

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. Wolfgang Kastenmüller**

**Einfluss von Osteopontin auf Foxp3-negative konventionelle und Foxp3-  
positive regulatorische CD4-positive T-Zellen der Maus**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Jonathan Lehnert**

**aus Würzburg**

**Würzburg, März 2019**

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. Niklas Beyersdorf  
**Koreferent bzw. Korreferentin:** Priv.-Doz. Dr.med. Alma Zerneck  
**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 28.01.2020

**Der Promovend ist Arzt**

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	4
1.1	Das menschliche Immunsystem .....	4
1.2	Regulatorische CD4+ Foxp3+ T-Zellen .....	4
1.3	Regulatorische T-Zellen und Osteopontin .....	5
1.4	Struktur von Osteopontin.....	6
1.5	Regulation der Osteopontin-Expression .....	7
1.6	Rezeptoren und Signalwege von Osteopontin .....	8
	a) Integrine:.....	8
	b) CD44:.....	8
	c) Toll-like-Rezeptor 9 .....	9
1.7	Funktionen und Aufgaben von Osteopontin .....	9
	d) Innerhalb des Immunsystems .....	9
	e) Osteopontin und Myokardinfarkt.....	11
	c) Knochenstoffwechsel .....	12
	d) Einfluss auf die Tumorentwicklung .....	12
	e) Einfluss auf das Zellüberleben.....	12
	f) Diabetogene Wirkung von OPN.....	13
	g) Zellmotilität und Zelladhäsion .....	13
1.8	Zielsetzung der Arbeit .....	13
2.	Material und Methoden .....	15
2.1	Material.....	15
	2.1.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer.....	15
	a) Zellkultur, Experimente .....	15
	b) Kits.....	15
	c) Durchflusszytometrie/Antikörper .....	16
	2.1.2 Lösungen und Zusammensetzungen.....	17
	2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	17
	2.1.4 Geräte.....	18
	2.1.5 Programme.....	19
2.2	Methoden.....	19

2.2.1 Mauslinien.....	19
2.2.2 Zellgewinn und –aufreinigung .....	20
a) Zellgewinnung .....	20
b) Zellaufreinigung.....	21
CD4+-Aufreinigung.....	21
CD4+CD25+ und CD25- Aufreinigung durch Treg Isolation-Kit.....	21
Aufreinigung der Antigenpräsentierenden Zellen .....	22
2.2.3 Färbung mit APC konjugiertem rekombinantem Osteopontin (rOPN) .....	22
2.2.4 Einfluss von rekombinantem OPN auf das Überleben unstimulierter Lymphozyten .....	23
2.2.5 Einfluss von rOPN auf die Expression von CTLA-4, CD25 und Ki-67 nach T-Zellaktivierung.....	23
2.2.6 Analyse der Zytokinsekretion von Treg- bzw. Tconv-Zellen durch Legendplex ..	24
2.2.7 Suppressionsassay .....	24
a) Labeling mit eFluor670.....	24
b) Kultivierung.....	25
2.2.8 Effekt von rOPN auf die Expression von GITR durch Treg und Tconv.....	25
2.2.9 FACS-Färbung .....	26
2.2.10 Statistik .....	27
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1 Rekombinantes Osteopontin bindet an konventionelle und regulatorische T-Zellen der Maus.....	28
3.2 Rekombinantes OPN erhöht das Überleben von konventionellen und regulatorischen T-Zellen in vitro.....	30
3.3 Rekombinantes OPN hat keinen Effekt auf die Aktivierung und Proliferation von Tconv- und Treg-Zellen nach anti-CD3-Antikörper-Stimulation in vitro.....	32
3.4 Die Zugabe von rOPN zu aufgereinigten CD4+ CD25+ T-Zellen (Treg-Zellen) führt zu erhöhter IL-17A-Sekretion nach anti-CD3-Antikörper-Stimulation in vitro .....	34
3.5 Osteopontin erhöht die Supprimierbarkeit von konventionellen T-Zellen durch Treg-Zellen in vitro .....	36
3.6 T-Zellen aus wildtypischen Mäusen exprimieren mehr GITR als T-Zellen aus Osteopontin-Knock-out Tieren .....	42
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>46</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>54</b>

6. Literaturverzeichnis.....	56
7. Anhang .....	62
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	62
7.2 Abkürzungsverzeichnis .....	63
8. Danksagung.....	65
9. Lebenslauf.....	66

# 1. Einleitung

## 1.1 Das menschliche Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist eine wichtige Schutzeinrichtung des Körpers. Es dient zur Abwehr verschiedenster Infektionserreger, kann fehlerhafte oder entartete körpereigene Zellen erkennen und zerstören und somit die Entstehung von Malignomen bekämpfen. Darüber hinaus ist das Immunsystem auch wichtig für den korrekten Ablauf während der Wundheilung.<sup>1</sup>

Der Aufbau des Immunsystems ist dabei sehr komplex. Grundsätzlich unterscheiden wir die angeborene Immunität von der erworbenen Immunität. Die angeborene, auch unspezifische Immunreaktion genannt, beinhaltet Mechanismen wie das Komplementsystem oder die rezeptorspezifische Phagozytose und reagiert als initiale Komponente des Immunsystems schnell aber unspezifisch.

Die erworbene Immunität umfasst dagegen zelluläre und humorale Anteile (beispielsweise Antikörper), die sehr spezifisch und hocheffektiv reagieren. Zu dieser erworbenen Immunität werden insbesondere auch die Lymphozyten gezählt, die wiederum in B- und T-Lymphozyten unterteilt werden können. B-Lymphozyten reifen vor allem im Knochenmark und der Milz und produzieren antigenspezifische Antikörper. T-Lymphozyten reifen vorwiegend im Thymus heran und erkennen Fremdartigene spezifisch.<sup>1</sup>

## 1.2 Regulatorische CD4+ Foxp3+ T-Zellen

Eine besondere Unterform der T-Lymphozyten sind die sogenannten regulatorischen T-Zellen (CD4+ Foxp3+ T-Zellen). Regulatorische T-Zellen (Tregs) haben wichtige Funktionen in der Beendigung von inflammatorischen Reaktionen und Immunantworten, sowie der Vermeidung von Autoimmunität. Durch die Suppression von diversen Immunzellen, wie z.B. CD4+ Helfer - und CD8+ T-Zellen, B-Zellen, sowie NK-Zellen, verhindern sie Autoimmunreaktionen,

Allergien und Schäden durch überschießende Immunreaktionen.<sup>2</sup> Die Suppression durch Tregs erfolgt auf verschiedene Arten. So kann über direkten Zell-Zell-Kontakt die T-Zellrezeptor (TCR) induzierte Proliferation von konventionellen T-Zellen gehemmt werden.<sup>2</sup> Tregs schütten weiterhin antiinflammatorische Zytokine, insbesondere TGF $\beta$ , IL-10 und IL-35, aus. Dadurch und durch den Konsum von IL-2, einem Überlebensfaktor für T-Zellen, wird eine Immunreaktion gedrosselt.<sup>2,3</sup> Auch besitzen Tregs die Fähigkeit, T-Zellen durch Granzyme direkt abzutöten.<sup>2</sup>

Foxp3<sup>+</sup> Tregs sind über den Interleukin 2 Rezeptor CD25 und über den Transkriptionsfaktor Foxp3 charakterisiert.<sup>2</sup> Foxp3 (kurz für forkhead box p3) kontrolliert die Treg-Entwicklung und -funktion. So reguliert der Transkriptionsfaktor unter anderem die Expression von CD25 und CTLA-4.<sup>3</sup>

Es lassen sich zwei Untergruppen der Foxp3<sup>+</sup> Tregs unterscheiden: Natürliche Tregs, die im Thymus gebildet werden, sowie induzierte Tregs, die erst peripher durch TGF $\beta$  aus CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen entstehen. Unabhängig vom Ursprung der Treg-Zellen besitzen diese unterschiedliche Mechanismen der Suppression, so beispielsweise durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch inhibitorische Zytokinausschüttung.<sup>3,4</sup>

### **1.3 Regulatorische T-Zellen und Osteopontin**

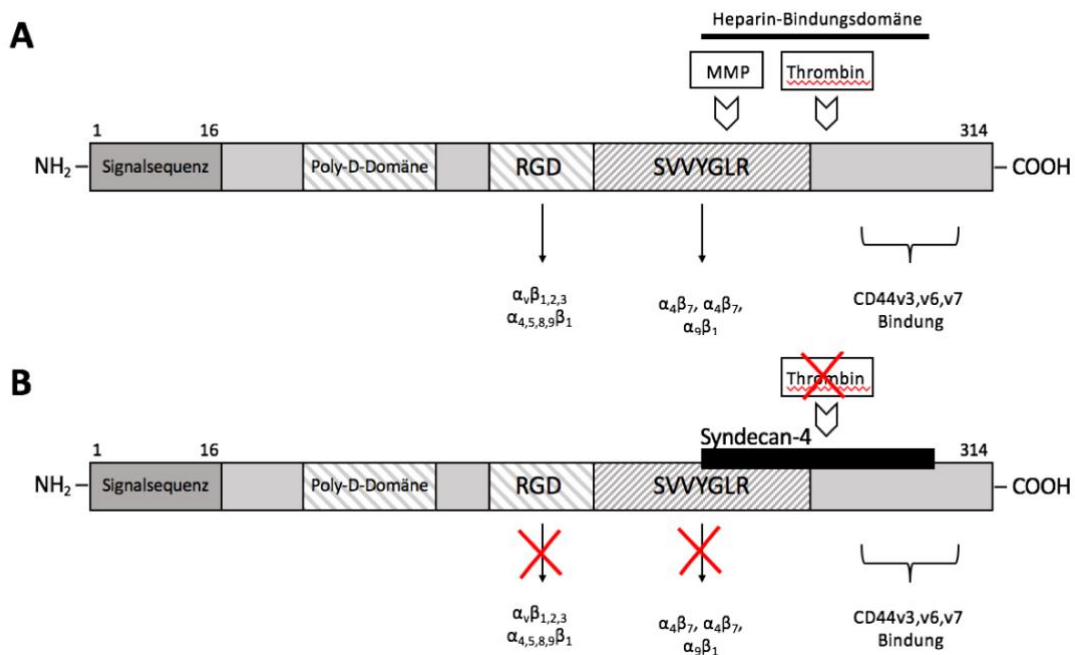
T-Lymphozyten produzieren eine Vielzahl an Zytokinen, regulatorischen Proteinen, die für die Zellinteraktion wichtig sind. Unter diesen findet sich auch das Molekül Osteopontin (OPN). Osteopontin ist ein Zytokin mit sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Wirkungen. Durch eben diese Interaktion mit dem Immunsystem ist dieses Protein auch klinisch interessant. Insbesondere Autoimmunerkrankungen oder entzündliche Prozesse in Zusammenhang mit Myokardinfarkten oder Wundheilungen anderer Art können durch eine Interaktion zwischen Osteopontin und dem Immunsystem positiv beeinflusst werden.

Eine wichtige Rolle spielen dabei CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Treg). Es konnte bereits eine deutliche Interaktion zwischen OPN und Treg-Zellen gezeigt werden. So können aktivierte Treg-Zellen die Ausschüttung von OPN verstärken

und dieses auch selbst produzieren.<sup>5-7</sup> Zudem zeigten erste noch unveröffentlichte Daten<sup>6</sup>, dass Treg-Zellen aus OPN-defizienten Mäusen eine verminderte Suppressionsfähigkeit aufwiesen.

## 1.4 Struktur von Osteopontin

Osteopontin (OPN) ist auch als Eta-1 (early T-lymphocyte activation gene 1) bekannt, da es in aktivierten T-Zellen in großen Mengen produziert wird.<sup>8,9</sup> Es ist ein stark negativ geladenes, saures und hydrophiles Protein, von etwa 300 Aminosäuren Länge (297 Aminosäuren in der Maus und 314 beim Menschen).<sup>8,10</sup> Strukturell zeichnet sich OPN durch zahlreiche translationale und



**Abbildung 1: Struktur von Osteopontin**

(A) OPN gehört zur SIBLING-Proteinfamilie (small integrin binding ligand N-linked glycoprotein) und ist etwa 300 Aminosäuren groß (Mensch: 314, Maus: 297). N-terminal findet sich eine 16 Aminosäuren lange Signalsequenz, die für die Sekretion des sOPN von Bedeutung ist. Eine Aspartat-reiche Region (Poly-D) vermittelt die Bindung an Hydroxyapatit. Im Zentrum des OPNs liegt eine RGD-reiche (Arginin-Glycin-Aspartat) Domäne, die die Integrinbindung vermittelt. OPN kann durch verschiedene Proteasen, wie Thrombin oder Plasmin, gespalten werden. Nach Spaltung wird eine SVVYGLR-Region (Serin, Valin, Valin, Tyrosin, Glycin, Leucin, Arginin (Mensch, Maus: SLAYGLR) freigelegt. Dieses Motiv kann von nicht-RGD-bindenden Integrinen erkannt werden. Auch einige Matrixmetalloproteasen (MMP) können OPN spalten. (B) Am C-terminalen Ende existiert eine Proteoglykan/Heparin-Bindungsdomäne. Bindet hier beispielsweise Syndecan-4 kann Thrombin OPN nicht mehr spalten und inflammatorische Zellen können via ihrer Integrin-Rezeptoren nicht mehr an OPN binden. Modifiziert nach Wang, 2008



posttranslationale Modifikationen aus. So konnten Shinohara et al zeigen, dass OPN durch alternative Translation in zwei Isoformen exprimiert wird.<sup>11</sup> Intrazellulärem Osteopontin (iOPN) fehlt eine Signalsequenz, die den Transport zu sekretorischen Vesikeln erlaubt. Sezerniertes Osteopontin (sOPN) dagegen wird als Zytokin in den Extrazellulärraum abgegeben.<sup>11,12</sup> Posttranslational wird OPN je nach Gewebetyp exzessiv durch Phosphorylierung, Glykosylierung, Sulfatierung, und Sialylierung modifiziert.<sup>8,10</sup> Darüber hinaus ist OPN auch Substrat für Thrombin, und verschiedene Matrixmetalloproteasen. Die proteolytische Prozessierung von OPN verstärkt dabei dessen biologische Wirkungen.<sup>9,13,14</sup> OPN gehört zur sog. SIBLING-Familie (small integrin binding ligand n-linked glycoprotein)<sup>8,9</sup> und besitzt darüber hinaus auch eine RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat), welche bekanntermaßen Integrine binden kann. Neben dieser Sequenz befinden sich auch weitere Aspartat-reiche Regionen, Heparin- und Thrombinbindungsstellen und eine CD44-bindende Stelle.<sup>8,10</sup> OPN wird auf einem einzelnen Gen (spp1 für secreted phosphoprotein 1<sup>15</sup>) auf Chromosom 4 (bzw. bei Mäusen auf Chromosom 5) codiert.<sup>5,16</sup> OPN wird weiterhin zu den matrizellulären Proteinen gezählt, d.h. Proteinen der Extrazellulärmatrix (EZM), die weniger zur Struktur der EZM beitragen sondern eher mehr regulatorische Funktionen erfüllen.<sup>17,18</sup>

## **1.5 Regulation der Osteopontin-Expression**

Die genauen Mechanismen, die zu einer vermehrten oder verminderten Expression von OPN führen sind noch nicht richtig verstanden. Dennoch gibt es Hinweise, dass die Produktion von OPN in zahlreichen Zelltypen durch verschiedene Stimuli verstärkt wird. So führen u.a. Hyperglykämie und Hypoxie zu einer Erhöhung der Expression von OPN.<sup>10</sup> Dabei könnten v.a. proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ )<sup>9,19,20</sup>, Hormone, wie Aldosteron<sup>21</sup> und Glukokortikoide<sup>18</sup> eine Rolle spielen. Speziell in Kardiomyozyten erhöhen Angiotensin II, Endothelin-1 und Norepinephrin die OPN-Expression.<sup>22</sup> Auf der anderen Seite wirkt IFN $\beta$  hemmend auf die OPN-

Produktion durch CD4<sup>+</sup>-Zellen.<sup>23</sup> Im Herzen können kardiale Fibroblasten die OPN-Spiegel senken.<sup>24</sup>

In T-Zellen ist die Expression von OPN vom Transkriptionsfaktor T-bet (T-box transcription factor) abhängig. T-bet ist ein Regulatorprotein für Genexpression in T-Zellen, dessen Aktivierung zu einer Th1-Zell-Polarisation führt. Dementsprechend findet man OPN hauptsächlich in Th1-Zellen und kaum in Th2-zellen.<sup>3</sup>

Die wichtigsten Produzenten von OPN sind Makrophagen und aktivierte T-Zellen. Naive T-Zellen produzieren dabei kaum OPN, nach Aktivierung kommt es jedoch in diesen Zellen zu einer starken Hochregulation der Produktion.<sup>9,11</sup>

## **1.6 Rezeptoren und Signalwege von Osteopontin**

### **a) Integrine:**

Über seine RGD-Sequenz interagiert OPN mit zahlreichen Integrinen, wie beispielsweise  $\alpha\beta3$ -,  $\alpha\beta1$ -,  $\alpha\beta5$ -Integrin. Darüber hinaus wird eine weitere Integrinbindungsstelle SVVYGLR (Serin, Valin, Valin, Tyrosin, Glycin, Leucin, Arginin) in humanen Zellen bzw. SLAYGLR in Mäusen mittels Spaltung durch Thrombin freigelegt (Abb. 1).<sup>8,13</sup> Die meisten Zellen binden OPN über Integrine. Dabei scheint der Vibronectinrezeptor  $\alpha\beta3$ -Integrin der Hauptrezeptor zu sein.<sup>25</sup> Die Bindung an Integrine ist wichtig für die Zelladhäsion zahlreicher Zellen, wie z.B. Leukozyten<sup>8,19</sup> und kardiale Myofibroblasten.<sup>22</sup> Andererseits verstärkt OPN durch Interaktion mit  $\alpha\beta3$ -Integrin die Migration und EZM-Invasion von Tumorzellen in vitro.<sup>26</sup>

### **b) CD44:**

Eine weitere bekannte Bindungsmöglichkeit von OPN ist der Hyaluronat-Rezeptor CD44. Neben der Bindung an Integrine ist auch die Interaktion von OPN mit CD44 wichtig für eine adäquate Zellmigration und –adhäsion von Fibroblasten, T-Zellen und Knochenmarkszellen.<sup>5,8,13</sup> Daneben führt die Bindung von OPN an Oberflächenrezeptoren von Makrophagen zu einer verstärkten

Sekretion von IL12 und einer verminderten IL10-Produktion. Dies fördert die Th1-Differenzierung.<sup>11,19</sup> Über den PI3K/Akt-Signalweg erhöht OPN zudem durch CD44 das Überleben der Zellen.<sup>8</sup> Wie Hyaluronat bindet OPN nur an die aktiven Isoformen CD44v6, v7 und v9.<sup>8,27</sup> OPN wirkt darüber hinaus auch regulatorisch auf die CD44-Expression. So zeigen OPN-KO Tiere eine verminderte CD44-Rezeptorzahl an der Zelloberfläche.<sup>9</sup> Insbesondere in Osteoklasten ist OPN ein Hauptregulator der Expression von CD44 an der Zelloberfläche.<sup>9,14</sup>

### **c) Toll-like-Rezeptor 9**

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind Rezeptoren des Immunsystems, die PAMPs (pathogen associated molecular patterns) registrieren. PAMPs sind funktionale Bestandteile von verschiedenen Bakterien, Viren und Pilzen. TLRs werden von vielen Immunzellen exprimiert, darunter dendritische Zellen, B-Lymphozyten, T-regulatorischen und konventionellen T-Zellen.<sup>28</sup> V.a. iOPN bindet TLRs (insbesondere TLR9).<sup>29</sup> In dendritischen Zellen aktiviert iOPN über IRF7 (Interferon regulatory factor 7 Transkriptionsfaktor) die IFN- $\alpha$ -Produktion,<sup>8,29</sup> welche zu einer verstärkten Th1-Differenzierung und einer proinflammatorischen Immunantwort führt.<sup>9</sup>

## **1.7 Funktionen und Aufgaben von Osteopontin**

Osteopontin ist ein wichtiger Mediator des Knochenstoffwechsels, der Tumorgenese und Wundheilung. OPN erhöht das Überleben vieler Zellen und ist an der Immunantwort beteiligt.

