

Regulation der peripheren immunologischen Toleranz durch die Transkriptionsfaktoren ICER, NFAT und Foxp3



Regulation of Peripheral Immunological Tolerance by
the Transcription Factors ICER, NFAT, and Foxp3

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von Martin Väth
geboren in Illertissen

Würzburg 2011

*Man muss viel gelernt haben, um über das,
was man nicht weiß, fragen zu können*

Jean-Jacques Rousseau

Regulation der peripheren immunologischen Toleranz durch die Transkriptionsfaktoren ICER, NFAT und Foxp3



Regulation of Peripheral Immunological Tolerance by
the Transcription Factors ICER, NFAT, and Foxp3

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von Martin Väth
geboren in Illertissen

Würzburg 2011

Eingereicht am:

.....

(Stempel)

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender:

Professor Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer:

Dr. Friederike Berberich-Siebelt

2. Betreuer:

Priv.-Doz. Dr. Ingolf Berberich

3. Betreuer:

Priv.-Doz. Dr. Robert Hock

4. Betreuer:

Professor Dr. Edgar Serfling

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Kollegen und Freunden bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Dr. Friederike Berberich-Siebelt für die hervorragende wissenschaftliche wie persönliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Durch ihre unermüdliche Geduld und ihr großes Engagement war Rike maßgeblich am Gelingen meiner Arbeit mit verantwortlich. Insbesondere möchte ich hervorheben, dass Sie mir stets große wissenschaftliche Freiheiten gewährte und mich dabei methodisch sowie theoretisch nach besten Kräften unterstützte.

Ganz besonders danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. Edgar Serfling für die uneingeschränkte Unterstützung meiner wissenschaftlichen Ideen. Einblicke in seine langjährige und abwechslungsreiche Forschungstätigkeit, aber auch so manche kritische Diskussion, waren äußerst motivierend und lehrreich. Die herzliche und kollegiale Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe „Molekulare Pathologie“ war letztlich die Grundlage für ein sehr angenehmes und erfolgreiches Arbeiten.

Weiter bin ich Herrn PD Dr. Ingolf Berberich und Herrn PD Dr. Robert Hock sehr verbunden, dass sie sich gerne bereiterklärt haben, als Mitglieder meines GSLS Betreuungskomitees, das Koreferat für diese Arbeit zu übernehmen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bin ich für ihre fachliche und kollegiale Unterstützung im Laboralltag sehr dankbar. Ohne den Rückhalt von Ronald Rudolf, Tom Benkert, Melanie Schott, Lena Dietz, Rhoda Busch, Dr. Andris Avots, Dr. Stefan Klein-Hessling, Dr. Josef Bodor und Dr. Amiya Kumar wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Neben kleinen und großen Gefälligkeiten im Labor war im Besonderen auch eine rege Diskussionsbereitschaft äußerst hilfreich. Gemeinsame Unternehmungen und zahlreiche durchgeführte Nächte sorgten für das nötige Gleichgewicht zur tagtäglichen Laborarbeit.

Auch meinen immerzu hilfsbereiten Kooperationspartnern Dr. Tobias Bopp, Dr. Matthias Klein und Professor Edgar Schmitt (Institut für Immunologie, Mainz), Professor Birgit Sawitzki (Charité Berlin), PD Dr. Helmuth Jonuleit (Institut für Dermatologie, Mainz), Dr.

Sonja Reißig und Professor Ari Waisman (Institut für molekulare Medizin, Mainz) und nicht zuletzt meinen Kollegen aus Würzburg Dr. Tea Gogishvili, Stefanie Manthey, Anja Döhler, Katrien Pletinckx, Professor Manfred Lutz und Professor Thomas Hünig (Institut für Virologie und Immunbiologie) möchte ich für die fruchtbare und lehrreiche Zusammenarbeit danken. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle auch den Organisatoren und Mitgliedern des Graduiertenkollegs GK520 „Immunmodulation“ meine volle Hochachtung aussprechen.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Freundin Miriam und meinen Eltern, die mich in dieser Zeit in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Erklärung an Eides statt (<i>affidavit</i>)	1
2.	Zusammenfassung in englischer Sprache (<i>abstract</i>)	2
3.	Zusammenfassung in deutscher Sprache	3
4.	Einleitung	4
4.1.	Das Immunsystem	4
4.2.	Entwicklung von T-Lymphozyten	5
4.3.	Regulatorische T-Zellen	8
4.3.1.	Natürliche regulatorische T-Zellen (nTregs)	9
4.3.2.	Induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs)	11
4.3.3.	Immun-Regulation durch Tregs	12
4.4.	Dendritische Zellen (DCs)	16
4.5.	<i>Nuclear factor of activated T cells</i> (NFAT)	17
4.5.1.	Die Familie der NFAT Transkriptionsfaktoren	17
4.5.2.	Signaltransduktion durch NFAT	19
4.5.3.	Autoregulation und NFATc1/ α A	21
4.6.	<i>Forkhead box protein 3</i> (Foxp3)	23
4.6.1.	Regulation der Foxp3 Expression	25
4.7.	<i>Inducible cAMP early repressor</i> (ICER)	27
4.7.1.	ICER als Repressor	29
4.7.2.	cAMP und ICER bei der Treg-vermittelten Suppression	30
4.8.	Zielsetzung der Arbeit	32
5.	Material und Methodik	33
5.1.	Materialien	33
5.1.1.	Chemikalien und Reagenzien	33
5.1.2.	Häufig verwendete Puffer	34
5.1.3.	Biologische Materialien	35
5.1.3.1.	Zelllinien	35
5.1.3.2.	Versuchstiere	35
5.1.3.3.	Antikörper und Antikörperkonjugate	36
5.1.3.4.	Antibiotika und Inhibitoren	37
5.1.3.5.	Oligonukleotide und Plasmide	38
5.1.3.5.1.	Primer für die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
5.1.3.5.2.	Primer für Mausschwanz-Genotypisierungen	39
5.1.3.5.3.	Primer für CHIP Analysen	39
5.1.3.5.4.	DNA Sonden für EMSA	40
5.1.3.5.5.	Plasmide	40
5.1.3.6.	Enzyme	41
5.1.3.7.	Liganden und Stimulantien	41
5.1.3.8.	Feinchemikalien für die Zellkultur	41
5.1.3.9.	Radioaktiv-markierte Stoffe	42
5.1.3.10.	Größenstandards	42
5.1.4.	Gebrauchsfertige Kits und Systeme	42
5.1.5.	Sonstiges	43
5.1.5.1.	Verbrauchsmaterialien	43
5.1.5.2.	Verwendete Geräte	44
5.1.5.3.	Elektronische Datenverarbeitung	45

5.2.	Methoden	46
5.2.1.	Zelluläre Techniken	46
5.2.1.1.	Zellkulturmedien	46
5.2.1.2.	Zentrifugation von Zellen	46
5.2.1.3.	Zellzählung und Vitalitätstest	46
5.2.1.4.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	47
5.2.1.5.	Kultur des X63-GMCSF Hybridoms	47
5.2.1.6.	Kultur von HEK 293T Zellen	47
5.2.1.7.	Kultur von EL-4 Zellen	48
5.2.1.8.	Transiente Transfektionen mittels Calciumphosphat	48
5.2.1.9.	Transiente Transfektion mittels DEAE-Dextran	48
5.2.1.10.	Luciferase-Reportergen Analysen	49
5.2.1.11.	Gewinnung von Knochenmark	50
5.2.1.12.	Generierung dendritischer Zellen aus Knochenmark	50
5.2.1.13.	Stimulation von dendritischen Zellen	50
5.2.1.14.	Präparation von Lymphknoten, Milz und Thymus	51
5.2.1.15.	Herstellung einer Zellsuspension und Erylyse	51
5.2.1.16.	Negativ-Anreicherung von CD4 ⁺ T-Zellen (Dyna)	52
5.2.1.17.	Positiv-Anreicherung von Lymphozyten (MACS Miltenyi Biotec)	53
5.2.1.18.	Isolation von CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen	53
5.2.1.19.	Kultur und Stimulation von T-Lymphozyten	54
5.2.1.20.	Polarisierung von naiven T-Lymphozyten in T _H -Zellen	54
5.2.1.21.	Kultur und Stimulation von B-Lymphozyten	55
5.2.1.22.	Proliferationsbestimmung mittels [³ H]-Thymidin	55
5.2.1.23.	Standard Treg-Assay	56
5.2.1.24.	Treg-Assay mit B-Lymphozyten	56
5.2.1.25.	Gen <i>knock down</i> mittels rekombinantem Cre-Fusionsprotein	57
5.2.1.26.	Gen <i>knock down</i> mittels <i>short hairpin</i> RNA (shRNA)	57
5.2.1.27.	Durchflusszytometrie (FACS)	58
5.2.1.28.	FACS-basierte Sortierung von Zellen	59
5.2.1.29.	Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation durch Calcein <i>in vitro</i>	60
5.2.2.	<i>In vivo</i> Experimente und Mausmodelle	60
5.2.2.1.	Depletion von nTregs in DEREK-Mäusen und CD28SA-Behandlung	60
5.2.2.2.	Untersuchung von Zell-Zell-Kommunikation durch Calcein <i>in vivo</i>	61
5.2.3.	Arbeiten mit Proteinen	62
5.2.3.1.	Herstellung von Proteinextrakten	62
5.2.3.2.	Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford	63
5.2.3.3.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	63
5.2.3.4.	Probenpräparation und Durchführung der SDS-PAGE	64
5.2.3.5.	Immunologischer Nachweis von Proteinen	65
5.2.3.6.	Strippen von Membranen	66
5.2.4.	Immunologische Methoden	66
5.2.4.1.	Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	66
5.2.4.2.	Immunpräzipitation (IP)	68
5.2.4.3.	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	69

5.2.5.	Arbeiten mit Nukleinsäuren	71
5.2.5.1.	Isolation von genomischer DNA	71
5.2.5.2.	Isolation von Gesamt RNA aus Zellen mit Trizol	71
5.2.5.3.	Vermessung von RNA	72
5.2.5.4.	Umschreiben von RNA in cDNA (Reverse Transkription)	73
5.2.5.5.	Amplifikation von DNA und cDNA mittels PCR	73
5.2.5.6.	Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel	74
5.2.6.	Bildgebende Verfahren	74
5.2.6.1.	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	74
5.2.6.2.	Probenvorbereitung von Zellen	75
5.2.6.3.	Vorbereitung von histologischen Proben	75
5.2.6.4.	Färben von Zellen und histologischen Schnitten (Immunfluoreszenz)	76
5.2.6.5.	Analyse der Proben mittels konfokaler Mikroskopie	77
5.2.7.	Statistische Analysen	77
6.	Ergebnisse	78
6.1.	Die Rolle von ICER in der nTreg-vermittelten Immunsuppression	78
6.1.1.	Aktivierung von Tconv führt zur zytosolischen Lokalisation von ICER	78
6.1.2.	Der Transport von ICER ins Zytoplasma wird durch CD28 reguliert	81
6.1.3.	Erhöhte cAMP-Konzentration in regulatorischen T-Zellen	82
6.1.4.	Direkter Kontakt zu nTregs dirigiert ICER in Kern von Tconv <i>in vivo</i>	83
6.1.5.	Depletion von nTregs <i>in vivo</i> dirigiert ICER ins Zytoplasma von Tconv	85
6.1.6.	Direkter Kontakt zu nTregs dirigiert ICER in Kern von B-Zellen	88
6.1.7.	nTregs hemmen die Proliferation und CD80-Expression von B-Zellen	91
6.1.8.	nTregs hemmen die Induktion des <i>Nfatc1</i> P1 Promoters	92
6.1.9.	ICER hemmt die Autoregulation von NFATc1/ α A	93
6.1.10.	ICER bindet direkt an den <i>Nfatc1</i> P1 Promotor	95
6.1.11.	Direkter Zell-Zell-Kontakt zu nTregs induziert ICER und supprimiert die Induktion von NFATc1/ α A in konventionellen T-Zellen	96
6.2.	Die Rolle von NFAT in natürlichen und induzierten Tregs	98
6.2.1.	Charakterisierung der NFATc1-Deletion in CD4 ⁺ T-Zellen	98
6.2.2.	Charakterisierung von <i>Nfatc1Nfatc2</i> -doppeldefizienten T-Zellen	100
6.2.3.	Die Entwicklung von nTregs ist unabhängig von NFAT-Faktoren	102
6.2.4.	NFAT-defiziente nTregs supprimieren normal <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	105
6.2.5.	NFAT-Faktoren regulieren direkt die Foxp3-Expression in iTregs	108
6.2.6.	Kostimulation spielt eine geringe Rolle bei der iTreg-Differenzierung	111
6.2.7.	NFAT reguliert die iTreg-Differenzierung <i>in vivo</i>	112
6.2.8.	Verringerte Kerntranslokation von NFAT-Faktoren in Foxp3 ⁺ T-Zellen	114
6.2.9.	Foxp3 hemmt die Autoregulation von NFATc1/ α A in Tregs	117

6.3.	Expression und Funktion von NFAT in dendritischen Zellen	123
6.3.1.	NFATc1 wird in DCs vom <i>Nfatc1</i> P2 Promotor transkribiert	123
6.3.2.	Gegensätzliche Funktion von NFATc1 und NFATc2 hinsichtlich der Generierung und Proliferation dendritischer Zellen	125
6.3.3.	Calcium- und NFAT-Signale regulieren die Reifung von BMDCs	127
6.3.4.	Die Expression von NFATc1 und NFATc2, nicht aber von NFATc3, wird durch Aktivierung in BMDCs gehemmt	129
6.3.5.	NFATc3 reguliert die Dectin-1-vermittelte Zytokinexpression	130
7.	Diskussion	133
7.1.	Die Rolle von ICER bei der Treg-vermittelten Suppression	133
7.1.1.	ICER hemmt die Induktion von NFATc1/ α A	137
7.2.	Die Rolle von NFAT in natürlichen und induzierten Tregs	140
7.2.1.	NFAT reguliert die Foxp3-Expression in induzierten Tregs	141
7.2.2.	Entwicklung und Funktion von nTregs ist unabhängig von NFAT	145
7.2.3.	Reduzierte Kerntranslokation von NFAT-Faktoren in Foxp3 ⁺ Tregs	149
7.2.4.	Foxp3 hemmt die Autoregulation von NFATc1/ α A in Tregs	150
7.3.	Expression und Funktion von NFAT in dendritischen Zellen	153
7.3.1.	NFATc1 und NFATc2 kontrollieren die Reifung von BMDCs	153
7.3.2.	NFATc3 reguliert die Dectin-1-vermittelte Zytokinexpression	156
7.4.	ICER, NFAT und Foxp3 als Regulatoren der peripheren Toleranz	158
8.	Anhang	161
8.1.	Kongressteilnahmen	161
8.2.	Veröffentlichungen	162
8.2.1.	Wissenschaftliche Originalpublikationen	162
8.2.2.	Vorträge bei Konferenzen	163
8.2.3.	Posterpräsentationen bei Konferenzen	164
8.3.	<i>Curriculum Vitae</i>	165
8.4.	Abkürzungsverzeichnis	166
9.	Literaturverzeichnis	169

1. Erklärung an Eides statt (*affidavit*)

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Regulation der peripheren immunologischen Toleranz durch die Transkriptionsfaktoren ICER, NFAT und Foxp3“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

I hereby confirm that my thesis entitled „Regulation of Peripheral Immunological Tolerance by the Transcription Factors ICER, NFAT, and Foxp3“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, den 7. September 2011

Martin Väth

2. Zusammenfassung in englischer Sprache (*abstract*)

Discrimination between self and nonself is a major challenge during a specific immune reaction. Pathological alterations of this fine boundary can cause severe autoimmune diseases, such as Diabetes Mellitus, Rheumatoid Arthritis or Multiple Sclerosis. In order to prevent unwanted (auto-) immune reactions, several mechanisms of peripheral tolerance exist. Transcription factors, including ICER (*inducible cAMP early repressor*), NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), and Foxp3 (*forkhead box protein 3*), are critical components thereby.

Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) are specialized immune-suppressive lymphocytes and inhibit the activation of conventional immune cells. One mechanism of Treg-mediated suppression is the transfer of cyclic adenosine-monophosphat (cAMP) from Treg cells into conventional T- and B-lymphocytes. Elevated concentrations of cAMP induce the transcription and subsequent nuclear translocation of ICER. The transcriptional repressor ICER arrests expression of NFAT-regulated genes and even the induction of the short NFATc1/ α A-isoform. Upregulation of NFATc1/ α A is a hallmark of activated effector cells, controlling their transcriptional program.

Foxp3 is essential for the development and function of thymus-derived nTregs as well as peripheral (TGF β -) induced iTregs. The *Foxp3*-gene is regulated in iTregs – but surprisingly not in nTregs – by NFAT-factors. Likewise, Foxp3 represses NFATc1/ α A in a negative feedback loop and, thereby, controls both plasticity and function of immune-suppressive Treg cells.

In addition, NFAT-proteins also affect antigen-presenting dendritic cells (DCs). While NFATc1 and NFATc2 influence differentiation and proliferation of DCs, NFATc3 is important for cytokine secretion and the subsequent T cell response.

Taken together, these results show that the transcription factors ICER, NFAT, and Foxp3 exert specific functions in controlling both immunity and tolerance, the opposing „faces“ of the immune system. The appropriate transcriptional regulation of this ambivalent situation is a requisite to achieve optimal immune responses and, coincidentally, to prevent deleterious (auto-) immune reactions.

3. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen ist eine grundlegende Herausforderung der spezifischen Immunantwort. Pathologische Veränderungen dieser wichtigen Abgrenzung können zu schwerwiegenden Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Diabetes Mellitus, Rheumatischer Arthritis oder Multipler Sklerose führen. Um unerwünschte (Auto-) Immunreaktionen zu verhindern, existieren verschiedene Formen von peripheren Toleranzmechanismen, die durch viele Transkriptionsfaktoren wie z. B. ICER (*inducible cAMP early repressor*), NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) und Foxp3 (*forkhead box protein p3*) kontrolliert werden.

Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs) sind spezialisierte immun-suppressive Lymphozyten, welche die Aktivierung anderer Immunzellen unterdrücken können. Einer der möglichen Mechanismen ist der Transfer zyklischen Adenosin-Monophosphats (cAMP) von Tregs in konventionelle T- und B-Lymphozyten. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration an cAMP führt in Effektorzellen zur Induktion und Kerntranslokation von ICER. Der transkriptionelle Repressor ICER supprimiert die Expression vieler NFAT-regulierter Gene und hemmt darüber hinaus die Induktion der NFATc1/ α A-Isoform selbst. Diese Isoform wird speziell in pro-inflammatorischen Effektorzellen hochreguliert und ist maßgeblich an deren spezifischem transkriptionellen Programm beteiligt.

Foxp3 ist ein zentraler Faktor für die Bildung und Funktion sowohl Thymusgenerierter nTregs als auch peripher (TGF β -) induzierter iTregs. Die Kontrolle des *Foxp3*-Gens wird in iTregs – überraschenderweise aber nicht in nTregs – durch NFAT-Faktoren reguliert. Allerdings hemmt Foxp3 durch eine negative Rückkopplung wiederum die Induktion und Aktivität von NFATc1/ α A. Dies stellt somit ein weiteres Regulativ dar, wobei Foxp3 nicht nur die Plastizität, sondern auch die Funktion von immun-suppressiven T-Zellen steuert.

Zusätzlich regulieren die verschiedenen NFAT-Faktoren auch die Antigen präsentierenden dendritischen Zellen (DCs). Während NFATc1 und NFATc2 die Differenzierung und Proliferation von DCs beeinflussen, reguliert NFATc3 deren Zytokinexpression und steuert indirekt auch die nachfolgende T-Zell-Immunantwort.

