. den wenigen V $\beta$ 8.1/2 T-Zellen als Ausnahme. Die regulatorische Wirkung der Treg-Zellen könnte damit die T-Zellen betreffen, die dasselbe Antigen wie die regulatorische T-Zellen binden oder Antigene auf derselben Antigen präsentierenden Zelle erkennen.

Die Regulation könnte dann entweder über eine vernetzendes Protein zwischen den beiden Zellen erfolgen oder durch die Ausschüttung von Zytokinen.

Es gibt verschiedenen Subpopulationen von Treg-Zellen, möglicherweise gibt es mehrere Wirkungsmechanismen, die von der Subpopulation abhängen.



**Abb. 5.1. Möglicher Wirkmechanismus der regulatorischen T-Zellen.** Diese Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des möglichen Wirkmechanismus einer regulatorischen T-Zelle. So deutet der polyklonale T-Zell-Rezeptor dieser Zellen daraufhin, dass sie möglicherweise dieselben Antigene wie die Responder-Zellen erkennen können. So könnte die Regulator und die Responderzelle an dasselbe Antigen binden, woraufhin die spezialisierte Regulatorzelle durch bestimmte Oberflächenproteine und/oder regulative Zytokine inhibitorischen Kontakt zu der Responder-Zelle aufnimmt und diese dadurch an der Proliferation hindert.

### 5.5.2. Wirkung von *KLRG1*

*KLRG1*+*CD4*+ Zellen zeigen ein vermindertes Proliferationsverhalten. Es stellt sich die Frage, ob die geringere Proliferation durch die Stimulation des *KLRG1* durch Antikörper verursacht wurde, oder ob *KLRG1* nur eine Marker für Zellen mit verringertem Proliferationspotenzial ist.

In unseren „Suppression“-Kulturen wurden die *KLRG1*+ Zellen durch Antikörper markiert, um sie aufzureinigen zu können. Dieses gängige Verfahren könnte zur Beeinflussung des Ergebnisses führen. Man geht davon aus, dass sich die Antikörper im Verlaufe von Stunden wieder von ihrem Rezeptor lösen, diese Annahme wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft und in der Literatur finden sich über die Festigkeit von Antikörperbindungen an ihr Antigen eine große Bandbreite von möglichen Varianten: Einige Antikörper diffundieren schon nach wenigen Stunden vom Antigen

ab, wohingegen andere tagelang mit ihm verbunden bleiben. So könnte der gegen KLRG1 gerichtete Antikörper auch durch Stimulation des Rezeptors für das anerge Verhalten der KLRG1+CD4+ Zellen verantwortlich sein.

Allerdings ergaben Versuche mit CSFE eine im Vergleich zu den KLRG1-CD4+ Zellen ebenfalls geringere Proliferation der KLRG1+CD4+ Zellen. Hier erfolgte die Färbung und damit die Gabe des gegen KLRG1 gerichteten Antikörpers erst nach 48 h Kultur.

Also scheint die Stimulation von KLRG1 vermutlich nicht der einzige Grund für die verminderte Proliferation zu sein.

Versuche von Robbins et al. konnten zeigen, dass im Zuge einer Infektion mit Toxoplasmen KLRG1 auf CD8+ Zellen, aber auch auf CD4+ Zellen hochreguliert wird [Robbins et al., 2002]. In normalen, keimfreien Kulturen blieb jedoch nach den hier gewonnenen Ergebnissen die Anzahl an KLRG1+CD4+ Zellen während einer 48 h dauernden Kultur konstant.

Daraus lässt sich vermuten, dass KLRG1+CD4+ Zellen ihre regulative Funktion insbesondere im Rahmen von Infektionen ausüben. Vielleicht ist es ihre Aufgabe, eine überschießende Reaktion der für sie spezifischen Responderzellen zu verhindern. Um die inhibitorische Aufgabe erfüllen zu können, muss die Menge der KLRG1+CD4+ proportional zu der Zahl ihrer Responderzellen hochreguliert werden. Möglicherweise ist für die Hochregulation eine Zytokinmischung nötig, die in unserem in vitro Modell nicht vorhanden war, oder das Signal kommt direkt durch den vermehrten Kontakt mit der größeren Menge der Responderzellen, die durch die Infektion zur Proliferation angeregt werden, zustande. Somit ließe sich erklären, dass der Killer Cell Lectin-like Rezeptor G1 in unserem in vitro Modell in seiner Ausprägung konstant blieb.

Nach erfolgter Infektabwehr könnte KLRG1 auf einer kleinen konstanten Anzahl von Antigen erfahrenen Zellen exprimiert bleiben, die dann auf den Lymphozyten einer gesunden Maus nachweisbar sind.

In den hier durchgeführten Experimenten regulieren die KLRG1+CD4+ Zellen die Responder-Zellen im Verhältnis von 1:1. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass die KLRG1+CD4+ Zellen eine spezifische kleine Untergruppe von regulatorischen T-Zellen darstellen, die auf eine bestimmte Population von Responderzellen spezialisiert sind, die ebenfalls nur in sehr geringer Anzahl vorkommen, wie z.B. NKT-Zellen. Diese Theorie böte auch einen Erklärungsansatz für

die erhöhte Ausprägung der V $\beta$ -Kette 8.1/2 auf den KLRG1+CD4+ Zellen. Wenn man annimmt, dass die regulatorischen T-Zellen vorrangig auf die T-Zellen regulativ wirken können, die dasselbe Antigen binden, dann müssten diese regulatorischen T-Zellen denselben Rezeptor ausprägen wie die Responderzellen. Ein großer Anteil der NKT-Zellen trägt die V $\beta$ 8.1/2 Kette in ihrem T-Zell Rezeptor. Diese Kette ist auch im ansonsten polyklonalen Repertoire der KLRG1+CD4+ häufiger vertreten. So könnte man spekulieren, dass KLRG1+CD4+ Zellen sich möglicherweise unter anderem auf NKT-Zellen als Responder-Zellen spezialisiert haben.