### **d) Innerhalb des Immunsystems**

Osteopontin ist wichtig für Inflammation und effiziente Immunantworten. Es besitzt dabei als Zytokin zahlreiche Effekte auf das Immunsystem. OPN ist in Ruhe nur in geringen Konzentrationen zu finden und wird nach einer Verletzung oder während einer inflammatorischen Reaktion stark exprimiert.<sup>8</sup> In der Folge unterstützt OPN die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1- und Th17-Zellen<sup>8,9</sup>, sowie die Bildung von Makrophagen. Weiterhin dient OPN als

chemischer Lockstoff für Neutrophile, Makrophagen und Dendritischen Zellen.<sup>8,9</sup> Es stimuliert darüber hinaus auch die IgM- und IgG-Produktion durch B-Zellen.<sup>20</sup> Die Bildung von Granulationsgewebe wird in Anwesenheit von OPN verstärkt, Kollagen Typ 1 wird vermehrt gebildet und die Wundheilung verbessert.<sup>15,30</sup>

Eine der wichtigsten Funktionen von OPN ist die Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen, insbesondere von Th1-Zellen. Lösliches sOPN steigert über die Bindung an CD44 und  $\alpha\beta 3$ -Integrine die Expression des proinflammatorischen Interleukin 12 durch Makrophagen. Gleichzeitig wird die Produktion von antiinflammatorischem Interleukin 10 gehemmt.<sup>11,31,32</sup> IL12 steigert die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1-Zellen, während IL10 diese hemmt.<sup>33</sup> Darüber hinaus wirkt OPN auch als Cofaktor für die  $\text{INF}\gamma$ -Produktion durch T-Zellen, welches ebenfalls die IL12-Expression durch antigenpräsentierende Zellen anregt.<sup>33</sup> Der Einfluss von OPN auf die T-Zell-Differenzierung zeigt sich auch darin, dass OPN hauptsächlich in Th1-Zellen, nicht jedoch in Th2-Zellen exprimiert ist.<sup>7</sup> Die Th1-Differenzierung führt zu einer zellvermittelten Immunität, die v.a. durch Phagozytose geprägt ist und gegen intrazelluläre Keime gerichtet ist.<sup>34</sup> Mäuse, die kein OPN produzieren können, zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber viralen, wie HSV-Typ 1, und bakteriellen (v.a. Listerien) Infektionen.<sup>19</sup> Abel et al.<sup>35</sup> dagegen kommen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass OPN für die Th1-Differenzierung nicht nötig sei, da sie keinen Unterschied zwischen OPN-Knock-out und Wildtyp-Tieren feststellen konnten.

Neben der Th1-Differenzierung hat OPN auch einen positiven Einfluss auf die Th17 Entwicklung. Intrazelluläres OPN hemmt in konventionellen Dendritischen Zellen (DC) die Expression von Interleukin 27, welches die Th17-Differenzierung bremst.<sup>12,13</sup> Unkontrollierte Th17-Immunantworten werden mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Dies könnte auch im Zusammenhang mit OPN stehen, da man bei einigen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Lupus erythematosus oder Autoimmunhepatitis eine Assoziation mit einer dysregulierten bzw. exzessiven OPN-Produktion finden kann.<sup>8,13</sup>

Auch für die Differenzierung und Funktion von Monozyten bzw. Makrophagen scheint OPN eine wichtige Rolle zu spielen. So konnten Nyström et al.<sup>36</sup> zeigen, dass ein OPN-Knock-Down zu einer Dedifferenzierung von Makrophagen zurück zu Monozyten-ähnlichen Zelltypen führte.

Obwohl OPN als ein proinflammatorisches Zytokin gilt, hat es auch antiinflammatorische Effekte. Dies zeigt sich beispielsweise durch eine Zwei-Phasen-Rolle von OPN während der Immunabwehr. Initial ist OPN wichtig für die Einleitung einer inflammatorischen Reaktion. In hohen Konzentrationen von OPN kommt es jedoch unter Umständen zu einer Verschlechterung der DC-Migration durch eine verminderte Expression von CCR7-Rezeptoren. Folglich resultiert eine verschlechterte T-Zell-Aktivierung und verminderte Immunantwort.<sup>37</sup> Hohe OPN-Konzentrationen hemmen zudem die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  durch Monozyten.<sup>38</sup>

Weiterhin zeigen noch unveröffentlichte Daten, dass regulatorische T-Zellen (Tregs) aus OPN-Knock-out-Tieren eine verminderte Suppressionskraft im Vergleich zu Wildtyp-Tregs aufweisen.<sup>6</sup> OPN scheint deshalb auch wichtig für die Suppression einer aktiven Immunantwort zu sein.

#### **e) Osteopontin und Myokardinfarkt**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen können nach der akuten Phase des Infarktes zu einer verbesserten Wundheilung beitragen.<sup>39</sup> Hierbei spielen insbesondere die regulatorischen T-Zellen (Tregs) eine wichtige Rolle. Treg-Zellen werden während eines Myokardinfarktes in den das Herz drainierenden Lymphknoten aktiviert. Von dort wandern sie in die Infarktzone und supprimieren einerseits die persistierende Inflammation und erhöhen andererseits die Produktion von OPN durch die Regulation der Makrophagendifferenzierung. Eine Depletion von Treg-Zellen resultiert in einer schlechteren Wundheilung nach Myokardinfarkt mit verschlechterter Herzfunktion gegenüber WT-Mäusen. Aktivierte Treg-Zellen stimulieren über IL10, TGF $\beta$ , und IL13 die Differenzierung von Monozyten in antiinflammatorische M2-Makrophagen, welche in großen Mengen OPN produzieren, was zu einer verbesserten Narbenbildung und Infarktheilung führt.<sup>40</sup>

Das Fehlen von OPN führt bei der Heilung nach Myokardinfarkt zu einer verminderten Ablagerung von Kollagen Typ 1 in der Infarktzone und zu einer generell schlechteren strukturellen Anordnung der Matrixproteine.<sup>24,41,42</sup>

### **c) Knochenstoffwechsel**

Osteopontin wurde ursprünglich aus dem Knochen isoliert. Darauf deutet der Name hin, lateinisch für „Knochenbrücken bildendes Molekül“.<sup>20</sup> Tatsächlich ist OPN ein wichtiger Faktor für die Knochenbildung und –stabilität. OPN fördert die Osteoklastendifferenzierung und –aktivität. Darüber hinaus hemmt OPN auch direkt die Mineralisierung der Knochenmatrix.<sup>16</sup> Für den effektiven Knochenauf- und umbau sind sowohl Knochenmineralisation als auch Knochenresorption wichtig. Für die Stabilität des Knochenskeletts ist eine ausgewogene Homöostase zwischen Osteoklasten und –blasten nötig. Eine Erhöhung der Osteoklastentätigkeit auf Kosten der Osteoblasten und umgekehrt führt zu instabileren Knochen. OPN-Knock-out Tiere zeigen daher aufgrund der verschlechterten Knochenhomöostase fragilere Knochen.<sup>14</sup>

### **d) Einfluss auf die Tumorentwicklung**

OPN ist stark mit der Entwicklung maligner Tumore assoziiert. Benigne Tumoren und gesundes Gewebe zeigen keine OPN-Expression, während in Malignomen und Metastasen OPN in hohen Konzentrationen nachweisbar ist.<sup>43</sup> OPN-mRNA wurde bereits in epidermalen Karzinomen und Melanomen<sup>44</sup>, sowie in hohen Plasmaspiegeln bei Mammakarzinomen, Multiplen Myelom und Prostatakarzinom gefunden.<sup>16</sup> OPN scheint zudem das Metastasierungspotential einiger Tumoren durch Interaktion mit dem ras-Onkogen zu steigern.<sup>44</sup> Entsprechend entwickeln OPN-Knock-out-Tiere seltener Knochen- und Weichteilmetastasen.<sup>16</sup>

### **e) Einfluss auf das Zellüberleben**

Osteopontin ist ein wichtiger antiapoptotischer Faktor für aktivierte<sup>14,45</sup> und ruhende<sup>46</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen. Darüber hinaus schützt OPN auch kardiale Fibroblasten<sup>47</sup>, Makrophagen<sup>36</sup>, Endothelzellen und Pro-B-Volläufere Zellen<sup>46</sup> vor

dem Zelltod. Die molekulare Grundlage dieses Effekts wird unterschiedlich diskutiert. So könnte OPN über CD44 mit dem Fas-Rezeptor interagieren<sup>8</sup> oder durch  $\alpha\beta 3$ -Integrine den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktivieren und proapoptische Proteine wie Bim, Bak und Bax hemmen<sup>46</sup>. Bim wird beispielsweise durch Zytokinentzug aktiviert.<sup>48</sup> OPN könnte durch verstärkte Induktion der Zytokinproduktion diesen Effekt hemmen.

#### **f) Diabetogene Wirkung von OPN**

OPN wirkt pro-diabetogen durch Steigerung der peripheren Insulinresistenz, indem es Immunzellen (ATMs: adipose tissue macrophages) in das Fettgewebe lockt.<sup>49</sup> Durch die nachfolgende Inflammation sinkt die insulinstimulierte Glucoseaufnahme der Adipozyten und folglich steigt der Insulinbedarf.<sup>50</sup> OPN-Knock-out-Tiere zeigen dagegen eine höhere Insulinsensitivität als Wildtyp-Tiere.<sup>49</sup>

#### **g) Zellmotilität und Zelladhäsion**

Intrazelluläres OPN moduliert u.a. Zytoskelett-assoziierte Funktionen, wie Zell-Motilität, Zellteilung und –fusion.<sup>8,12</sup> Extrazelluläres OPN dagegen gehört zu den matrizellulären Proteinen, d.h. es ist sowohl Bestandteil der EZM als auch ein Zytokin.<sup>9</sup> Anders als klassische EZM-Proteine ist es ein gelöstes Molekül und induziert Zellmotilität und trägt weniger zur stabilen Zelladhäsion bei.<sup>13</sup>

### **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Vor Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass Treg-Zellen Osteopontin sezernieren können und auch andere Zellen zur verstärkten Ausschüttung anregen können.<sup>40,5–7</sup> Auch zeigen bisher noch unveröffentlichte Daten, dass Treg-Zellen aus OPN-defizienten Mäusen eine geringere Suppressionskraft aufweisen als Treg-Zellen aus Wildtyp-Tieren.<sup>6</sup>

In dieser Arbeit sollte daher der Einfluss von OPN auf konventionelle und regulatorische T-Zellen näher untersucht werden. Insbesondere stellte sich die

Frage, inwiefern OPN die Suppression von konventionellen T-Zellen durch Tregs verändern kann. Ein genauerer Blick wurde auf den Einfluss von OPN auf die Aktivierung und das Überleben von Treg- und Tconv-Zellen, sowie auf deren Zytokinsekretion geworfen. Auch Unterschiede in der Suppressionskraft von Treg-Zellen aus OPN-Knock-out und Wildtyp-Tieren und die jeweilige Supprimierbarkeit von Tconv-Zellen wurden analysiert.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer

##### a) Zellkultur, Experimente

- |   |                         |
|---|-------------------------|
| - NaCl-Lösung   | Selbst angesetzt        |
| - Trypanblau  | Hartenstein<br>Würzburg |
| - Rekombinantes Osteopontin (Klon 441-OP)<br>(aus Maus-Myelom-Zellen) | R&D Systems             |
| - Hyaluronat  | Sigma                   |
| - Anti-Osteopontin-Antikörper<br>(Anti-Maus; Klon AF808)              | R&D Systems             |
| - Nomales Maus Immunglobulin G  | Sigma                   |
| - Proleukin   | Novartis                |
| - eFluor670   | ebioscience             |
| - Calibrite Microbeads  | BD                      |

##### b) Kits

- |  |             |
|--|-------------|
| - T-cell-enrichment-Kit  | Milteny     |
| - Treg-Isolation-Kit   | Milteny     |
| - Mouse-antiCD90-Kit   | Milteny     |
| - Conjugation-Kit LNK031 APC   | AbD-Serotec |
| - Legendplex: Zytokine: INF $\gamma$ , IL-10,<br>IL-2, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ und IL-17A | Biologend   |

### c) Durchflusszytometrie/Antikörper

Antikörper	Klon	Reaktivität	Fluoro- chrom	Endver- dünnung	Firma
$\alpha$ Foxp3	3G3	Anti- Maus/Anti- Human	APC	1:50	Miltenyi biotec
$\alpha$ CTLA4	UC10- 4B9	Anti-Maus	PECy7	1:250	Bio-legend
$\alpha$ Ki-67		Anti- Maus/Anti- Human	PE	1:100	BD
$\alpha$ CD3 $\epsilon$	145- 2C11	Anti-Maus	---	1:1000	Bio-legend
$\alpha$ CD3	145- 2C11	Anti-Maus	PerCp	1:100	Bio-legend
$\alpha$ CD4	RM 4-5	Anti-Maus	Pacific Blue	1:300	Bio-legend
$\alpha$ CD4	Gk 1.5	Anti-Maus	PE	1:500	Bio-legend
$\alpha$ CD25	PC61	Anti-Maus	PE	1:200	Bio-legend
$\alpha$ CD25	PC61	Anti-Maus	FITC	1:100	Bio-legend
$\alpha$ B220/CD45 R	RA3- 6B2	Anti- Maus/Anti- Human	FITC	1:100	Bio-legend
AntiFcy Rezeptor II/III	Klon 2.4G2	Anti-Maus	---	1:5	BD/eigene Herstellung
Isotyp IgG2b	RMG2 b-1	Ratte/Anti- Maus	FITC	1:100	Bio-legend
$\alpha$ CD69	H1.2F 3	Anti-Maus	PE	1:200	Bio-legend
$\alpha$ GITR	DTA-1	Anti-Maus	FITC	1:100	Bio-legend
ViabilityDye			eFlour780	1:1000	eBio-science

## 2.1.2 Lösungen und Zusammensetzungen

### FACS-Puffer

0,1% BSA in PBS + 0,02% NaN<sub>3</sub>

### 2.4G2-Blockingreagenz

10 µl anti-FcγRezeptor II/III, Klon 2.4G2, 40 µl FACS-Puffer

### Lysepuffer

25mM NaOH, 0,2mM EDTA

### Nährmedium für die Zellkultur

500 ml RPMI + 40ml SC (1 mM Natriumpyruvat, nicht essentiellen Aminosäuren MEM (0,05–2 mM), 100 U / ml Penicillin und 100 µg / ml Streptomycin, 30 µM Mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamin und 10 % (v / v) hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum) + 27ml FCS

### BSS/ 0,1% BSA

## 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- |                                 |                         |
|---------------------------------|-------------------------|
| - Zellsiebe (Porengröße: 70µm)  | Falcon                  |
| - 20ml Spritzen                 | Braun                   |
| - LD- & LS-Säulen               | Milteny                 |
| - Pipettenspitzen               | Hartenstein<br>Würzburg |
| - Serologische Pipettenspitzen  | Sarstedt                |
| - 15ml, 50ml Falcons            | Sarstedt                |
| - FACS-Tubes, 5ml, round bottom | Hartenstein<br>Würzburg |

- Reagenzröhrchen Hartenstein  
Würzburg
- 96-Well Mikrottestplatten V-Boden Greine bio-one
- 96-Well Cell culture Plate U- und F-Boden Greine bio-one
- Petrischalen Hartenstein  
Würzburg
- 1,5ml, 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß Eppendorf
- PCR-Reaktionsstreifen Hartenstein  
Würzburg

#### 2.1.4 Geräte

- FACS BD LSR II und FACScalibur
- Vortexer Bonder und Hobein  
AG, Zürich
- Zentrifuge Heraeus
- Neubauerzählkammer Hartenstein  
Würzburg
- Magnisort-Magnet Milteny
- MidiMACS-Magnet Milteny
- Sterilbank Heraeus
- Wasserbad GFL
- PCR: Thermocycler, Gelelektrophorese MJ Research
- Pipetten Eppendorf
- Multipipette Eppendorf
- Serologische Pipette Brand
- Brutschrank Heraeus
- Objektträger und Deckgläser Hartenstein  
Würzburg
- Mikroskop Leica
- Analysewaage Mettler

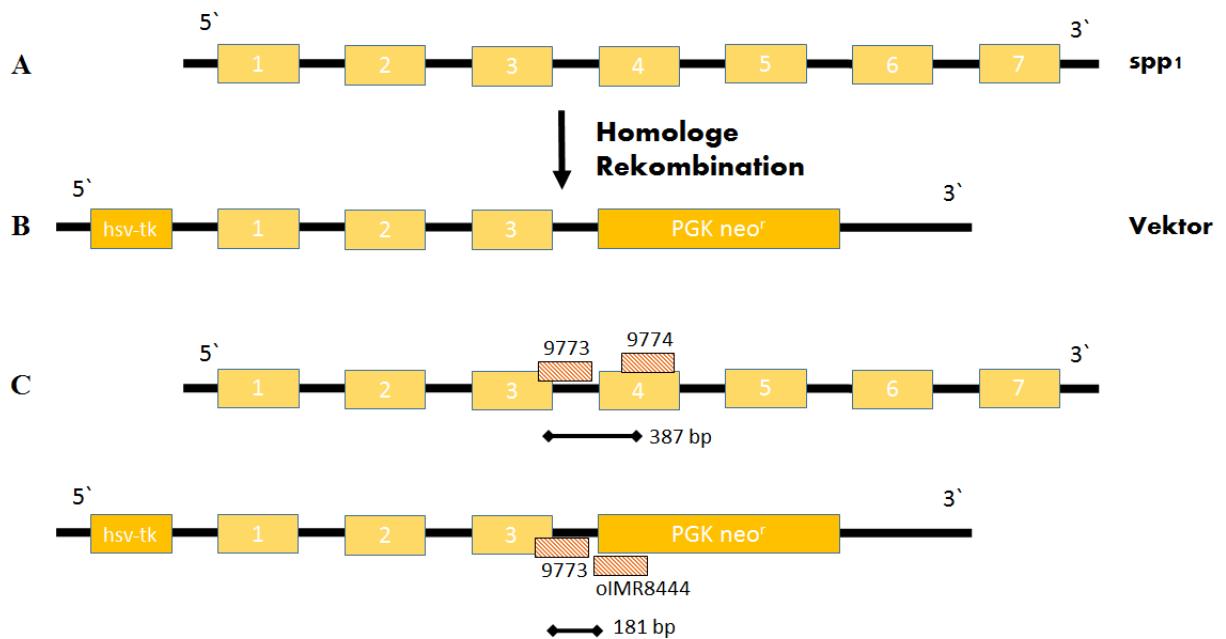
### 2.1.5 Programme

- FlowJo V.7.6
- Legendplex Data Analysis Software V.7.0
- Graphpad Prism 6, 2015
- BD FACSDiva-Software

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mauslinien

Für alle Experimente wurden männliche oder weibliche Wildtyp C57BL/6 (J) Mäuse (Hauszucht des Instituts für Virologie und Immunologie, Würzburg) und entsprechend alters- und geschlechtsgleiche Osteopontin-knock-out Tiere (ssp1-; Stammname: B6.129S6(Cg)-spp1<sup>tm1Blh</sup> /J) ursprünglich von The Jackson Laboratories verwendet. Die homozygoten ssp1-Knock-out-Mäuse wurden für die folgenden Experimente mit homozygoten WT-Tieren der Hauszucht (C57BL/6/7) verpaart. Die Mäuse waren im Schnitt zwischen 5 und 8 Wochen alt. Die Mäuse wurden mittels einer PCR genotypisiert. Dazu wurde DNA mittels eines Lysepuffers aus dem Gewebe isoliert. Nach Liaw et al.<sup>15</sup> wurden folgende Primer generiert: Primer 9773: 5'CCATACAGGAAAGAGAGACC3', welcher sowohl an das WT-Gen, als auch an das KO-Gen bindet. Sowie Primer 9774: 5'AACTGTTTTGCTTGCATGCG3', der spezifisch nur an das WT-Gen bindet und Primer oIMR8444: 5'CGTCCTGTAAGTCTGCAGAA3' für das KO-Gen. Abbildung 2 zeigt einen Schematischen Aufbau des murinen Osteopontingens und der Anlagerung der Primer.