Die Kontrolle der Genregulation in Immunzellen durch die Transkriptionsfaktoren ICER, NFAT und Foxp3 erfüllt somit spezifische Funktionen der Immunität, reguliert aber gleichzeitig wichtige Aspekte der peripheren Toleranz, um schädliche (Auto-) Immunreaktionen zu verhindern.

4. Einleitung

4.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem (von lat. *immunis*: unberührt, rein) ist ein biologisches Abwehrsystem, das unter Beteiligung verschiedener Organe, Zelltypen und Moleküle den Körper vor Krankheitserregern schützt. Neben Pathogenen ist das Immunsystem außerdem in der Lage, entartete Zellen und körperfremde Substanzen zu erkennen und gezielt zu neutralisieren. Grundsätzlich werden die angeborene (*innate immunity*) und die erworbene Immunität (*adaptive immunity*) unterschieden. Dennoch sind beide Systeme eng miteinander verflochten.

Das phylogenetisch ältere angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie gegenüber eingedrungenen Mikroorganismen. Epithelzellen, die als physiologische, mikrobiologische und chemische Barrieren dienen, und biochemische Faktoren, wie etwa das Komplementsystem, bilden dabei ein (eher) passives Abwehrsystem, während die zellulären Komponenten der angeborenen Immunantwort körperfremde Strukturen erkennen und gezielt eliminieren können. Die Zellen der angeborenen Immunität werden grundsätzlich von myeloiden Vorläuferzellen gebildet und umfassen Monozyten, Makrophagen, Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile und Basophile), Mastzellen und dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs). Desweiteren werden die Natürlichen Killerzellen (NK Zellen) zum angeborenen Immunsystem gezählt. Die Erkennung von „selbst“ und „fremd“ spielt bei der angeborenen Immunabwehr eine herausragende Rolle und wird meist durch keimbahnkodierte Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), die spezifische körperfremde Strukturen (*pathogen-associated molecular Patterns*, PAMPs) auf Mikroorganismen erkennen, vermittelt (7). Die Zellen sind in der Lage, Pathogene direkt zu eliminieren (beispielsweise mittels Lyse bei NK Zellen oder Phagozytose bei Makrophagen) oder durch Ausschüttung von Botenstoffen, wie Interleukinen, Zytokinen und Chemokinen, eine Entzündungsreaktion unter Beteiligung der erworbenen Immunantwort zu initiieren. Eine weitere wichtige Funktion der myeloiden Zellen ist die Präsentation von fremden und eigenen (Protein-) Strukturen auf spezialisierten Oberflächenmolekülen (*major histocompatibility complex*, MHC), die für die Reifung und Funktion von T-Lymphozyten wesentlich sind.

Die erworbene Immunabwehr entwickelte sich in höheren Vertebraten und zeichnet sich durch eine hochspezialisierte Immunreaktion aus, die zwar eine längere „Anlaufzeit“ benötigt, aber Dank einer hohen Anpassungsfähigkeit an neue Krankheitserreger und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses hochspezifisch und sehr effizient arbeitet. Die erworbene Immunität unterteilt sich in eine zelluläre und eine humorale (von lat. *humor*: Flüssigkeit) Immunantwort. Die zellulären Komponenten werden aus den lymphoiden

Vorläuferzellen gebildet und differenzieren im Wesentlichen zu verschiedenen T-Lymphozyten (abgeleitet vom Entstehungsort *Thymus*) und B-Zellen (abgeleitet von *bone marrow* (Knochenmark) bei Säugern oder *bursa fabricii* bei Vögeln). Die humorale Immunantwort wird hauptsächlich durch Antikörper vermittelt, die von B-Zellen bzw. sich daraus entwickelnden Plasmazellen sezerniert werden. Die hohe Spezifität der erworbenen Immunantwort beruht auf dem Prinzip der klonalen Selektion. Das bedeutet, dass jede einzelne T- oder B-Zelle durch somatische Rekombination einen individuellen Antigen-Rezeptor (T-Zell-Rezeptor, TCR oder B-Zell-Rezeptor, BCR) exprimiert und die Zelle nur nach Kontakt mit dem passenden Antigen aktiviert wird (8). Durch rasche klonale Expansion der Zellen mit den spezifischen Rezeptoren wird eine sehr effiziente Immunreaktion ausgelöst. Darüber hinaus können nach dem Abklingen der Entzündung aus den aktivierten Lymphozyten langlebige Gedächtniszellen gebildet werden.

4.2. Entwicklung von T-Lymphozyten

Wie alle Immunzellen entwickeln sich T-Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells, HSCs*) in speziellen Nischen des Knochenmarks. Von dort aus wandern sie als lymphoide Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors, CLPs*) über den Blutstrom in den Cortex des Thymus ein und migrieren als naive $CD4^-CD8^-$ Thymozyten weiter in die Medulla (9). Dabei passieren sie ein enges Netzwerk an kortikalen (cTECs) und medullären Thymus-Epithelzellen (mTECs). Diese Epithelzellen, aber auch spezialisierte Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimieren MHC I- und MHC II-Oberflächenproteine, verschiedene Korezeptoren (etwa die B7 Moleküle) und produzieren zahlreiche Interleukine, beispielsweise IL-7 (9). Im sog. doppelnegativen Stadium der Thymozyten ($CD4^-CD8^-$ oder auch pro-T-Zellen) werden die TCR-kodierenden (VDJ-) Segmente somatisch rekombiniert, so dass schließlich ein pre-TCR exprimiert wird (10). Im anschließenden doppelpositiven Stadium ($CD4^+CD8^+$) wird diese Rekombination abgeschlossen und ein reifer, d.h. voll funktioneller, heterodimerer – $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ – TCR wird gebildet (9, 11). Da das so erreichte Repertoire an TCRs auch prinzipiell körpereigene Strukturen erkennen und die Zellen somit schädlich für den Organismus sein könnten, müssen autoreaktiven Thymozyten eliminiert werden. Dies geschieht in einem zweistufigen Selektionsprozess, der als zentrale Toleranz bezeichnet wird (12, 13). Der erste Auswahlprozess im Thymus wird als Positivselektion bezeichnet: Dabei überleben nur diejenigen T-Zellen, deren TCR mit einer geringen bis mäßigen Avidität körpereigene Peptid-MHC-Komplexe erkennt. Bei fehlender Positivselektion werden die T-Zellen durch Apoptose

entfernt (9, 12, 13). Dieser Mechanismus stellt die sog. MHC-Restriktion sicher. Entsprechend der Peptiderkennung, präsentiert über MHC I oder MHC II, werden hierbei auch die $CD8^+$ (zytotoxische T-Zellen) oder $CD4^+$ (Helfer-T-Zellen) Linien festgelegt (9). Die anschließende Negativselektion dient der Eliminierung autoreaktiver T-Zellen. Thymozyten, deren TCRs mit hoher Avidität oder Affinität körpereigene Peptide binden, werden ebenfalls durch Apoptose abgetötet (9, 11-13). Wahrscheinlich wird dabei aber auch ein kleiner Anteil selbst-reaktiver $CD4^+$ T-Zellen in natürliche $Foxp3^+$ Tregs konvertiert (siehe auch Punkt 4.3) (14, 15). Signale durch Korezeptoren (wie CD28 oder ICOS) und das umgebende Interleukinmilieu (beispielsweise durch IL-7) sind ebenfalls essentiell an der Thymozytenentwicklung beteiligt (10). Die selektierten Zellen verlassen anschließend den Thymus als naive $CD4^+$ (Helfer-T-Zellen), $CD8^+$ (zytotoxische T-Zellen) oder $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (regulatorische) T-Zellen (Abb. 4.1).

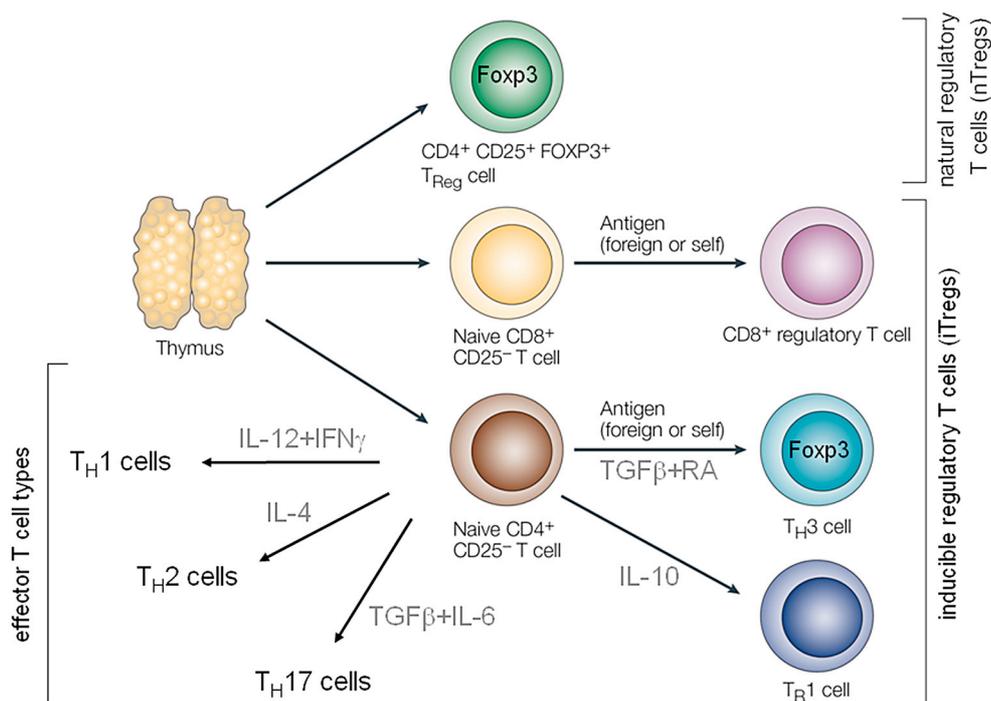


Abb. 4.1. Überblick über die verschiedenen T-Zell-Typen und deren Differenzierung. Im Thymus reifen lymphoide Vorläuferzellen zu zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$), zu Helfer-T-Zellen ($CD4^+CD25^-$) und zu natürlichen regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$). In der Peripherie können naive $CD4^+CD25^-$ Helfer-T-Zellen nach Antigenkontakt und in Gegenwart entsprechender Zytokine zu inflammatorischen T_H1 , T_H2 und T_H17 , aber auch zu verschiedenen induzierten regulatorischen T-Zellen (T_H3 und T_{R1}) differenzieren. Modifiziert nach K.H. Mills 2004 (1).

Allerdings werden durch die Mechanismen der zentralen Toleranz nicht alle potentiell autoreaktiven Lymphozyten „aussortiert“, so dass weitere periphere Toleranzmechanismen existieren (13). Diese werden im peripheren Gewebe u. a. durch regulatorische T-Zellen (Tregs) und immunologische Anergie- und Ignoranzmechanismen gewährleistet (siehe dazu Punkt 4.3).

Im Gewebe können $CD4^+$ oder $CD8^+$ Lymphozyten durch Erkennen eines adäquaten Peptid-Antigens, welches über MHC-Moleküle präsentiert wird, aktiviert werden. Verschiedene Zyto- und Chemokine begünstigen dabei die Differenzierung zu funktionell unterschiedlichen T-Zellsubtypen (16). Die $CD8^+$ Zellen reifen zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs), die durch Ausschüttung von Zellmembran-zerstörenden Perforinen und Granzymen oder durch Induktion von Apoptose infizierte oder entartete Zellen abtöten. $CD4^+$ Helfer T-Zellen können unter dem Einfluss unterschiedlicher Interleukine zu verschiedenen Effektor- oder (induzierten) regulatorischen T-Zellen differenzieren. IL-12 und $IFN\gamma$ begünstigen die Bildung von T_H1 -Zellen, die für eine effiziente Abwehr von (intrazellulären) einzelligen Pathogenen nötig sind. T_H2 -Zellen differenzieren in Anwesenheit von IL-4 und sind verantwortlich für eine Immunreaktion gegen größere Pathogene, wie z.B. gegen Würmer. Den T_H2 -Zellen wird auch eine wichtige Rolle bei pathologischen allergischen und chronischen Entzündungsreaktionen zugeschrieben. Eine weitere funktionelle Gruppe bilden die T_H17 -Zellen, welche durch eine Kombination von $TGF\beta$ - (*transforming growth factor β*) und pro-inflammatorischem IL-6-Signalen gebildet werden. Sie sind in die Immunantwort gegen Mikroorganismen involviert. Zusammen mit den T_H1 - sind die T_H17 -Zellen allerdings auch an zahlreichen Autoimmunreaktionen beteiligt. Beispielsweise finden sich diese T-Zellpopulationen vermehrt in der zerebralen Flüssigkeit bei Patienten mit multipler Sklerose (17). Neben den pro-inflammatorischen $CD4^+$ Zellen können auch suppressive oder regulatorische T-Zellen in der Peripherie ausdifferenzieren. Unter dem Einfluss von IL-10 oder $TGF\beta$, zusammen mit IL-2, können sogenannte induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs, siehe Punkt 4.3.2) gebildet werden. Daneben existieren noch weitere Subpopulationen, wie z. B. die folliculären T-Helferzellen (T_{FH}), spezialisiert für die Regulation der B-Zell-Antwort und T_H9 -Zellen, die ähnliche Eigenschaften wie T_H2 -Zellen aufweisen (18). Die ausdifferenzierten $CD4^+$ Subpopulationen sind jedoch keineswegs starr determinierte Phänotypen. Vielmehr zeigen sie eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Plastizität und lassen sich durch Änderung des Zytokinmilieus in Mischformen oder sogar vollständig andere Differenzierungen überführen (16).

4.3. Regulatorische T-Zellen

Die Existenz spezialisierter Suppressor-T-Zellen wurde schon in den 1970er Jahren postuliert, die aber, mangels geeigneter Marker, nicht genauer beschrieben werden konnten (19-21). Erst 1995 gelang Sakaguchi *et al.* der Nachweis, dass eine kleine Fraktion von CD4⁺ T-Zellen, charakterisiert durch die konstitutive Expression der IL-2 Rezeptor α -Kette (CD25), die Entstehung fataler Autoimmunreaktionen unterdrücken kann (22). Neonatal durchgeführte Thymektomie bei Mäusen, die zu schweren Autoimmunreaktionen führt, identifizierte den Thymus als Entstehungsort dieser sogenannten natürlichen regulatorischen T-Zellen (nTregs) (23-25). Eine weitere grundlegende Entdeckung bei der Beschreibung von Tregs war die Identifizierung des Foxp3 (*forkhead box P3*) Transkriptionsfaktors, der für die Funktion und die Aufrechterhaltung des regulatorischen Phänotyps dieser Zellen unverzichtbar ist (26, 27). Dementsprechend entwickeln Mäuse mit einer Rasterverschiebung im *Foxp3*-Gen (*scurfy*-Mäuse) oder einem totalen Verlust des *Foxp3*-Gens (*Foxp3*^{-/-}) eine fatale systemische Autoimmunreaktion (27, 28). Diese wird als *scurfy* (von engl. schorfig) bezeichnet, da die Mäuse äußerlich von einer starken autoimmun-bedingten Schuppenflechte (*psoriasis*) gekennzeichnet sind (27, 28). Eine vergleichbare genetisch-bedingte Krankheit namens IPEX (*immunodysregulation, polyendokrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome*) ist auch beim Menschen bekannt, wobei hier zahlreiche verschiedene Mutationen des *FOXP3*-Gens beschrieben wurden, die zum Versagen der regulatorischen T-Zellen und letztlich zu einer tödlichen Autoimmunreaktion führen (28-30). Auch eine Depletion von Tregs mittels anti-CD25 Antikörpern (31) oder im DEREK-Mausmodell (*depletion of regulatory T cells*) (32) führt zu *scurfy*-ähnlichen Symptomen und unterstreicht die zentrale Rolle von regulatorischen T-Zellen bei der Unterdrückung unerwünschter (Auto-) Immunreaktionen (25). Obwohl Foxp3 für die Funktion und die Stabilität von Tregs essentiell ist, scheint Foxp3 nur bedingt an der Entwicklung von nTregs im Thymus beteiligt zu sein (33-35). Neben den sich im Thymus entwickelnden nTregs existieren auch induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs), die durch Konversion aus naiven konventionellen T-Zellen in der Peripherie gebildet werden können (36-39). Abhängig von Zytokinmilieu und der Qualität der TCR-Stimulation können sowohl Foxp3⁺ iTregs (sog. T_H3, in Gegenwart von TGF β) als auch Foxp3⁻ iTregs (sog. T_R1, in Gegenwart von IL-10) differenziert werden (40), die ähnliche funktionelle und phänotypische Eigenschaften aufweisen (36).

4.3.1. Natürliche regulatorische T-Zellen (nTregs)

Natürliche regulatorische T-Zellen entwickeln sich bereits im fötalen Thymus und machen in der Peripherie etwa 10-15% aller CD4⁺ T-Zellen aus (2, 24, 41). Dabei können Foxp3⁺ Zellen frühestens im CD4⁺CD8⁺ Stadium nachgewiesen werden. Die Mehrheit der nTregs wird aber wohl synchron zur Positivselektion im Übergang zu CD4⁺CD8⁻ Zellen generiert (41, 42). In experimentellen Ansätzen mit gestörter CD4⁺-Positivselektion konnten vermehrt CD8⁺Foxp3⁺ nTregs gebildet werden (43). Dies deutet darauf hin, dass die Konversion von Thymozyten zu nTregs erst nach der Festlegung der CD4- oder CD8-Linie stattfindet (42, 44). Wie aber die Differenzierung von Tregs im Thymus genau reguliert wird, konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Die Positivselektion der nTregs benötigt, vergleichbar der von konventionellen T-Zellen, eine intakte TCR-MHC Interaktion (42). Zusätzlich ist aber eine weitaus stärkere Kostimulation durch CD28 notwendig (45, 46). Dabei ist die Kostimulation – also neben der TCR-Stimulation (entspricht Signal 1) ein zusätzliches zweites Signal, welches die Aktivierung und Differenzierung steuert – von herausragender Bedeutung bei der Entwicklung, Homoöstate und Funktion von nTregs (47). Insbesondere die Mitglieder der CD28-Superfamilie CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 und deren Liganden aus der B7-Familie (CD80/86, B7-H3, PD-L1, PD-L2 sowie ICOSL), sind dabei wichtig (47-49). Daneben kann auch die Signaltransduktion durch die TNFR-Superfamilie (OX40, GITR, CD40L, 4-1BB) oder PRRs als Kostimulation angesehen werden (47). Dabei nehmen CD28 und CTLA-4 eine Schlüsselrolle ein, da beide um die gleichen B7-Liganden konkurrieren und sowohl für die Entwicklung als auch Suppressorfunktion von Tregs notwendig sind (50, 51).

Natürliche regulatorische T-Zellen exprimieren $\alpha\beta$ -Antigenrezeptoren (TCRs), die zwar ein vergleichbar großes TCR-Repertoire nutzen, sich aber in der Komposition der $\alpha\beta$ -Ketten deutlich unterscheiden (52-54). Die ungleiche Spezifität der Treg-Antigenrezeptoren deutet darauf hin, dass die Qualität der Stimulation die Differenzierungsrichtung bedingt. In transgenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Auto-Antigene zur verstärkten Selektion von Tregs führen (14, 15). Desweiteren scheinen Foxp3⁺ Zellen auch resistent gegenüber klonaler Deletion im Thymus zu sein (55, 56). Es ist aber wohl zu einfach anzunehmen, nTregs seien notwendigerweise „konvertierte“ autoreaktive T-Zellen. Entsprechende Befunde von transgenen Mäusen mit autoreaktiven nTregs (57) oder monoklonalen CD4⁺ T-Lymphozyten (58) zeigen, dass nTregs nicht zwangsläufig „mehr“ selbst-reaktiv sein müssen als konventionelle T-Zellen (44).