Wie oben erwähnt wäre eine andere Erklärung für die geringe Zahl der KLRG1+CD4+ Zellen, dass KLRG1 in einer gesunden Maus nur auf einer geringen Zahl von Antigen erfahrenen CD4+ Zellen exprimiert, im Falle einer Infektion jedoch hochreguliert wird, wie von Robbins et al. [2002] gezeigt wurde. Diese größere Menge an KLRG1+CD4+ Zellen würde dann die aktivierten T-Zellen inhibieren. KLRG1+ wäre damit ein Marker für eine Zellpopulation, die nicht vor Autoimmunerkrankungen schützt, wie die CD25+CD4+ Zellen, sondern deren Funktion es ist, überschießende Immunantworten auf Infektionen zu verhindern. Die periphere Induktion von KLRG1 und die hohe Expression von CD44+ auf den KLRG1+CD4+ Zellen stützen diese These, da CD44 sich u.a. an Hyalonsäure bindet und sich somit CD44+ Zellen in Entzündungsgebieten anreichern. Aufgrund der derzeit unzureichenden Datenlage sei hier nochmals betont, daß es sich bei diesen Überlegungen um rein theoretische Konzepte handelt.

## **5.6. Vorschläge für zukünftige Untersuchungen**

Zur Klärung der Funktion der KLRG1+CD4+ Zellen sind weitere Versuche u.a. auch in vivo erforderlich. So wäre es interessant, KLRG1 gezielt mit einem anderen Antikörper zu blocken oder das Protein durch Kreuzvernetzung zu stimulieren und dann die Wirkung auf andere CD4+ Zellen zu untersuchen. Auch könnte man gezielt Mäuse mit Krankheitserregern infizieren und danach KLRG1+CD4+ Zellen entnehmen, um deren Phänotyp, Zytokinproduktion und regulatorisches Potenzial zu untersuchen. Die Entnahme der Lymphozyten gesunder Mäuse, Entfernung von KLRG1+CD4+Zellen,

Injektion der von KLRG1+CD4+ aufgereinigten Zellen in SCID-Mäusen und Rückführung der KLRG1+CD4+ Zellen diene ebenfalls zur weiteren Klärung der Funktion der KLRG1+CD4+ Zellen. Möglicherweise könnte man, eine erhöhte Proliferation einer bestimmten Unterpopulation von Zellen erkennen und dann damit die spezifischen Responderzellen der KLRG1+CD4+ zu identifizieren. Die Mäuse könnten auch eventuell eine ganz bestimmte Autoimmunerkrankung entwickeln oder es träte eine überschießende Reaktion auf eine infektionsbedingte Immunantwort auf, was einen großen Schritt zur Klärung der Funktion der KLRG1+CD4+ Zellen bedeuten würde.

Eine besonders wichtige Aufgabe im Rahmen der Analyse der Funktion von KLRG1 bleibt auch das Auffinden des Liganden für den Rezeptor. Untersuchungen von KLRG1 Knock-Out-Mäusen würden bei der Lösungsfindung all dieser Fragestellungen enorm beitragen.

## **6. Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, welche den inhibitorischen NK-Zell Rezeptor (KLRG1) exprimieren, phänotypisch und funktionell genauer zu charakterisieren.

Mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen und T-Lymphozyten-Funktionstests konnte erstmals gezeigt werden, dass KLRG1 auf einer Untergruppe von ca. 1-2% der peripheren CD4 Zellen der Maus exprimiert wird, welche polyklonal sind und den Phänotyp "regulatorischer" d.h. für die Aufrechterhaltung der Toleranz essentieller T-Zellen aufweisen. Die Anzahl dieser Zellen bleibt im Laufe des Lebens einer Maus konstant.

Nur ein kleiner Teil der KLRG1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, nämlich etwa 5%, gehört zu den NKT-Zellen, wie die 4-Farbenfluoreszenzanalyse belegt hat.

KLRG1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden im Gegensatz zu den regulatorischen CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nicht im Thymus gebildet, befinden sich aber in allen anderen lymphatischen Kompartimenten.

Besonders interessant ist, dass KLRG1 eine Unterpopulation von CD4<sup>+</sup> Zellen kennzeichnet, welche die Proliferation anderer CD4<sup>+</sup>T-Zellen inhibieren kann und damit funktionelle Eigenschaften regulatorischer T-Zellen aufweist.

Mit dieser Arbeit konnte eine neue Untergruppe zu den Zellen mit regulatorischen Fähigkeiten hinzugefügt werden. KLRG1 ist also ein neuer nützlicher Marker zur Identifikation von regulatorischen T-Zellen.

In welcher Weise diese Zellen suppressorisch wirken und wo ihr besonderer Aufgabenbereich im Organismus liegt, sind in zukünftigen Versuchen zu klärende Fragestellungen.