**Abbildung 2: Knock-out Mutation des spp1-Gens und Anlagerung der Primer:** (A) Das endogene spp1-Gen besteht aus 7 Exons (Kästchen 1-7). (B) Bei der Nullmutation mit Unfähigkeit, ein funktionierendes Opn-Transkript zu bilden, wurden die Exons 4-7 durch eine Phosphoglycerokinase (PGK) und ein Neomycin-Resistenzgen (*neo<sup>r</sup>*) ersetzt. Dazu wurde durch homologe Rekombination ein pPNT-Vektor mit dem spp1-Gen generiert und anschließend mit dem PKG *neo<sup>r</sup>* Gen beladen. Zusätzlich wurde dem Vektor eine Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Cassette außerhalb der homologen Sequenzen angehängt. (C) Die verwendeten Primer 9773 und 9774 binden an die Exons 3 und 4 des spp1-Gens, wobei 9773 sowohl beim Wildtyp, als auch beim KO-Tier binden kann, während 9774 nur beim Wildtyp eine Bindungsstelle findet. Der Primer oIMR8444 bindet spezifisch an das PGK *neo<sup>r</sup>* Gen und damit an das KO-Gen. Es resultieren ein 387 Basenpaare langes Produkt aus dem WT-Gen und ein 181 Basenpaare langes aus dem spp1-KO-Gen.<sup>15</sup>

## 2.2.2 Zellgewinn und –aufreinigung

### a) Zellgewinnung

Die Tiere wurden mittels CO<sub>2</sub> (Gas oder Trockeneis) getötet und anschließend sofort präpariert. Für die Aufreinigung der T-Lymphozyten wurden Lymphknoten von inguinal, axillär, zervikal und des Mesenteriums, sowie die Milz entnommen. Für die Aufreinigung der antigenpräsentierenden Zellen wurden lediglich Milzzellen verwendet.

Die Organe wurden mit Hilfe von Zellsieben (Porengröße: 70µm) und Stempeln aus 20ml-Spritzen zerdrückt und die Zellen in BSS/BSA aufgenommen.

Die Milzen wurden anschließend von Erythrozyten befreit. Dazu wurde die Zellsuspension bei 460g für 5min pelletiert und das entstandene Zellpellet in 3ml destilliertem Wasser resuspendiert. Die Zellyse wurde durch Zugabe von 3ml 1,8% NaCl-Lösung gestoppt. Nach 5min bei 4°C wurde die übrige Zellsuspension von den abgesetzten Zelltrümmern getrennt.

Die Zellzahl wurde durch eine 1:10 Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer erfasst.

## **b) Zellaufreinigung**

### **CD4+-Aufreinigung**

Anschließend wurden aus den Lymphknoten- und Milzzellen mit Hilfe des T-cell-enrichment-Kit von eBioscience und einem entsprechendem Magni-Sort-Magneten gemäß Herstellerprotokoll CD4+ T-Zellen aufgereinigt.

### **CD4+CD25+ und CD25- Aufreinigung durch Treg Isolation-Kit**

Anschließend zur CD4+-Aufreinigung wurden die Lymphozyten mit Hilfe des Treg-Isolation-Kits von Miltenyi Biotec in CD4+CD25+ und CD4+CD25- Zellen aufgetrennt. Anders als der Hersteller dies vorsieht wurden die Zellen anstelle von MS-/MD-Säulen mit LD- und LS-Säulen aufgereinigt.

Dazu wurden die Zellen zunächst in 40µl BSS/BSA pro  $10^7$  Zellen aufgenommen und mit 10µl Biotin-Antikörpercocktail pro  $10^7$  Zellen versetzt. Nach einer Inkubation von 10min bei 4°C wurden zusätzlich 30µl BSS/BSA, 20µl anti-Biotin-Microbeads und 10µl anti-CD25-PE Antikörper pro  $10^7$  Zellen hinzugefügt. Nach 15min wurden die Zellen mit BSS/BSA bei 300g für 5min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 1ml BSS/BSA resuspendiert und auf eine LD-Säule gegeben, die daraufhin 3x mit je 1ml BSS/BSA gewaschen wurde. Der Durchfluss wurde zentrifugiert und in 90µl Puffer/ $10^7$  Zellen aufgenommen. In die Zellsuspension wurden dann 10µl Anti-PE-Microbeads/ $10^7$  Zellen pipettiert und damit für 15min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und in einem Volumen von 1ml BSS/BSA auf eine LS-Säule aufgetragen, die 3x mit je 1ml BSS/BSA gespült (Durchfluss = Tconv) und schließlich mit 4ml BSS/BSA

außerhalb des Magnetfeldes ausgedrückt wurde (=Treg). Um die Reinheit zu erhöhen, wurden die Treg durch eine zweite LS-Säule aufgereinigt.

Die Reinheit betrug sowohl für Treg- als auch für Tconv-Zellen im Schnitt zwischen 80-90%.

### **Aufreinigung der Antigenpräsentierenden Zellen**

Für den Suppressionsassay wurden aus den Milzzellen durch das Mouse-anti-CD90-Kit (Mitsunaka Biotec) durch T-Zelldepletion vor allem B-Zellen und Monozyten gewonnen. Die Aufreinigung erfolgte dabei nach Herstellerprotokoll. Diese Zellen wurden im Folgenden als Antigenpräsentierende Zellen (APZ) verwendet.

Die Reinheit betrug durchschnittlich 90%.

### **2.2.3 Färbung mit APC konjugiertem rekombinantem Osteopontin (rOPN)**

Zum Nachweis der Bindung von rekombinantem Osteopontin an Lymphozyten wurden Lymphknotenzellen mit rekombinantem Osteopontin, welches zuvor mit dem Fluorochrom APC (Allophycocyanin) konjugiert wurde, inkubiert. Das rOPN wurde dabei mit Hilfe eines Conjugation-kit von AbD-Serotec nach Herstelleranleitung in einem Verhältnis von 1:1 (Protein:Fluorochrom) behandelt. Zur Färbung wurden Lymphknotenzellen von WT- und spp1-KO-Mäusen präpariert. Anschließend wurden je  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well in eine 96-Well V-Bodenplatte überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde ein Teil der Zellen mit  $25 \mu\text{g/ml}$  unkonjugiertem rOPN oder alternativ mit  $25 \mu\text{g/ml}$  Hyaluronsäure in  $25 \mu\text{l}$  FACS-Puffer für 15min bei  $4^\circ\text{C}$  geblockt. Die übrigen Ansätze wurden nur mit  $50 \mu\text{l}$  FACS-Puffer behandelt. Ohne die Zellen zu waschen wurde nun direkt rOPN-APC in verschiedenen Konzentrationen in  $25 \mu\text{l}$  FACS-Puffer pro Well hinzugefügt und erneut 15min auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit  $\alpha\text{CD4-PE}$ ,  $\alpha\text{CD25-FITC}$  und ViabilityDye gefärbt (s.u.).



#### **2.2.4 Einfluss von rekombinantem OPN auf das Überleben unstimulierter Lymphozyten**

Um den Einfluss von rOPN auf das Überleben von Mauslymphozyten zu ermitteln, wurden Lymphknotenzellen und Milzzellen isoliert. Von diesen Zellsuspensionen wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen in 150  $\mu$ l RPMI in eine 96-Well U-Bodenplatte pipettiert. Jeder Ansatz wurde dabei als Triplet angelegt, sodass ein Mittelwert gebildet werden konnte. Zu den Zellen wurde dann in 50  $\mu$ l RPMI rOPN in den Konzentrationen 0, 0,5, 1 und 5  $\mu$ g/ml hinzugegeben. Nach 0, 1, 2, und 3 Tagen wurden dann die jeweiligen Ansätze in 96-Well V-Bodenplatten überführt und mit  $\alpha$ CD4-Pacific Blue,  $\alpha$ CD25-PE, ViabilityDye, sowie intrazellulär mit  $\alpha$ Foxp3-APC gefärbt (siehe Kapitel FACS-Färbung).

In Reagenzröhrchen wurden 50  $\mu$ l FACS-Puffer und je  $1 \times 10^4$  BD Calibrite Beads vorgelegt und schließlich die Zellen in 50  $\mu$ l hinzugefügt. Durch das Zählen der Beads lässt sich von dem gemessenen Anteil der Zellen auf die Gesamtzellzahl rückschließen.

#### **2.2.5 Einfluss von rOPN auf die Expression von CTLA-4, CD25 und Ki-67 nach T-Zellaktivierung**

Eine 96-Well Flach-Bodenplatte wurde mit 10  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3-Antikörper in 200  $\mu$ l sterilem Natriumbikarbonat-Puffer für 2h bei 37°C gecoatet. Anschließend wurden die Wells durch 3maliges Waschen mit sterilem BSS/BSA von nicht gebundenem  $\alpha$ CD3-AK befreit. Um unspezifische Bindungen an den Plattenboden zu vermeiden, wurde jedes Well mit je 20  $\mu$ g/ml normalem Maus-IgG in 200  $\mu$ l BSS/BSA bei 37°C geblockt und anschließend erneut 3mal mit sterilem BSS/BSA gewaschen.

Zellen aus WT- und KO-Mäusen wurden wie oben beschrieben in Treg und Tconv getrennt und jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen in 150  $\mu$ l RPMI in die vorbereiteten Wells pipettiert. Da die isolierten Treg-Zellen Proleukin (IL-2) zum Überleben benötigen wurde zu den Ansätzen  $10^{-6}$ M Proleukin gegeben. Zudem wurde rOPN in den Konzentrationen 0, 0,1, 1 und 5  $\mu$ g/ml hinzugefügt.

Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank für 1,2 oder 3 Tage stimuliert. An den jeweiligen Tagen wurden von den entsprechenden Ansätzen Überstand entnommen, sowie die Zellen mittels FACS-Färbung (siehe dort) mit den Oberflächenmarkern  $\alpha$ CD25-FITC,  $\alpha$ CD4-Pacific Blue, und ViabilityDye, sowie den intrazellulären Markern  $\alpha$ CTLA-4-PE und  $\alpha$ Ki-67-PE gefärbt.

### **2.2.6 Analyse der Zytokinsekretion von Treg- bzw. Tconv-Zellen durch Legendplex**

Da OPN bekanntermaßen die Zytokinausschüttung von T-Zellen beeinflussen kann, wurden diese mithilfe des Untersuchungskits „Legendplex“ von Biolegend analysiert. Dazu wurden Treg- bzw. Tconv-Zellen mit 10 $\mu$ g  $\alpha$ CD3-Antikörper für zwei Tage stimuliert (vgl. Experiment 2.2.5). Einem Teil der Zellen wurde rekombinantes OPN hinzugegeben. Nach zwei Tagen wurde der Überstand aus den Kulturen entnommen und mit dem Legendplex-Kit auf Zytokine untersucht. Der Legendplex ist ein Microbead-basierter Immunoassay, bei dem Microbeads die entsprechenden Zytokine binden und anschließend Sekundärantikörper hinzugegeben werden, über die man die gebundenen Zytokine sichtbar machen kann. Im Legendplex wurden folgende Zytokine gleichzeitig bestimmt: IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-13 und IL17-A. Dabei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen, wobei jedoch von den Puffern und Beads lediglich  $\frac{1}{4}$  der Herstellerangaben verwendet wurden. Die inkubierten Überstände wurden anschließend am FACSCalibur gemessen und die gewonnenen Daten mittels der Legendplex-Software (VigeneTech) ausgewertet.

### **2.2.7 Suppressionsassay**

#### **a) Labeling mit eFluor670**

Nach der Aufreinigung der Zellen in Treg- und Tconv-Zellen wie oben beschrieben, wurden die konventionellen T-Zellen mit 10 $\mu$ M eFluor670 gelabelt. Dieser Farbstoff wird bei jeder Zellteilung zu etwa gleichen Teilen an beide Tochterzellen abgegeben und kann so die Anzahl der Zellteilungen über die

Anzahl der MFI-Halbierungen anzeigen. Die MFI ist die mittlere Fluoreszenzintensivität („Median Fluorescence Intensity“) und stellt ein Maß für die Anzahl der gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe pro Zelle dar. Dazu wurden die Zellen mit 50ml warmem PBS gewaschen, um alle Reste von Proteinen zu entfernen, und anschließend auf  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in warmem PBS eingestellt. eFluor670 10 $\mu$ M wurde im gleichem Volumen in einem Verhältnis von 1:1000 (10nM) direkt auf dem Vortexer dazugegeben. Ursprünglich sah das Protokoll eine Konzentration von 1:500 vor, welche aber aufgrund der Toxizität des Farbstoffes reduziert wurde. Die Zellen wurden zusammen mit dem Farbstoff bei 37°C im Wasserbad für 10min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das 4-5fache an BSS/BSA des ursprünglichen Volumens hinzugegeben und nach 5min bei 4°C mit BSS/BSA gewaschen.

## **b) Kultivierung**

Jeweils  $5 \times 10^4$  Treg, Tconv, sowie APCs wurden in je 50 $\mu$ l RPMI in ein Well pipettiert. Zuerst wurden dabei die Treg in einer 1:2-Titration in Reihe verdünnt. In diese Wells wurden anschließend je  $5 \times 10^4$  Tconv zugegeben, sodass diese mit den regulatorischen T-Zellen in den Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8 kokultiviert wurden. Zur Stimulation der Tconv-Zellen wurden  $5 \times 10^4$  APCs, sowie 1 $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3-AK hinzupipettiert. Zu entsprechenden Ansätzen wurden dann rOPN oder Hyaluronsäure zugegeben. Zusätzlich wurden in einigen Ansätzen anstelle von Treg ungelabelte Tconv-Zellen als Kontrollzellen hinzu pipettiert. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit  $\alpha$ CD25-FITC,  $\alpha$ CD4-Pacific Blue, und ViabilityDye gefärbt

### **2.2.8 Effekt von rOPN auf die Expression von GITR durch Treg und Tconv**

Je  $2 \times 10^5$  Lymphknoten- und Milzzellen von WT- oder KO-Mäusen wurden in 150 $\mu$ l RPMI +SC + 5%FCS in eine 96-Well U-Bodenplatte pipettiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1 $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3-AK ohne weitere Zugabe oder 5 $\mu$ g/ml

rOPN und 1 µg/ml αCD3-AK für 0h, 24h, 32h oder 48h stimuliert. Zusätzlich wurde zu jedem Ansatz eine Isotypkontrolle angelegt, um eine unspezifische Bindung ausschließen zu können.

Nach der Stimulationszeit wurden die Zellen in eine 96-Well V-Bodenplatte überführt und mit αCD4-Pacific Blue, αCD69-PE, ViabilityDye, αGITR-FITC bzw. Isotypkontrolle mouse IgG2b, sowie αFoxp3-APC gefärbt.

### **2.2.9 FACS-Färbung**

Die Experimente wurden am Durchflusszytometer (FACS) analysiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst in 96-Well V-Bodenplatten überführt und bei 460g für 3 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden daraufhin in 25µl FACS-Puffer und Anti-Fcγ-Rezeptor II/III-Antikörper (Klon 2.4G2; Verhältnis 1:5) resuspendiert. Dieser Antikörper bindet Fcγ-Rezeptor II/III von Leukozyten und verhindert so eine unspezifische Bindung von Antikörpern an diese Rezeptoren. Nach 15min auf Eis wurden 25µl FACS-Puffer und die entsprechenden fluorochromkonjugierten Antikörper hinzugegeben und weitere 15min im Dunklen bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 200µl FACS-Puffer in Reagenzröhrchen überführt.

Sofern jedoch die Zellen neben den oberflächenbindenden Antikörpern auch mit intrazellulär bindenden Antikörpern gefärbt wurden, wurden die Zellen nach der ersten Antikörperfärbung mit PBS gewaschen und nachfolgend mit 100µl/Well Fixationspuffer von eBioscience nach Herstellerprotokoll für 30min bei Raumtemperatur und im Dunkeln (alternativ bei 4°C über Nacht) fixiert. Nach einem Waschschrift mit PERM-Puffer (1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser) wurden die Zellen mit 50µl FACS-Puffer und den entsprechenden gegen intrazelluläre Antigene gerichtete Antikörpern für 45min bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit PBS gewaschen und letztlich in 200µl FACS-Puffer in Reagenzröhrchen überführt.

### **2.2.10 Statistik**

Alle FACS-Daten wurden mit dem Programm FlowJo bearbeitet. Daten aus dem Legendplex mit der entsprechenden Analysesoftware von Biolegend.

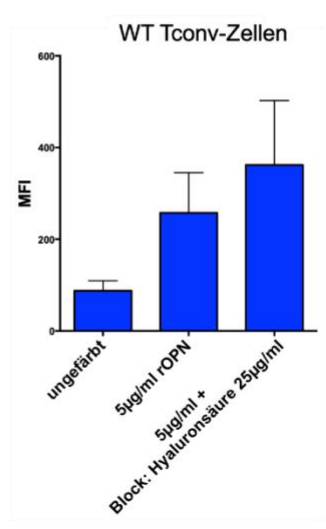
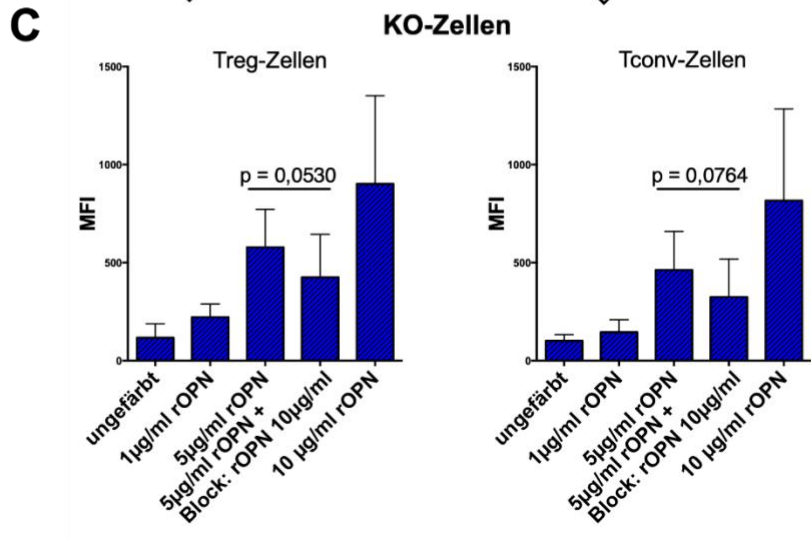
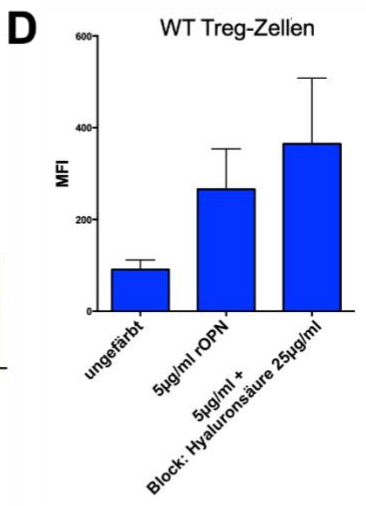
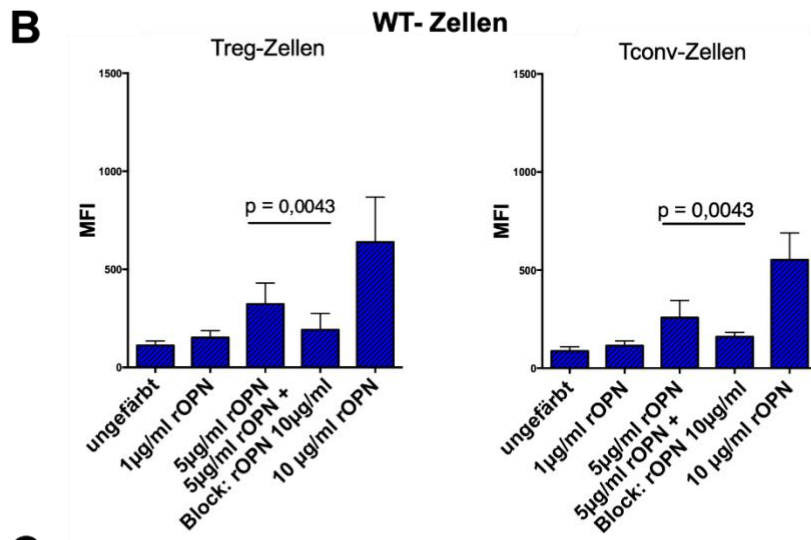
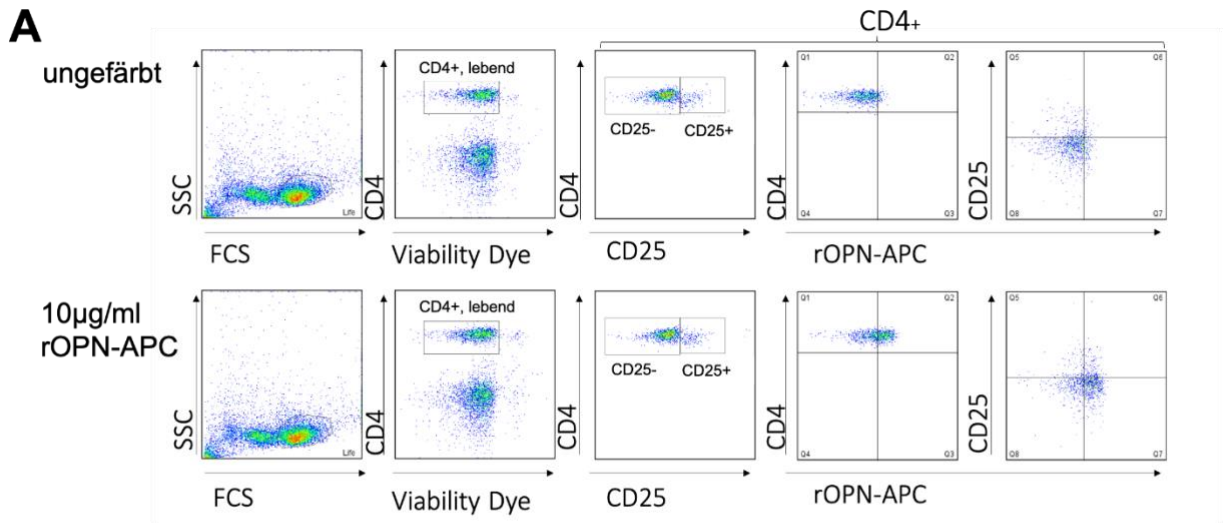
Die Daten wurden anschließend mittels Excel sowie Graphpad Prism ausgewertet. Um signifikante Unterschiede zu ermitteln wurden Student's t-Tests durchgeführt. Für den Suppressionsassay wurden mittels zweiseitiger ANOVA-Testung Unterschiede ermittelt. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als signifikant gewertet. Alle Daten werden als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung abgebildet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Rekombinantes Osteopontin bindet an konventionelle und regulatorische T-Zellen der Maus