Unlängst wurde ein zweistufiger Prozess der nTreg-Entwicklung beschrieben. Eine Zwischenpopulation von CD25^{high}Foxp3⁻ Thymozyten, welche bereits (teilweise)

rekombinierte TCR-Sequenzen aufweisen, differenzieren im Thymus durch IL-2 zu „reifen“ Foxp3⁺ nTregs (59, 60). Möglicherweise kann IL-2 hierbei auch durch andere Zytokine, wie z.B. IL-7 oder IL-15, die ebenfalls den Jak/STAT Signalweg aktivieren, ersetzt werden (61). Im Gegensatz zur Differenzierung von Foxp3⁺ iTregs in der Peripherie scheint die Selektion von nTregs im Thymus unabhängig von TGFβ (*transforming growth factor β*) zu sein (44). Wie die Signale von Antigen-, Interleukin- und anderen Rezeptoren in der nTreg-Differenzierung verarbeitet werden, ist nur unzureichend geklärt. Allerdings konnte in zahlreichen Arbeiten der letzten beiden Jahre gezeigt werden, dass die Aktivität der NF-κB-Transkriptionsfaktoren, insbesondere von c-Rel, essentiell ist (62-64). So wurde in Mäusen mit einer konditionellen Deletion von Faktoren, die eine TCR-Stimulation mit dem NF-κB Signalweg verknüpfen, stark dezimierte Treg-Populationen beobachtet (65). Entsprechend sind die NF-κB-Signalmoleküle PKC-θ, Bcl-10, CARMA1 oder IKK2, insbesondere aber der NF-κB-Transkriptionsfaktor c-Rel, unverzichtbar für die Differenzierung von Tregs (64-69). Darüber hinaus ist auch die MAPK Kinase Kinase TAK1 (*TGFβ activated kinase 1*) entscheidend für die Entwicklung von Tregs im Thymus, indem sie wohl die Signale von Interleukinrezeptoren (wie von IL-2 oder IL-15) mit dem TCR Signal synchronisiert und integriert (70, 71). Andere Kinasen, wie Akt, scheinen dagegen einen negativen Einfluss auf die Differenzierung regulatorischer T-Zellen auszuüben. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass eine konstitutiv-aktive Akt-Variante mit der Treg-Entwicklung interferiert (72) oder eine Blockade des Akt-Signalweges durch Rapamycin einen positiven Effekt bewirkt (73, 74).

Die Rolle des Calcium-Signalweges nach TCR-Ligation ist ähnlich unzureichend verstanden. Zwar ist eine Funktion von Calcium unbestreitbar, jedoch scheint sich der davon kontrollierte Signalweg in nTregs von dem in konventionellen T-Zellen zu unterscheiden (75). Dabei zeigen regulatorische T-Lymphozyten die größere Abhängigkeit von Calcium-Signalen (76). Verschiedene Mausmodelle mit konditionellen Deletionen der für *calcium-signaling* verantwortlichen Komponenten belegen diese Theorie: Beispielsweise führt eine Mutation in LAT (*linker of activated T cells*), welches die Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER reguliert (77), oder die Deletion der beiden Calcium-Sensoren STIM1 und STIM2 (*stromal interaction molecule*) (75, 76) zum Verlust der Foxp3-Expression. Auch eine biochemische Blockade der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin durch Cyclosporin A (CsA) hemmt die Differenzierung von nTregs im Thymus (75, 78). Paradoxerweise zeigen Mäuse, die für zwei von drei in T-Zellen exprimierten Calcium/Calcineurin-abhängigen NFAT-Transkriptionsfaktoren (*nuclear factor of activated T cells*) defizient sind, keine dezimierten

oder funktionell beeinträchtigten nTregs (79). Dagegen verdichten sich die Befunde, dass der Calcium-Signalweg synergistisch eine Aktivierung von NF- κ B bewirken kann (80, 81) und dies möglicherweise verstärkt in Treg-Zellen stattfindet.

Natürliche regulatorische T-Zellen bilden allerdings keine homogene Zellpopulation, sondern bestehen vielmehr aus einer Vielzahl funktioneller und phänotypisch differenzierter Foxp3⁺ Zellen (44). Subtypen können anhand ihrer Oberflächenmoleküle oder Transkriptionsfaktoren unterschieden werden. Beispielsweise exprimieren 20-30% der Foxp3⁺ Zellen das Integrin $\alpha_E\beta_7$ (CD130), welches eine effektivere Migration in entzündete periphere Gewebe (z.B. in den Darm) ermöglicht (82, 83). In ähnlicher Weise können Chemokinrezeptoren, wie etwa CCR4, als Marker von Treg-Subtypen herangezogen werden (83). Hervorzuheben ist auch, dass sich nTregs im Gewebe in den zu supprimierenden Zellen transkriptionell „spiegeln“ und so eine angepasste Suppression entfalten können. Im Kontext einer T_H1- (84, 85) als auch T_H2-vermittelten Immunantwort konnte dies gezeigt werden (86). So exprimieren nTregs in einem „T_H2-Milieu“ den Transkriptionsfaktor IRF4 (*Interferon regulatory factor 4*), der in T_H2-Zellen für die Sekretion von IL-4, IL-10, IL-5 und IL-13 verantwortlich ist (87). Gleichzeitig befähigt IRF4 Tregs, die T_H2-Lymphokine IL-4 und IL-5 zu supprimieren (86). Analog konnten T-bet⁺, GATA3⁺, ROR γ t⁺ oder Blimp-1⁺ regulatorische T-Zellen, mit spezifischen funktionellen Eigenschaften, beobachtet werden (88, 89).

4.3.2. Induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs)

Neben den im Thymus generierten nTregs existieren in der Peripherie sog. induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs) (36, 37, 39, 40). Die Begriffe „natürlich“ und „induziert“ sind dabei insofern irreführend, da es sich bei den iTregs nicht um artifizielle, sondern um eine natürlich vorkommende T-Zellpopulation handelt. Die iTregs werden, im Gegensatz zu den nTregs, in der Peripherie durch Konversion von konventionellen naiven T-Zellen „induziert“ (39, 40). Grundsätzlich können hierbei Foxp3⁺ (auch T_H3-Zellen genannt) oder Foxp3⁻ iTregs (synonym zu T_R1) unterschieden werden: Eine Polarisation zu T_R1-Zellen geschieht unter Einfluss von IL-10, die Differenzierung zu Foxp3⁺ T_H3 regulatorischen T-Zellen ist abhängig von TGF β und IL-2 (36, 40). Entscheidend für die Bildung von iTregs ist eine suboptimale T-Zell-Aktivierung mit zwar starker TCR-Stimulation, aber gleichzeitigem Fehlen adäquater Kostimulation (90). Inhibitorische Signale hingegen scheinen essentiell für die Bildung von iTregs zu sein. Entsprechend können CTLA-4-defiziente (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) Mäuse keine Foxp3⁺ Zellen durch TGF β generieren (90, 91). Antigen-spezifische iTregs können folglich therapeutisch durch blockierende Antikörper

gegen die B7-Moleküle CD80/CD86 und CD28 oder den Korezeptor CD4 generiert werden (92-94).

Bemerkenswertweise werden unter dem Einfluss von TGF β nicht nur regulatorische, sondern auch verschiedene pro-inflammatorische T-Zelltypen differenziert (18, 95, 96). Insbesondere sind dabei T_H17-Zellen hervorzuheben, die bei der Immunantwort gegen Mikroorganismen gebildet werden, aber auch bei zahlreichen pathologischen (Auto-) Immunreaktionen auftreten (95, 97). Diese Diskrepanz unterstreicht die Bedeutung der Vernetzung mit zusätzlichen Signalen, wie etwa der Kostimulation oder des Lymphokin-Mikromilieus (16). Insbesondere durch IL-6 wird die Expression von Foxp3 zugunsten des Transkriptionsfaktors ROR γ t unterdrückt, der entscheidend für die Differenzierung von T_H17-Zellen ist (95, 98). Wie genau die Signale auf molekularer Ebene „verarbeitet“ werden, ist Gegenstand intensiver Forschung. IL-2/IL-15 und TGF β regulieren die Transkriptionsfaktoren STAT5 und verschiedene Smad-Proteine, während die TCR-Stimulation vorrangig NFAT aktiviert. Ohne entsprechende Kostimulation, die etwa AP-1 oder NF- κ B triggert, führt diese Transkriptionsfaktor-Kombination aus NFAT, Smads und STAT5 zur Induktion und dem Erhalt von Foxp3 und begünstigt die Bildung von iTregs (44, 62, 64, 99, 100). Durch IL-6 hingegen wird STAT3 aktiviert, das zusammen mit den Signalen einer Kostimulation die Expression von Foxp3 hemmt (95, 100). Das komplexe molekulare Zusammenspiel, das qualitativ und quantitativ über die verschiedenen Rezeptoren initiiert wird, reguliert somit die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen T-Zellen (siehe auch Punkt 4.6.1).

4.3.3. Immun-Regulation durch Tregs

Natürliche und induzierte regulatorische T-Zellen sind Teil der peripheren Toleranz und „regulieren“ die Immunantwort. Dies geschieht meist durch Suppression von Zellen des Immunsystems, um Autoimmunreaktionen zu vermeiden und (überschießende) Immunantworten zu limitieren. Grundsätzlich können dabei vier Suppressionsmechanismen unterschieden werden (schematisch dargestellt in Abb. 4.2) (101-103).

Bei der Immunmodulation durch inhibitorische Interleukine und andere lösliche Mediatoren spielen IL-10 (104, 105) und TGF β (106, 107) eine zentrale Rolle. Darüber hinaus wurden auch IL-35 (34, 108) und sezernierte Galektine (109, 110) als immun-suppressive Moleküle beschrieben. Die Funktion löslicher Stoffe wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert, da *in vitro* Experimente diese Zellkontakt-unabhängige Immunsuppression nur eingeschränkt bestätigten (111). Demgegenüber stehen jedoch

zahlreiche *in vivo* Versuche, die eine klare Funktion der inhibitorischen Interleukine zeigen konnten (102, 104, 105). Diese Diskrepanz ist wohl teilweise auf die Tatsache zurückzuführen, dass einige dieser Moleküle auch als membranständige Formen exprimiert werden und nur durch direkten Zell-Zell-Kontakt wirken können. Dementsprechend steuern beispielsweise LAP-TGF β 1 (*latent TGF β*) oder Galektin-1 vornehmlich als membran-gebundene Moleküle die Immunantwort (109, 112, 113). Die Wirkungsweise dieser sezernierten oder membranständigen Stoffe ist äußerst facettenreich und kann auf viele verschiedene Zelltypen einwirken. Beispielsweise können durch IL-10 oder TGF β konventionelle T-Zellen zu iTregs konvertiert werden. Dieser Mechanismus wird als *infectious tolerance* bezeichnet (36, 40, 102). Auch hemmen diese Interleukine die Reifung von dendritischen Zellen und regulieren so die Präsentation von MHC-Molekülen und/oder Korezeptoren, die wiederum für eine vollständige T-Zell-Aktivierung notwendig sind (114, 115).

Ein zweiter Mechanismus der Immunsuppression durch Tregs wird durch gezielte Zytolyse gewährleistet. Ähnlich den NK(T) Zellen und den CD8⁺ CTLs exprimieren regulatorische T-Zellen Granzyme und Perforine und zeigen eine vergleichbare Zytotoxizität (116, 117). Dabei werden von Tregs Perforine ausgeschüttet und permeabilisieren die Zellmembran von Zielzellen für zytotoxische Stoffe, wie etwa für Granzym-Proteasen (101, 102, 116, 118). Daneben wurden auch Granzym-vermittelte, aber Perforin-unabhängige Suppressionsmechanismen beschrieben (119). Ein weiterer Mechanismus der Zytolyse durch Tregs ist die Induktion von Apoptose in Zielzellen, beispielsweise durch den TRAIL-DR5 (*TNF-related apoptosis-induced ligand-death receptor 5*) Signalweg (120). Auch durch Galektin-1, das vorrangig von regulatorischen T-Zellen produziert wird, kann ein gezielter Zelltod in konventionellen T-Zellen initiiert werden (101, 109).

Eine weitere Möglichkeit der Suppression ist durch Interferenz mit dem Metabolismus der Zielzellen (*metabolic disruption*) gekennzeichnet (101). Ein seit langem diskutierter Mechanismus mag die sogenannte IL-2-Falle (*IL-2 sink*) sein (121-123): Regulatorische T-Zellen exprimieren konstitutiv die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25), was ihre hohe Abhängigkeit von IL-2 anzeigt und einen „Konsum“ von lokalem IL-2 ermöglicht. IL-2 wird nur von konventionellen T-Zellen sezerniert und dient daher sowohl auto- als auch parakrin (für Tregs) als Wachstumsfaktor. Der Entzug von IL-2, wie er auch durch eine größere Anzahl an Tregs vorstellbar ist, führt zu einem Zellzyklusarrest und langfristig zur Apoptose von Effektor-T-Zellen (121-124). Inwiefern dieser Mechanismus aber tatsächlich zur Immunsuppression beiträgt, bleibt umstritten (125).

Zwei weitere Strategien von regulatorischen Zellen, andere Zellen zu inhibieren, werden durch den *second messenger* Botenstoff cAMP gekennzeichnet (zu Details siehe Punkt 4.7.2.). Zum Einen weisen Tregs einen massiv erhöhten Gehalt an intrazellulärem cAMP auf (126). Die erhöhten cAMP-Level in Tregs werden dabei durch die Suppression des cAMP-abbauenden Enzyms Phosphodiesterase 3b (PDE3b) durch Foxp3 aufrechterhalten (34, 127). cAMP wird von den Tregs über *gap junctions* direkt in andere (cAMP-arme) Zellen „gepumpt“, was eine Suppression der Proliferation und IL-2 Synthese bewirkt (126, 127). Zum Anderen exprimieren nTregs die beiden Ektoenzyme CD39 (eine ATPase/ADPase) und CD73 (eine 5'-Ektonukleosidase) auf der Zelloberfläche, die extrazelluläres ATP/ADP zu Adenosin hydrolysieren (128, 129). Adenosin bindet an G-Protein-gekoppelte A2A-Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen und bewirkt über eine Erhöhung von intrazellulärem cAMP eine Immunsuppression (130-132). Weitere Zellkontakt-abhängige Mechanismen, wie etwa die CTLA-4/B7 Interaktion oder eine LAP-TGF β - und Galektin-vermittelte Kommunikation, scheinen ebenfalls mit dem Metabolismus der Zielzellen zu interferieren (93, 109, 110, 113, 115).

Ein vierter zentraler Mechanismus der Treg-vermittelten Immunsuppression betrifft die Wechselwirkung mit dendritischen Zellen (DCs) (101, 102). Dendritische Zellen durchlaufen komplexe Reifungsstadien, die ihre tolerogenen oder inflammatorischen Eigenschaften festlegen (siehe auch Punkt 4.4). Regulatorische T-Zellen können auf verschiedene Arten diese Reifung von DCs beeinflussen (133-141). Neben immunsuppressiven Interleukinen (104, 105) und TGF β (106, 107) spielen dabei insbesondere Zellkontakt-abhängige Mechanismen eine entscheidende Rolle (133, 139). Gegenstand intensiver Forschungsarbeit ist insbesondere CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), welches mit den B7 Molekülen CD80/CD86 auf DCs interagiert und deren Expression hemmt (114, 142). Auf welche molekulare Weise dies genau erreicht wird ist (noch) ungeklärt. Eine Möglichkeit stellt die Trogozytose (auch Trans-Endozytose) dar. Lymphozyten „entreißen“ dabei Oberflächenproteine durch Ausbildung einer immunologischen Synapse von dendritischen Zellen (143, 144). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in DCs durch CTLA-4 die Expression von Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) induziert wird (133, 134). Dieses Enzym katalysiert die Bildung eines Tryptophan-Abbauproduktes (Kynurenin), das eine suppressive und pro-apoptische Wirkung auf Zellen des Immunsystems aufweist (133, 134). Zusätzlich können Tregs die Reifung von DCs durch das CD4-Homolog LAG3 (*lymphocyte activation gene 3*) beeinflussen. LAG-3 ist verstärkt auf regulatorischen T-Zellen exprimiert und kann mit hoher Affinität MHC II Moleküle binden (138-140). Dabei wird durch die

LAG3-MHC-Interaktion in DCs eine negative Signalkaskade induziert, das eine vollständige Reifung blockiert und die kostimulatorischen Eigenschaften von DCs minimiert (139, 141). Wahrscheinlich können auch aktivierte (humane) Effektor-T-Zellen, welche MHC II exprimieren, direkt durch LAG3 supprimiert werden (145). Daneben ist Neuophilin-1 verstärkt auf Tregs zu finden und befähigt diese, bevorzugt mit dendritischen Zellen zu interagieren (und zu supprimieren) (146, 147). Es kommt dementsprechend zu einer Konkurrenz-Situation mit konventionellen T-Zellen, da das Verhältnis zwischen regulatorischen und konventionellen T-Zellen etwa 1 : 8, das zwischen Tregs und DCs aber nur 1 : 0.8 beträgt (101). Die Strategie, insbesondere dendritische Zellen zu hemmen, scheint also weitaus effizienter und nachhaltiger zu wirken als die Hemmung über direkten T-Zell-Interaktionen (147, 148).