## **7. Literatur**

1. Janeway CA and Travers P (1997) Immunologie 2.Auflage, Spektrum
2. Arase H, Arase N, Nakagawa K, Good RA and Onoe K (1993) NK1.1+CD4+CD8-thymocytes with specific lymphokine secretion *Eur. J. immunol.* 23:307-310
3. Arase H, Arase N and Saito T (1996) interferon  $\gamma$  production by natural killer (NK) and NK1.1. T cells upon NKR-P1 cross-linking *J. Exp. Med.* 183:2391-2396
4. Zlontik A, Godfrey DI, Fischer M and Suda T (1992) Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells:  $\alpha\beta$ -T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J. Immunol.* 149:1211-1215
5. Taniguchi M, Seino K and Nakayama T (2003) The NKT cell system: bringing innate and aquired Immunity *Nat. Immunol.* 4:1164-1165
6. Gershon RK and Kondo K (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes *Immunology* 18:723-735
7. Von Boehmer H and Kisielow P (1990) Self-nonsel self discrimination by T cells *Science* 248:1369-1373
8. Kappler JW, Rochm N and Marrack P (1987) T cell tolerance by clonal elimination in the thymus *Cell* 49:273-280
9. Kyewski B and Derbinski J (2004) Self-representation in the thymus: an extended view *Nat. Rev. Immunol.* 4:688-698
10. Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel R and Hengartner H (1991) Ablation of tolerance and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice *Cell* 65:305-317
11. Rocha B and von Boehmer H (1991) Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 251:1225-1228
12. Rocha B, Grandien A, Freitas AA (1995) Anergy and exhaustion are independent mechanism of peripheral T cell tolerance *J. Exp. Med.* 181:993-1003
13. Schwartz RH (1996) Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J. Exp. Med* 184:19-29
14. Nishizuka Y and Sakakura T (1969) Thymus and reproduction: sex linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice *Science* 166:753-55
15. Shevach EM (2000) Regulatory T cells in autoimmunity *Annu. Rev. Immunol.* 18:423-449

16. Sakaguchi N, Miyai K, Sakaguchi S (1994) Ionizing radiation and autoimmunity. Induction of autoimmune disease in mice by high dose fractionated total lymphoid irradiation and its prevention by inoculating normal T cells *J. Immunol.* 152:2586-2595
17. Sakaguchi S, Takahashi T, and Nishizuka Y (1982) Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice I. Requirement of Lyt-1-effector cells for oocytes damage adoptive transfer *J. Exp. Med.* 156:1577-1586
18. Powrie F and Mason D (1990) OX-22 high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22 low subset. *J. Exp. Med.* 172:1701-1708
19. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB and Coffman RL (1993) Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C.B-17 scid mice *Int. Immunol* 5:1461-71
20. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh N, and Toda M (1995) Breakdown of a single mechanism of Self-Tolerance causes various autoimmune diseases *J. Immunol.* 155:1151-1164
21. Nelson BH and Willerford DM (1998) the biology of the interleukin 2 receptor *Adv. Immunol.* 70:1-81
22. Plaetinck G, Combe MC, Corthesy P, Sperisen P, Kanamori H, Honjo T and Nabholz M (1990) Control of IL-2 receptor- $\alpha$  expression by IL-1, tumor necrosis factor, and IL-2: complex regulation via elements in the 5' flanking region *J. Immunol.* 145:3340-3347
23. Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R and Powrie F (1998) CD38<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro *Eur. J. Immunol.* 28:3435-3447
24. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J and Sakaguchi S (1998) Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state *Int. Immunol.* 10:1969-80
25. Read S, Malmstrom V and Powrie F (2000) T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation *J. Exp. Med.* 192:295-302
26. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW and Sakaguchi S (2000), Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 *J. Exp. Med.* 192:303-310

27. Perkins D, Wang Z, Donovan C, He H, Mark D, Guan G, Wang Y, Walunas TL, Bluestone J and Listman J (1996) Regulation of CTLA-4 expressing during T cell activation *J. Immunol.* 1996 156:4154-4159
28. Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD and Bluestone JA (1996) CTLA-4: A negative regulator of autoimmune disease *J. Exp. Med.* 1996 184:783-788
29. Eagar TN, Karandikar NJ, Bluestone JA and Miller SD (2002) The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance *Eur. J. Immunol.* 32:972-981
30. Waterhouse P, Penniger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H and Mak TW (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4 *Science* 270:932-933
31. Thornton AM and Shevach EM (1998) CD4+ immunoregulatory T cells polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin-2 production *J. Exp. Med.* 188:287-96
32. Thornton AM and Shevach EM (2000) Suppressor effector function of CD4+CD25+ Immunoregulatory T cells is antigen nonspecific *J. Immunol.* 164:183-190
33. Cederborn L, Hall H and Ivars F (2000) CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells *Eur. J. Immunol.* 30:1538-1543
34. Vendetti S, Chai JG, Dyson J, Simpson E, Lombardi G and Lechler R (2000) Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells *J. Immunol.* 165:1175-1181
35. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL and Powrie F (1999) An essential role for IL-10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation *J. Exp. Med.* 190:995-1004
36. Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ and Powrie F (2003) CD4+CD25+ TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanism *J. Exp. Med.* 197:111-119
37. Wolf M, Schimpl A and Hünig T (2001) Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4+CD25- and CD4+CD25+ T cells: evidence for two distinct regulatory mechanism *Eur. J. Immunol.* 31:1637-1645
38. De La Rosa M, Rutz S, Dorninger H and Scheffold A (2004) Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function *Eur. J. Immunol.* 34:2480-2488
39. Hori S, Nomura T and Sakaguchi S, (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 *Science* 299, 1030-1031

40. Khattri R, Cox T, Yasayko SA and Ramsdell F. (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells *Nat. Immunol* 4:304-306
41. Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+D25+ regulatory T cells *Nat. Immunol.* 4: 330-336
42. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Rmasdell F and Ziegler SF (2001) Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation *J. Biol. Chem.* 276:37672-37679
43. Benett CL, Christie J, Rmasdell F, Brunkiw MF, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF and Ochs HD (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by a mutation of FOXP3 *Nat. Genet.* 27:20-21
44. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, der Vries RR, Huizinga TW, Ottenhoff TH and Toes RE (2005) Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans *Hum. Immunol.* 66:13-20
45. Shimizu J, Yamazaki S and Sakaguchi S (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ immunoregulatory cells *J. Immunol.* 163:5211-5218
46. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujitja T and Nakayama E (1999) Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody *Cancer Res.* 59: 3128-3133
47. Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R and Melief CJ (2001) Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25+ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses *J. Exp. Med.* 194:823-832
48. Papiernik M, de Moraes M.L, Pontoux C, Vasseur F and Penit C (1998) Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency *Int. Immunol.* 10:371-378
49. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J and Enk AH (2002) Infection tolerance: human CD25+ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4+ T helper cells *J. Exp. Med.* 196:255-260
50. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB and Schuler G (2002) Human CD4+CD25+ regulatory contact-dependent T cells induce interleukin 10- producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells *J. Exp. Med.* 196:24-253

51. Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP and Waldmann H (2002) Both CD4+CD25+ and CD4+CD25- regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance *J. Immunol.* 168:5558-65
52. Hauet-Broere F, Unger WW, Garssen J, Hoijer Ma, Kraal G and Samson JN (2003) Functional CD25- and CD25+ mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48h after oral antigen application *Eur. J. Immunol.* 33:2801-2810
53. Stephens LA and Mason D (2000) CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations *J. Immunol.* 165:3105-3110
54. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbossa TC, Cumano A and Bandeira A (2001) CD25+CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10 *J. Immunol.* 2001 166:3008-3018
55. Waite DJ, Appel MC, Handler ES, Mordes JP, Rossini AA and Greiner DL (1996) Ontogeny and immunohistochemical localization of thymus-dependent and thymus-independent Rt6+ cells in the rat. *Am. J. Pathol.* 148:2043-2056
56. Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RM, Walsetz TF and Lee HC (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalysed by lymphocyte antigen CD38 *Science* 262:1056-1059
57. Delovitch TL and Singh B (1997) The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: Immune dysregulation gets the NOD *Immunity* 7:727-738
58. Lepault F, Gagnerault MC, Faveeuw C, Bazin H and Boitard C (1995) Lack of L-selectin expression by cells transferring diabetes in NOD mice: insights into the mechanisms involved in diabetes prevention by Mel-14 antibody treatment *Eur. J. Immunol.* 25:1502-1507
59. Shimada A, Rohane P, Fathman CG and Charlton B (1996) Pathogenic and protective roles of CD45Rblow CD4+ cells correlate with cytokine profiles in the spontaneously autoimmune diabetic mouse *Diabetes* 45:71-78
60. Herbelin A, Gombert JM, Lepault F, Bach JF and Chatenoud L (1998) Mature mainstream TCR alpha beta+CD4+ thymocytes expressing L-selectin mediate "active tolerance" in the nonobese diabetic mouse *J. Immunol.* 161:2620-2628
61. Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI and Baxter AG alpha/beta-T cell receptor(TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic(NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and /or IL-10 *J. Exp. Med* 187:1047-1056

62. Lepault F and Gagnerault MC (2000) Characterization of peripheral regulatory CD4<sup>+</sup> T Cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice *J. Immunol.* 164:240-247
63. Kilshaw PJ and Murrant SJ (1991) Expression and regulation of beta 7 (beta p) integrins on mouse lymphocytes: relevance to the mucosal immune system *Eur. J. Immunol.* 21, 2591-2597
64. Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL and Brenner MB (1994) Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin *Nature* 372:190-193
65. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyra F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A and Hamann A (2002) Expression of the integrin identifies unique subsets of CD25<sup>+</sup> as well as CD25<sup>-</sup> regulatory T cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13031-13036
66. Banz A, Peixoto A, Pontoux C, Cordier C, Rocha B and Papiernik M (2003) A unique subpopulation of CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis *Eur. J. Immunol.* 33:2419-2428
67. Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, Nakamura T and Watanabe M (2003) Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene<sup>+</sup> regulatory T cells *J. Immunol.* 171:708-716
68. Lombardi G, Sidhu S, Batchelor R and Lechler R (1994) Anergic T cells as suppressor cells in vitro *Science* 264:1587-1589
69. Taams LS, van Rensen AJML, Poelen MCM, van Els CACM, Besseling AC, Wagenaar JPA, van Eden W and Wauben MHM (1998) Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen presenting cell *Eur. J. Immunol.* 28:2902-2912
70. Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz CG and Bitar DM (1991) Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis III, Evidence for clonal anergy *J. Immunol.* 147:2155-2163
71. Taams LS, van Eden W and Wauben MHM (1999) Dose-dependent induction of distinct anergic phenotypes: multiple levels of T cell anergy *J. Immunol.* 162:1974-1981
72. Buer J, Lanoue A, Franzke A, Garcia C, von Boehmer H and Sarukhan A (1998) Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo *J. Exp. Med.* 187, 177-183
73. Groux H, Bigler M, de Vries JE and Roncarolo MG (1996) Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4<sup>+</sup> T cells *J. Exp. Med.* 184:19-29

74. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE and Roncarolo MG (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis *Nature* 389:737-742
75. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R and Roncarolo MG (2001) IFN- $\alpha$  and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells *J. Immunol.* 16:5530-5539
76. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J and Enk AH (2002) CD4+ and CD8+ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity *Blood* 99:2468-2476
77. Vieira PL, Christensen JR, Minae S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC and O'Garra A (2004) IL-10- secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4CD25+ regulatory T cells *J. Immunol.* 172:5986-93
78. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM and O'Garra A (2002) In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (th1)- and Th2-inducing cytokines *J. Exp. Med.* 195:603-616
79. Roncarolo MG, Gregori S and Levings M (2003) Type 1 T regulatory cells and their relationship with CD4+CD25+ T regulatory cells *Novartis Found Symp.* 252:115-127, discussion 127-31, 203-10
80. Foussat A, Cottrez F, Brun V, Fournier N, Breitmayer JP and Groux H (2003) A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation *J. Immunol.* 171:5018-5026
81. Mills KHG and McGuirk P (2004) Antigen-specific regulatory T cells- their induction and role in infection *Seminars in Immunol.* 16: 107-117
82. Seder RA, Marth T, Sieve MC, Strober W, Letterio JJ, Roberts AB and Kelsall B (1998) Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naïve CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production *J. Immunol.* 160:5719-5728
83. Weiner HL (2001) Oral tolerance: Immune mechanism and the generation of Th3-type TGF- $\beta$  secreting regulatory cells *Microbes Infect* 3:947-954
84. Jonuleit H, Schmitt E (2003) The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations *J. Immunol.* 171:6323-6327
85. Seddon B and Mason D (2000) The third function of the Thymus *Immunol. Today* 21:95-99