Zum Nachweis, dass das verwendete rekombinante Maus-Osteopontin (rOPN) auch tatsächlich an die untersuchten regulatorischen (Treg) und konventionellen (Tconv) Zellen bindet, wurden die Zellen zunächst mit APC (Fluorochrom Allophycocyanin) markiertem rOPN versetzt (Abb. 3A). Bei Zellen aus Wildtyp-Tieren (WT) lässt sich sowohl bei Treg- als auch bei Tconv-Zellen mit Steigerung der rOPN-Konzentration eine Zunahme der MFI feststellen (siehe Abb. 3B). Bei vorheriger Inkubation der Zellen mit ungelabeltem rOPN kommt es zu einer signifikant geringeren Anfärbung mit rOPN-APC (siehe Abb. 3B). Daraus lässt sich schließen, dass in der Tat rOPN an die Zellen bindet und nicht das Fluorochrom selbst. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Zellen aus Knock-out-Tieren (KO) (siehe Abb. 3C). Auch hier kommt es zu einer Zunahme der Bindung von gelabeltem rOPN mit steigender Konzentration, sowie einer Reduktion der Bindung durch vorherige Blockade der Rezeptoren durch ungelabeltes rOPN.

Aus der Literatur ist bekannt, dass OPN unter anderem mit den CD44v9- und CD44v6-Varianten des CD44-Rezeptors interagiert.<sup>8,27</sup> Darüber hinaus weiß man, dass auch Hyaluronsäure an diese Rezeptorvarianten bindet.<sup>27,51</sup> Es sollte nun geprüft werden, ob eine Blockade der CD44-Rezeptoren mittels vorheriger Inkubation mit Hyaluronsäure die Bindung von rOPN vermindert (siehe Abb. 3D). Es ist jedoch kein Unterschied zwischen einer Vorbehandlung mit Hyaluronsäure und alleiniger Färbung mit rOPN erkennbar. Allerdings sind die Zellen in diesem Experiment nicht stimuliert, sodass die Konformation der CD44-Rezeptoren auf der Zelloberfläche ungeeignet für die Bindung von OPN sein dürfte. Diese Ergebnisse decken sich auch mit der Literatur, da Hyaluronsäure hauptsächlich an aktivierte und kaum an unstimulierten Zellen bindet.



### **Abbildung 3: Bindung von APC-markiertem OPN an Treg- und Tconv-Zellen**

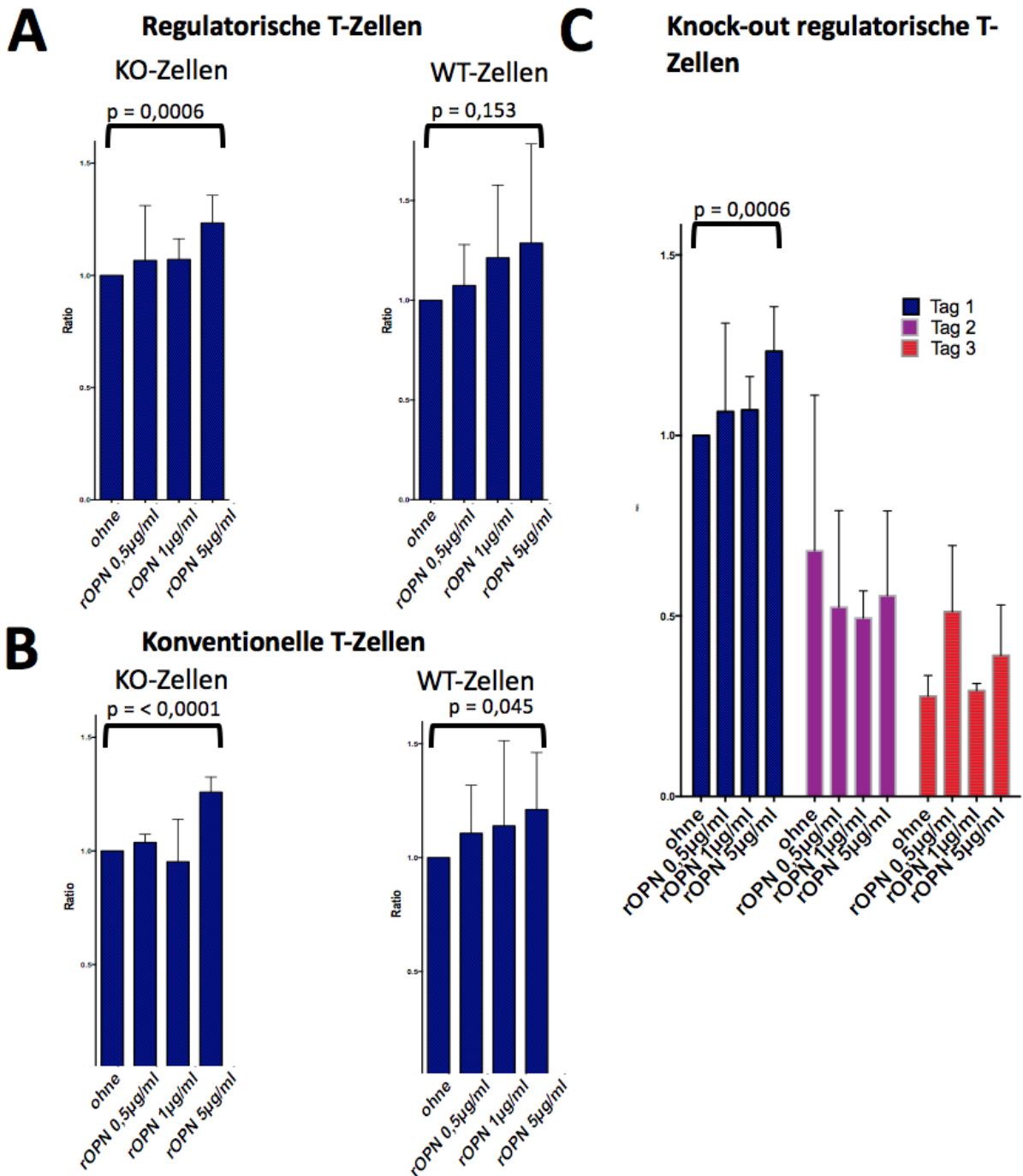
(A) Repräsentative FACS-Daten zur Darstellung der Gatingstrategie. Zunächst wurden alle lebenden (Viability Dye negativen) CD4<sup>+</sup>-Zellen gated. Diese wurden anschließend in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>- (Treg-Zellen) und CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen (Tconv-Zellen) unterschieden und jeweils auf rOPN-APC-Bindung analysiert. (B-C) Die Diagramme zeigen die Bindung von rOPN-APC für WT- (B) bzw. KO-Zellen (C). Bei beiden zeigt sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Bindung von rOPN-APC sowohl bei Treg- als auch bei Tconv-Zellen. Zudem lässt sich die Bindung durch Zugabe ungelabelten OPNs inhibieren (WT n=14); KO n=3). (D) stellt die Bindung von rOPN-APC an mit Hyaluronsäure vorinkubierten Zellen dar. Hyaluronsäure bewirkt dabei keine Blockierung der Bindung von rOPN (n=3). P-Werte mittels t-Test bestimmt.

Zellen aus OPN-Knock-out-Tieren zeigten insgesamt eine höhere MFI für gebundenes OPN als Zellen aus WT Tieren (Vgl. Abb. 3B und C). Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass die KO-Tiere kein OPN vorgebunden haben und somit mehr gelabeltes OPN sich anlagern kann. Zusammenfassend kann man nun sagen, dass das verwendete rekombinante Maus-OPN an die hier auch im Folgenden untersuchten Zellen binden kann.

### **3.2 Rekombinantes OPN erhöht das Überleben von konventionellen und regulatorischen T-Zellen in vitro**

Osteopontin kann das Überleben von aktivierten und ruhenden CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen erhöhen.<sup>45,46</sup> Bislang wurden lediglich CD4<sup>+</sup>-Zellen im Gesamten untersucht. In dieser Arbeit sollten die Untergruppen der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>- Treg- und CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>-</sup>Tconv-Zellen verglichen werden. Hierzu wurden Zellen aus WT- oder OPN-KO-Tieren (aus Lymphknoten und der Milz gewonnen) für 1, 2 oder 3 Tage mit oder ohne OPN im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Die Anzahl der überlebenden Zellen wurde anschließend mittels Microbeads ermittelt. Da jedoch die absoluten Zahlen der Zellen in den einzelnen Experimenten – bei gleichen Tendenzen – stark schwankten, wurden die Zahlen für jedes Experiment auf den Tag 0 normalisiert (vgl. Abb.4A). Wie aus Abbildung 4A ersichtlich ist die Zahl der nach einem Tag überlebenden Treg-Zellen durch OPN-Zugabe leicht erhöht gegenüber unbehandelten Zellen. Dieser Effekt ist insbesondere am ersten und am dritten Tag nach Zellisolation erkennbar (Abb. 4C).





**Abbildung 4: OPN erhöht das Überleben von Tconv- und Treg-Zellen**

Die absoluten Zahlen der noch lebenden Zellen (aus Lymphknoten und Milz) schwankten in den einzelnen Experimenten – bei gleichen Tendenzen – stark, daher wurden die Zahlen für jedes Experiment auf den Tag 0 normalisiert. (A-B) zeigen die normalisierten Zellzahlen am ersten Tag nach Inkubation für Treg- (A) und Tconv-Zellen (B) aus WT-Tieren bzw. KO-Tieren. Durch rOPN-Zugabe kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Zellzahlen. (WT n=7; KO n=3). P-Werte mittels t-Test erhoben (jeweils Gruppe „5µg rOPN“ gegen Gruppe „ohne“ verglichen). (C) Darstellung der Zellzahlen von WT-Treg-Zellen nach ein, zwei und drei Tagen nach Beginn der Inkubation.

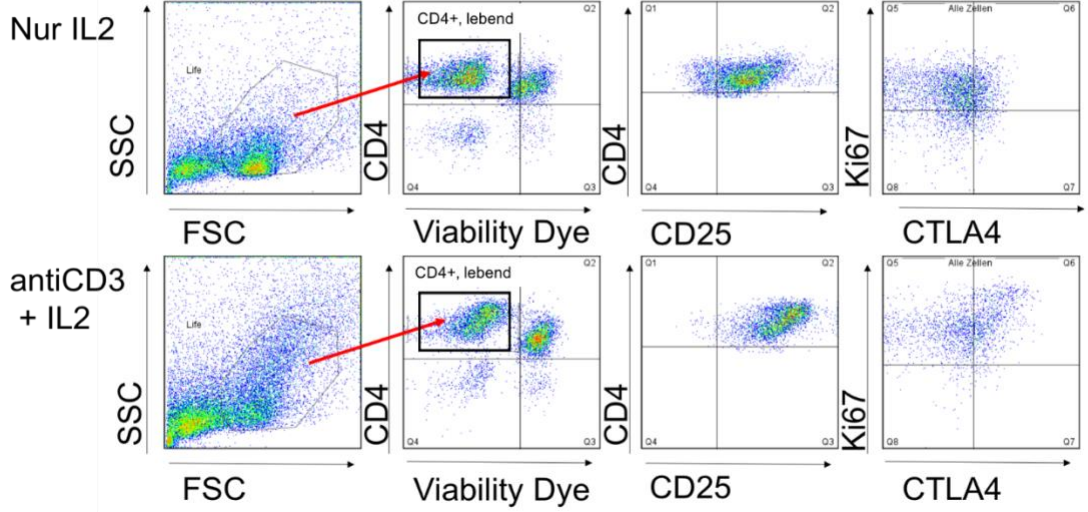
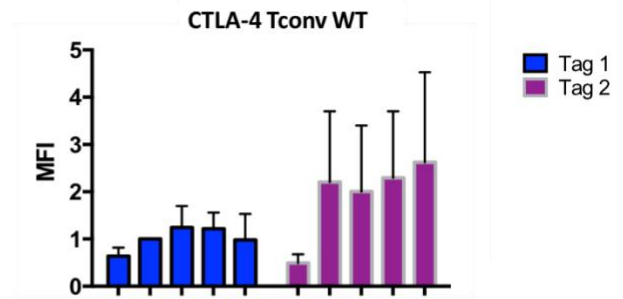
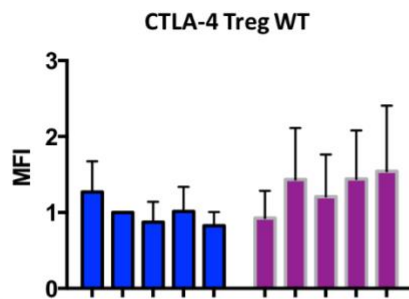
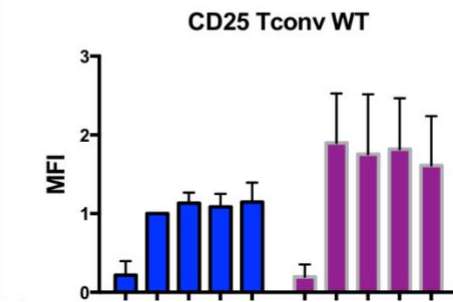
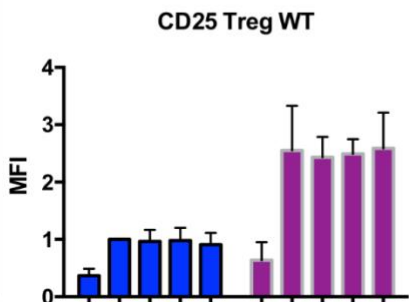
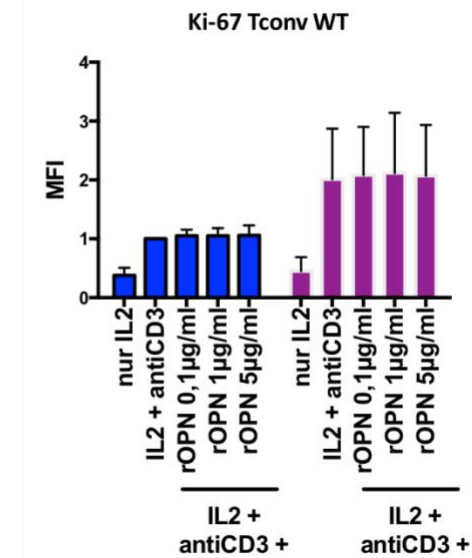
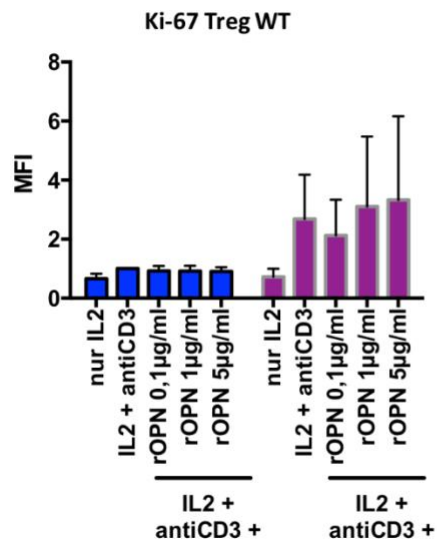
Auch Tconv-Zellen zeigen in Abhängigkeit zu der zugegebenen Konzentration von rOPN ein gesteigertes Überleben im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 4B). Es scheinen also durch Zugabe von Osteopontin zu ruhenden Zellen mehr Zellen zu überleben. Dabei sind sowohl Treg- als auch Tconv-Zellen betroffen, wobei die Werte für Treg-Zellen aus WT-Tieren keine statistische Signifikanz erreichten. Bei Treg- und Tconv-Zellen aus KO-Tieren zeigte sich eine stärkere konzentrationsabhängige Erhöhung der Zellzahlen nach OPN-Zugabe, die für beide Subpopulationen signifikante Werte ergab.

Allerdings sind die beobachteten Effekte nur sehr gering ausgeprägt und zeigen nur bei den Zellen aus KO-Tieren signifikante Werte. Dies deckt sich damit, dass rOPN höhere MFI-Werte bei T-Zellen der OPN-KO-Tiere aufweist (Abb. 3). Diese stärkere Bindung kann eine mögliche Ursache für den etwas besseren Effekt auf das Überleben der Zellen aus KO-Tieren im Vergleich zu Zellen aus WT-Tieren darstellen.

Zusammenfassend lässt sich ein erhöhtes Zellüberleben durch Zugabe von rOPN zu ruhenden Treg- oder Tconv-Zellen zeigen.

### **3.3 Rekombinantes OPN hat keinen Effekt auf die Aktivierung und Proliferation von Tconv- und Treg-Zellen nach anti-CD3-Antikörper-Stimulation in vitro**

Osteopontin ist ein wichtiger Aktivator verschiedenster Zelltypen. Es sollte daher der Einfluss von rOPN auf die Expression der Aktivitätsmarker CTLA-4 und CD25 von Treg- und Tconv-Zellen, sowie die Proliferationsrate anhand des Ki-67-Proteins ermittelt werden. CTLA-4 ist wichtig für die suppressive Funktion und Entwicklung von Tregs<sup>4</sup>, CD25 ist als Teil des IL-2-Rezeptors ebenfalls wichtig für Treg-Entwicklung und -Überleben.<sup>3</sup> Beide Moleküle werden auch von aktivierten konventionellen T-Zellen exprimiert und dienen somit als Marker für eine Aktivierung dieser Zellen. Die Expression von Ki-67 ist stark mit der Zellteilung assoziiert<sup>52</sup> und kann daher als Indikator für die Zellproliferation verwendet werden. Treg- oder Tconv-Zellen wurden in mit  $\alpha$ CD3-Antikörpern gecoateten Platten für ein bzw. zwei Tage stimuliert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit rOPN versetzt.