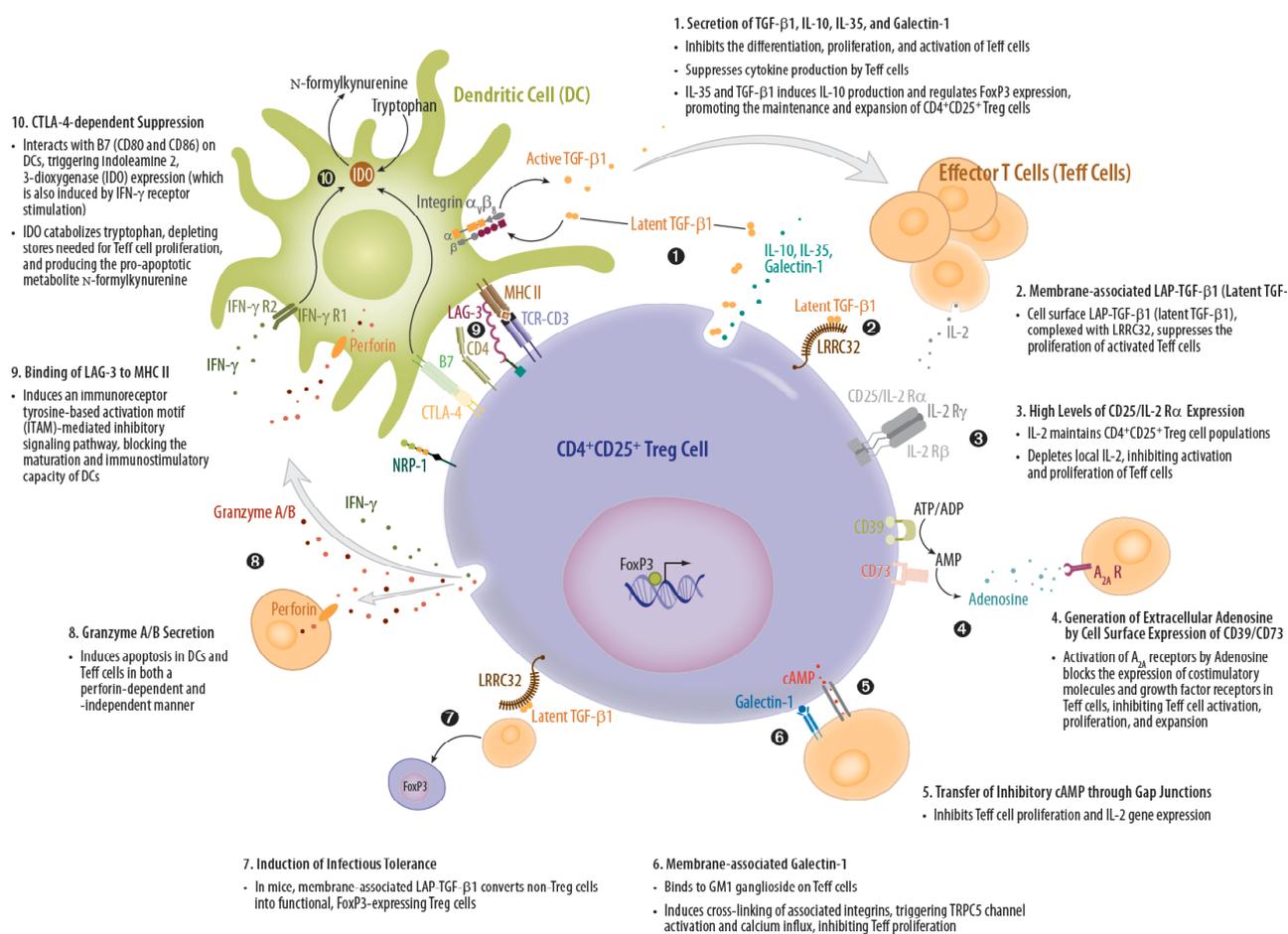


Abb. 4.2. Mechanismen der Immunmodulation durch regulatorische T-Zellen. Die Suppression von Immunzellen durch Tregs kann grundsätzlich in vier Mechanismen erfolgen: Hemmung durch immunsuppressive Interleukine und andere lösliche Botenstoffe (Punkte 1, 2 und 7), Elimination von (auto-) reaktiven Zellen durch gezielte Zytolyse (Punkt 8), Interferenz mit dem Metabolismus der Zielzellen (*metabolic disruption*, Punkte 3, 4, 5 und 6) und Wechselwirkung mit dendritischen Zellen (Punkte 9 und 10). Modifiziert nach R&D Systems; Broschüre zu regulatorischen T-Zellen.

4.4. Dendritische Zellen (DCs)

Dendritische Zellen (*dendritic cells*; DCs) sind Teil des angeborenen Immunsystems und zählen mit den Makrophagen und den B-Zellen zu den (professionellen) APCs (*antigen presenting cells*). Myeloide hämatopoetische Stammzellen differenzieren im Knochenmark unter dem Einfluss von GM-CSF (*granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*) zu Monozyten und/oder unreifen (*immature*) DCs heran, die über den Blutstrom das periphere Gewebe erreichen. Unreife dendritische Zellen zeichnen sich durch eine hohe Phagozytose-Aktivität, geringe Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen und geringer Sekretion von Interleukinen aus. Kommen unreife DCs mit Mikroorganismen in Kontakt, können sie diese durch Keimbahn-kodierte Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) erkennen. Dabei werden spezifisch körperfremde Strukturen auf Pathogenen (*pathogen-associated molecular Patterns*, PAMPs) identifiziert. Dieses „Erkennen“ führt zur Endozytose der Antigene und zum Ausreifen der dendritischen Zellen. Dabei werden die phagozytierten Proteine lysosomal degradiert und die daraus resultierenden Peptide über MHC II-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert. Außerdem wird die Expression der B7-Moleküle CD80/CD86 sowie CD40 hochreguliert. Je nach Antigenqualität sind DCs auch in der Lage, pro- und anti-inflammatorische Interleukine zu sezernieren. Aktivierte DCs migrieren anschließend in die afferenten Lymphknoten und initiieren dort eine starke T-Zell-Antwort. Obwohl alle DCs durch eine gemeinsame biologische Funktion charakterisiert sind, handelt es sich um eine äußerst heterogene Population von Leukozyten: Myeloide (mDCs) und plasmazytoide (pDCs) DCs sowie viele weniger gut definierte dendritische Zelltypen lassen sich funktionell und phänotypisch voneinander unterscheiden. Eine T-Zell-Antwort wird insbesondere durch die komplexen Reifungsstadien der verschiedenen DCs beeinflusst. Die Präsentation eines Peptids über MHC-Moleküle ist unabdingbar für eine T-Zell-Aktivierung (MHC-Restriktion). Kostimulation und Interleukine regulieren zusätzlich die Stärke und Qualität der Immunreaktion. Entsprechend nehmen DCs eine zentrale Rolle in peripheren Toleranzmechanismen ein, da sie sowohl tolerogene (unreife DCs) als auch inflammatorische Eigenschaften (aktivierte/reife DCs) aufweisen.

Die Aktivierung und somit ein vollständiges Ausreifen von DCs wird insbesondere über die PRRs erreicht. Dazu zählen neben den *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) auch die Typ C Lektine, wie Dectin-1 (7). Beide Gruppen von Rezeptoren erkennen konservierte und überlebensnotwendige Strukturen von Mikroorganismen (PAMPs), beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) und β -Glucanverbindungen der Zellwand oder Virus-typische Nukleinsäuremotive. Der genaue molekulare Mechanismus der Signaltransduktion,

ausgehend von diesen Rezeptoren, ist allerdings noch nicht endgültig aufgeklärt. Neben den gut charakterisierten „klassischen“ NF- κ B und AP-1 sowie den *interferon-regulating factors* (IRFs) wurden unlängst auch Calcium-abhängige Signalwege beschrieben (149-154). Die Ligation von Dectin-1 mit Zymosan oder eine CD14/TLR4 Stimulation durch LPS scheinen eine Calciumfreisetzung in DCs zu bewirken (150, 151, 154, 155). Darüber hinaus wurden auch oszillierende Calciumströme in unreifen DCs beschrieben, die allerdings nach einer Aktivierung der Zellen zusammenbrechen (156). In diesem Zusammenhang wurde eine Rolle von NFAT-Transkriptionsfaktoren, die durch die Calcium-sensitive Phosphatase Calcineurin reguliert werden, vorgeschlagen (150, 151). Eine genaue Analyse der verschiedenen NFAT-Faktoren und Isoformen bei der Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen bleibt jedoch abzuwarten.

4.5. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)

4.5.1. Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren

Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) wurde erstmals im Jahre 1988 als TCR-induzierbarer Faktor, der an der Regulation des IL-2 Promotors beteiligt ist, beschrieben (157-159). Inzwischen ist bekannt, dass die NFAT-Proteine eine eigene Familie von Transkriptionsfaktoren darstellen, die aus fünf Mitgliedern bestehen: aus NFATc1 (auch NFAT2 oder NFATc), NFATc2 (NFAT1 oder NFATp), NFATc3 (NFAT4 oder NFATx), NFATc4 (NFAT3) und dem „untypischen“ NFAT5 (auch *tonicity element binding protein*, TonEBP genannt) (siehe Abb. 4.3) (3, 4, 29, 75, 158, 160, 161). Darüber hinaus wurde klar, dass NFAT nicht nur in Lymphozyten, sondern auch in den unterschiedlichsten Zell- und Gewebearten exprimiert wird und an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt ist (3, 162-168). NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4 werden über Calcium/Calcineurin-Signale reguliert, während das evolutionär älteste Mitglied NFAT5 durch osmotischen Stress aktiviert wird (157, 158, 169).

Allen NFAT-Faktoren ist eine hoch-konservierte DNA-bindende Domäne gemeinsam, welche aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den Rel-Proteinen als *Rel similarity domain* (RSD) bezeichnet wird (157, 158, 162). Obwohl zwischen den Rel-Domänen und der RSD weniger als 20% Sequenzhomologie herrscht, zeigt sich eine große Übereinstimmung in der dreidimensionalen Struktur: Beide zeichnen sich durch zehn β -Faltblattstrukturen und zwei konservierte Schleifen aus, die für die Interaktion mit der DNA und anderen Transkriptionsfaktoren notwendig sind (170, 171). N-terminal der RSD ist in NFATc1 bis NFATc4, nicht aber in NFAT5, eine (schwach) konservierte Regulationsdomäne (*NFAT*

NFATc1/A, NFATc1/B und NFATc1/C (174, 177, 178). In aktivierten Lymphozyten wird das α -Peptid vorrangig mit der kurzen Isoform A exprimiert (NFATc1/ α A), während die β -Isoformen konstitutiv mit den beiden längeren C-Termini (NFATc1/B und NFATc1/C) translatiert werden (siehe dazu Punkt 4.5.3) (174, 177-181).

4.5.2. Signaltransduktion durch NFAT

Alle NFATc-Familienmitglieder werden durch den Calcium/Calcineurin-Signalweg reguliert (160, 173, 182, 183). In ruhenden Zellen liegen die NFATc-Proteine phosphoryliert im Zytoplasma vor. Rezeptoren, die eine Calcium-Freisetzung in der Zelle bewirken, können die NFAT-Transkriptionsfaktoren aktivieren (183). Dies sind beispielsweise Antigenrezeptoren von B- und T-Lymphozyten (173, 180) oder Fc-Rezeptoren von Mastzellen, Monozyten und NK-Zellen (184). Unlängst wurde für den C-Typ Lektin Rezeptor Dectin-1, welcher auf vielen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird, eine ähnliche Eigenschaft, intrazellulär Calcium freizusetzen, beschrieben (154).

Nach Ligation des Rezeptors erfolgt eine Phosphorylierungskaskade über mehrere Kinasen und Adaptermoleküle (beispielsweise Lck, Fyn, ZAP-70 und LAT in T-Lymphozyten), die schließlich zur Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) führt (162, 163). Die aktivierte PLC γ hydrolysiert das membranständige Phospholipid Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P $_2$) zu Inositol-1,4,5-Triphosphat (InsP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). Freigesetztes DAG reguliert die Mitglieder der Proteinkinase C (PKC)-Familie und den RAS-MAPK Signalweg. InsP $_3$ bindet an die entsprechenden Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER), die einen raschen Calcium-Ausstrom ins Zytoplasma bewirken (siehe Abb. 4.4) (160, 163, 182). Dieser transiente Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration reguliert wiederum die CRAC-Kanäle (*calcium release-activated calcium channel*) der Zellmembran. Dieser Vorgang wird als *store operated calcium entry* (SOCE) bezeichnet (183). Dieser zweite (und wesentlich stärkere) extrazelluläre Calcium-Einstrom durch die CRAC-Kanäle ist entscheidend für eine optimale NFATc-Aktivierung (185). Die beiden Calcium-Sensoren des endoplasmatischen Retikulums, STIM1 und STIM2 (*stromal interaction molecules*), reagieren auf die Calcium-Freisetzung durch Bildung von hochmolekularen Komplexen („punctae“) und regulieren daraufhin die Oligomerisierung und Funktion der CRAC-Kanäle (169, 183, 185). Obwohl der genaue Mechanismus dieser „molekularen Kommunikation“ noch unbekannt ist, weiss man, dass insbesondere die CRAC-Untereinheit Orai1 durch STIMs reguliert wird (183, 185, 186). Freies Calcium bindet an das kleine Calcium-bindende Protein Calmodulin, das daraufhin an die große Untereinheit A von

Calcineurin (CnA) bindet und die Phosphatase-Aktivität reguliert (169). Calcineurin setzt sich aus zwei Untereinheiten, einer katalytischen (CnA) und einer regulatorischen (CnB), zusammen, welche gewebsspezifisch in unterschiedlichen Isoformen vorkommen. In lymphoiden Zellen werden vorrangig die Isoformen CnA β und CnB1 exprimiert (187-189). Die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin wird durch das C-terminale Peptid – eine selbst-hemmende Domäne – der CnA-Untereinheit kontrolliert (190). Die regulatorische Untereinheit CnB dient als Calcium-Sensor und katalysiert die Interaktion mit Calmodulin (190). Calmodulin verdrängt die selbst-hemmende C-terminale Domäne von CnA, die das katalytische Zentrum von Calcineurin blockiert, und ermöglicht eine enzymatisch-aktive Konformation (190, 191).

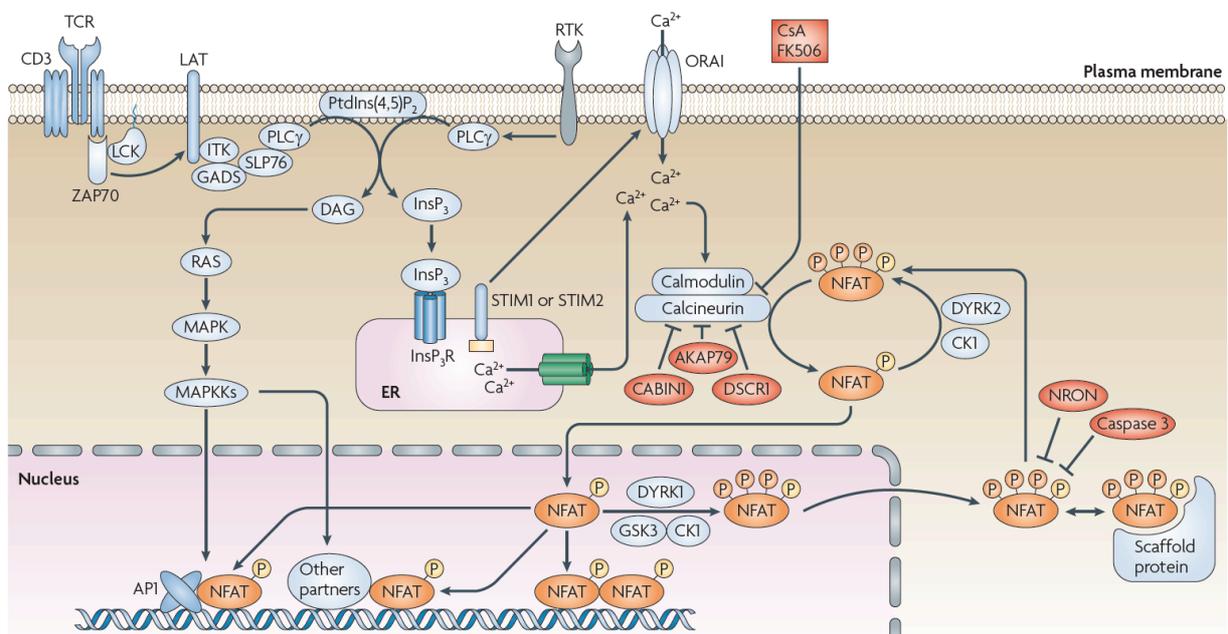


Abb. 4.4. Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch NFAT. Ausgehend von einer Rezeptor-vermittelten Phosphorylierungskaskade wird PLC γ aktiviert, das PtdIns(4,5)P $_2$ zu DAG und InsP $_3$ hydrolysiert. Bindung von InsP $_3$ an die Rezeptoren des ER bewirkt einen transienten Calcium-Ausstrom, wodurch die STIM-Proteine aktiviert werden. Diese assoziieren in „punctae“, die anschließend mit den ORAI-Proteinen der CRAC-Kanäle interagieren. Dies erzeugt einen *store operated calcium entry* (SOCE) über die CRAC-Kanäle. Freies intrazelluläres Calcium bindet an Calmodulin, das wiederum die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Durch Dephosphorylierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren wird deren NLS zugänglich, notwendig für den Kerntransport. Modifiziert nach Müller und Rao, 2010 (3).

Die Dephosphorylierung der NFATc-Transkriptionsfaktoren setzt eine direkte Interaktion mit Calcineurin voraus. Die Calcineurin-Erkennungssequenz PxIxIT (wobei x für eine beliebige Aminosäure steht) ist in der NFATc-Regulationsdomäne (NHD) konserviert (4, 151). Das Entfernen der zahlreichen Phosphatgruppen an Serin- oder Threoninresten in der NHD bewirkt eine Konformationsänderung und macht ein Kernlokalisierungssignal (NLS)

zugänglich, das entscheidend für den Transport der Transkriptionsfaktoren in den Nukleus ist (3, 162, 173-176). Die in der Transplantationsmedizin eingesetzten Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) binden an (verschiedene) zelluläre Immunophilinen, die daraufhin Calcineurin komplexieren und dessen Phosphatase-Aktivität blockieren (192). Dadurch wird die Calcineurin-vermittelte NFATc-Kerntranslokation und – damit einhergehend – eine Aktivierung der Lymphozyten vollständig verhindert (160, 182, 190). Auch der Einsatz eines experimentellen hoch-affinen Peptids (VIVIT), welches sequenzspezifisch mit NFAT um die Bindung an Calcineurin konkurriert, hemmt kompetitiv die NFAT-Dephosphorylierung (193, 194).

Die Gegenregulation durch (Re-) Phosphorylierung der NFAT-Proteine wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Kinasen gewährleistet, wie durch Glykogen-Synthase Kinase 3 (GSK3 β), Casein Kinase 1 (CK1), p38, DYRKs (*dual-specificity tyrosin phosphorylation-regulated kinases*) und die Jun N-terminale Kinase (JNK) (173, 195, 196). Die Kinasen können grundsätzlich in Export- und Erhaltungskinasen eingeteilt werden, die entweder für das Ausschleusen aus dem Zellkern oder für die Aufrechterhaltung des (hyper-) phosphorylierten Zustands von NFAT im Zytoplasma verantwortlich sind (183, 195-198). GSK3 β und CK1 können als Exportkinasen angesehen werden, die allerdings für die Interaktion mit NFAT eine Vor-Phosphorylierung benötigen (3, 183, 198). Dieses sog. *priming* wird durch spezielle Kinasen (wie z.B. PKA oder verschiedene DYRKs), die entweder SP- (Ser-Pro-X-X) oder SRR-Motive (*serin rich region*) in NFAT phosphorylieren, gewährleistet (3, 183, 198). Das Zusammenspiel der Calcineurin-Aktivität mit den Export- und der Erhaltungskinasen gewährleistet somit eine präzise subzelluläre Lokalisation der NFAT-Proteine.

4.5.3. Autoregulation und NFATc1/ α A

Ein Mitglied der NFAT-Faktoren sticht durch einige Besonderheiten aus der NFAT-Familie hervor. Und zwar NFATc1, dessen Expression durch zwei Promotoren, alternatives *splicen* und verschiedenen Polyadenylierungs-Mustern reguliert wird und dadurch die Expression von (mindestens) sechs verschiedenen Isoformen ermöglicht (177, 179, 199). Außerdem wurde für die kürzeste Isoform NFATc1/ α A eine positive Autoregulation beschrieben, die zu hohen NFATc1-Konzentrationen in aktivierten Lymphozyten führt (174, 181). Der vor dem Exon 1 gelegene Promotor „P1“ zeichnet sich durch eine starke Induzierbarkeit aus, der (im Intron) vor dem Exon 2 organisierte „P2“ Promotor hingegen zeigt eine eher konstitutive Aktivität (174, 178, 181). P1-exprimiertes NFATc1 enthält das von Exon 1 kodierte α -Peptid von 42 Aminosäuren (AS) Länge, die P2- exprimierten Proteine weisen hingegen das von Exon 2

kodierte β -Peptid (von 29 AS) auf. Welche Funktion die beiden N-terminalen Peptide genau erfüllen, ist noch nicht bekannt, jedoch lassen sich diverse Motive für Proteinmodifikationen im α -Peptid vorhersagen (181). Auch die Länge des C-Terminus ist durch alternatives *splicen* und zwei unterschiedliche Polyadenylierungsstellen (pA1 und pA2) sehr variabel und erlaubt die Expression von drei (C-terminalen) Isoformen: NFATc1/A (716 AS), NFATc1/B (825 AS) und NFATc1/C (930 AS) (174, 177, 178). Die längste Isoform NFATc1/C enthält im C-Terminus eine zusätzliche (schwache) Transaktivierungsdomäne, sowie zwei SUMOylierungsstellen (179, 200). SUMO-Modifikation von NFATc1/C bestimmt dessen subnukleäre Lokalisation und kann Histon-Deacetylasen (HDACs) rekrutieren, die ursächlich für ein „Abschalten“ der Transkription des *Il2*-Gens verantwortlich sind (179). Ein gegensätzlicher Effekt der kurzen (NFATc1/A) und der langen Isoform (NFATc1/C) hinsichtlich der Regulation des *activation induced cell death* (AICD) untermauert die Annahme, dass der C-Terminus für ein „*finetuning*“ der NFATc1-Aktivität notwendig ist (174, 181).