86. Seddon B and Mason D (1999) Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity *J. Exp. Med.* 189:877-881
87. Modigliani Y, Bandeira A and Coutinho A (1996) A model for developmentally acquired thymus-dependent tolerance to central and peripheral antigens *Immunol. Rev.* 149:120-155
88. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliot J, Kioussis D, Davies J and Waldmann H (1993) "infectious" transplantation tolerance *Science* 259:974-977
89. Sakaguchi N, Miyai K and Sakaguchi S (1994) Ionizing radiation and autoimmunity. Induction of autoimmune disease in mice by high dose fractionated total lymphoid irradiation and its prevention by inoculating normal T cells *J. Immunol.* 152:2586-95
90. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T and Sakaguchi S (2005) Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+)CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization *J. Exp. Med.* 201:723-735
91. Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P and Kong L (2002) CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R $\beta$ -deficient mice: implication for the nonredundant function of IL-2 *Immunity* 17: 167-178
92. Almeida AR, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA (2002) Homeostasis of peripheral CD4<sup>+</sup> T cells: IL-2R $\alpha$  and IL-2 shape a population of regulatory T cells that controls CD4<sup>+</sup> T cell number *J. Immunol.* 169:4850-4860
93. Bach JF (2003) Regulatory T cells under scrutiny *Nat. Rev. Immunol.* 3:189-198
94. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukzide N, Lafaille JJ (2002) Interleukin 2 signaling is required for CD4<sup>+</sup> regulatory T cell function *J. Exp. Med.* 196:851-857
95. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H and Shevach EM (2002) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor  $\beta$ 1 production and responsiveness *J. Exp. Med.* 196:237-245
96. Seddon B and Mason D (1999) Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4<sup>+</sup>CD45<sup>RC</sup>-T cells and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> thymocytes *J. Exp. Med.* 189:278-288
97. Seewaldt S, Alferink J and Förster I (2002) Interleukin-10 is crucial for maintenance but not for developmental induction of peripheral T cell tolerance *Eur. J. Immunol.* 32:3607-3616

98. Hara M., Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, Morris PJ, Powrie F and Wood KJ (2001) IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo *J. Immunol.* 166:3789-3796
99. Pontoux C, Banz A and Papiernik M (2002) Natural CD4CD25+ regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10 *Int. Immunol.* 24:233-239
100. Powrie F, Carolino J, Leach MW, Mauze S, and Coffman (1996) A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper typer 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+T cells *J. Exp. Med.* 183:2669-2674
101. Crispin JC, Vargas MI and Alcocer-Varela J (2004) Immunoregulatory T cells in autoimmunity *Autoimmunity reviews* 3:45-51
102. Ding L and Shevach EM (1992) IL- 10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function *J. Immunol.* 148:3133-3139
103. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW and O`Garra A.(1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells *J. Immunol.* 146:3444-3451
104. Takeuchi M, Alard P and Streilein JW (1998) TGF- $\beta$  promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells *J. Immunol.* 160: 1589-1597
105. Letterio JJ and Roberts AB (1998) Regulation of immune responses by TGF- $\beta$  *Annu. Rev. Immunol.* 16: 137-161
106. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL and O`Garra (2001) Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor *Annu. Rev. Immunol.* 19:683-765
107. Ortega Soto E and Pecht I (1988) A monoclonal antibody that inhibits secretion from rat basophilic leukaemia cells and binds to a novel membrane component *J. Immunol.* 141: 4324-4332
108. Guthmann MD, Tal M and Pecht I (1995) A secretion inhibitory signal transduction molecule on mast cells is another C-type lectin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9397-9401
109. Chan PY and Takei F (1989) Molecular cloning and characterization of a novel murine T cell surface Ag, YE1/48 *J. Immunol.* 142:1727-1736
110. Yokoyama WM, Jacobs LB, Kanagawa O, Shevach EM and Cohen DI (1989) A murine T lymphocyte belongs to a supergene family of type II integral membrane protein *J. Immunol.* 143:1379-1386