**A****B****C****D**

**Abbildung 5: rOPN besitzt keinen Einfluss auf die Expression von CTLA-4, CD25 und Ki-67 in  $\alpha$ CD3-Antikörper stimulierten Treg- und Tconv-Zellen**

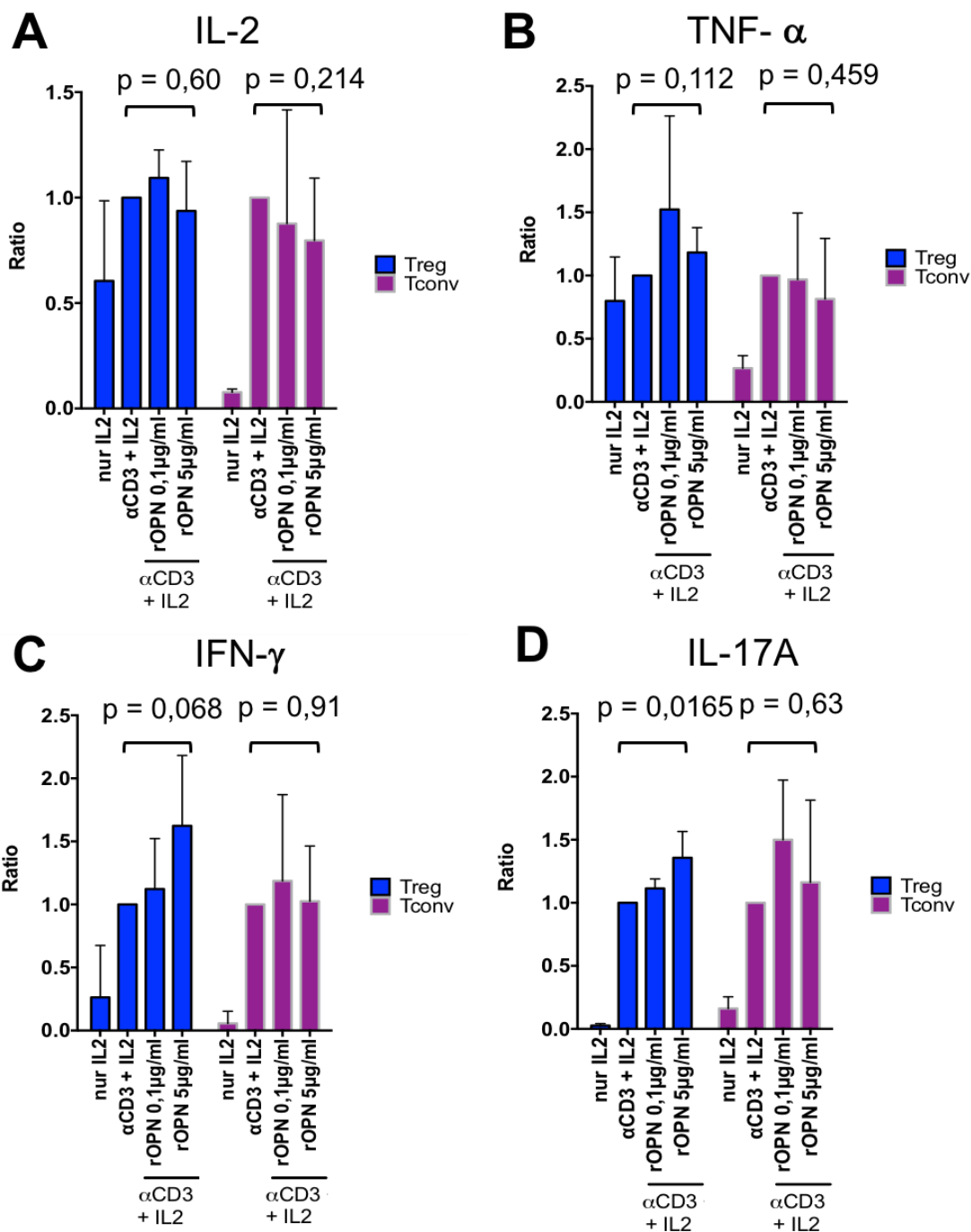
(A) Repräsentative FACS-Daten (aufgereinigte CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen) zur Darstellung der Gatingstrategie. Zunächst wurden alle lebenden (Viability Dye negativen) CD4<sup>+</sup>-Zellen gated. Anschließend wurde die Expression (MFI) von CTLA-4, CD25 und Ki-67 untersucht. Die Daten aus den einzelnen Experimenten wiesen Schwankungen auf weshalb die Daten auf den stimulierten Ansatz ( $\alpha$ CD3-Antikörper und IL-2) des ersten Tages normalisiert wurden. (B) und (C) zeigen die MFI von CTLA-4 und CD25 von unstimulierten Zellen und nach Stimulation von Treg- bzw. Tconv-Zellen. Deutlich kann man die Erhöhung der MFI beider Marker durch Stimulation erkennen. Jedoch hat die Zugabe von rOPN keinen weiteren Effekt. (D) zeigt die Daten für die Expression von Ki-67, welche ebenfalls nicht durch rOPN-Zugabe beeinflusst wird. Die Rohdaten der Knock-out-Tiere werden nicht gezeigt, sind jedoch denen der WT-Zellen sehr ähnlich. (WT n=7; KO n=4)

Die Daten aus den einzelnen Experimenten wiesen bei konsistenten und vergleichbaren Ergebnissen starke Schwankungen auf, weshalb – wie aus Abbildung 5 ersichtlich – die Daten auf den stimulierten Ansatz ( $\alpha$ CD3-Antikörper und IL-2) des ersten Tages normalisiert wurden. Dabei zeigte sich, dass kein Unterschied der MFI für CTLA-4, CD25 und Ki-67 zwischen stimulierten Zellen ohne und stimulierten Zellen mit rOPN-Zugabe besteht (Abb. 5 A-D). Dies betrifft sowohl den ersten als auch den zweiten Stimulationstag. Wurden die Zellen über 3 Tage stimuliert ergibt sich ebenfalls keine Differenz durch rOPN-Zugabe (Daten nicht gezeigt). Dass die Treg- und CD4<sup>+</sup> Tconv-Zellen stimuliert waren, zeigt sich in der Erhöhung der MFI von CD25, CTLA-4 und Ki-67 gegenüber den unstimulierten Ansätzen, sowie durch die deutlich höheren Werte am zweiten Stimulationstag. Ebenfalls gibt es keine Diskrepanz zwischen WT- und KO-Zellen. Diese zeigen sehr ähnlich Bilder (Daten nicht gezeigt).

Rekombinantes Osteopontin zeigte also keinen Effekt auf die Expression der Aktivitätsmarker CTLA-4 und CD25 von Treg- und Tconv-Zellen, sowie auf die Proliferationsrate.

### **3.4 Die Zugabe von rOPN zu aufgereinigten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen (Treg-Zellen) führt zu erhöhter IL-17A-Sekretion nach anti-CD3-Antikörper-Stimulation in vitro**

OPN hat starken Einfluss auf die Zytokinexpression diverser Zelltypen. Daher sollte die Zytokinsekretion von regulatorischen und konventionellen T-Zellen in



**Abbildung 6: rOPN erhöht die Sekretion von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-17A**

Die Daten in den Abbildungen A-D sind auf den ersten Tag der Stimulation normalisiert. Nach Stimulation ( $\alpha$ CD3-Antikörper und IL-2) von aufgereinigten Treg- und Tconv-Zellen schütten sowohl regulatorische als auch konventionelle T-Zellen vermehrt IFN- $\gamma$  (C) und TNF- $\alpha$  (B) aus. Dabei führt rOPN-Zugabe zu einer weiteren Steigerung der Expression. Auf die IL-2-Produktion (A) hat rOPN dagegen keinen Einfluss. Jedoch erhöht rOPN die Sekretion von IL-17A (D) durch konventionelle und auch regulatorische T-Zellen ( $n=3$ ). P-Werte durch t-Test ermittelt.

Anwesenheit von rOPN bestimmt werden. Dazu wurden Überstände von mit  $\alpha$ CD3-Antikörpern stimulierten Treg- bzw. Tconv-Zellen mit oder ohne rOPN

mittels des Immunoassays „Legendplex“ von Biolegend analysiert (Überstände aus den unter 3.3 beschriebenen Experimenten). Hierbei werden über Microbeads die entsprechenden Zytokine gebunden und anschließend mittels Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Es wurden folgende Zytokine gleichzeitig bestimmt: IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-13 und IL-17A. Allerdings konnten nur die Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-17A gemessen werden. Bei den restlichen Zytokinen lagen die Konzentrationen meist unter der Nachweisgrenze. Zudem wiesen die Einzelerperimente untereinander starke Schwankungen der absolut gemessenen Werte auf. Da jedoch ähnliche Tendenzen erkennbar waren, wurden die Ergebnisse, wie aus Abb. 6 ersichtlich, auf den Tag eins der Stimulation normalisiert. Es ergab sich dabei, dass rekombinantes OPN keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-2 besitzt. Gegenüber den unstimulierten Zellen (nur IL-2) weisen die stimulierten Tconv-Zellen eine stärkere Zytokinproduktion auf. Jedoch kommt es zu keinem weiteren Anstieg oder Abfall der Sekretion durch Zugabe von rOPN zu Tconv-Zellen (Abb. 6A).

Jedoch scheint rOPN in geringen Ausmaß statistisch nicht signifikant die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  durch Treg-Zellen, nicht aber durch Tconv-Zellen zu verstärken (Abb. 6B und C). Betrachtet man die IL-17A-Sekretion (Abb. 6D), so zeigt sich eine geringe, aber statistisch signifikante Zunahme der Sekretion durch Hinzugabe von rekombinantem OPN bei regulatorischen T-Zellen. Insgesamt gesehen erhöht also eine rOPN-Zugabe zu Treg-Zellen vor allem die IFN- $\gamma$ - und IL-17A- Sekretion.

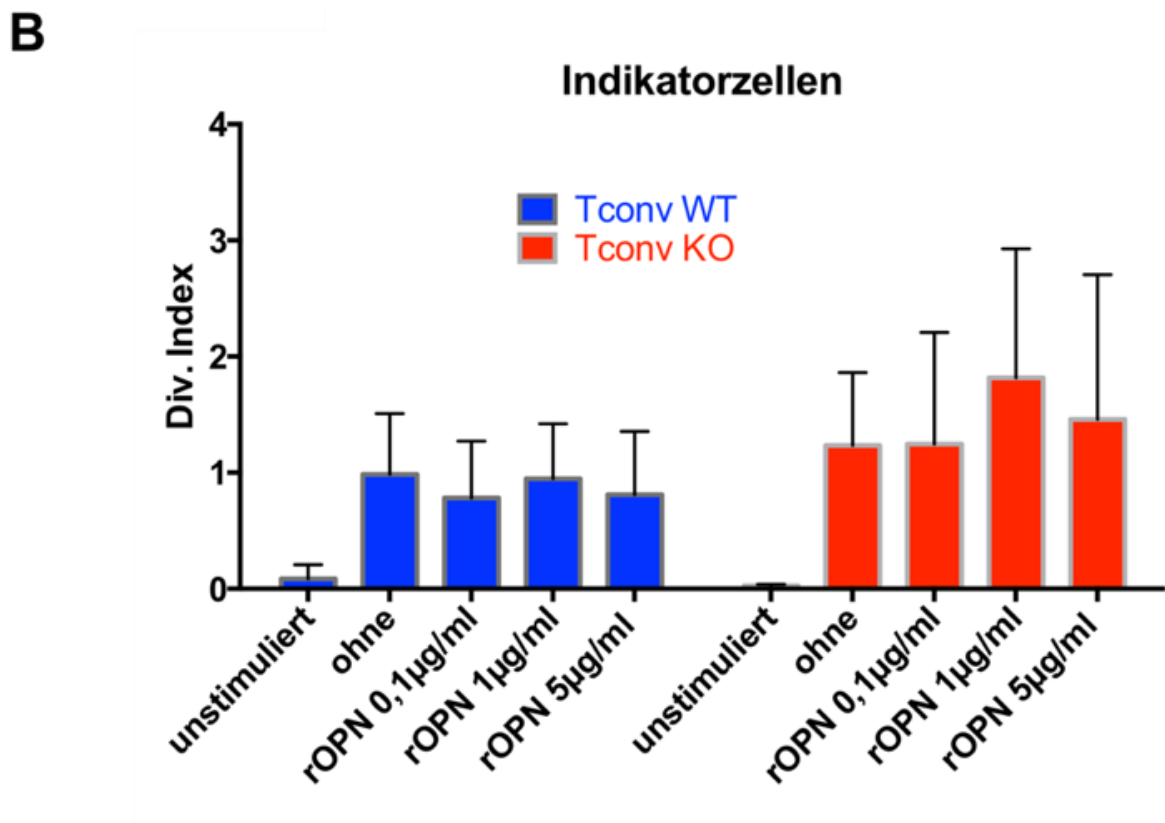
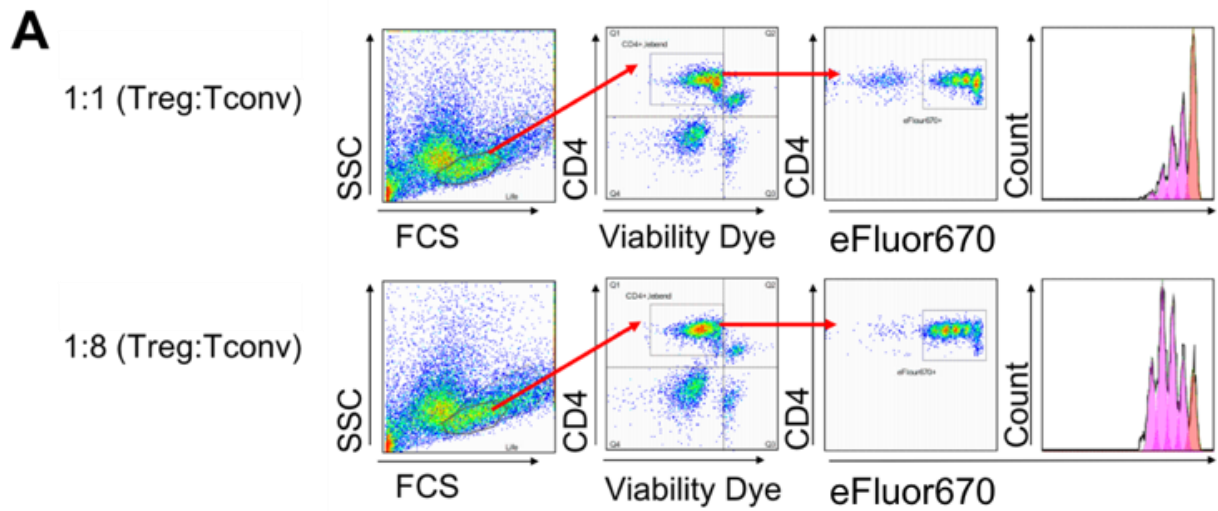
### **3.5 Osteopontin erhöht die Supprimierbarkeit von konventionellen T-Zellen durch Treg-Zellen in vitro**

Unveröffentlichte Daten von Hollmann<sup>6</sup> zeigen bereits, dass regulatorische T-Zellen aus Osteopontin-Knock-out-Tieren eine verminderte Suppression von konventionellen T-Zellen aus OPN-Knock-out Tieren aufweisen als dies für Wildtyp Treg- und Wildtyp Tconv-Zellen der Fall ist. Daran anknüpfend sollte nun die Wirkung von OPN auf CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>-Zellen differenziert betrachtet werden. Nach Aufreinigung der Zellen in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>

CD25-Zellen wurden diese in den Verhältnissen 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8 (Treg:Tconv) zusammen inkubiert. Eine solche Kokultur von Treg- und Tconv-Zellen macht die Suppression der Tconv-Zellen durch die mitkultivierten Treg-Zellen deutlich. Dabei inhibieren die Treg-Zellen die Proliferation der konventionellen T-Zellen, was sich am Durchflusszytometer mittels des Zellproliferationsfarbstoffes eFluor670 messen lässt (Abb. 7A). Dieser Farbstoff wird bei jeder Zellteilung zu etwa gleichen Teilen an beide Tochterzellen abgegeben und kann so die Anzahl der Zellteilungen über die Anzahl der MFI-Halbierungen anzeigen. Die FACS-Daten wurden anschließend mittels des Programmes „Flowjo“ analysiert, welches jeweils den Divisionsindex für jede Probe errechnet. Der Divisionsindex umfasst die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen aller Zellen. Für die Auswertung wurde der Division index von konventionellen Zellen mit und ohne Kokultur von Tregs ermittelt. Abbildung 7B zeigt den Divisionsindex von konventionellen T-Zellen aus WT- oder KO-Tieren ohne Zugabe von Treg-Zellen. Diese Ansätze wurden als Indikatorzellen für die grundsätzliche Zellteilungsrate ohne Einfluss der Suppression durch Treg-Zellen verwendet. Dabei ist aus Abbildung 7B ersichtlich, dass rOPN keinen proliferationsfördernden Einfluss auf die Tconv-Zellen unter diesen Bedingungen aufweist. Ähnliches ist auch aus den unter 5D beschriebenen Experimenten zu erkennen. Der prozentuale Anteil der Suppression wurde mithilfe der Formel:

$$\text{Suppression in Prozent} = 100 - \frac{\text{Division index (Treg und Tconv)}}{\text{Division index (Tconv ohne Treg)}} \times 100 \quad \text{bestimmt.}$$

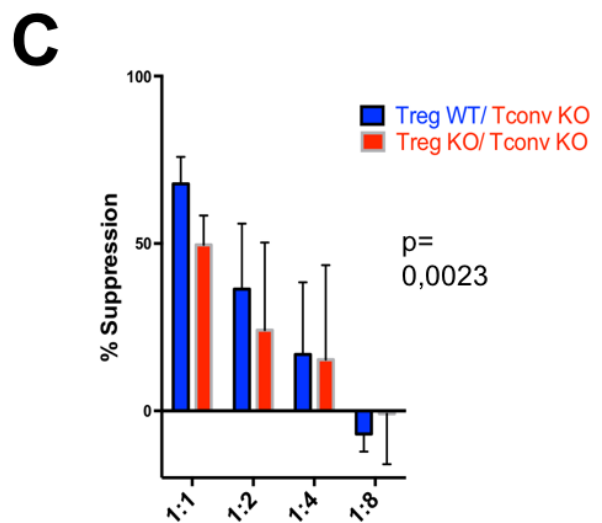
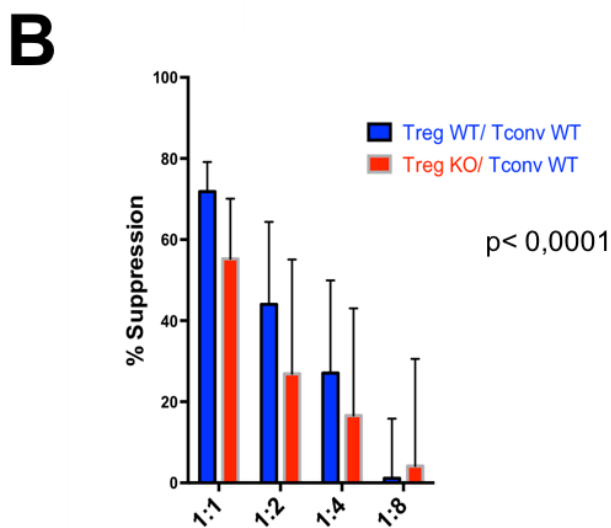
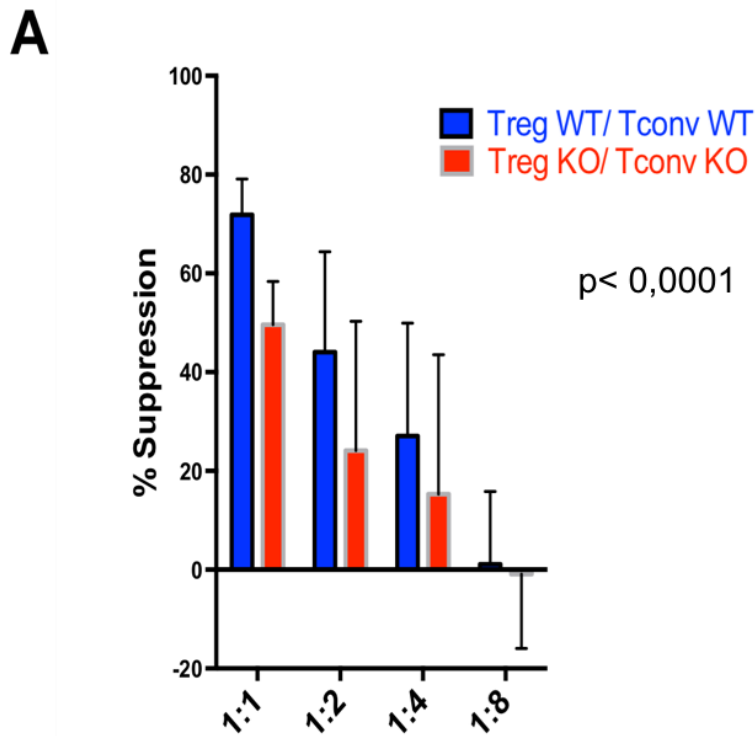
Vergleicht man Kokulturen von Treg- und Tconv-Zellen, die allein aus dem WT- bzw. dem OPN-KO-Tier stammen (Abb. 8A), zeigt sich insbesondere bei den hohen Treg-Konzentrationen (1:1 bis 1:2), wie bereits beschrieben, eine geringere Suppression der Tconv-Zellen bei Verwendung von OPN-KO-Zellen versus WT-Zellen. Tauscht man wie in Abb. 8B und C gezeigt die Treg-Zellen des WT- bzw. des OPN-KO-Tieres gegen Treg-Zellen der jeweils anderen Linie aus, supprimieren die WT-Treg-Zellen ebenfalls stärker als die KO-Treg-Zellen. Die Suppressionsfähigkeit der regulatorischen T-Zellen von OPN-KO-Tieren scheint also gegenüber WT-Treg-Zellen vermindert zu sein.