Der induzierbare P1 Promotor von *Nfatc1* wird über mehrere Signale reguliert, benötigt aber mindestens ein starkes Calcium-Signal und eine Kostimulation, beispielsweise durch CD28, welches PKC und/oder MAP-Kinasen aktiviert (174, 181). Paradoxe Weise lässt sich in Tumorzelllinien (z.B. EL-4 Zellen) ein P1-Reportergenkonstrukt durch cAMP (massiv) induzieren, in primären T-Lymphozyten hingegen bewirkt eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung einen suppressiven Effekt auf die P1-Aktivität. Die Diskrepanz hinsichtlich der cAMP-Wirkung scheint durch zwei CRE- (*cAMP responsive element*) Motive vermittelt zu werden, die möglicherweise durch Bindung von CREM, CREB, ATF-2 oder ICER unterschiedlich reguliert werden können (siehe auch Punkt 4.7) (174, 201). Es finden sich zwei NFAT-Bindungsmotive (TGGAAA) im *Nfatc1* P1 Promotor, wobei ein distales (Position -800) und ein proximales (Position-240) Element identifiziert wurden (174, 181). Interessanterweise befinden sich in beiden Motiven keine TRE- (*TPA-responsive element*) Sequenzen, die eine Bindung von AP-1 und „klassischen“ NFAT/AP-1 Komplexen ermöglichen würden. Ausgehend von der Tatsache, dass es sich um eine doppelte NFAT-Bindungsstelle handelt, die als *tandem-repeat* beschrieben wurde, bindet NFAT möglicherweise als Homodimer wie in den Promotoren der E3-Ligasen Cbl-b, Itch und Grail und wahrscheinlich nicht als heteromeres Komplex mit AP-1-Faktoren (181, 202-204). Für das distale Element konnte gezeigt werden, dass sowohl NFATc1 als auch NFATc2 binden, jedoch ist die Induktion von NFATc1/ α A in T-Zellen von *Nfatc2*^{-/-}*Nfatc3*^{-/-} defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt (174, 181). Mutationen, welche eine NFAT-Bindung an diese

Elemente unterbinden, zeigen *in vitro* eine deutliche Abnahme der P1-Aktivität (174, 181). Daraus lässt sich ableiten, dass die Aktivität des P1 Promotors vorrangig von NFATc1 (auto-) reguliert wird (181). Die Aktivierung von T-Zellen resultiert in einer 15-20fachen Induktion der kurzen Isoform NFATc1/ α A, während die längeren Transkripte von NFATc1/ α B und NFATc1/ α C dagegen nur um das 2-5fache erhöht werden (174, 178, 181). Dies wird durch die Tatsache erklärt, dass viele Polyadenylierungs-Faktoren erst nach Aktivierung von Lymphozyten exprimiert werden und die proximale Polyadenylierungssequenz pA1 „überlesen“ wird. Durch Stimulation werden diese Faktoren generiert und die Expression von NFATc1 wird an pA1 durch Hinzufügen der polyA-Sequenz „gestoppt“, und dementsprechend wird hauptsächlich NFATc1/ α A exprimiert (174, 178, 181). Die positive Autoregulation von NFATc1/ α A hat Auswirkungen auf zahlreiche biologische Prozessen und vermag eine terminale Zelldifferenzierung zu entscheiden. Letzteres konnte am Beispiel von RANKL-induzierten Osteoklasten überzeugend gezeigt werden (205). In Lymphozyten ist diese Autoamplifikation von NFATc1 kennzeichnend für aktivierte Effektor-T-Zellen (158, 176, 180). Im Gegensatz dazu zeigen CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen diese Autoregulation nicht (42, 179, 206).

4.6. *Forkhead box protein 3 (Foxp3)*

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 (*winged helix/forkhead box protein 3*) gehört zu der umfangreichen Familie der *forkhead*-Proteine, die eine Vielzahl von unterschiedlichen biologischen Prozessen steuern (207). Der Name dieser Faktoren leitet sich vom *forkhead*-Genprodukt (*fkh*) der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ab, wobei *fkh* in *Drosophila* die terminale Musterausbildung während der Embryonalentwicklung reguliert (208, 209). In Säugern sind bisher etwa 35 *forkhead*-Faktoren identifiziert worden (210). Allen gemeinsam ist eine schmetterlingsartige zweiflügelige Struktur, die als *winged helix* bezeichnet wird (211, 212). Foxp3 gehört zu der Subgruppe „P“ der *forkhead*-Proteine, bestehend aus Foxp1 bis Foxp4. Obwohl alle vier Foxp-Transkriptionsfaktoren einen hoch-konservierten C-Terminus mit einem Zinkfingermotiv und einer *leucine zipper* Domäne aufweisen, unterscheidet sich Foxp3 von den anderen Familienmitgliedern durch einen untypischen Prolin-reichen N-Terminus (213, 214). Foxp3 zeigt zwischen Maus, Ratte und Mensch etwa 86% Sequenzhomologie. In Maus und Ratte wird nur eine Isoform exprimiert, während in humanen Zellen drei Foxp3-Varianten nachgewiesen werden können (Foxp3a und Foxp3b [entspricht Foxp3 Δ Exon2] sowie Foxp3 Δ Exon2 Δ Exon7) (215, 216). Eine essentielle Funktion von Foxp3

im Immunsystem wurde bei der Analyse der sog. *scurfy*-Maus beschrieben. Davon abgeleitet wird der Name *Scurfin* synonym zu Foxp3 gebraucht (28). Die natürlich vorkommende Mutation im *Foxp3*-Gen, verantwortlich für den *scurfy*-Phänotyp, führt zum totalen Verlust von (funktionellen) regulatorischen T-Zellen, vergleichbar mit den tödlich verlaufenden humanen Autoimmunkrankheiten IPEX und XLAAD (siehe auch Punkt 4.3) (26, 28, 29). Hervorzuheben ist, dass in murinen T-Zellen Foxp3 ausschließlich in natürlichen und induzierten regulatorischen T-Zellen, in humanen konventionellen T-Zellen aber zusätzlich nach Aktivierung exprimiert wird (217). Welche Rolle Foxp3 in (humanen) aktivierten Effektor-T-Zellen erfüllt, ist aber ungewiss. Foxp3 wird von 11 Exons kodiert, wobei der Zinkfinger von den Exons 5 und 6, die *leucine zipper* Domäne durch einen Teil des Exons 6, hauptsächlich aber durch Exon 7, und die *forkhead*-Domäne von den Exons 9, 10 und 11 kodiert wird (2, 218). Die C-terminale *forkhead*-Domäne ist entscheidend für die DNA-Bindung, der *leucine zipper* und das Zinkfingermotiv sind für Homo- oder Heterodimerisierung von Foxp3 notwendig (siehe Abb. 4.5) (214, 218, 219). Obwohl (*nonsense* und *missense*) IPEX-Mutationen von *Foxp3* in nahezu allen Bereichen des Gens auftreten, ist in den meisten Fällen die *forkhead*-Domäne und demzufolge die DNA-Bindung beeinträchtigt (220, 221).

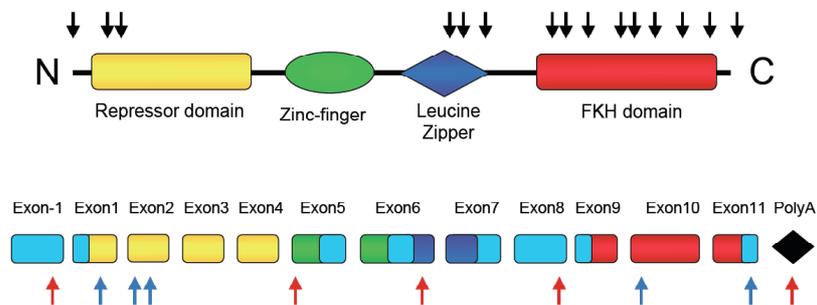


Abb. 4.5. Genetische Organisation und Proteinstruktur von Foxp3. Das *Foxp3*-Gen ist in 11 Exons gegliedert. Das Foxp3-Protein enthält vier funktionelle Domänen: Eine Prolin-reiche N-terminale Repressordomäne, ein Zinkfingermotiv, einen *leucine zipper* und die namensgebende *forkhead* Domäne. *Missense*-Mutationen sind mit schwarzen Pfeilen, Mutationen, welche die mRNA-Stabilität betreffen, mit roten und Mutationen, die zur Leserasterverschiebungen führen, mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. Verändert nach SF Ziegler, 2006 (2).

Durch Foxp3 werden in T-Zellen ca. 700 Gene reguliert, wobei allerdings in etwa 10-20% der Gene eine direkte Bindung von Foxp3 an die entsprechenden DNA-Elemente nachgewiesen wurde (222-224). Vorrangig wirkt Foxp3 als transkriptioneller Repressor, beispielsweise abzulesen an *Il2*, *Il4*, *Ifng*, *Nfatc1* und *Pde3b*, gleichwohl gibt es aber auch Gene, wie etwa *Cd25*, *Ctla-4* und *Tnfrsf18*, die positiv reguliert werden (33, 222-224). Die repressive

Eigenschaft von Foxp3 wird durch die Fähigkeit, Histon-Deacetylasen (HDACs) zu rekrutieren, verständlich (213, 225). Neben der Interaktion mit HDAC7 und HDAC9, welche mit der N-terminalen Repressordomäne von Foxp3 wechselwirken, wurde aber auch eine Interaktion mit der Histon-Acetylase (HAT) Tip60 nachgewiesen (214, 225). Dieser hochmolekulare Foxp3/HAT/HDAC-Komplex reguliert die Genexpression höchstwahrscheinlich über die Zugänglichkeit der DNA für Faktoren der Transkriptionsmaschinerie, also über ein „Öffnen“ und „Schließen“ des Chromatins (213, 214, 219). Weiter wird die Funktion von Foxp3 durch ein Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren determiniert. Eine direkte Interaktion wurde etwa mit NFAT, verschiedenen NF- κ B Proteinen und Runx1/AML1 (*runt-related transcription factor1/acute myeloid leukemia1*) beschrieben (218, 219, 226-228). Bemerkenswerterweise scheinen alle diese Faktoren auch an der Regulation der Foxp3-Expression selbst beteiligt zu sein (siehe dazu auch Punkt 4.7.1) (229, 230). Die transkriptionelle Regulation des *Il2* Promotors gilt dabei als Paradigma für die Repression durch Foxp3. In konventionellen aktivierten T-Zellen wird *Il2*, neben NF- κ B, insbesondere durch NFAT und AP1 reguliert, wobei der „klassische“ NFAT/AP-1 Komplex ausgebildet wird (170). Foxp3 vermag mit der Bindung von Jun und Fos (AP-1) an NFAT zu konkurrieren, so dass ein repressiver NFAT/Foxp3 Komplex entsteht (218, 219). In ähnlicher Weise wird wohl auch die transkriptionelle Aktivität von Runx1 und NF- κ B durch Foxp3 beeinflusst (227, 228). Obwohl Foxp3 für die Funktion und die Stabilität von Tregs essentiell ist, scheint deren Entwicklung im Thymus nur teilweise durch Foxp3 kontrolliert zu werden (33-35). Dieser Annahme entsprechend werden auch zahlreiche Treg-spezifische Gene, wie beispielsweise *Helios*, unabhängig von Foxp3 reguliert (33, 34, 222).

4.6.1. Regulation der Foxp3-Expression

Aufgrund der zentralen Rolle von Foxp3 in regulatorischen T-Zellen wurden in den vergangenen Jahren große Anstrengungen unternommen, die molekularen Mechanismen der Genregulation von *Foxp3* besser zu verstehen. Die unterschiedliche Regulation in natürlichen und induzierten Tregs sowie die Diskrepanz zwischen murinen und aktivierten humanen konventionellen T-Zellen erschweren jedoch ein einheitliches „molekulares“ Gesamtbild (62, 229-231). Zusätzlich zum Promotor wurden drei *noncoding conserved sequences* (CNS1, CNS2 und CNS3) innerhalb des *Foxp3*-Lokus identifiziert, welche entscheidend an der Regulation von *Foxp3* beteiligt sind (siehe Abb. 4.6.) (230-232).

CNS3 stellt eine DNase I hypersensitive Chromatin-Region dar und ist durch typische Histon 3-Monomethylierung (H3K4me1) charakterisiert, die „klassische“ *enhancer*-Elemente

kennzeichnet (231, 232). Analysen Gen-defizienter Mäuse zeigten, dass c-Rel, ein Mitglied der NF- κ B Familie, essentiell für die Entwicklung von natürlichen Tregs ist (62-64, 232, 233). c-Rel bindet an CNS3 – möglicherweise auch an den *Foxp3* Promotor – und verstärkt die *Foxp3*-Expression in Tregs (62, 232). Entsprechend weisen Mäuse, die defizient für CNS3 und somit auch für das daran bindende *c-Rel enhanceosome* sind, eine drastisch reduzierte Zahl von Tregs im Thymus auf (62, 232, 234).

CNS2, welches auch als *Treg-specific de-methylated region* (TSDR) bezeichnet wird, enthält zahlreiche CpG Motive, deren Methylierungszustand mit der *Foxp3*-Expression und Stabilität korreliert (229, 235). Tatsächlich scheint CNS2 nur in nTregs komplett de-methyliert zu sein, nicht aber in TGF β -generierten *Foxp3*⁺ iTregs oder aktivierten humanen *Foxp3*⁺ T-Zellen (229, 236). Eine Bindung der Transkriptionsfaktoren CREB, ATF, Ets-1, sowie STAT5 findet nur an de-methyliertem CNS2 statt (235). Möglicherweise sind diese Faktoren ursächlich für eine stabile *Foxp3*-Expression in nTreg-Zellen, während methyliertes CNS2 keine Bindung erlaubt und nur eine transiente *Foxp3*-Transkription in iTregs und aktivierten humanen T-Zellen zulässt (236, 237). Entsprechend zeigen Mäuse, denen Komponenten der IL-2 Signaltransduktion fehlen, wie etwa *Il2*-, *Cd25*-, *Jak3*- oder *Stat5*-defizienten Mäuse, (nahezu) keine natürlichen Tregs (59, 238, 239).

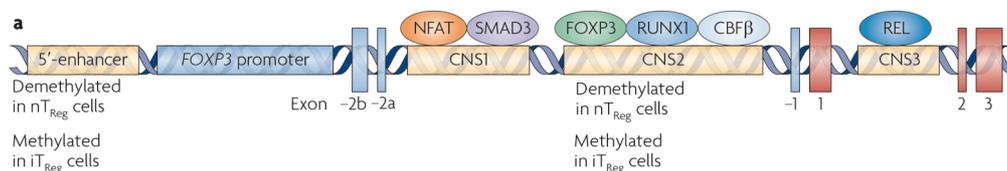


Abb. 4.6. Schematische Darstellung der *Foxp3*-Kontrollelemente. Die Expression von *Foxp3* wird durch den Promotor und verschiedene regulatorische Elemente kontrolliert: Ein 5'-Enhancer und drei *conserved noncoding sequences* (CNS1, CNS2 und CNS3) mit Bindungsstellen für diverse Transkriptionsfaktoren. An CNS1 binden die Faktoren NFAT und Smad3, die entscheidend für die Expression von *Foxp3* in induzierten Treg-Zellen sind. Die Regulation scheint dabei in nTregs und iTregs unterschiedlich kontrolliert zu werden, was am Methylierungszustand der einzelnen DNA-Elemente abzulesen ist. Modifiziert nach Müller und Rao, 2010 (3).

CNS2-defiziente Mäuse haben zwar eine normale *Foxp3*-Induktion im Thymus, dennoch ist die Stabilität der *Foxp3*-Expression von proliferierenden nTreg-Zellen stark beeinträchtigt (231, 232). Desweiteren wurde eine Bindung von *Foxp3* an CNS2 nachgewiesen, welche, vermutlich zusammen mit Runx1 und dem Kofaktor CBF β , offenbar an der stabilen *Foxp3*-Expression beteiligt ist (232). Somit kann CNS2 als eine Art *cellular memory modul* angesehen werden, das nicht nur die Identität der Zellen bewahrt, sondern auch einen *feed-forward* Mechanismus über Zellteilungsgenerationen hinweg darstellt (231).

CNS1 (oder Enhancer I) enthält Bindungsstellen für NFAT, Smad3 und RAR α (99, 240). Zunächst wurde eine Funktion von CNS1 bei der *Foxp3*-Induktion im Thymus vermutet, was aber durch die Analyse CNS1-defizienter Mäuse widerlegt wurde (232). Vielmehr scheint dieses Element entscheidend für die *Foxp3*-Expression in (peripheren) induzierten regulatorischen T-Zellen zu sein (99, 100, 230). In einem (zeitlich) konzertierten Prozess wird zunächst die Wirkung von TGF β durch Smad3, etwas verzögert das TCR-Signal über NFAT, an CNS1 in eine transiente *Foxp3*-Expression „übersetzt“ (99, 230). Dementsprechend zeigt eine biochemische Blockade von NFAT mittels CsA sowie genetische oder pharmakologische Intervention der Smad3-Aktivierung eine klare Reduktion von *Foxp3* in TGF β -generierten iTregs (99, 230, 241).

Paradoxerweise ist über den Promotor von *Foxp3* noch wenig bekannt, zumal sich die *Foxp3*-Regulation in humanen und murinen Zellen deutlich unterscheidet (217). Sowohl in der Maus als auch im Menschen finden sich aber GC, CAAT und TATA-Elemente, die typisch für eukaryontische Promotoren sind (100, 217). In der *Foxp3*-Promotorregion sind drei NFAT-Bindungsmotive konserviert, zwei davon in unmittelbarer Nähe von AP-1 Motiven (100, 217). In humanen konventionellen T-Zellen – nicht aber in nTregs – konnte nach Aktivierung eine Bindung von NFATc2, AP-1 und Sp-1 an den *Foxp3*-Promotor nachgewiesen werden. Eine Hemmung der NFAT-Aktivität durch CsA zeigte entsprechend eine reduzierte *Foxp3* Transkription (217). Der Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren scheint jedoch auch für die *Foxp3*-Expression in murinen nTreg-Zellen vernachlässigbar zu sein, wie Studien mit *Nfatc2*^{-/-}*Nfatc3*^{-/-} Mäusen zeigten (79). Dagegen lässt sich in der Maus eine TGF β -induzierte Acetylierung des Promotors, also ein Öffnen des Chromatins, nachweisen (62, 99, 242). Dies wird nicht direkt durch Smad-Proteine vermittelt, da sich keine Bindungsstellen für Smad im Promotor finden lassen. TGF β induziert aber auch die E3-Ligase Itch, die den Transkriptionsfaktor TIEG1 (*TGF β -inducible early gene 1*) aktiviert. TIEG1 bindet an das Sp-1 Motiv und reguliert so die Expression von *Foxp3* (243). Neben den genannten Proteinen sind weitere Transkriptionsfaktoren, wie etwa Runx, STAT5, E2A, Id3 und GATA3 an der Regulation von *Foxp3* beteiligt. Die genaue Funktion dieser Faktoren bei der *Foxp3*-Transkriptionskontrolle ist jedoch unbekannt (100, 230, 244-247).