111. Ziegler SF, Ramsdell F, Hjerrild KA, Armitage RJ, Grabstein KH, Hennen KB, Farrah T, Fanslow WC, Shevach EM and Alderson MR. (1993) Molecular characterization of the early activation Ag CD 69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation *Eur. J. Immunol.* 23:1643-1648
112. Vely F and Vivier E (1997) Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts *J. Immunol.* 159:2075-2077
113. Matthews RJ, Browne DB, Flores E and Thomas ML (1992) Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: Description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences *Mol. Cell Bio.* 12: 2396-2405
114. Tamir I, Dal Porto JM and Cambier JC (2000) Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction *Curr. Opin. Immunol.* 12:307-315
115. Rohrschneider LR, Fuller, JF, Wolf I, Liu Y and Lucas DM (2000) Structure, functions, and biology of SHIP proteins *Review, genes & developments* 14:505-520
116. Ravetch JV and Lanier LL (2000) Review immune inhibitory receptors *Science* 290:84-89
117. Rong X and Pecht I (1996) Clustering the mast cell function-associated antigen (MAFA) induces tyrosyl phosphorylation of the FcεRI-β subunit *Immunol. Letters* 54:105-108
118. Taylor JA, Karas JL, Ram MK, Green OM and Seidel-Dugan C (1995) Activation of the high affinity immunoglobulin E receptor FcεRI in RBL-2H3 cells is inhibited by Syk SH2 domains *Mol. Cell Biol.* 15:4149-4157
119. Zhang J, Berenstein EH, Evans RL and Siragania RP (1996) Transfection of Syk protein tyrosine kinase reconstitutes high affinity IgE receptor mediated degranulation in a Syk-negative variant of rat basophilic leukaemia RBL-2H3 cells *J. Exp. Med.* 184:71-80
120. Amramson J, Xu R and Pecht I (2002) An unusual inhibitory receptor –the mast cell function-associated antigen (MAFA)
121. Bocek P Jr, Guthmann MD and Pecht I (1997) Analysis of the genes encoding the mast cell function-associated antigen and its alternatively spliced transcripts *J. Immunol.* 158:3235-3243
122. Geller-Bernstein C, Berrebi A., Bassous Gedj L, Ortega E, Licht A and Pecht I (1994) Antibodies specific to membrane components of rat mast cells are crossreacting with human basophils *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1994 105:269-273

123. Butcher S, Arney KL and Cook GP (1998) MAFA-L an ITIM- containing receptor encoded by the human NK cell gene complex and expressed by basophils and NK cells *Eur. J. Immunol.* 1998 28:3755-3762
124. Hanke T, Corral L, Vance RE and Raulet DH (1998) 2F1 antigen, the mouse homolog of the rat “mast cell function-associated antigen”, is a lectin-like type II transmembran receptor expressed by natural killer cells *Eur. J. Immunol.* 28:4409-4417
125. Blaser C, Kaufmann M and Pircher H (1998) Virus-Activated CD 8 T cells and lymphokine- activated NK cells express the mast cell function- associated antigen, an inhibitory C-type lectin *J. Immunol.* 161:6451-6454
126. Beyersdorf NB, Ding X, Karp K and Hanke T (2001) Expression of inhibitory “killer cell lectin-like receptor G1 identifies unique subpopulations of effector and memory CD8 T cells *Eur. J. Immunol.* 31:3443-3452
127. Corral L, Hanke T, Vance RE, Cado D and Raulet DH (2000) NK cell expression of the killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG 1), the mouse homolog of MAFA, is modulated by MHC class I molecules *Eur. J. Immunol.* 30:920-930
128. Brown MG, Fulmek S, Matsumoto K, Cho R, Lyons PA, Levy ER, Scalzo AA and Yokoyama WM (1997) A 2-Mb YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosom 6 *Genomics* 42:16-25
129. Renedo M, Arce I, Rodriguez A, Carretero M, Lanier LL, Lopez-Botet M and Fernandez- Ruiz E.(1997) the human natural killer gene complex is located on chromosome 12p12-p13 *Immunogenetics* 46:307-311
130. Vohringer D, Koschella M and Pircher H (2002) Lack of proliferate capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1) *Blood* 10:3698-3702
131. Raulet DH and Held W (1995) Natural killer cell receptors: the offs and ons of NK cell recognition *Cell* 82:697-700
132. Vance RE, Kraft JR, Altmann JD, Jensen PE and Raulet DH (1998) Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical MHC class I molecule Qa-1b *J. Exp. Med.* 188:1841-1848
133. Long EO, Colonna M and Lanier LL (1996) Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells: a standart nomenclatur *Immunol Today* 17:100
134. Ferrini S, Cambiaggi A, Meazza R, Sforzini S, Marciano S, Mingari MC and Moretta L (1994) T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotyp proprieties and p58 function *Eur. J. Immunol.* 24:2294-2298

135. Phillips JH, Gumperz JE, Parham P and Lanier LL (1995) Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class receptors I on T lymphocytes *Science* 268:403-405
136. D'Andrea A and Lanier LL (1998) Killer cell inhibitory Receptor Expression by T Cells *Curr. Top Microbiol. Immunol* 230:25-39
137. Ponte M, Bertone S, Vitale C, Tradori-Cappai A, Bellomo R, Castriconi R, Moretta L and Mingari MC (1998) Cytokine-induced expression of killer inhibitory receptors in human T lymphocytes *Eur. Cytokine News* 9:69-72
138. Mingari MC, Schiavetti F, Ponte M, Vitale C, Maggi E, Romagnani S, Demarest J, Pantaleo G, Fauci AS and Moretta L (1996) Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12433-12438
139. Eisen SA, Wedner HJ and Parker CW (1972) Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns *Immunol. Commun.* 1:571-577
140. Miltenyi S, Muller W, Weichel W and Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS *Cytometry* 11:231-238
141. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U and Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters *J. Biol. Chem.* 257:7847-7851
142. Blumberg PM (1980) In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters: part 1 *Crit. Rev. Toxicol.* 8:153-197
143. Blumberg PM (1981) In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters: part 2 *Crit. Rev. Toxicol.* 8:199-234
144. Morgan AJ and Jacob R (1994) Ionomycin enhances Ca<sup>2+</sup> influx by stimulation store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane *Biochem. J.* 300:665-672
145. Klausner RD, Donaldson JG and Lippincott-Schwartz J (1992) Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure *J. Cell. Biol.* 116:1071-1080
146. Pelham HR (1991) Multiple targets for brefeldin A *Cell* 67:449-451
147. Björck L and Kronvall G (1984) Purification and some properties of streptococcal Protein G: a novel IgG-binding reagent *J. Immunol.* 133:969-974
148. Bendelac A, Rivera MN, Park SH and Roark JH (1997) Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:535-562

149. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R and Santoni A (1994) The CD69 receptor: a multipurpose cell- surface trigger for hematopoietic cells *Immunol. Today* 15:479-483
150. Marchesi VT and Gowans JL (1964) The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: An electron microscope study *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* 159:283-290
151. Gowans JL and Knight EJ (1964) The route of re-circulation of lymphocytes in the rat *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* 159:257-282
152. Ortega G, Korty PE, Shevach EM and Malek TR (1986) Role of Ly-6 in lymphocyte activation I. Characterization of a monoclonal antibody to a nonpolymorphic Ly-6C specificity *J. Immunol.* 137:3240-3246
153. McCormack, J.M., Leenen PJM and Walker WS (1993) Macrophage progenitors from mouse bone marrow and spleen differ in their expression of the Ly-6C differentiation antigen *J. Immunol.* 151:6389-6398
154. Ostberg JR, Barth RK and Frelinger JG (1998) The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43 *Immunol. Today* 19:546-550
155. Asano M, Toda M, Sakaguchi N and Sakaguchi S (1996) Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation *J. Exp. Med.* 184:387-396
156. Romagnani S (2000) T-cell subsets (Th1 versus Th2) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 85: 9-18
157. Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B and Reutlingsperger (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure *Cytometry* 31:1-9
158. Apostolou I, Saukhan A, Klein L and von Boehmer H (2002) Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen *Nat. Immunol.* 8:756-763
159. Ponta H, Sherman L and Herrlich PA (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:33-45
160. Mikecz K, Brennan FR, Kim JH and Glant TT (1995) Anti-CD44 treatment abrogates tissue oedema and leukocyte infiltration in murine arthritis *Nat. Med.* 1:558-563
161. Sprent J and Tough DF (1994) Lymphocyte life-span and memory *Science* 265:1395-1400

162. Thimme R, Appy V, Koschella M, Panther E, Roth E, Hislop AD, Rickinson AB, Rowland-Jones SL, Blum HE and Pircher H (2005) Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific CD8 T-cells during persistent antigen stimulation *J. Virol.* 79:12112-12116
163. Sperling AI, Green JM, Mosley RL, Smith PL, DiPaolo RJ, Klein JR, Bluestone JA and Thompson CB (1995) CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28 *J. Exp. Med.* 182:139-146
164. Onami TM, Harrington LE, Williams MA, Galvan M, Larsen CP, Pearns TC, Manjunath N, Baum LG, Pearce BD and Ahmed R (2002) Dynamic regulation of T cell immunity by CD43 *J. Immunol.* 168:6022-6031
165. Kyoizumi S, Ohara T, Kusunoki Y, Hayasahi T, Koyama K and Tsuyama T (2004) Expression characteristic and stimulatory functions of CD43 in human CD4+memory T cells: analysis using a monoclonal antibody to CD43 that has a novel lineage specificity *J. Immunol.* 172:7246-7253
166. Shevach EM (2001) Certified professionals: CD4(+)/CD25(+) suppressor T cells *J. Exp. Med.* 193:41-46
167. Roncarolo MG, Bacchette R, Bordignon C, Narula S and Levings MK (2001) Type 1 T regulatory cells *Immunol. Rev.* 182:68-79
168. Weiner HL (2001) Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta secreting Th3 regulatory cells *Immunol. Rev.* 182:207-214
169. Akbar AN, Taams LS, Salomon M, Vukmanovic-Stejić M (2003) The peripheral generation of CD4+CD25+ regulatory T cells *Immunology*, 109,319-332
170. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J and Enk AH (2001) Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood *J. Exp. Med.* 193:1285-1294
171. Diekmann D, Plottner H, Berchthold S, Berger T and Schuler G (2001) Ex vivo isolation and characterization of CD4CD25 cells with regulatory properties from human blood *J. Exp. Med.* 193: 1303-1310
172. Earle KE, Tang Q, Zhou X, Liu W, Zhu S, Bonyhadi ML and Bluestone JA (2005) In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation *Clin. Immunol.* 115:3-9
173. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ and Hafler DA (2001) CD4+CD25+high regulatory cells in human peripheral blood *J. Immunol.* 167:1245-1253
174. Zeng D, Gazit G, Dejbakhsh-Jones S, Balk SP, Snapper S, Taniguchi M and Strober S (1999) Heterogeneity of NK1.1+ T cells in the bone marrow: Divergence from the thymus *J. Immunol.* 163:5338-5345

175. Shtrichman R and Samuel C (2001), The role of gamma interferon in antimicrobial immunity *Curr. Opin. Microbiol.* 4:251-259
176. Boehm, U, Klamp T, Groot M and Howard JC (1997). Cellular responses to interferon-gamma *Annu. Rev. Immunol.* 15:749-795
177. Walker W, Aste-Amezaga M, Kastelein RA, Trinchieri G and Hunter CA (1999) IL-18 and CD 28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12 induced IFN- $\gamma$  *J. Immunol.* 162:5894-5901
178. Powrie F (2004) Immune regulation in the intestine: A balancing act between effector and regulatory T cell responses *Ann. N.Y. Acad. Science* 1029:132-141
179. Sury-Payer E, Amar AZ, McHugh R, Natarajan K, Margulies DH and Shevach EM (1999) Post-thymectomy autoimmune gastritis: fine specificity and pathogenicity of anti-H/K ATPase-reactive T cells *Eur. J. Immunol.* 29:669-677
180. Asseman C, Read S and Powrie F (2003) Colitogenic Th1 Cells are present in the antigen-experienced T cell Pool in normal mice: Control by CD4+ regulatory T cells and IL-10 *J. Immunol.* 171:971-978
181. Taams LS and Akbar AN (2005) Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 293:115-131
182. Robbins SH, Nguyen KB, Takahashi N, Mikayama T, Biron CA and Brossay L (2002) Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin- like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells *J. Immunol.* 168:2585-2589