**Abbildung 7: Färbung der Zellen mittels eFluor670 und Darstellung der Proliferation von konventionellen T-Zellen ohne Treg-Zell-Zugabe (Indikatorzellen)**

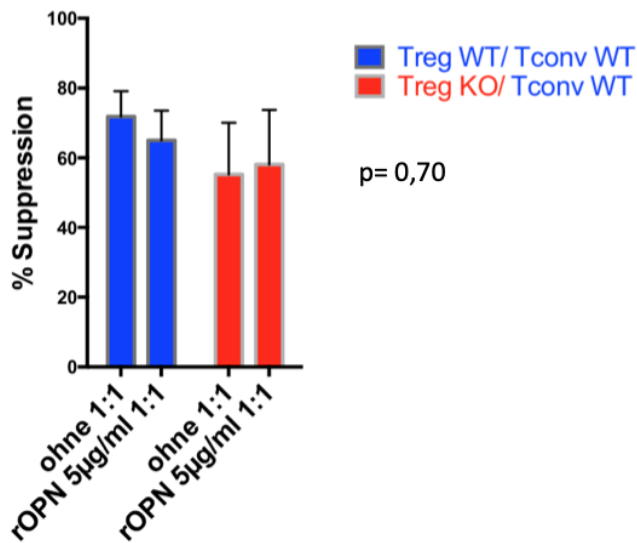
(A) Repräsentative FACS-Daten. Die Proliferation der konventionellen T-Zellen wurde mittels eFluor670-Verdünnung gemessen und anschließend mit der Funktion „Proliferation“ des Programms Flowjo ermittelt. (B) zeigt die Proliferation von konventionellen Zellen aus WT- bzw. aus KO-Tieren ohne Zugabe von regulatorischen T-Zellen. Dabei zeigt sich, dass OPN keinen Einfluss auf die Proliferation der Tconv-Zellen aufweist. (WT n=8, KO n=4)



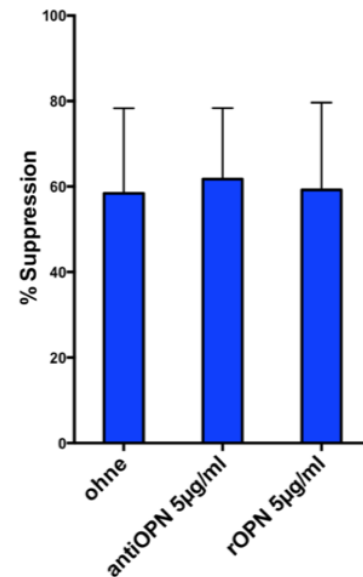


**Abbildung 8: Wildtypische Treg-Zellen supprimieren stärker als Treg-Zellen aus OPN- KO-Tieren.**

(A) Zellen aus dem OPN-Knock-out-System (sowohl Treg, als auch Tconv aus KO-Tieren) zeigen eine schlechtere Suppression als Zellen, die aus dem WT-System stammen. (B-C) Regulatorische T-Zellen aus KO-Tieren supprimieren bei sonst gleichen konventionellen Zellen diese geringer als die wildtypischen Treg-Zellen. Dies zeigt sich gegenüber WT-Tconv- (B) sowie gegenüber KO-Tconv-Zellen (C). (n= 8 bzw. 4). P-Werte mit ANOVA ermittelt.

**A****B**

Treg WT/ Tconv WT (1:1)



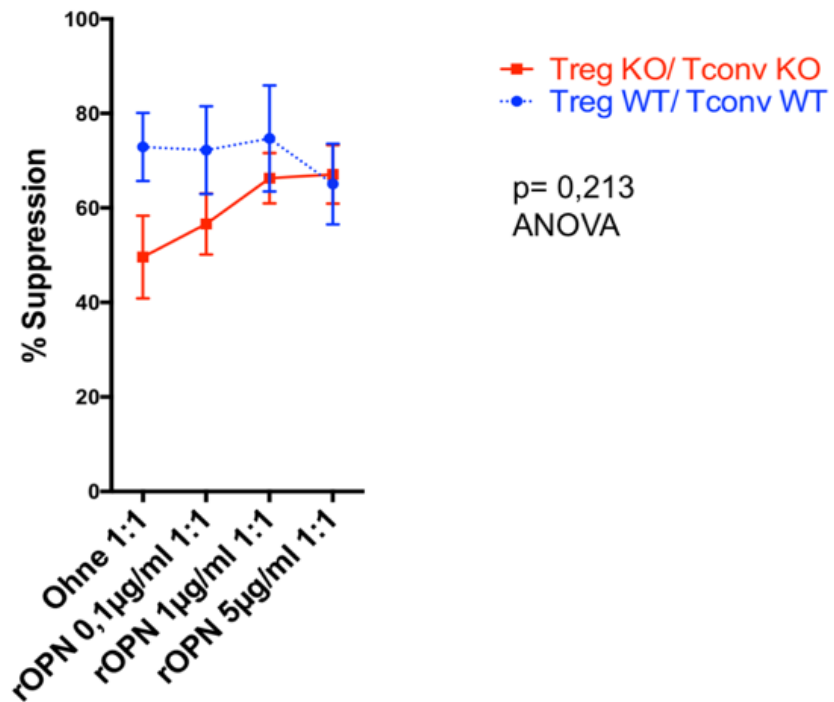
**Abbildung 9: Zugabe oder Neutralisation von OPN verändert die Suppression von WT-Tconv-Zellen nicht**

(A) Liegen wildtypische konventionelle T-Zellen vor, lässt sich durch Zugabe von rOPN weder bei WT- noch bei KO-Treg-Zellen die Suppression verbessern. (B) Eine Neutralisation von OPN durch  $\alpha$ OPN-Antikörper zeigt keinen Effekt auf die Suppression von wildtypischen Tconv-Zellen durch WT-Treg-Zellen. (rOPN n= 8 bzw. 4;  $\alpha$ OPN-Antikörper n=3). P-Werte durch ANOVA ermittelt.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Zugabe von rekombinantem OPN in das KO-System bzw. die Wegnahme von OPN aus dem WT-System den Grad der Suppression beeinflussen kann. Hierbei zeigte sich, dass weder das Hinzufügen von rekombinantem OPN die Suppression von WT-Tconv durch WT-Treg-Zellen oder KO-Treg-Zellen verbesserte (Abb. 9A), noch diese durch OPN-Neutralisation durch antiOPN-Antikörper schlechter wurde (Abb. 9B).

Jedoch zeigte sich nach Zugabe von rOPN zu Treg- und Tconv-Zellen aus dem KO-Tier eine Zunahme der Suppression mit zunehmender Dosierung des rOPNs (Abb. 10). Unabhängig davon, ob die kokultivierten regulatorischen T-Zellen aus WT- oder KO-Tieren stammen, erhöht sich die Suppression der konventionellen T-Zellen aus KO-Tieren mit steigender Dosierung von rOPN (Abb. 11). Müssen die regulatorischen T-Zellen dagegen konventionelle Zellen aus WT-Tieren

inhibieren, führt eine Zugabe von rOPN zu keinem Anstieg der Suppression – gleichgültig ob die Treg-zellen aus WT- oder KO-Tieren stammen (Abb. 9).

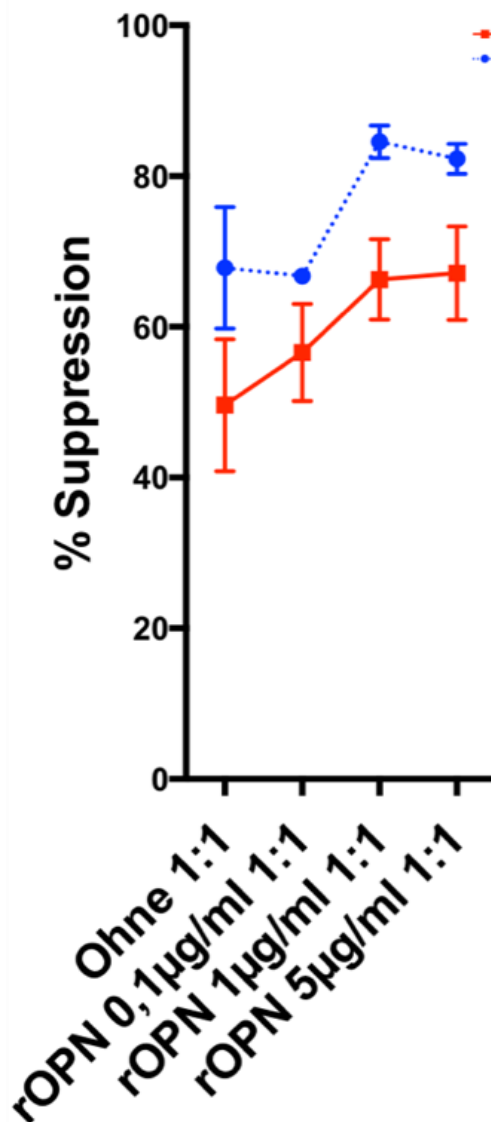


**Abbildung 10: Zugabe von rekombinantem OPN steigert die Suppression im Knock-out-System**

Mit Zunahme der Konzentration des in das KO-System zugegebenen OPNs nähert sich die Suppression der des Wildtyps an. (rOPN n= 8 bzw. 4). P-Werte durch ANOVA ermittelt.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Zugabe von rekombinantem Osteopontin die Supprimierbarkeit von konventionellen T-Zellen aus KO-Tieren durch wildtypische und KO- Treg-zellen erhöht. Die Supprimierbarkeit von WT-Tconv dagegen wird durch rOPN nicht beeinflusst.

Dabei bleibt auch bei höheren Dosierungen von rOPN die Suppressionskraft von KO-Treg-Zellen geringer als die von WT-Treg-Zellen.



**Abbildung 11: Trotz Zugabe von rOPN zeigen KO-Treg eine geringere Suppression als WT-Treg**

Die Abbildung zeigt die Zunahme der suppressiven Kraft von WT- und KO-Treg-Zellen gegenüber KO-Tconv-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration der zugegebenen OPN-Menge. Die wildtypischen Treg-Zellen zeigen dabei durchweg eine höhere Suppression als die KO-Treg-Zellen. (n= 8 bzw. 4). P-Werte mittels ANOVA ermittelt.

p= 0,0067  
ANOVA

### 3.6 T-Zellen aus wildtypischen Mäusen exprimieren mehr GITR als T-Zellen aus Osteopontin-Knock-out Tieren

Eine Möglichkeit, über die rOPN vor allem über konventionelle T-Zellen die Suppression von Treg-Zellen beeinflussen könnte, ist über die Regulation der GITR-Expression. GITR gehört zur TNF-Rezeptorfamilie und steht für Glucocorticoid-induced-tumor-necrosis-factor-receptor.<sup>61</sup> GITR wird von Tregs konstitutiv exprimiert<sup>53,54</sup> während Tconv-Zellen erst nach Aktivierung GITR exprimieren<sup>55</sup>. Dabei vermindert die GITR-Aktivierung auf Tconv-Zellen die Suppression durch Treg-Zellen, nicht jedoch GITR-Aktivierung auf Treg.<sup>53</sup> Aus

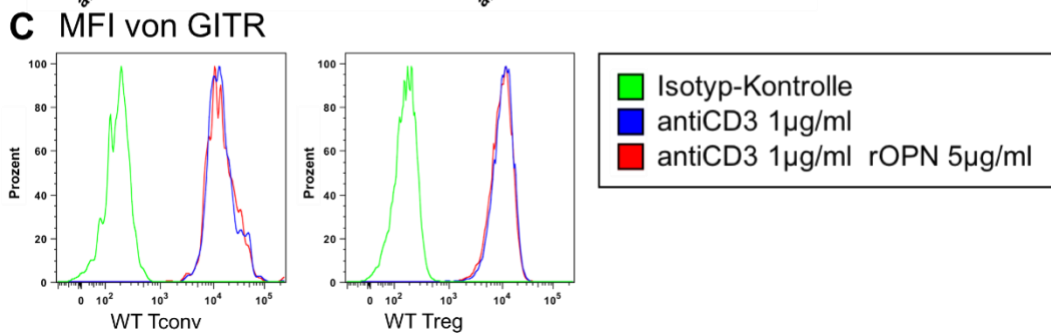
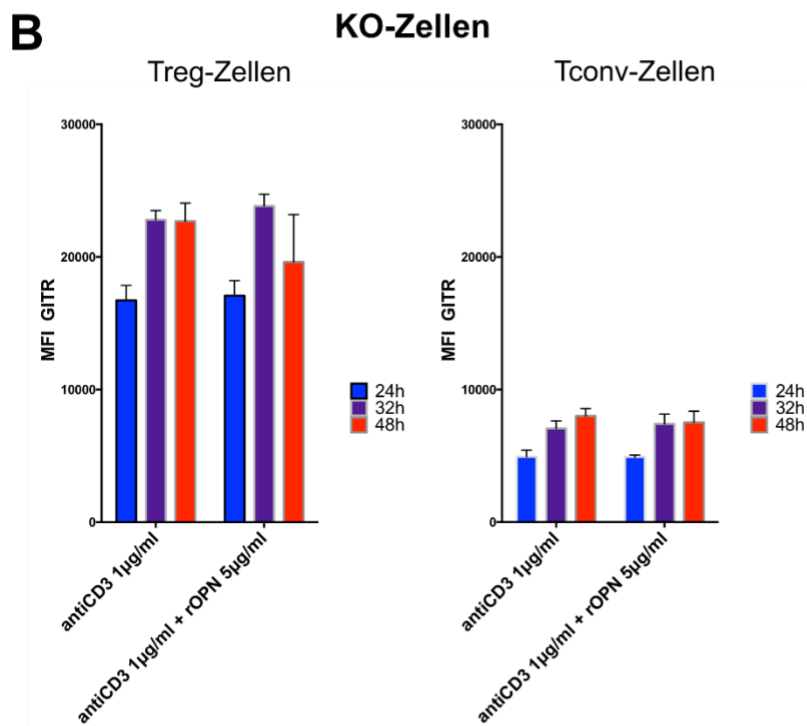
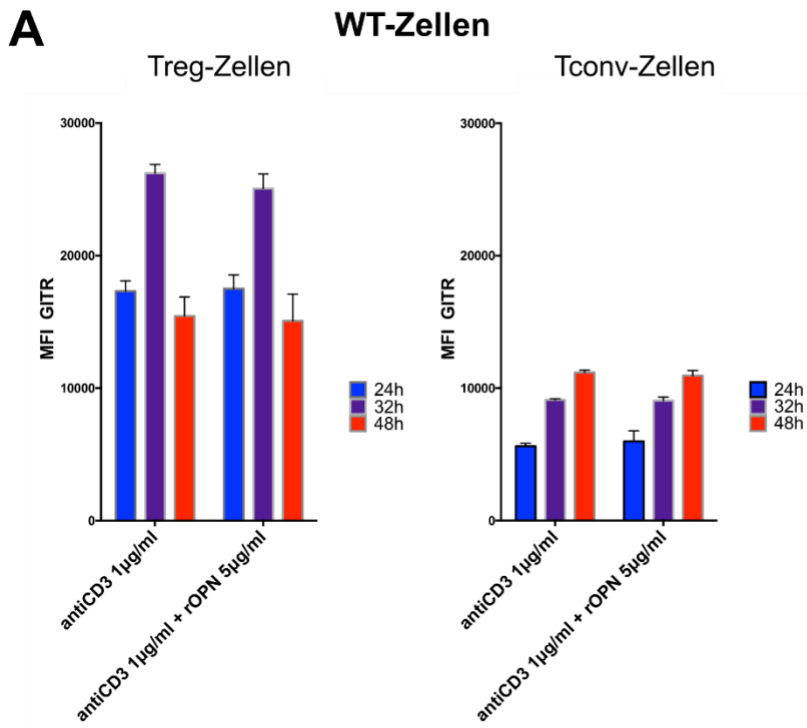
diesem Grund untersuchte ich den Einfluss von rOPN auf die Expression von GITR auf Treg- bzw. Tconv-Zellen. Hierzu wurden Lymphknoten- und Milzzellen mit  $\alpha$ CD3-Antikörpern für 24h, 32h und 48h stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde gleichzeitig mit rOPN versetzt. Die Zellen wurden anschließend am Durchflusszytometer auf GITR-Expression untersucht. Aus der Abbildung 12 erkennt man, dass rOPN dabei keinen Einfluss auf die GITR-Expression nach  $\alpha$ CD3-Antikörper-Stimulation besitzt. Die Expression steigt sowohl auf wildtypischen (Abb. 12A), als auch auf Treg- und Tconv-Zellen aus KO Tieren (Abb. 12B) an und zeigt keinen Unterschied zwischen rOPN-Zugabe und alleiniger Stimulation.