4.7. *Inducible cAMP early repressor (ICER)*

Die Familie der cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren umfasst die Mitglieder CREB (*cAMP responsive element binding protein*), CREM (*cAMP responsive element modulator*) und ATF-1 (*activating transcription factor-1*) (248-250). Daneben existieren die vier ICER

(*inducible cAMP early repressor*) Transkriptionsfaktoren, die von dem internen Promoter „P2“ des *Crem*-Gens transkribiert werden (siehe Abb. 4.7.) (251, 252). ICER-Proteine besitzen eine γ -Domäne und zwei DNA-bindende Domänen (*DNA binding domains*, DBDs), die durch ihre *leucine zipper* gleichzeitig der Protein-Dimerisierung dienen (253, 254). Da die ICER-Transkripte von einem internen Promotor reguliert werden, enthalten sie nicht die im *Crem*-Gen *upstream* (5') gelegene Transaktivierungsdomänen (TADs), sondern nur die beiden DBDs (251, 255-257). Daher wirken diese Faktoren aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu CREM und den eng verwandten CREB und ATF-1 als dominant-negative Repressoren von *cAMP responsive element* (CRE) regulierten Genen (251, 252, 257). Der P1 Promotor von *Crem*, welcher ausgedehnte GC-reiche Sequenzen enthält, ist in den meisten Zellen konstitutiv aktiv. Der in einem Intron gelegene P2 Promotor dagegen besitzt eine ausgeglichene AT und GC Verteilung und ist durch vielerlei Stimuli stark induzierbar (5, 251, 258). Der best charakterisierte Signalweg, welcher zur Transkription von ICER führt, wird durch die cAMP-sensitive Kinase PKA (*cAMP-protein kinase A*) vermittelt, die das Protein CREB an einem Serin-Rest (Ser133) phosphoryliert und somit die Transkription von CRE-enthaltenen Promotoren induziert (259).

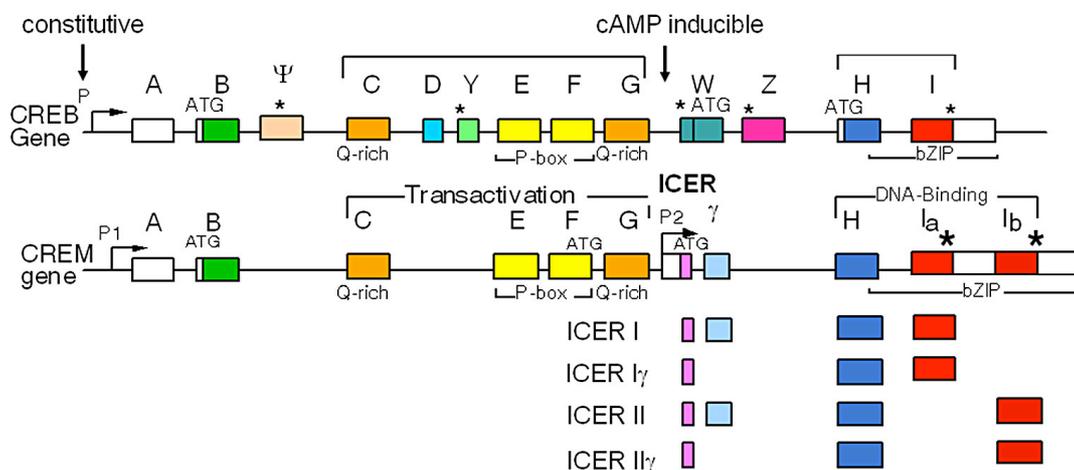


Abb. 4.7. Schematische Struktur der *Creb* und *Crem* Gene und die Transkription von ICER durch den internen induzierbaren Promotor P2. Die Exons kodieren für unterschiedliche funktionelle Teile im CREM/ICER Protein: Die DNA-bindenden Domänen, notwendig für Sequenzerkennung und Dimerisierung, werden durch die Exons H und I in CREM und ICER kodiert. Die in ICER fehlenden Transaktivierungsdomänen werden von den Exons E und F (phosphorylierungs-abhängig, P-box) exprimiert, zwei flankierende Glutamin-reiche Regionen (Q-rich) von Exon C bzw. G. Durch alternatives Splicing können vier verschiedene Isoformen von ICER durch den cAMP-sensitiven internen Promotor 2 generiert werden. Modifiziert nach Bodor *et al.* (5).

Eine Erhöhung von intrazellulärem cAMP, welches die PKA aktiviert, kann durch eine Vielzahl von Stimuli erreicht werden, beispielsweise durch Prostaglandine, Chemokine und Hormone, die durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirken (260, 261). Auch ein direkter Transfer von cAMP zwischen regulatorischen und konventionellen T-Zellen (126, 127) oder dendritischen Zellen (262) über *gap junctions* wurde als Stimulus beschrieben.

Der für die Bildung von ICER verantwortliche P2 Promotor des *Crem*-Gens enthält zwei eng zusammen liegende Tandem-ähnliche Paare an CRE-Sequenzen, welche als CARE1 bis CARE4 (*cAMP autoregulatory elements*) bezeichnet werden (251, 263). Dabei zeigen die vier verschiedenen CARE-Sequenzen unterschiedliche Affinitäten hinsichtlich CREB-, CREM- oder ICER-Bindung (263), aber auch eine differenzielle Rolle bei der cAMP-unabhängigen Transkription von ICER (264). Etwa sechs Stunden nach Aktivierung von CREB erreicht ICER ein Maximum und konkurriert dann als Repressor um die Bindung an CRE-Elemente. Auch die CARE-Sequenzen im P2 Promotor werden so in einer negativen Rückkopplung gehemmt (251). Neben der oben genannten Induktion von ICER durch cAMP, PKA und CREB wurden auch daran beteiligte cAMP-unabhängige Signalwege beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass EGF (*epidermal growth factor*) und NGF (*nerve growth factor*) über ihre Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und die nachfolgende Aktivierung von MAP-Kinasen und Ras die Phosphorylierung von CREB und somit die Transkription von ICER bewirken (264-266). Auch eine Stimulation mit Phorbol ester (PMA), die zur Aktivierung von Protein Kinase C (PKC) führt, konnte in manchen Zelllinien ICER induzieren (266). Neben einer alternativen Phosphorylierung von CREB an Ser142 und Ser143 durch Stimulation mit IFN γ in einem Casein Kinase II (CKII)-abhängigen Prozess (267) konnte auch ein CREB-unabhängiger, aber Calcium- und CamK IV- (*Calmodulin-dependent kinase IV*) regulierter Signalweg aufgedeckt werden (268). Neben der transkriptionellen Regulation werden *Icer*-mRNA und Protein auch über Degradation kontrolliert (269). Dabei kommt der Phosphorylierung von ICER an Ser41 durch ERK1/2 MAP-Kinasen und nachfolgende Ubiquitylierung bei der proteasomalen Degradation eine herausragende Rolle zu (270). Interessanterweise werden MAP-Kinasen durch cAMP gehemmt und damit die Halbwertszeit von ICER-Protein, als auch die *Icer*-Transkription, erhöht (270).

4.7.1. ICER als Repressor

ICER fungiert aufgrund seiner Strukturhomologie zu CREM und CREB als potenter Repressor der cAMP-abhängigen Transkription (251, 257, 264). Da ICER von dem intern gelegenen P2 Promotor transkribiert wird, ist zwar die DNA-Bindung möglich, es fehlen aber

die im *Crem*-Gen *upstream* kodierten TADs (251). Diese TADs rekrutieren das *CREB-binding protein p300* (CBP/p300) (271), welches als Histon-Acetyl-Transferase Chromatin öffnet und somit Transkription ermöglicht (272). Daher erscheint es naheliegend, dass ICER als dominant-negative Version von CREM und CREB CRE-Sequenzen bindet, und, ohne CBP/p300 rekrutieren zu können, um die DNA-Bindung konkurriert. Da insbesondere ICER durch einen erhöhten cAMP-Gehalt induziert wird, nicht aber CREM und CREB, verschiebt sich das Gleichgewicht zu einer Netto-Repression vieler CRE-kontrollierter Gene (251, 264). Insbesondere *CD28-responsive elements* (CD28REs), welche eine Komposition aus CRE-Sequenzen sowie NFAT- bzw. NF- κ B-Bindungsmotive darstellen, können durch ICER reprimiert werden (257). Dabei interagiert ICER aller Wahrscheinlichkeit nach direkt mit der *Rel-similarity domain* (RSD) (170, 171) und hemmt die Transkription vieler NFAT-regulierter Gene, wie etwa *Il2*, *Il4*, *Il13*, *Csf2* (GM-CSF), *Tnf*, *Faslg* oder *Fos* (252, 257, 273-276). NFAT-Proteine binden an zahlreichen CD28REs in Kooperation mit AP-1 (277, 278). Die mangelnde Fähigkeit, CBP/p300 zu rekrutieren, und die gleichzeitige Inhibition von c-Fos ermöglicht ICER, mit den aktiven NFAT/AP-1-Komplexen zu interferieren und reprimierende NFAT/ICER-Proteinkomplexe an vielen CD28REs auszubilden (257, 276).

4.7.2. Die Rolle von cAMP und ICER bei der Treg-vermittelten Suppression

nTregs verhindern schädliche (Auto-) Immunreaktionen im Körper. Die Hemmung der Proliferation sowie der IL-2-Produktion von konventionellen T-Zellen ist dabei charakteristisch für die Treg-vermittelte Suppression (121). Hemmende Effekte hinsichtlich Proliferation und IL-2-Sekretion konnten auch durch den Einsatz von cAMP-induzierenden Agenzien, wie Forskolin, Choleratoxin oder künstliche cAMP-Analoga, beobachtet werden (279). Der Brückenschlag zwischen cAMP und Treg-vermittelter Suppression gelang in einer Studie von Bopp *et al.*, indem gezeigt wurde, dass regulatorische T-Zellen einen massiv erhöhten Gehalt an intrazellulärem cAMP aufweisen, welches durch *gap junctions* direkt in andere Zellen übertragen wird (126). Höchstwahrscheinlich werden diese erhöhten cAMP-Konzentrationen in Tregs über die Suppression des cAMP-abbauenden Enzyms Phosphodiesterase 3b (PDE3b) durch den Repressor Foxp3 aufrechterhalten (34, 127). Weiterhin werden durch Foxp3 die beiden miRNAs miR-155 und miR-142-3p reprimiert: miR-155 reguliert die *PKA inhibitory subunit a* (PKI α) (280), während miR-142-3p die Adenylatzyklase 9 supprimiert (281). Infolgedessen kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in Tregs (280, 281). So kann cAMP von den Tregs direkt in andere (cAMP-arme) Zellen „gepumpt“ werden, was in diesen Zellen eine

Suppression der Proliferation und der IL-2-Synthese bewirkt (126, 127). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Hemmung der cAMP-Degradation durch den PDE-Inhibitor Rolipram die Treg-vermittelte Suppression verstärkt (127). Eine Blockade der *gap junctions* zwischen Tregs und konventionellen Zellen durch chemische Inhibitoren (126, 262) oder genetische Manipulation (282) interferiert hingegen mit der Suppression. Folglich wurde auch eine verstärkte *Icer*-Transkription in den durch cAMP-Transfer gehemmten konventionellen T-Zellen nachgewiesen (126). Dies legt nahe, dass ICER eine zentrale Rolle bei der nTreg-vermittelten Suppression einnimmt (256).

Neben dem direkten Transfer durch *gap junctions* kann cAMP in Effektorzellen auch durch verschiedene Rezeptoren induziert werden: Das auf nTregs konstitutiv exprimierte CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) bindet mit sehr hoher Affinität die beiden B7 Moleküle CD80 [B7.1] und CD86 [B7.2] (25). Eine B7-Ligation, wie sie auch bei anhaltender Stimulation auf T-Zellen nachzuweisen ist, kann in aktivierten Tconv tatsächlich zur Induktion von ICER führen. Dementsprechend zeigen B7-defiziente Tconv eine gewisse Resistenz gegenüber einer nTreg-vermittelten Suppression (256, 283). Desweiteren exprimieren nTregs – speziell im sauerstoffarmen Milieu – auch die beiden Ektoenzyme CD39 (eine ATPase/ADPase) und CD73 (eine 5'-Ektonukleosidase), welche extrazelluläres ATP/ADP zu Adenosin hydrolysieren (128, 129). Das perizelluläre Adenosin bindet an die G-Protein-gekoppelten A2A-Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen und führt zu einer Erhöhung von intrazellulärem cAMP und folglich zur Immunsuppression (130-132). Daneben könnten auch lösliche Moleküle, die von nTregs sezerniert werden, wie Interleukine, Chemokine oder hormonähnliche Stoffe, cAMP und die ICER-Expression in Effektorzellen regulieren (284-286).

4.8. Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der peripheren Toleranz besser verstehen zu lernen. Dabei sollte der Schwerpunkt der experimentellen Arbeiten auf die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren ICER, NFAT und Foxp3 bei der Bildung und Funktion regulatorischer T-Zellen gelegt werden. Entsprechend standen molekular- und zellbiologische, aber auch immunologische und Tier-experimentelle Arbeiten im Vordergrund, um Einblicke in die komplexen Regulationsmechanismen des Immunsystems zu gewinnen. Die Fragestellung lässt sich in drei Bereiche untergliedern:

(1.) Zunächst sollte die Rolle von ICER bei der Immunsuppression durch nTregs genauer analysiert werden. Vorrangig lag das Augenmerk auf der vermuteten Funktion von ICER, die NFAT-regulierte Genexpression in Tregs, aber auch in Tconv zu hemmen. Das „Abschalten“ der Effektor-Funktion durch Tregs ist ein entscheidender Aspekt der Immunsuppression. Möglicherweise wird die Expression von NFATc1 direkt durch ICER unterdrückt. Diese Annahme sollte auf molekularer Ebene untersucht werden.

(2.) Eine weitere Fragestellung befasste sich mit der Beteiligung von NFAT-Transkriptionsfaktoren an der *Foxp3*-Expression in Tregs. Foxp3 ist von zentraler Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von nTregs, aber auch von bestimmten Populationen der iTregs. Die individuellen Kontrollmechanismen der *Foxp3*-Genexpression scheinen sich aber in nTregs und iTregs zu unterscheiden, wobei die Beteiligung von NFAT-Faktoren genauer untersucht werden sollte. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob – *vice versa* – Foxp3 einen Einfluss auf die (induzierbare) *Nfatc1*-Expression hat und somit eine *feedback* Hemmung der NFATc1-Induktion durch Foxp3 stattfindet.

(3.) Dendritische Zellen nehmen eine Schlüsselrolle bei der peripheren Toleranz ein. Die tolerogenen oder pro-inflammatorischen Eigenschaften dendritischer Zellen werden insbesondere durch deren Reifungszustand, d.h. die Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und Kostimulation auszuüben, definiert. Zunächst sollte eine Analyse der Expression verschiedener NFAT-Familienmitglieder in dendritischen Zellen unternommen werden, die zur Untersuchung der Bedeutung von NFAT-Faktoren und ihrer Isoformen für die Reifung und Funktion von dendritischen Zellen führen sollte.

5. Material und Methodik

5.1. Materialien

5.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Die folgenden Chemikalien und Reagenzien wurden verwendet:

Acrylamid/Bisacrylamid	Agarose
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Borsäure
Bromphenolblau	BSA (Bovines Serumalbumin)
DAPI	Dinatriumhydrogenphosphat
DMSO (Dimethylsulfoxid)	DTT (Dithiothreitol)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	EGTA
Ethanol	Essigsäure
FCS (Fötale Kälberserum)	Glycerin
Glycin	Isopropanol
Kaliumchlorid	Magermilchpulver
Magnesiumchlorid	β -Mercaptoethanol
Methanol	Natriumazid
Natriumchlorid	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Natriumhydrogenphosphat	Natriumhydroxid
Natriumpyruvat	Natriumcarbonat
Paraformaldehyd	Phosphorsäure
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Ponceau S
2-Propanol	Phosphorsäure
Salzsäure	Schwefelsäure
Stickstoff, flüssig	TEMED (Tetramethylethyldiamin)
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Triton-X-100
Trypanblau	Tween 20

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Substanzen von den Firmen Amersham Biosciences, AppliChem GmbH, Calbiochem, Carl Roth GmbH, Fluka, Gibco BRL/Life Technologies, Merck KGaA, Roche Diagnostics und Roche Molecular Biochemicals, Serva und Sigma-Aldrich Chemie bezogen.

5.1.2. Häufig verwendete Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden mit *Aqua bidest.* angesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass die Chemikalien die höchstmögliche Reinheit aufwiesen.