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocanin
Anti-XY	Ein gegen XY gerichteter AK
AK	Antikörper
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BIO	Biotinyliert
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BSS	Balanced Salt Solution
bzw.	Beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CTL	Zytotoxischer T- Lymphozyt
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylenediaminetetraacteticacid
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanner
FSC	Forward scatter
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O bidest	Zweifach destilliertes Wasser
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ko	Kontrollfärbung
KLRG1	Killer Cell Lectin-like Rezeptor G1
MACS	Magnetic Cell Sorting
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
n	Anzahl unabhängiger Experimente
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle

PE	Phycoerythrin
PBS	Phosphate Buffered Saline
rIL-2	Rekombinantes Interleukin 2
RT	Raumtemperatur
SSC	Sideward scatter
Th1/Th2 Zelle	T-Helferzelle Typ 1 bzw. 2
Tr1 Zelle	Regulatorische T-Zelle 1
TGF	Transforming tumor growth factor
TZR	T-Zell-Rezeptor
XdT <sub>x</sub>	Am X. Tag thymektomiert
U	Einheiten (Units)

## **Danksagung**

Herrn Privatdozent Dr. Thomas Hanke möchte ich für die freundliche und engagierte Betreuung dieser Arbeit und die Vergabe dieses aktuellen und interessanten Themas danken.

Herrn Prof. Dr. T. Hünig bin ich für die Möglichkeit innerhalb eines Projektes seines Lehrstuhls meine Dissertation anfertigen zu können zu großem Dank verpflichtet.

Weiterhin danke ich Klaus Karp sehr herzlich für seine immerwährende Hilfsbereitschaft bei jeder Art von unerwartet auftretenden Problemen und für die psychische Erbauung im Labor.

Frau Xin Ding danke ich besonders für ihre freundliche Anleitung und Zusammenarbeit.

Bei Frau Sonja Rotzold möchte ich mich für ihren ausdauernden Einsatz beim Zellsorting bedanken.

Frau Erna Winkler danke ich für ihre bereitwillige und tatkräftige Hilfestellung bei allen auftretenden Fragen.

Der Arbeitsgruppe Schimpl und Hünig danke ich sehr für das Aushelfen mit benötigten Antikörpern.

Mein ganz besonderer Dank aber gebührt meinen Eltern für ihre Liebe und Unterstützung, die sie mir immer in jeder Hinsicht gegeben haben.



Julia Tietze  
Baaderstr. 65  
80469 München

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Geburtsdatum	05. Mai 1978
Geburtsort	Dortmund
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Prof. Dr. Dr. h.c. Lutz F. Tietze, Studienrätin Karin Tietze

### **Schule und Studium**

1984-1988	Besuch der Hainbund-Grundschule in Göttingen
1988-1990	Besuch der Lutherschule (Orientierungsstufe) in Göttingen
1990 bis Juli 1995	Besuch des Max-Planck-Gymnasiums in Göttingen
August bis Dezember 1995	Besuch der West Highschool in Madison/ Wisconsin/ USA
Januar 1995 bis Juni 1997	Besuch des Max-Planck-Gymnasiums in Göttingen Abschluss mit dem Abitur am 13.06.1997
Wintersemester 1997/98	Aufnahme des Medizinstudiums an der Georg-August-Universität in Göttingen
17. September 1999	Physikum
20. September 2000	1. Staatsexamen
Wintersemester 2000/01	Wechsel zur Julius-Maximilian-Universität in Würzburg
11. April 2003	2. Staatsexamen
09. Juni 2004	3. Staatsexamen

### **Berufliche Weiterbildung**

November 2002	Beginn der Doktorarbeit im Fachbereich Immunologie bei PD. Dr. Hanke, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hünig, mit dem Titel: Untersuchung der regulatorischen Funktion von KLRG1+CD4+ Lymphozyten der Maus
25. Oktober 2004	Aufnahme der Tätigkeit als Beraterin bei der Boston Consulting Group GmbH

## **Praktika**

### ***Famulaturen***

13.-27. März 2000	Fachgebiet Plastische und Wiederherstellungschirurgie Evangelisches Krankenhaus Weende, Göttingen
01. August bis 16. September 2001	Fachgebiet Immunologie speziell Immundiagnostik, Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg
11. Februar bis 11. März 2002	Fachgebiet Chirurgie, Clinique du Mail, Genf
12. März bis 14. April 2002	Fachgebiet Allgemeinmedizin und Rheumatologie, Clinique du Mail, Genf
22. Juli bis 09. August 2002	Fachgebiet Innere Medizin (Kardiologie), Medizinische Universitätsklinik Würzburg

### ***Praktisches Jahr***

28. April bis 22. Juni	Fachgebiet Innere Medizin, Medizinische Universitätsklinik Würzburg
23. Juni bis 17. August 2003	Fachgebiet Chirurgie, Centre Hospitalier in Sierre, Schweiz
18. August bis 12. Oktober 2003	Fachgebiet Innere Medizin, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier Hôpital Lapeyronie, Frankreich
13. Oktober bis 07. Dezember 2003	Fachgebiet Chirurgie, Medizinische Universitätsklinik Würzburg
08. Dezember 2003 bis 28. März 2004	Fachgebiet Anästhesiologie, Klinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg

### ***Hospitation***

26. Juli bis 08. August 2004	Fachgebiet Dermatologie, Universitätsklinik und Poliklinik für Hautkrankheiten, Würzburg
------------------------------	---