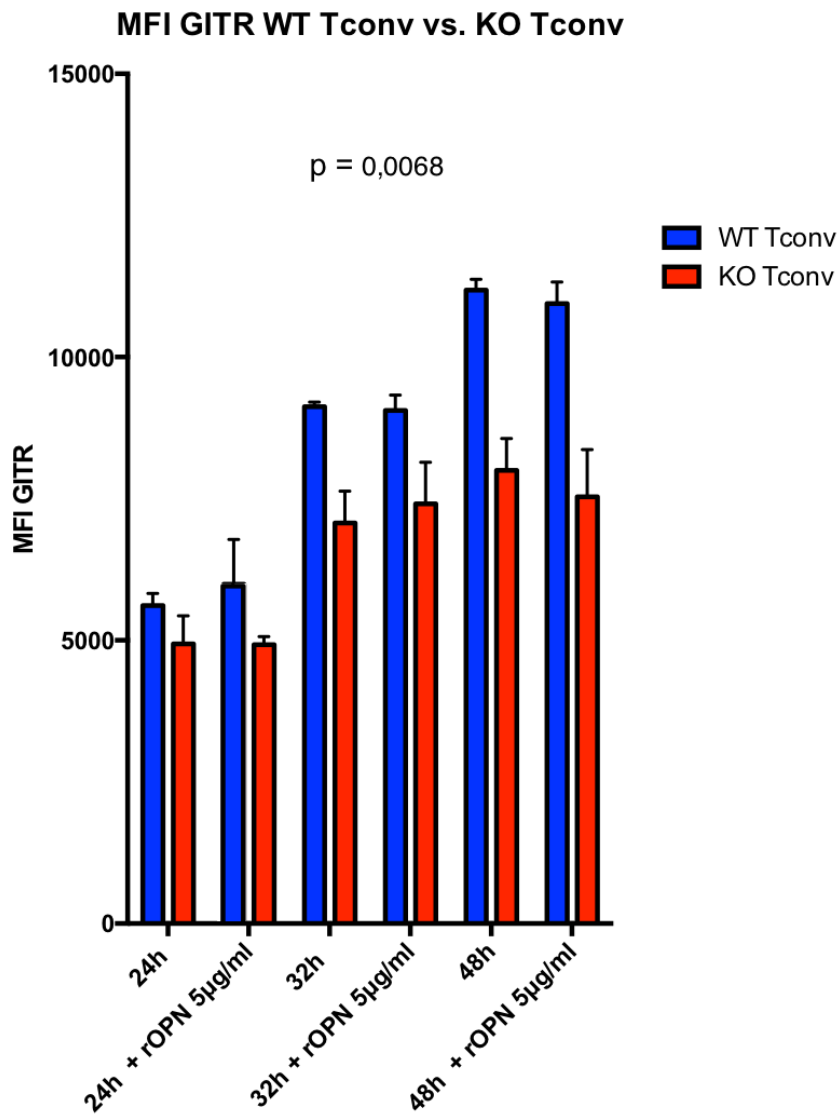
Allerdings fiel auf, dass einerseits die Treg-Zellen aus den WT- bzw. den KO-Tieren ähnliche MFI-Werte für GITR aufweisen, während andererseits die MFI für GITR bei den Tconv-Zellen aus den KO-Tieren geringer ist als bei den Tconv-Zellen aus WT-Tieren (Abb. 13).

Obwohl die GITR-Aktivierung eine gute Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von rOPN auf Treg- bzw. Tconv-Zellen bieten würde, scheint diese jedoch hierfür keine Rolle zu spielen.

**Abbildung 12 (umseitig): Rekombinantes OPN verändert nicht die Expression von GITR**

*Bei mit  $\alpha$ CD3-Antikörpern stimulierten Zellen unterscheidet sich die MFI für GITR nicht zu zusätzlich mit rOPN behandelten Zellen. Die Expression von GITR ist dabei sowohl an Tag 1, als auch an den Tagen 2 und 3 der Stimulation zwischen beiden Gruppen gleich. Dies betrifft WT-Zellen (A) sowie KO-Zellen (B). (C) zeigt repräsentativ die MFI-Kurven für GITR (n=4).*





**Abbildung 13: Die MFI für die GITR-Expression ist bei den OPN-KO-Tconv-Zellen geringer als bei den wildtypischen Zellen**

Der direkte Vergleich zwischen den konventionellen T-Zellen aus KO- bzw. WT-Tieren zeigt eine geringere MFI bei den KO-Zellen. (n=4). P-Wert ermittelt mit ANOVA.

## 4. Diskussion

Neben seinen vielfältigen gut dokumentierten proinflammatorischen Eigenschaften gab es vor dieser Arbeit erste experimentelle Belege, dass OPN auch Einfluss auf die Suppression von konventionellen T-Zellen durch regulatorische T-Zellen nimmt. OPN ist ein Faktor, der die Suppressionsfähigkeit der regulatorischen T-Zellen erhöhen kann.<sup>6</sup> In diesem Rahmen sollten nun die Effekte von OPN auf CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>+</sup>- bzw. auf CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>-</sup>-Zellen untersucht werden. Dazu wurde zunächst geprüft, inwiefern rekombinantes OPN an diese Zellen bindet. Dabei banden sowohl Treg- als auch Tconv-Zellen aus WT- oder KO-Tieren umso mehr rOPN, je größer die zugegebene Konzentration von rOPN war (Abb. 3). Diese Bindung konnte durch ungelabeltes rOPN vermindert werden, jedoch nicht durch zugegebene Hyaluronsäure, die wie OPN an die CD44v6- und CD44v9-Varianten des CD44-Rezeptors bindet.<sup>23,49</sup> Die Bindung von rOPN scheint also in diesem Experiment über andere Rezeptoren als den Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 zu funktionieren, wie beispielsweise über Integrine. Wobei die Bindung an CD44-Moleküle auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, da CD44 v.a. nach Stimulation der Zellen exprimiert wird, während die Zellen in diesem Experiment unstimuliert waren. Ggf. müsste hierfür das Experiment mit vorstimulierten Zellen wiederholt werden. Zellen aus OPN-Knock-out-Tieren zeigten dabei insgesamt eine höhere MFI für gebundenes OPN als Zellen aus WT Tieren. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass die KO-Tiere kein OPN vorgebunden haben und somit mehr gelabeltes OPN sich anlagern kann.

OPN erhöht weiterhin das Überleben von regulatorischen, wie auch von konventionellen T-Zellen (Abb. 4). Die Zugabe von rOPN führte zu einer größeren Zahl noch lebender Zellen insbesondere an Tag eins und drei nach Start der Kultur. Dieser Effekt ist jedoch nur gering ausgeprägt, was sich dadurch erklären lässt, dass die Zellen unstimuliert waren. In der Literatur werden stärkere Effekte beschrieben, die jedoch bei vorstimulierten Zellen auftraten.<sup>46</sup> Bislang wurde in anderen Studien nur der Effekt von OPN auf Gesamt-CD4<sup>+</sup> Zellen untersucht. In



dieser Arbeit konnte nun der Effekt auf das Zellüberleben auch speziell auf die Untergruppen der CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>+</sup>- (Treg) bzw. CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>-</sup>-(Tconv) Zellen gezeigt werden. Hyaluronsäure führte ebenfalls wie rOPN zu einer höheren Zellzahl nach ein bis drei Tagen Inkubation (Daten nicht gezeigt). Dies könnte durch die Aktivierung des Hyaluronsäure-Rezeptors CD44 erklärt werden, welche das Zell-Überleben verbessern kann.<sup>56</sup> Allerdings band Hyaluronsäure im Vorexperiment (Abb. 3) nur in geringem Maße an unstimulierte Zellen (Daten nicht gezeigt) und konnte die Bindung von gelabeltem rOPN nicht blockieren. Die gemeinsame Inkubation von rOPN und Hyaluronsäure dagegen zeigte keinen Unterschied gegenüber der alleinigen Inkubation mit rOPN. Dies bedeutet, dass beide Substanzen wohl unabhängig voneinander wirken, sich aber auch nicht gegenseitig in ihrer Wirkung ergänzen oder blockieren. D.h. die Wirkung von rOPN auf das Zell-Überleben ist wahrscheinlich unabhängig von CD44-Rezeptoren. Jedoch sind die Zellen auch in diesem Experiment unstimuliert und binden daher nur gering Hyaluronsäure. Zudem liegen die Zellen hier nicht aufgetrennt vor, d.h. auch B-Zellen und weitere Leukozyten könnten hier eine Rolle spielen und Einfluss auf das Zellüberleben haben bzw. durch rOPN selbst beeinflusst werden.

Neben einer direkten Hemmung von proapoptischen Proteinen könnte rOPN auch nach Zytokinentzug zu einer Minderaktivierung des proapoptischen Proteins Bim führen.<sup>48</sup> Dies könnte ebenfalls die verbesserte Überlebensraten von Immunzellen unter rOPN-Zugabe erklären. Zur Klärung dieser Frage müssten jedoch weitere Experimente erfolgen.

Anders als auf das Zellüberleben hat rOPN keinen Einfluss auf die Expression der Aktivitätsmarker CTLA-4 und CD25 von Treg- oder Tconv-Zellen (Abb. 5). Diese Oberflächenmoleküle sind wichtig für die suppressive Funktion und Entwicklung von regulatorischen T-Zellen und werden auch auf konventionellen T-Zellen nach Stimulation exprimiert und können daher als Aktivitätsmarker dienen.<sup>4</sup> Jedoch kann man keine Veränderung der Expression dieser Aktivitätsmarker nach einer Inkubation von stimulierten Treg- oder Tconv-Zellen mit rOPN erkennen. Selbst nach einem bis drei Tagen Stimulation mit  $\alpha$ CD3-

Antikörpern und rOPN zeigte sich kein Effekt gegenüber der alleinigen Stimulation mit  $\alpha$ CD3-Antikörpern. Die Aktivierung von CTLA-4 kann die Suppressionsfähigkeit von regulatorischen T-Zellen erhöhen.<sup>4</sup> Da in diesem Experiment kein Einfluss von rOPN auf CTLA-4 nachweisbar war, könnte die stärkere Suppressionsfähigkeit von WT-Treg-Zellen auf andere Mechanismen als CTLA-4 beruhen. Die Zugabe von rOPN zu mit  $\alpha$ CD3-Antikörpern stimulierten Zellen hatte weiterhin auch keinen Effekt auf die Expression von Ki-67, einem Marker für Zellproliferation und -teilung. Trotz Zugabe von rOPN blieb die MFI für Ki-67 auf dem gleichen Niveau wie bei Zellen, die nur mit  $\alpha$ CD3-Antikörpern stimuliert wurden. Dementsprechend zeigt sich die Zellproliferation unabhängig von rOPN. Die stärker verminderte Proliferation von konventionellen T-Zellen in Gegenwart von regulatorischen T-Zellen im WT-System gegenüber dem OPN-KO-System (Abb. 8) beruht also tatsächlich auf einer Suppression der Tconv-Zellen und nicht auf einen auf die Zellproliferation der Tconv-Zellen hemmend wirkenden Effekt von OPN. Diese Ergebnisse widersprechen allerdings den Studien von O'Regan et al.<sup>5,57</sup>, demnach OPN als Kostimulator neben  $\alpha$ CD3-Antikörper die T-Zellproliferation steigert, wobei die Zell-Proliferation hier mit radioaktiv-markiertem Thymidin gemessen wurde. Jedoch muss festgestellt werden, dass das rekombinante OPN in dieser Arbeit aus Maus-Myelomzelllinien stammt, andere Präparationen aus Bakterien könnten neben dem OPN auch LPS (Lipopolysaccharide) enthalten, welche als Antigene einen kostimulatorischen Effekt aufweisen könnten. Auf der anderen Seite konnten Hur et al.<sup>46</sup> durch CFSE-Messung, einem Farbstoff, der sich mit jeder Teilung halbiert, keinen Anstieg der Zellproliferation bei stimulierten Zellen durch rOPN-Zugabe messen.

Da OPN zudem an der Regulation der Zytokinausschüttung verschiedener Zellen beteiligt ist, wurde auch der Einfluss auf die Zytokinexpression durch T-Zellen untersucht.<sup>7,15</sup> Die Zugabe von rOPN zu mit  $\alpha$ CD3-Antikörpern stimulierten Zellen ergab jedoch keine Veränderung der Sekretion von IL-2 (Abb. 6). Andererseits zeigte sich eine leichte Tendenz, dass rOPN die Ausschüttung von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-17A verstärken könnte. Durch Zugabe von rekombinantem OPN erhöhte sich die Sekretion der Zytokine insbesondere durch Treg-Zellen.

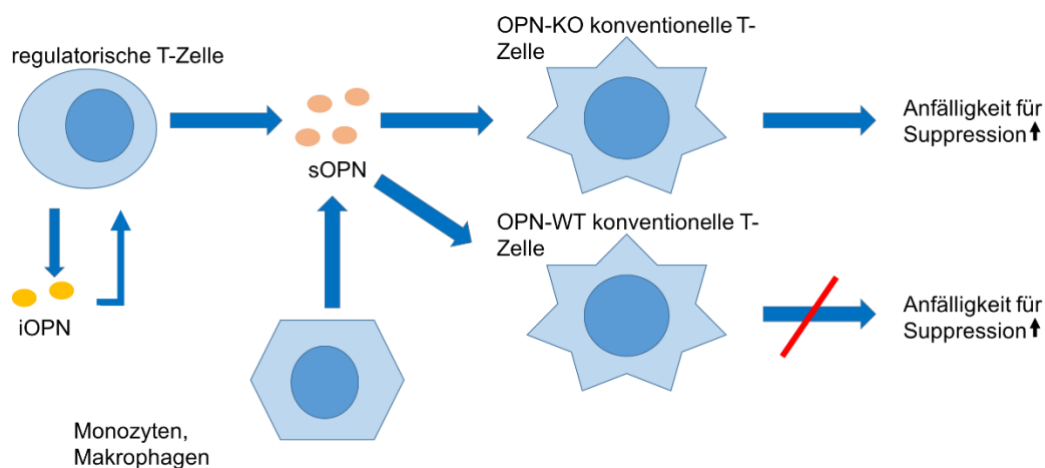
IL-17A wurde auch von konventionellen T-Zellen vermehrt produziert. Allerdings ist zu beachten, dass die Reinheit der regulatorischen T-Zellen im Durchschnitt zwischen 80-90% lag. Das heißt die Veränderung der Zytokinproduktion ist nicht eindeutig den Treg-Zellen zuzuordnen und könnte auch durch andere Zellen, wie z.B. CD25<sup>+</sup> Tconv-Zellen, bedingt sein. Andererseits kennt man inzwischen eine über den Marker CD161 definierte Population von CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen, die sowohl Charakteristiken und die suppressive Funktion von klassischen Treg-Zellen aufweisen, aber auch proinflammatorische Effekte besitzt. Diese Treg-Population kann z.B. die proinflammatorischen Zytokine IL-17A und TNF- $\alpha$  produzieren.<sup>58</sup> Ferner konnte bereits Hollmann<sup>6</sup> eine Sekretion von IL-17A durch Treg beobachten. Andererseits zeigen T-Zellen aus OPN-KO-Tieren eine geringere IL-17A-Produktion – v.a. durch das fehlende intrazelluläre OPN bedingt, jedoch u.U. verstärkt durch die fehlende Einwirkung durch sOPN.<sup>59</sup> Dies passt zu der Beobachtung, dass rOPN-Zugabe zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Sekretion führt. IL-17A ist ein proinflammatorisches Zytokin und wird hauptsächlich von Th17-Zellen produziert. OPN erhöht die Th17-Polarisation von naiven T-Zellen<sup>12,13</sup>, deshalb könnte die verstärkte IL-17A-Sekretion durch rOPN auch zu der verstärkten Th17-Immunantwort passen. Jedoch wird aus den vorliegenden Versuchen nicht klar, ob das sezernierte IL-17A tatsächlich von den Treg-Zellen oder aus Verunreinigungen beispielsweise mit CD25<sup>+</sup> Memory-Tconv-Zellen stammt.

IFN- $\gamma$  wird vor allem nach OPN-Zugabe von den dadurch induzierten Th1-Zellen produziert.<sup>60</sup> In dieser Arbeit konnte jedoch nur ein geringer Effekt von rOPN auf die Produktion von IFN- $\gamma$  beobachtet werden. Dies dürfte jedoch daran liegen, dass es sich in den zugrundeliegenden Versuchen um Kurzzeitinkubationen ohne Ausreichende Th1-Differenzierung handelte. Dementsprechend konnte hier die Bedeutung von OPN für die Th1-Generierung nicht bestätigt werden.

Da bereits bekannt ist, dass regulatorische T-Zellen aus WT-Tieren eine höhere Suppressionskraft aufweisen als die gleichen Zellen aus OPN-KO-Tieren, wurde der Effekt von rOPN auf Treg- bzw. Tconv-Zellen hinsichtlich der Suppression untersucht. Dabei führte die Wegnahme von OPN mittels  $\alpha$ OPN-Antikörper oder

das Hinzufügen von rekombinantem OPN nicht zu einer Verschlechterung oder Verbesserung der Suppression durch die WT Treg-Zellen. Werden dagegen konventionelle T-Zellen aus OPN-KO-Tieren supprimiert, führte die Zugabe von rOPN unabhängig vom Genotyp der verwendeten Treg-Zellen zu einem Anstieg der Suppression. Die verminderte Suppression im KO-System scheint demnach auf zwei Grundlagen zu beruhen. Erstens haben KO-Treg-Zellen gegenüber WT-Treg-Zellen eine geringere Fähigkeit zu supprimieren. Und zweitens weisen KO-Tconv-Zellen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Suppression durch Treg-Zellen auf. D.h. OPN erhöht die Supprimierbarkeit von konventionellen T-Zellen. Als Grund für die schlechtere Supprimierbarkeit der konventionellen T-Zellen aus dem KO-Tier lässt sich klar OPN festmachen, da die Zugabe von rOPN zu einem Anstieg der Suppression führte.

Ein Hinweis auf die Wirkung von OPN auf die Tconv-T-Zellen bildet die fehlende Fähigkeit von Hyaluronsäure, die Bindung von rOPN zu blocken. Da Hyaluronsäure bekanntermaßen über CD44-Aktivierung die suppressive Aktivität von Treg-Zellen erhöhen kann<sup>27,51</sup>, zeigt die fehlende Blockade der OPN-Bindung, dass rOPN eher auf Tconv wirken könnte. Allerdings muss natürlich



**Abbildung 14: Möglicher Wirkmechanismus von OPN an regulatorischen und konventionellen Zellen**

Die Zugabe von rOPN führte nur bei KO-Tconv-Zellen zu einer Zunahme der Suppression. Daher könnte gelöstes OPN von den Treg-Zellen, aber auch von Monozyten und anderen Zellen stammend, konventionelle T-Zellen aus KO-Tieren in ihrer Supprimierbarkeit verstärken, während es nicht bei wildtypischen Zellen wirkt, womöglich da diese bereits selbst OPN in ausreichendem Maße produzieren. Daneben könnte v.a. das intrazelluläre OPN auf die regulatorischen T-Zellen wirken und diese in ihrer Fähigkeit zur Suppression verstärken.

bedacht werden, dass die Zellen in diesem Bindungsexperiment unstimuliert waren und damit CD44-Rezeptoren nur gering exprimierten. Deshalb müsste dieses Experiment ggf. mit stimulierten Zellen wiederholt werden. Betrachtet man jedoch den Suppressionsassay (Punkt 3.5) sieht man, dass hier auch bei stimulierten Zellen kein Effekt erkennbar war.

Die Grundlage, weshalb die regulatorischen T-Zellen aus dem KO-Tier dabei schlechter supprimieren ist noch unklar. Ursache könnte hier ein noch unbekannter Faktor X in den KO-Mäusen sein, der in der WT-Linie fehlt/inaktiv ist oder vermehrt gebildet wird. Als eine Erklärung könnte das intrazelluläre iOPN dienen. Um diese Frage zu klären sind weitere Untersuchungen z.B. auf mRNA-Ebene nötig.

Eine mögliche Ursache für die Wirkung von rOPN auf die Supprimierbarkeit von Tconv-Zellen könnte die verminderte GITR-Expression auf den konventionellen T-Zellen von OPN-KO versus wildtypischen Mäusen darstellen. GITR, kurz für Glucocorticoid-induced-tumor-necrosis-factor-receptor, gehört zu TNF-Rezeptorfamilie<sup>28</sup>. Das Molekül wird von Tregs konstitutiv exprimiert<sup>53,54</sup> während Tconv-Zellen erst nach Aktivierung GITR exprimieren<sup>55</sup>. Die GITR-Aktivierung auf Tconv-Zellen vermindert dabei die Suppression durch Treg-Zellen, jedoch nicht die GITR-Aktivierung auf Treg-Zellen.<sup>53</sup> GITR-L (GITR-Ligand) wird von APCs und aktivierten T-Zellen exprimiert. Bei GITR-GITR-L-Interaktion kommt es zu einer Verminderung der Suppression.<sup>53</sup> OPN könnte also direkt auf GITR oder auf die GITR-GITR-L-Interaktion einwirken. Jedoch zeigte sich, dass rOPN keinen Einfluss auf die Aktivierung von GITR auf Treg- oder Tconv-Zellen nach  $\alpha$ CD3-Antikörper-Stimulation zu haben scheint (Abb. 12).