PBS (1x)	NaCl (pH 7.4)	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2.6 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
FACS-Puffer	NaCl (pH 7.4)	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2.6 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	BSA	0.1% (w/v)
	(NaN ₃)	0.1% (w/v)
MACS-Puffer	NaCl (pH 7.4)	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2.6 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	BSA	0.1% (w/v)
	EDTA	2 mM
TBS (1x)	Tris-HCl (pH 7.5)	25 mM
	Glycin	150 mM
	(NaN ₃)	0.1% (w/v)
Lämmli-Puffer (1x)	Tris-HCl (pH 6.8)	125 mM
	SDS	4% (w/v)
	Glycerin	20% (v/v)
	β-Mercaptoethanol	10% (v/v)
	Bromphenolblau	0.004% (w/v)
SDS-Laufpuffer	Tris-HCl (pH 8.4)	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0.1% (w/v)
Transferpuffer	Tris-HCl (pH 8.4)	48 mM
	Glycin	40 mM
	SDS	14 mM
	Methanol	20% (v/v)
ELISA-Waschpuffer	NaCl (pH 7.4)	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2.6 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	Tween 20	0.05% (v/v)

5.1.3. Biologische Materialien

5.1.3.1. Zelllinien

HEK 293T (DSMZ Nr. ACC305), humane embryonale Nierenzelllinie

EL-4 (ATCC Nr. TIB-39), murine Lymphom-Zelllinie

X63-GMCSF (287), GM-CSF-produzierende Hybridomzelllinie

5.1.3.2. Versuchstiere

Alle verwendeten Mäuse wurden in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei einer Temperatur von 22°C und geeigneter Luftfeuchtigkeit in den Tierställen des Pathologischen Instituts, des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene und des Zentrums für experimentelle molekulare Medizin (ZEMM) der Universität Würzburg gehalten und gezüchtet. Den Tieren stand in den pathogenarmen Bedingungen der Tierställe stets pelletierte Zucht-diät-Nahrung und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Alle Nachkommen der einzelnen Verpaarungen wurden im Alter von etwa 4 Wochen genotypisiert. Für experimentelle Arbeiten wurden nach Möglichkeit Geschwistertiere des gleichen Geschlechts, wenigstens aber Tiere mit vergleichbarem Alter und gleichem Geschlecht aus verwandten Verpaarungen, mit einem Mindestalter von acht Wochen verwendet. Nachkommen folgender Mausstämmen, die mit- und untereinander verpaart wurden, dienten in dieser Arbeit als Versuchstiere:

Mausstamm

wild type C57BL/6

wild type BALB/c

B6-Tg(Cd4-cre)1Cwi/Cwilbcm

Foxp3-IRES-Cre (FIC) BALB/c

Nfatc1^{fl/fl} C57BL/6

Nfatc2^{-/-} C57BL/6

Nfatc3^{-/-} C57BL/6

Nfatc1 ex3-eGFP C57BL/6

Cd28^{-/-} C57BL/6

Cd90.1 C57BL/6

DEREG C57BL/6

OT-II C57BL/6

Rag2^{-/-} C57BL/6

Herkunft/Referenz

Jackson Laboratory/Charles River

Jackson Laboratory/Charles River

The European Mouse Mutant Archive

K. Wing, University of Uppsala

A. Rao, Harvard University

L. Glimcher, Harvard University

L. Glimcher, Harvard University

S. Klein-Hessling, Universität Würzburg

Jackson Laboratory/Charles River

Jackson Laboratory/Charles River

T. Sparwasser, Twincore Hannover

Jackson Laboratory/Charles River

Jackson Laboratory/Charles River

5.1.3.3. Antikörper und Antikörperkonjugate

Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper für FACS Analysen (gegen Maus)

anti-B220-Biotin (RA3-6B2)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD3 ϵ -Biotin (Klon 145-2C11)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD4-APC (Klon RM4-5)	Fa. eBiosciences
anti-CD4-Biotin (Klon RM4-5)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD4-PE-Cy7 (Klon GK1.5)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD8 α -APC (Klon 53-6.7)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD8 α -FITC (Klon 53-6.7)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD11b-PE (Klon M1/70)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD11c-APC (Klon HL3)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD19-Biotin (Klon 1D3)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD19-PE (Klon 1D3)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD25-PE (Klon PC61)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD62L-Biotin (Klon MEL-14)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD69-Biotin (Klon H1.2F3)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD80-FITC (Klon 16-10A1)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD86-FITC (Klon GL1)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD90.1-Biotin (Klon HIS51)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD90.1-Biotin (Klon 53-2.1)	Fa. BD Pharmingen
anti-CTLA4-PE (Klon UC10-4B9)	Fa. eBiosciences
anti-Helios-FITC (Klon 22F6)	Fa. BioLegend
anti-Fc γ RII/Fc γ RIII (Klon 2.4G2)	Fa. BD Pharmingen
anti-Foxp3-FITC (Klon FJK-16s)	Fa. eBiosciences
anti-Foxp3-PE (Klon FJK-16s)	Fa. eBiosciences
Streptavidin-PE	Fa. BD Pharmingen
Streptavidin-APC	Fa. BD Pharmingen

Primärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz (gegen Maus)

Hamster-anti-CD3 ϵ (Klon 145-2C11)	Fa. BD Pharmingen
Kaninchen-anti-CD20 (polyklonal)	Fa. Dako
Kaninchen-anti-ER α (polyklonal)	Fa. Santa Cruz Biotechnologies
Kaninchen-anti-ICER/CREM (Serum)	J. Bodor (273)

Kaninchen-anti-NFATc1 (polyklonal)	Fa. ImmunoGlobe
Kaninchen-anti-NFATc1/ α (polyklonal)	Fa. ImmunoGlobe
Kaninchen-anti-NFATc2 (polyklonal)	Fa. ImmunoGlobe
Kaninchen-anti-Smad3 (polyklonal)	Fa. Abcam
Maus-anti- β -Aktin (Klon C4)	Fa. Santa Cruz Biotechnologies
Maus-anti-HA (Klon 12CA5)	Fa. Sigma-Aldrich
Maus-anti-NFATc1 (Klon 7A6)	Fa. BD Pharmingen
Maus-anti-NFATc1 (Klon 7A6)	Fa. Alexxis
Maus-anti-NFATc3 (Klon F-1)	Fa. Santa Cruz Biotechnologies
Ratte-anti-Foxp3 (Klon FJK-16s)	Fa. eBiosciences

HRP-konjugierte Sekundärantikörper für Western Blot

Ziege-anti-Kaninchen-HRP	Fa. Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Maus-HRP	Fa. Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Ratte-HRP	Fa. Sigma-Aldrich

Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

Esel-anti-Hamster-AlexaFluor488	Fa. Molecular Probes
Esel-anti-Maus-AlexaFluor488	Fa. Molecular Probes
Esel-anti-Maus-AlexaFluor555	Fa. Molecular Probes
Esel-anti-Kaninchen-AlexaFluor555	Fa. Molecular Probes
Esel-anti-Kaninchen-AlexaFluor647	Fa. Molecular Probes
Ziege-anti-Maus-CyChrom5	Fa. Dianova
Ziege-anti-Ratte-CyChrom3	Fa. Dianova

5.1.3.4. Antibiotika und Inhibitoren

Ampicillin	Fa. Sigma-Aldrich
Cyclosporin A (CsA)	Fa. Calbiochem
FK506 (Tacrolimus)	Fa. Sigma-Aldrich
GolgiPlug (Brefeldin A)	Fa. BD Biosciences
GolgiStop (Monensin)	Fa. BD Biosciences
Penicillin/Streptomycin	Fa. Gibco

5.1.3.5. Oligonukleotide und Plasmide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Fa. Eurofins/MWG synthetisiert.

5.1.3.5.1. Primer für die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Primer	Sequenz	Temp.
<i>C/ebpβ s</i>	GCTTCGAACCCGCGGACTGCAA	60.4°C
<i>C/ebpβ as</i>	CATCTTTAAGGTGATTACTCAGG	51.7°C
<i>Nfatc1flox s</i>	CCTATTTAAACACCTGGCTCCCTGCG	61.1°C
<i>Nfatc1flox as</i>	CCATCTCTCTGACCAACAGAAGCCAG	61.1°C
<i>Nfatc1Δexon3 s</i>	CTAGGCCTCAGGCGTTCACC	60.2°C
<i>Nfatc1Δexon3 as</i>	CCTGCCTCTCTCAGCCTTTGA	56.3°C
<i>β-Actin s</i>	GAGCTGCCTGACGGCCAG	62.9°C
<i>β-Actin as</i>	GGAGCAATGATCTTGATCTTC	57.5°C
<i>Icer s</i>	ATGGCTGTAAGTGGAGATGAAACT	54.0°C
<i>Icer as</i>	CTAATCTGTTTTGGGAGAGCAAATGTC	56.7°C
<i>Il2 s</i>	CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA	55.3°C
<i>Il2 as</i>	TCCAGAACATGCCGCAGAG	53.2°C
<i>Nfatc1 s</i>	CATGCGCCCTCTGTGGCCC	59.7°C
<i>Nfatc1 as</i>	GGAGCCTTCTCCACGAAAA	51.1°C
<i>Nfatc1 P1 s</i>	GGGAGCGGAGAACTTTGC	53.2°C
<i>Nfatc1 P1 as</i>	GATCTCGATTCTCGGAC TCTCC	56.7°C
<i>Nfatc2 P2 s</i>	CGACTTCGATTTCTCTTCGAG	54.8°C
<i>Nfatc2 P2 as</i>	GATCTC GATTCTCGGACTCTCC	56.7°C
<i>Nfatc2 s</i>	CATCCGCGTGCCCGTCAAAG	57.9°C
<i>Nfatc2 as</i>	CTCGGGGCAGTCTGTTGTTG	55.9°C
<i>Nfatc3 s</i>	CTACTGGTGGCCATCCTGTTG	56.3°C
<i>Nfatc3 as</i>	CTTGAGCAGATCGCTGAGAGCACTC	61.0°C
<i>Nfatc4 s</i>	GCCCTGCCTCGGTCTGAAG	57.6°C
<i>Nfatc4 as</i>	CTCACCCCTCCGTAGCTCAATG	56.7°C

5.1.3.5.2. Primer für Mausschwanz-Genotypisierungen

Folgende Primer wurden zur Genotypisierung von Mausschwanzbiopsien eingesetzt:

Primer	Sequenz	Temp.
<i>Cd4-Cre s</i>	AGGACCAAGTGACAGCAATG	51.8°C
<i>Cd4-Cre as</i>	CTCGACCAGTTTAGTTACCC	51.8°C
<i>Foxp3-Cre s</i>	CTGCTTCCTTCACGACATTCAAC	55.3°C
<i>Foxp3-Cre as</i>	AAGTGCTTTGTGCGAGTGGAGAGC	59.1°C
<i>Foxp3-wt s</i>	TGTGTGATAGTGCCCGTGGTTC	56.7°C
<i>Foxp3-wt as</i>	TTCGCAAGAAGAGGAGCCAACG	56.7°C
<i>Nfatc1flox s</i>	CCTATTTAAACACCTGGCTCCCTGCG	61.1°C
<i>Nfatc1flox as</i>	CCATCTCTCTGACCAACAGAAGCCAG	61.1°C
<i>Nfatc2 s</i>	CAAGCCTCAGTGACAAAGTATCCACTT	58.2°C
<i>Nfatc2 s</i>	AGCGTTGGCTACCCGTGATATTGC	59.1°C
<i>Nfatc2 as</i>	CGAGCTGCCCATGGTGGAGAGAC	62.4°C
<i>Nfatc3 s</i>	CAGCTGTGAGCTACCTTATGGAAGC	59.3°C
<i>Nfatc3 s</i>	GCTCTAAAGAAGATGGCTCCGTGC	59.1°C
<i>Nfatc3 as</i>	AGCGTTGGCTACCCGTGATATTGC	59.1°C

5.1.3.5.3. Primer für ChIP Analysen

Folgende Primerpaare wurden zur PCR Amplifikation von genomischer DNA nach Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) eingesetzt:

Primer	Sequenz	Temp.
<i>Foxp3 P s</i>	CTTCCCATTCACATGGCAGGC	56.3°C
<i>Foxp3 P as</i>	CTTTGCCCTTTACAAGTCATCTG	53.6°C
<i>Foxp3 CNS1 s</i>	GCACTTGAAAATGAGATAACTGTTC	52.8°C
<i>Foxp3 CNS1 as</i>	CATCACAGTACATACGAGGAAATG	54.0°C
<i>Foxp3 CNS3 s</i>	CCAGATGGACGTCACCTACC	55.9°C
<i>Foxp3 CNS3 as</i>	GGCGTTCCTGTTTGAAGTGTTC	54.8°C
<i>Nfatc1 P1 s</i>	CTGTTAGTAATTTAGCGGGATGG	53.5°C
<i>Nfatc1 P1 as</i>	GGTGCCCTGAGAAAGCTACTC	56.3°C

5.1.3.5.4. DNA Sonden für EMSA

Folgende DNA-Sonden wurden für Gelretardationsversuche (EMSA) eingesetzt:

Sonde	Sequenz
<i>Il2</i> (-160)	CTAGAAAAGAATTCCAAAGAGTCATCAGAAA
<i>Il2</i> (-280)	CTAGAAAGAAAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGA
<i>Nfatc1 P1</i> (-145)	CGGGCAGGGGCGTGATGTCACTGAAGGGAGGGGG
<i>Nfatc1 P1</i> (-640)	GCGATTTTACATAATGACTTCAGCATGCAAGGC

5.1.3.5.4. Plasmide

Folgende Plasmide wurden für Transfektionen und Reportergeren Analysen in HEK 293T und EL-4 Zellen eingesetzt:

Plasmid	Vektor	Herkunft/Referenz
NFATc1/A-ER	pEGZ	F. Berberich-Siebelt (179)
NFATc1/C-ER	pEGZ	F. Berberich-Siebelt (179)
NFATc1/C ^{ΔSumo} -ER	pEGZ	F. Berberich-Siebelt (179)
HA-ER	pEGZ	F. Berberich-Siebelt (179)
HA-cJun	pEGZ	M. Väth (201)
HA-Foxp3-WT	pEGZ	S. Klein-Hessling (201)
HA-Foxp3ΔC	pEGZ	F. Berberich-Siebelt
HA-Foxp3ΔC _{NLS}	pEGZ	F. Berberich-Siebelt
HA-Foxp3ΔN	pEGZ	F. Berberich-Siebelt
HA-Foxp3-Scurfy	pEGZ	F. Berberich-Siebelt
ICER II	pKWJL5	J. Bodor (273)
ICER II (Klon 9 und 11)	pLVX	A. Avots (201)
Leervektor	KRSPA	D. Derse (288)
Myc-ICER II	pcDNA	F. Berberich-Siebelt (201)
<i>Il2 P Luc</i>	TATA-Luc	S. Chuvpilo (174)
<i>Nfatc1 -0.8 P1 Luc</i>	pGL3basic	S. Chuvpilo (174)

5.1.3.6. Enzyme

Collagenase D (0.15 U/mg)	Fa. Roche Diagnostics
HTNCre	A. Avots, Universität Würzburg
Restriktionsenzyme, diverse	Fa. Fermentas/NEB
Proteinase K (822 U/ml)	Fa. Fermentas
T4 DNA-Ligase (1000 U/μl)	Fa. Fermentas
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Fa. Fermentas

5.1.3.7. Liganden und Stimulantien

anti-CD3ε (Klon 145-2C11)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD28 (Klon 37.51)	Fa. BD Pharmingen
anti-CD28SA (Klon D665)	Fa. Serotec
anti-CD40 (Klon 1C10)	Fa. R&D Research
anti-IgM μ-Kette F(ab) ₂ (polyklonal)	Fa. Jackson ImmunoResearch
Forskolin	Fa. AppliChem/Sigma-Aldrich
IBMX	Fa. Sigma-Aldrich
Ionomycin	Fa. Sigma-Aldrich
LPS, ultra pure	Fa. Sigma-Aldrich
TPA (PMA)	Fa. Merck
Zymosan, ultra pure	Fa. Sigma-Aldrich

5.1.3.8. Feinchemikalien für die Zellkultur

anti-murin IFNγ (Klon 7DF3)	Fa. R&D Systems
anti-murin IL-12 (polyklonal)	Fa. R&D Systems
anti-murin IL-4 (polyklonal)	Fa. PeproTech
anti-murin TGFβ (polyklonal)	Fa. R&D Systems
Calcein-AM	Fa. Molecular Probes
Rekombinantes humanes IL-2	Fa. PeproTech
Rekombinantes humanes TGFβ ₁	Fa. PeproTech
Rekombinantes murines GM-CSF	Fa. PeproTech/Milteyi Biotec
Rekombinantes murines IFNγ	Fa. PeproTech
Rekombinantes murines IL-4	Fa. PeproTech/R&D Systems
Rekombinantes murines IL-6	Fa. PeproTech

Rekombinantes murines IL-10	Fa. PeproTech
Rekombinantes murines IL-12	Fa. PeproTech/R&D Systems

5.1.3.9. Radioaktiv-markierte Stoffe

[³ H]-Thymidin	Fa. Hartmann Analytics
γ-[³² P]-UTP	Fa. Hartmann Analytics

5.1.3.10. Größenstandards

DNA-Marker Gene Ruler 1 kb	Fa. Fermentas
DNA-Marker Gene Ruler 100 bp	Fa. Fermentas
Proteinmarker Page Ruler protein ladder	Fa. Fermentas

5.1.4. Gebrauchsfertige Kits und Systeme

anti-murin CD4 (L3T4) MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec
anti-murin CD19 MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec
anti-murin IgM MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec
anti-PE MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec
ChIP-IP Express magnetic Kit	Fa. Active Motif
Direct cAMP Enzyme Immunoassay	Fa. Assay Designs
IL-2 mouse ELISA Ready-SET-Go!	Fa. eBiosciences
IL-10 mouse ELISA Ready-SET-Go!	Fa. eBioscience
IL-23p19 mouse ELISA Ready-SET-Go!	Fa. eBiosciences
iScript cDNA Synthesis Kit	Fa. BioRad
Foxp3 Staining Kit	Fa. BD Biosciences
Dynal mouse CD4 Negative Isolation Kit	Fa. Invitrogen
OptEIA Set mouse IL-6 ELISA	Fa. BD Biosciences
OptEIA Set mouse TNFα ELISA	Fa. BD Biosciences
OptEIA Set mouse IL-12p40 ELISA	Fa. BD Biosciences
PCR-Mastermix (2x)	Fa. Fermentas
SimpleChiP Chromatin IP Kit	Fa. Cell Signalling Technologies
SuperSignal West Pico ECL Substrate	Fa. Pierce/Thermo Scientific

5.1.5. Sonstiges

5.1.5.1. Verbrauchsmaterialien

Material	Herkunft
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Fa. Hartenstein/Menzel
Einfrierröhrchen (1.8 ml)	Fa. Brand
Einweghandschuhe	Fa. Ansell
Einwegspritzen (1, 5 und 10 ml)	Fa. Braun
FACS Röhrchen	Fa. Hartenstein, BD Biosciences
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturplatten (6, 12, 24, 96-well)	Fa. Greiner/Nunc
Gewebekulturschalen (6 und 10 cm)	Fa. Greiner/Nunc
Hämakritröhrchen	Fa. Hartenstein
Kanülen (20G, 22G, 26G)	Fa. Braun
Küvetten (Kunststoff)	Fa. Braun
Labortücher	Fa. Kimtech Science
Maxisorb ELISA-Platten	Fa. Nunc
Nitrozellulose Transfermembran	Fa. Whatman
Objektträger	Fa. Menzel
Parafilm	Fa. Hartenstein
Pasteurpipetten	Fa. Brand
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Fa. Sarstedt, Sorenson
Rasierklingen	Fa. Hartenstein
Reaktionsgefäße (1.5 und 2.0 ml)	Fa. Sarstedt, Eppendorf
Röntgenfilme	Fa. Kodak
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Fa. Greiner
Sterilfilter (0.2 und 0.45 µm)	Fa. Machery-Nagel
Zellschaber	Fa. Hartenstein
Zellseparationssäulen LS	Fa. Miltenyi Biotec
Zellsiebe (70 µm)	Fa. Hartenstein
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Fa. Greiner

5.1.5.2. Verwendete Geräte

Gerät	Herkunft
Analysenwaage	Fa. Hartenstein
Autoklav	Fa. Systec
Brutschränke	Fa. Heraeus Instruments
Durchflusszytometer FACSCalibur	Fa. BD Biosciences
Durchflusszytometer FACScan	Fa. BD Biosciences
Durchflusszytometer LSR II	Fa. BD Biosciences
Eismaschine	Fa. Genheimer
ELISA-Reader Vmax	Fa. Molecular devices
Fluoreszenzmikroskop TCS SP5 II	Fa. Leica Microsystems
Heizblock	Fa. Heidolph
Magnetrührer	Fa. Heidolph
Mikroliterpipetten	Fa. Eppendorf
Lichtmikroskope	Fa. Leica Microsystems
PCR-Maschinen	Fa. MWG Biotec
Pipettierhilfe	Fa. Brand
pH-Meter	Fa. WTW
Photometer	Fa. Pharmacia
Photometer Nanodrop	Fa. PeqLab
Schüttler	Fa. Edmund Bühler
Spannungsgeräte PowerPac 2000	Fa. BioRad
Strahlungsmessgerät	Fa. TomTec
Sterilbank	Fa. Heraeus Instruments
Tiefkühlschrank (-20°C)	Fa. Privileg
Tiefkühltruhe (-70°C)	Fa. Siemens
Überkopfschüttler	Fa. Hartenstein
UV-Transilluminator	Fa. Herolab
Vortexer	Fa. GLW/Hartenstein
Westernblot-System	Fa. BioRad/Höfer
Zentrifuge 5415C	Fa. Eppendorf
Zentrifuge Rotina 420R	Fa. Hettich Laborapparate
Zytospin Zentrifuge	Fa. Shandon

5.1.5.3. Elektronische Datenverarbeitung

Zur Gewinnung, Auswertung und Präsentation der hier vorgestellten Daten und Abbildungen wurden verschiedene Macintosh-Rechner der Fa. Apple, diverse Windows-Rechner der Fa. Fujitsu-Siemens und ein Scanner der Fa. Hewlett-Packard verwendet. Dabei wurden u.a. folgende Programme benutzt:

Microsoft Word 2007	Thomson EndNote 9.0
Microsoft Excel 2007	SoftMax Pro 4.3 LS
Microsoft PowerPoint 2007	Adobe Photoshop CS2
GraphPad Prism 5.0	Adobe Illustrator CS2
BD CellQuest 3.3	HP Scanjet Software
BD FACSDiva 5.0	Tree Star FlowJo 8.8.6

5.2. Methoden

5.2.1. Zelluläre Techniken

5.2.1.1. Zellkulturmedien

Die Zellen wurden stets bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung in einem Brutschrank kultiviert. Entsprechend Zelltyp und Fragestellung wurden folgende Medien der Fa. Gibco verwendet:

RPMI-Medium , supplementiert mit	10% FCS (v/v) 2 mM L-Glutamin 1 mM Natrium-Pyruvat 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 50 µM β-Mercaptoethanol
---	---

X-Vivo 15 Medium , supplementiert mit	10% FCS (v/v) 2 mM L-Glutamin 100 µM NEAA 1mM Natrium-Pyruvat 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 50 µM β-Mercaptoethanol
--	---

DMEM-Medium , supplementiert mit	10% FCS (v/v) 2mM L-Glutamin 1mM Natrium-Pyruvat 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
---	--

5.2.1.2. Zentrifugation von Zellen

Die Zentrifugation der Zellen erfolgte, sofern nicht anders vermerkt, in einer Rotina 420R der Fa. Hettich für 5 min bei 1400 rpm und 4°C.