Allerdings fiel in diesen Experimenten auf, dass einerseits die Treg-Zellen aus den WT- bzw. den KO-Tieren ähnliche MFI-Werte für GITR aufweisen, während andererseits die MFI für GITR bei den Tconv-Zellen aus den KO-Tieren geringer sind als bei den Tconv-Zellen aus WT-Tieren. Demnach müsste die Supprimierbarkeit höher sein als bei den WT-Tconv-Zellen. Dies steht im Widerspruch zu den zuvor erhobenen Daten.

In der Literatur wird diskutiert, dass eine GITR-Aktivierung auch die Suppression fördern kann.<sup>61</sup> So kommt es bei in-vivo Stimulation von GITR nicht zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen, was an einer nur zeitlich begrenzten Inhibition der Suppression und einer eventuell anschließenden Verstärkung der Suppression liegen könnte. Diese kann darauf zurückgehen, dass GITR die Proliferation von Treg-Zellen erhöhen kann<sup>3</sup>. Zudem gibt es CD25<sup>-</sup> (oder auch CD25<sup>+</sup>) GITR<sup>HIGH</sup>- Zellen, deren Depletion zu schweren Autoimmunerkrankungen führt.<sup>62</sup>

Eine direkte Wirkung von OPN auf die GITR-Expression konnte in meinen Versuchen allerdings ausgeschlossen werden (Abb.12), da rOPN-Zugabe zu keinem Effekt auf die GITR-Expression führte. Welche Signalwege OPN intra- oder extrazellulär nutzt, um die GITR-Expression zu beeinflussen bzw. ob die verminderte GITR-Expression der Tconv-Zellen aus OPN-KO-Tieren tatsächlich mit den Effekten von rOPN zusammenhängt und kein Nebeneffekt ist, bleibt offen.

Eine weitere Möglichkeit, wie OPN die Treg-Funktion steigern könnte, wäre über die Hochregulation von CD44-Molekülen. OPN-KO Tiere weisen eine verminderte CD44-Rezeptoranzahl auf.<sup>5</sup> Die Treg-Funktion ist mitunter auch abhängig von der CD44-Expression.<sup>61</sup> Dazu müsste jedoch in weiteren Experimenten die Expression von CD44 beispielsweise vor und nach OPN-Zugabe zu aufgereinigten Treg-Zellen gemessen werden.

Vergleicht man Kokulturen von Zellen, die allein aus dem WT- bzw. dem OPN-KO-Tier stammen, kann man die schlechtere Suppression im KO-System erkennen. Dies könnte einen Einfluss auf das schlechtere klinische Outcome von OPN-KO-Tieren nach Myokardinfarkt darstellen (vgl. Trueblood et al.<sup>42</sup>). Durch das fehlende OPN kommt es zu einer verminderten Supprimierbarkeit der konventionellen T-Zellen und damit zu einer überschießenden Immunreaktion und verschlechterten Wundheilung, was dann in größere linksventrikuläre Dilatationen und stärker ausgeprägte Herzinsuffizienzen münden kann<sup>42</sup>. Um diese Hypothese weiter zu überprüfen, wäre ein in vivo Experiment sinnvoll. Dazu könnte man in OPN-KO-Mäuse einen Myokardinfarkt auslösen und gleichzeitig

z.B. mit einem CD28-Superagonisten die Treg-Zellen in vivo stark aktivieren. Wäre hierbei das klinische Outcome nach dem MI wieder besser, würde dies darauf hinweisen, dass die Ursache für das schlechtere klinische Outcome nach MI bei OPN-KO-Tieren darin liegt, dass die Immunregulation durch das fehlende OPN verschlechtert ist.

Die mögliche klinische Relevanz der Fähigkeit von OPN zur Suppressionssteigerung von T-Zellen zeigt auch Klement et al.<sup>63</sup> auf. Über den Interferon regulatory factor 8 (IRF8), welcher an den Spp1 Promoter bindet, wird die OPN-Expression in Colon-Epithelzellen vermindert. Colon-Carzinomzellen sezernieren weniger IRF8 als normale Colon-Epithelzellen und dadurch mehr OPN, womit sie unter anderem eine starke T-Zellreaktion unterdrücken.

## 5. Zusammenfassung

Osteopontin ist ein Zytokin, welches sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften aufweist. Es ist ein wichtiger Faktor für die Th1-Zell- und Makrophagen-Differenzierung. Zudem hat OPN Einfluss auf Apoptose, die Zelladhäsion und auf die Wundheilung. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von OPN speziell auf CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>- regulatorische bzw. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup>-konventionelle T-Zellen mithilfe v.a. durchflusszytometrischer Daten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes OPN an T-Zellen, insbesondere an regulatorische und konventionelle T-Zellen, binden kann. Eine gleichzeitige Inkubation mit Hyaluronsäure dagegen erbrachte keine Blockierung dieser Bindung. OPN erhöht bekanntermaßen das Überleben diverser Zellen. Der Vergleich von unstimulierten Treg- bzw. Tconv-Zellen mit oder ohne rOPN-Inkubation ergab eine erhöhte Zellzahl noch nach drei Tagen für beide Subpopulationen, sofern sie mit rOPN behandelt wurden. OPN erhöht demnach das Überleben auch unstimulierter Treg- bzw. Tconv-Zellen *in vitro*. Die Expression der Aktivitätsmarker CTLA-4 und CD25 dagegen wurden durch rOPN-Zugabe nicht erhöht. Auch die Bildung des Proliferationsmarkers Ki-67 wird von rOPN nicht beeinflusst.

Die Zugabe von rOPN hatte keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-2 und TNF- $\alpha$  durch Treg- oder Tconv-Zellen. Jedoch zeigten sich Tendenzen, dass OPN die Expression von IL-17A und IFN- $\gamma$  verstärkt.

Rekombinantes OPN erhöht die Supprimierbarkeit von konventionellen T-Zellen aus OPN-Knock-out-Tieren durch regulatorische T-Zellen aus Wildtyp- oder OPN-KO-Tieren. Die Supprimierbarkeit von wildtypischen Tconv-Zellen wird durch OPN jedoch nicht beeinflusst. Dabei bleibt die suppressive Aktivität von regulatorischen T-Zellen aus KO-Tieren auch bei höher dosierten Zugaben von rekombinantem OPN geringer gegenüber wildtypischen Treg-Zellen.

Als eine mögliche Ursache für die Wirkung von rOPN auf die Supprimierbarkeit von Tconv-Zellen kam eine veränderte GITR-Expression auf konventionellen T-Zellen in Betracht. Tconv-Zellen aus OPN-KO-Tieren zeigten jedoch eine



verminderte GITR-Expression, weshalb eine erhöhte GITR-Aktivierung als mögliche Ursache der OPN-Wirkung auf konventionelle T-Zellen eher unwahrscheinlich ist.

Diese Arbeit trägt zu einem besseren Verständnis der Interaktion von Immunzellen, insbesondere von regulatorischen und konventionellen T-Zellen bei und soll auch die Rolle von Osteopontin dabei aufzeigen.

Dadurch könnten nach weiterer Forschung in diesem Bereich Immunreaktionen auch im klinischen Alltag, wie beispielsweise bei der Wundheilung, nach Myokardinfarkten oder Autoimmunerkrankungen besser erklärbar und eventuell auch besser therapierbar werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Janeway, C. A. (et al. . Immunobiology: the immunsystem in health and disease. *Garl. Sci.* **6th edition**, (2005).
2. Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P. H. Molecular mechanisms of Treg-mediated cell suppression. *Front. Immunol.* **3**, 1–20 (2012).
3. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* **133**, 775–787 (2008).
4. Tang, Q. *et al.* Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T-cell function. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2996–3005 (2004).
5. O'Regan, A. W., Nau, G. J., Chupp, G. L. & Berman, J. S. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol.Today* **21**, 475–478 (2000).
6. Hollmann, C. Funktionelle Bedeutung der Expression von Osteopontin in CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischen T-Zellen im Rahmen eines experimentellen Myokardinfarkts. *Masterarbeit Univ. Würzbg.* (2013).
7. Shinohara, M. L. *et al.* T-bet-dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17101–17106 (2005).
8. Wang, K. X. & Denhardt, D. T. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 333–345 (2008).
9. Lund, S. A., Giachelli, C. M. & Scatena, M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 311–322 (2009).
10. Mazzali, M. *et al.* Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM* **95**, 3–13 (2002).
11. Shinohara, M. L., Kim, H.-J., Kim, J.-H., Garcia, V. a & Cantor, H. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7235–7239 (2008).
12. Shinohara, M. L. Regulation of T-helper-cell lineage development by osteopontin. **9**, 137–141 (2009).
13. Uede, T. Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory

- diseases. *Pathol. Int.* **61**, 265–80 (2011).
14. Scatena, M., Liaw, L. & Giachelli, C. M. Osteopontin: A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2302–2309 (2007).
  15. Liaw, L. *et al.* Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *J. Clin. Invest.* **101**, 1468–1478 (1998).
  16. Standal, T., Borset, M. & Sundan, A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp. Oncol.* **26**, 179–184 (2004).
  17. Marcin Dobaczewski & Frangogiannis, C. G.-Q. N. G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **18**, 1492–1501 (2011).
  18. Singh, M. Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *Changes* **29**, 997–1003 (2012).
  19. Ashkar, S. *et al.* Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* **287**, 860–864 (2000).
  20. Weber, G. F. & Cantor, H. The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**, 241–248 (1996).
  21. Sam, F. *et al.* Mice lacking osteopontin exhibit increased left ventricular dilation and reduced fibrosis after aldosterone infusion. *Am. J. Hypertens.* **17**, 188–193 (2004).
  22. Graf, K. *et al.* Myocardial Osteopontin Expression Is Associated With Left Ventricular Hypertrophy. *Circulation* **96**, 3063–3071 (1997).
  23. Chen, M. *et al.* Regulatory effects of IFN-beta on production of osteopontin and IL-17 by CD4+ T Cells in MS. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2525–2536 (2009).
  24. Duerr, G. D. *et al.* Cardioprotective effects of osteopontin-1 during development of murine ischemic cardiomyopathy. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
  25. Stawowy, P. *et al.* Increased myocardial expression of osteopontin in patients with advanced heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **4**, 139–146 (2002).
  26. Philip, S., Bulbule, A. & Kundu, G. C. Osteopontin Stimulates Tumor Growth and Activation of Promatrix Metalloproteinase-2 through Nuclear

- Factor-kappa-B-mediated Induction of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase in Murine Melanoma Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 44926–44935 (2001).
27. Bollyky, P. L. *et al.* Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **179**, 744–747 (2007).
  28. Suttmuller, R. P. M., Morgan, M. E., Netea, M. G., Grauer, O. & Adema, G. J. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol.* **27**, 387–393 (2006).
  29. Shinohara, M. L. *et al.* Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol.* **7**, 498–506 (2006).
  30. Mori, R., Shaw, T. J. & Martin, P. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *J. Exp. Med.* **205**, 43–51 (2008).
  31. Wang, K. X. & Denhardt, D. T. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 333–45 (2008).
  32. Lund, S. A., Giachelli, C. M. & Scatena, M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 311–22 (2009).
  33. O'Regan, A. W., Hayden, J. M., Berman, J. S. & Regan, A. W. O. Osteopontin augments CD3-mediated interferon- $\gamma$  and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 495–502 (2000).
  34. Spellberg, B. & Edwards, J. E. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 76–102 (2001).
  35. Abel, B., Freigang, S., Bachmann, M. F., Boschert, U. & Kopf, M. Osteopontin is not required for the development of Th1 responses and viral immunity. *J. Immunol.* **175**, 6006–6013 (2005).
  36. Nyström, T., Dunèr, P. & Hultgardh-Nilsson, A. A constitutive endogenous osteopontin production is important for macrophage function and differentiation. *Exp. Cell Res.* **313**, 1149–1160 (2007).
  37. Begum, M. D. *et al.* Suppression of the bacterial antigen-specific T cell

- response and the dendritic cell migration to the lymph nodes by osteopontin. *Microbiol Immunol* **51**, 135–147 (2007).
38. Inoue, M. & Shinohara, M. L. Cutting Edge: Role of Osteopontin and Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 in T Cell-Mediated Anti-Inflammatory Responses in Endotoxemia. *J. Immunol.* **194**, 5595–5598 (2015).
  39. Hofmann, U. & Frantz, S. Role of Lymphocytes in Myocardial Injury, Healing, and Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **116**, 354–367 (2015).
  40. Weirather, J. *et al.* Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ. Res.* **115**, 55–67 (2014).
  41. Krishnamurthy, P., Peterson, J. T., Subramanian, V., Singh, M. & Singh, K. Inhibition of matrix metalloproteinases improves left ventricular function in mice lacking osteopontin after myocardial infarction. *Mol. Cell. Biomech.* **322**, 423–439 (2009).
  42. Trueblood, N. a *et al.* Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ. Res.* **88**, 1080–1087 (2001).
  43. Crawford, H. C., Matrisian, L. M. & Liaw, L. Distinct Roles of Osteopontin in Host Defense Activity and Tumor Survival during Squamous Cell Carcinoma Progression in Vivo Distinct Roles of Osteopontin in Host Defense Activity and Tumor Survival during Squamous Cell Carcinoma Progression in Vivo1. 5206–5215 (1998).
  44. Craig, a. M. *et al.* Secreted phosphoprotein mRNA is induced during multi-stage carcinogenesis in mouse skin and correlates with the metastatic potential of murine fibroblasts. *Int. J. Cancer* **46**, 133–137 (1990).
  45. Stromnes, I. M. & Goverman, J. M. Osteopontin-induced survival of T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 19–20 (2007).
  46. Hur, E. M. *et al.* Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 74–83 (2007).
  47. Zohar, R., Zhu, B., Liu, P., Sodek, J. & McCulloch, C. a. Increased cell

- death in osteopontin-deficient cardiac fibroblasts occurs by a caspase-3-independent pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H1730-9 (2004).
48. You, H. *et al.* FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine / growth factor withdrawal. **203**, (2006).
  49. Nomiya, T. *et al.* Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 2877–2888 (2007).
  50. Leitner, L. *et al.* Immunological blockade of adipocyte inflammation caused by increased matrix metalloproteinase-cleaved osteopontin in obesity. *Obesity* **23**, 779–785 (2015).
  51. Lesley, J., Hascall, V. C., Tammi, M. & Hyman, R. Hyaluronan Binding by Cell Surface CD44. *J. Biol. Chem.* **35**, 26967–26975 (2000).
  52. Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* **182**, 311–322 (2000).
  53. Stephens, G. L. *et al.* Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J. Immunol.* **173**, 5008–5020 (2004).
  54. Zhan, Y. *et al.* Glucocorticoid-induced TNF receptor expression by T cells is reciprocally regulated by NF-kappaB and NFAT. *J. Immunol.* **181**, 5405–13 (2008).
  55. Ephrem, A. *et al.* Modulation of Treg cells/T effector function by GITR signaling is context-dependent. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2421–2429 (2013).
  56. Bas J. G. Baaten, Cheng-Rui Li, Mia F. Deiro, Melissa M. Lin, Phyllis J. Linton†, and L. M. B. CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. *Immunity* **32(1)**, 104–115 (2010).
  57. O'Regan, a W. *et al.* Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J. Immunol.* **162**, 1024–31 (1999).
  58. Pesenacker, A. M. *et al.* CD161 defines the subset of FoxP3+ T cells capable of producing pro-inflammatory cytokines. (2018). doi:10.1182/blood-2012-08-443473

59. Shinohara, M. L., Kim, J.-H., Garcia, V. a & Cantor, H. Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity* **29**, 68–78 (2008).
60. Regan, A. W. O., Hayden, J. M. & Berman, J. S. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-beta and CD40 ligand expression by T cells , which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells Abstract: Osteopontin is an RGD-containing tion of CD40L provides mechanistic support for ce. **68**, (2000).
61. Nocentini, G., Ronchetti, S., Cuzzocrea, S. & Riccardi, C. GITR/GITRL: More than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1165–1169 (2007).
62. Ono, M., Shimizu, J., Miyachi, Y. & Alerts, E. Control of Autoimmune Myocarditis and Multiorgan Inflammation by Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Family-Related Protein high, Foxp3-Expressing CD25 + and CD25- Regulatory T Cells (2017). *J Immunol* 2006
63. Klement, J. D. *et al.* An osteopontin / CD44 immune checkpoint controls CD8 + T cell activation and tumor immune evasion Find the latest version : An osteopontin / CD44 immune checkpoint controls CD8 + T cell activation and tumor immune evasion. **128**, 5549–5560 (2018).

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Struktur von Osteopontin .....</b>	<b>6</b>
<b>Abbildung 2: Knock-out Mutation des spp1-Gens und Anlagerung der Primer .....</b>	<b>20</b>
<b>Abbildung 3: Bindung von APC-markiertem OPN an Treg- und Tconv- Zellen .....</b>	<b>30</b>
<b>Abbildung 4. OPN erhöht das Überleben von Tconv- und Treg-Zellen.....</b>	<b>31</b>
<b>Abbildung 5: rOPN besitzt keinen Einfluss auf die Expression von CTLA-4, CD25 und Ki-67 in <math>\alpha</math>CD3-Antikörper stimulierten Treg- und Tconv- Zellen .....</b>	<b>34</b>
<b>Abbildung 6: rOPN erhöht die Sekretion von TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math> und IL-17A .....</b>	<b>35</b>
<b>Abbildung 7: Färbung der Zellen mittels eFluor670 und Darstellung der Proliferation von konventionellen T-Zellen ohne Tregzell-Zugabe (Indikatorzellen).....</b>	<b>38</b>
<b>Abbildung 8: Wildtypische Treg-Zellen supprimieren stärker als Treg- Zellen aus KO-Tieren. ....</b>	<b>39</b>
<b>Abbildung 9: Zugabe oder Neutralisation von OPN verändert die Suppression von WT-Tconv-Zellen nicht .....</b>	<b>40</b>
<b>Abbildung 10: Zugabe von rekombinanten OPN steigert die Suppression im Knock-out-System .....</b>	<b>41</b>
<b>Abbildung 11: Trotz Zugabe von rOPN zeigen KO-Treg eine geringere Suppression als WT-Treg .....</b>	<b>42</b>
<b>Abbildung 12: Rekombinantes OPN verändert nicht die Expression von GITR .....</b>	<b>43</b>
<b>Abbildung 13: Die MFI für die GITR-Expression ist bei den OPN-KO-Tconv- Zellen geringer als bei den wildtypischen Zellen .....</b>	<b>45</b>
<b>Abbildung 14: Möglicher Wirkmechanismus von OPN an regulatorischen und konventionellen Zellen .....</b>	<b>50</b>



## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
APC (Fluorchrom)	Allophycocyanin
BSA	Bovine Serum Albumin
BSS	Balanced Salt Solution
B-Zellen	B-Lymphozyten
CD	cluster of differentiation
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DC	Dendritische Zelle
Eta-1	early T-lymphocyte activation gene 1
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
Foxp3	Forkhead-box-Protein P3
GITR	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor
HSV	Humanes Herpes Virus
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgM/IgG	Immunglobulin M/G
IL-10, IL-12	Interleukin 10 /12
IRF-7	Interferon regulatory factor 7 Transkriptionsfaktor
KO	Knock-out
MFI	median fluorescence intensity
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matix-Metallo-Protease
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells

OPN	Osteopontin
iOPN	intrazelluläres OPN
sOPN	soluble, sezerniertes OPN
rOPN	rekombinantes OPN
PAMPS	pathogen assoziiated molekular patterns
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
Spp1	secreted phosphoprotein 1
T-bet	T-box transcription factor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
T-Zellen	T-Lymphozyten
Tconv	CD4+, Foxp3-, CD25- -konventionelle T-Zellen
Treg	CD4+, Foxp3+, CD25+, regulatorische T-Zellen
Th1-Zelle	Typ 1 T-Helferzelle
Th17-Zelle	Typ 17 T-Zelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp

## **8. Danksagung**

Mein Dank gilt nachstehenden Personen, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Niklas Beyersdorf meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Hilfe und der mannigfachen Ideengebung, die mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik eröffnete.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Hofmann für die wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Mein außerordentlicher Dank gilt zudem Claudia Hollmann, die mich wunderbar und oft sehr geduldig in die wissenschaftliche Thematik und Laborarbeit eingeführt und betreut hatte.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meiner Familie die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten. Vielen Dank für die finanzielle Unterstützung sowie euren motivierenden Beistand während meines gesamten Studiums!