5.2.1.3. Zellzählung und Vitalitätstest

Zur Bestimmung der Zellzahl diente eine Neubauer-Kammer. Dazu wurden 10 µl der auszuzählenden Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau versetzt, um die toten Zellen anzufärben (Vitalitätstest). Die Zellen wurden in die mit einem Deckglas versehene Zählkammer überführt und ausgezählt. Es wurden jeweils vier Felder gemittelt und nach Berücksichtigung des Kammer-Verdünnungsfaktors (1×10^4) konnte die tatsächliche Zelldichte pro ml errechnet werden.

5.2.1.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen (etwa 1×10^7) wurden durch Zentrifugation von ihrem Kulturmedium abgetrennt, in 1.5 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt. Nach Inkubation auf Eis für etwa 5 min wurden die Zellen bei -80°C tiefgefroren und zur längeren Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert. Für eine erneute Kultur wurden die Zellen rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Medium versetzt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen.

Einfriermedium	RPMI-Medium	40% (v/v)
	FCS	50% (v/v)
	DMSO	10% (v/v)

5.2.1.5. Kultur des X63-GMCSF Hybridoms und Gewinnung von GM-CSF

Die GM-CSF produzierende B-Zelllinie X63-GMCSF (287, 289) wurde in 10 cm Petrischalen bei 37°C und 5% CO_2 in RPMI-Medium kultiviert. Sobald die Zellen eine ausreichende Konfluenz erreicht hatten (Gelbfärbung des Mediums), wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min bei 1400 rpm) und der Überstand steril filtriert. Von diesem Überstand wurden 10% dem RPMI-Medium für die Knochenmarks-Kultur zugesetzt. Die benötigte Menge an GM-CSF wurde zuvor in einem Bioassay ermittelt: werden primäre Knochenmarkszellen in Gegenwart von 10% GM-CSF über 8 Tage in RPMI-Medium kultiviert, sollten über 90% myeloide dendritische Zellen ($\text{CD11b}^+/\text{CD11c}^+/\text{MHCII}^+$) gewonnen werden. So konnte darauf verzichtet werden, die exakte Menge an GM-CSF im Medium zu bestimmen.

5.2.1.6. Kultur von HEK 293T Zellen

HEK 293T Zellen wurden adhären in Zellkulturflaschen oder auf 10 cm Petrischalen in DMEM-Medium bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS (RT) gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA für 2 min abgelöst. Nachdem die enzymatische Reaktion durch Zugabe von kaltem DMEM (10% FCS) gestoppt wurde, konnten die Zellen abzentrifugiert und in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:20 neu ausgesät werden, um ein gleichmäßiges Wachstum in der logarithmischen Phase zu gewährleisten.

5.2.1.7. Kultur von EL-4 Zellen

Die EL-4 Thymom-Zelllinie wurde als Suspensionskultur bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-Medium (5% FCS) kultiviert. Je nach Dichte der Zellen wurde die Kultur alle paar Tage im Verhältnis 1:10 bis 1:50 verdünnt, um ein gleichmäßiges Wachstum in der logarithmischen Phase zu gewährleisten.

5.2.1.8. Transiente Transfektionen mittels Calciumphosphat

Bei der Transfektion mittels Calciumphosphat präzipitiert man DNA-Phosphat-Komplexe auf die Zellmembran, welche vermutlich mittels Endozytose aufgenommen werden. Die HEK 293T Zellen wurden am Tag zuvor weniger als semi-konfluent in 8 ml DMEM-HEPES Medium auf 10 cm Schalen ausgesät und ÜN bei 37°C kultiviert. Um DNA-Phosphat-Präzipitate herzustellen, wurden steril 850 µl *Aqua bidest.* in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und anschließend mit 130 µl CaCl₂ (2 M) und 10 µg Plasmid-DNA gemischt. Unter ständigem Vortexen wurde 1 ml HBS-Puffer tropfenweise zupipetiert, bevor der Ansatz für 20 min bei RT präzipitieren konnte.

HBS-Puffer (2x)	HEPES (pH 7.05)	50 mM
	NaCl	280 mM
	KCl	10 mM
	Dextrose	12 mM
	Na ₂ HPO ₄	1.5 mM

Die Plasmid-Präzipitate wurden gut resuspendiert und tropfenweise über die HEK 293T Zellen verteilt, die Kulturschale vorsichtig geschwenkt und ÜN bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium durch frisches DMEM ersetzt und erneut ÜN inkubiert, bevor die transfizierten Zellen für weitere Versuche eingesetzt wurden. Transfektionen für Luciferase-Reportergen-Analysen wurden in 6-well Platten durchgeführt, wobei nur ein Zehntel des Präzipitat-Ansatzes pro Napf verwendet wurde.

5.2.1.9. Transiente Transfektion mittels DEAE-Dextran

Die Transfektion mit Diethylaminoethyl-dextran (DEAE-Dextran) eignet sich für Suspensionszellen, wobei die DNA durch kationische Komplexierung mit DEAE-Dextran in die Zellen aufgenommen wird (290). Für die Transfektion von EL-4 Zellen wurden jeweils 1×10^7 Zellen in TBS gewaschen und anschließend in 600 µl Transfektionsansatz aufgenommen.

Transfektionsansatz	TBS (1x)	540 µl
	Plasmid-DNA	insg. 10 µg
	DEAE-Dextran	60 µl

Nach 20 min Inkubation auf dem Schüttler wurden die Zellen durch Zugabe von 400 µl DMSO (35% in TBS) für 3 min geschockt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml TBS gestoppt, die Zellen abzentrifugiert und nach einmaligem Waschen mit RPMI-Medium in 20 ml Medium aufgenommen. Nach zwei Tagen in Kultur konnten die Zellen für weitere Experimente verwendet werden.

5.2.1.10. Luciferase-Reportergen Analysen

Um die Aktivität von Promotoren *in vitro* zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Luciferase-Reportergene verwendet (291). Dabei kontrolliert der zu untersuchende Promotor ein Reportergen, welches für das Enzym Luciferase kodiert. Durch Zugabe von Luciferin als Substrat und ATP kann die Enzymaktivität durch Lumineszenzmessung bestimmt und so auf die Aktivität des Promotors rückgeschlossen werden.

HEK 293T Zellen oder EL-4 Zellen wurden zwei Tage zuvor transient mit Reportergen- (250 ng DNA) und diversen Expressions-Plasmiden (insgesamt 2.5 µg DNA) transfiziert und nachfolgend mit kaltem PBS in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 µl Harvesting-Puffer lysiert. Auf einer weißen 96-well Tüpfelplatte wurden 50 µl Assay-Puffer vorgelegt und mit 50 µl des Lysat-Überstandes blasenfrei gemischt.

Harvesting-Puffer	Tris (pH 7.8)	50 mM
	MES	50 mM
	Triton-X-100	2% (v/v)
	DTT	1 mM
Assay-Puffer	Tris (pH 7.8)	50 mM
	MES	50 mM
	Mg(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	20 mM
	ATP-Pulver	10 mM (1 spsp)
Luciferin-Lösung	K ₂ PO ₄ (pH 7.8)	5 mM
	Luciferin-Stock	10% (v/v)

Kurz vor der Messung wurde je Napf 100 µl gebrauchsfertige Luciferin-Lösung angesetzt, an den Injektor angeschlossen und die 96-well Platte mit dem Messgerät analysiert. Um die Werte der Luciferase-Messung anhand der Proteinmenge zu normalisieren, wurden anschließend 5 µl des Zelllysats-Überstandes mit 1 ml Bradford-Reagenz vermessen.

5.2.1.11. Gewinnung von Knochenmark

Zur Gewinnung von dendritischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wurden Mäuse mit Hilfe von CO₂ getötet und nach Überprüfung der Reflexe auf einem Präparierbrett an Vorder- und Hinterläufen fixiert. Anschließend wurde ventral die Bauchhaut etwas angehoben und mit einem Medianschnitt die Bauchhöhle geöffnet. Nachdem die Hinterläufe freigelegt waren, konnten die Röhrenknochen des Ober- und Unterschenkels (*Os femoris* und *Os tibia*) vom umgebenden Gewebe befreit und durch vorsichtige Schnitte herauspräpariert werden. In der Sterilbank wurden die Knochen anschließend mit Hilfe einer Spritze (Kanüle G26) mit RPMI-Medium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gespült. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 900 rpm abzentrifugiert und in 10 ml GM-CSF-Medium aufgenommen.

5.2.1.12. Generierung dendritischer Zellen aus Knochenmark

Die isolierten dendritischen Vorläuferzellen wurden auf 10 cm Petrischalen (*non tissue culture*) mit einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen pro 10 ml GM-CSF-Medium ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung. Täglich erfolgte eine Kontrolle des Wachstums und mögliche Kontaminationen durch Mikroorganismen. Je nach Zelldichte und Zustand des Mediums wurde frisches GM-CSF-Medium zugegeben. Acht Tage nach Präparation der Zellen wurden die Platten vorsichtig mit Medium gespült, und die abgelösten Zellen für weitere Versuche abgenommen. Sowohl die Generierungseffizienz, als auch die Zusammensetzung der generierten Zellpopulation wurden stets mittels Durchflusszytometrie überprüft.

5.2.1.13. Stimulation von dendritischen Zellen

Für Stimationsversuche mit den kultivierten dendritischen Zellen wurden diese mit einer Dichte von 1×10^6 pro ml in 24-well Platten ausgesät. Für die Stimulation diente GM-CSF freies RPMI-Medium, um die evtl. störenden Effekte des GM-CSF Signalweges zu vermeiden. Die Versuche erfolgten stets am achten Tag nach der Präparation. Die verschiedenen Liganden lagen dabei mit folgenden Endkonzentrationen im Medium vor:

Liganden	LPS	1 µg/ml
	Zymosan	5 µg/ml
	Curdlan	1 µg/ml

Die Stimulationszeit richtete sich primär nach der Fragestellung, überschritt 24 Stunden aber nicht. Eine Ausnahme stellten ELISA-Experimente dar, bei denen bis zu 48 h stimuliert wurde. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zugabe von 500 µl eiskaltem PBS, um alle biochemischen Reaktionen abrupt zu stoppen. Die Zellen wurden anschließend mit einer Pipette abgenommen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um auch die adhärennten Zellen von der Platte zu gewinnen, wurde der Boden mit einem Zellschaber abgekratzt und die Zellen vereinigt. Die Zellsuspension wurde kurz abzentrifugiert (1 min bei 13000 rpm) und der Überstand abgenommen. Nach Schockfrieren des Zellpellets in flüssigem Stickstoff, konnte dieses bis zur endgültigen Verwendung bei -80°C gelagert werden.

5.2.1.14. Präparation von Lymphknoten, Milz und Thymus

Die Mäuse wurden mit Hilfe von CO₂ oder durch Genickbruch getötet und nach Überprüfung der Reflexe auf einem Präparierbrett an Vorder- und Hinterläufen fixiert. Anschließend wurde ventral die Bauchhaut etwas angehoben, mit einem Medianschnitt die Bauchhöhle (*Cavitas abdominalis*) geöffnet und die Haut unter Spannung fixiert. Es wurden zunächst die inguinalen (*Lymphonodi inguinales*), die lumbalen (*L. lumbales*), die axillären (*L. axillares*), die viszeralen (*L. cervicales*), als auch die parotidalen (*L. parotidei*) und – nach Öffnung des Peritoneums – die mesenterischen (*L. mesenterici*) Lymphknoten freigelegt, bevor auch die Milz (*Lien*) und der Thymus entfernt wurden. Die Organe wurden bis zur weiteren Verwendung in BSS/BSA auf Eis verwahrt.

5.2.1.15. Herstellung einer Zellsuspension und Erylyse

Für die Analyse von Zellen aus Milz (Splenozyten), Thymus (Thymozyten) und Lymphknoten müssen die Zellen zunächst vereinzelt und von den Erythrozyten befreit werden. Nachdem die Organe aus den Mäusen präpariert waren, wurden diese mit einem sterilen Spritzenstempel durch einen Zellsieb (Maschenweite 0.4 mm) in ein 50 ml Röhrchen gerieben und mehrfach mit eiskaltem BSS/BSA nachgespült. Nach Zentrifugation (15000 rpm für 5 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 2 ml RBC-Lysepuffer pro Milz resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die hypotone Salzkonzentration der

Ammoniumchloridlösung bringt die Erythrozyten osmotisch zum Platzen, lässt andere Zellen aber unbeschädigt (Erylyse).

RBC-Lysepuffer	NH ₄ Cl	150 mM
	KHCO ₃	10 mM
	EDTA	1 mM

Um die Zelltrümmer nach der Lyse zu entfernen, wurde eiskaltes Medium (10% FCS) zugefügt, zentrifugiert (14000 rpm für 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in frischem Medium aufgenommen, bevor die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer ausgezählt werden konnten.

5.2.1.16. Negativ-Anreicherung von CD4⁺ T-Zellen (Dyna)

Um CD4⁺ T-Zellen anzureichern, ohne diese durch das Prozedere bereits zu aktivieren, wurde in der vorliegenden Arbeit das *Dyna Mouse CD4 negativ isolation Kit* der Fa. Invitrogen verwendet. Das Prinzip beruht auf einer Antikörper-basierten Markierung aller nicht-CD4-positiven Zellen, welche anschließend durch Antikörper-bindende magnetische Kügelchen depletiert werden. Die übrigen Zellen waren zu etwa 95% reine CD4⁺ T-Zellen.

Nach Angaben des Herstellers wurden 1×10^7 Zellen in 80 μ l sterilem FACS-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 20 μ l FCS alle unspezifisch bindenden Epitope blockiert. Der Ansatz wurde entsprechend der eingesetzten Zellzahl hochgerechnet. Aus dem Antikörper-Cocktail (anti-B220, anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD16/32 und anti-Ter-119) wurden weitere 20 μ l zugefügt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 5 ml kaltem FACS-Puffer wurden die Zellen in 800 μ l frischem FACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen resuspendiert und 200 μ l magnetische Kügelchen zugefügt. Es wurde darauf geachtet, dass die Kügelchen sich in Suspension befanden, bevor sie pipettiert wurden. Die Antikörper-markierten Zellen wurden zusammen mit den magnetischen Kügelchen, welche den Fc-Teil von Antikörpern binden, für 15 min bei RT auf einem Überkopfschüttler durchmischt, anschließend mit etwas FACS-Puffer verdünnt und in 15 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Diese Röhrchen wurden in einen Dyna-Magnethalter (Fa. Invitrogen) gestellt, wobei sich die Kügelchen im Magnetfeld an der Seite des Gefäßes sammeln. Durch Abnehmen der klaren Flüssigkeit mit einer sterilen Pasteurpipette konnten die (nicht-depletierten) CD4⁺ T-Zellen gewonnen werden. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in RPMI-Medium aufgenommen und ausgezählt. Stichprobenartig wurde die Reinheit der so angereicherten CD4⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie überprüft.

5.2.1.17. Positiv-Anreicherung von Lymphozyten (MACS Miltenyi Biotec)

Neben der bereits beschriebenen Negativ-Anreicherung wurden in der vorliegenden Arbeit auch verschiedene Zellpopulationen durch Positiv-Selektion isoliert. Dabei werden ebenfalls magnetische Kügelchen (MicroBeads) eingesetzt, die aber direkt mit spezifischen Antikörpern gekoppelt sind und somit die entsprechende Zellpopulation binden können. Durch Einbringen dieser Kügelchen in eine magnetische Säule werden alle anderen Zellen durch Waschen entfernt und die gewünschte Population außerhalb des Magnetfeldes eluiert.

MACS-Puffer	NaCl (pH 7.4)	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2.6 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	BSA	0.1% (w/v)
	EDTA	2 mM

Alle verwendeten Aufreinigungssysteme (anti-PE-MicroBeads, anti-CD4-MicroBeads, anti-CD19-MicroBeads und anti-IgM-MicroBeads) wurden von der Fa. MACS Miltenyi Biotec bezogen und entsprechend den Protokollen verwendet. Zu einer Zellsuspension von 1×10^7 Zellen wurden je nach System 10 bis 20 μ l magnetische MicroBeads in 80 μ l MACS-Puffer zugefügt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 10 ml MACS-Puffer wurden die Zellen in 500 μ l Puffer resuspendiert und auf eine sich im Magnetfeld befindende LS-Säule (Fa. MACS Miltenyi Biotec) gegeben. Die Separationssäule wurde anschließend dreimal mit kaltem MACS-Puffer gewaschen, bevor diese aus dem Magnetfeld entnommen wurde und die Zellen mit Hilfe eines Stempels und 5 ml MACS-Puffer in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen eluiert werden konnten. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in RPMI- oder X-Vivo-Medium aufgenommen. Stichprobenartig wurde auch hier die Reinheit der so angereicherten Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie überprüft.

5.2.1.18. Isolation von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen

Um natürliche regulatorische T-Zellen (nTregs) zu isolieren, wurde zunächst eine CD4⁺ negativ-Anreicherung durchgeführt und die erhaltenen T-Zellen anschließend mit einem anti-CD25-PE-gekoppelten Antikörper markiert. Durch Positiv-Selektion von PE- (und damit auch von CD25⁺) markierten Zellen konnten sowohl CD4⁺CD25⁻ konventionelle T-Zellen, als auch CD4⁺CD25⁺ nTregs gewonnen werden.

Die negativ-angereicherten CD4⁺ T-Zellen (mittels Dynal System) wurden in 500 μ l FACS-Puffer resuspendiert und mit 2 μ l anti-CD25-PE Antikörper für 15 min bei 4°C inkubiert.

Nachdem die Zellen einmal mit 20 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen worden waren, wurde eine anti-PE Positiv-Selektion (mittels MACS Milteyi Biotec System) nach Herstellerangaben durchgeführt. Somit konnten $CD4^+CD25^-$ konventionelle T-Zellen, welche sich im Säulendurchfluss befanden, von den $CD4^+CD25^+$ nTregs, die aus der Säule eluiert wurden, separiert werden. Beide Fraktionen wurden abzentrifugiert, ausgezählt und in entsprechendem Medium aufgenommen. Die Reinheit der $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen wurde durch eine FACS-Analysen, hinsichtlich der Foxp3-Expression, verifiziert und lag üblicherweise höher als 90% Foxp3⁺ nTregs.

5.2.1.19. Kultur und Stimulation von T-Lymphozyten

Die Stimulation von T-Zellen erfolgte in 12-, 24- oder 48-well Gewebekulturplatten, welche zuvor mit stimulierenden Antikörpern beschichtet worden waren. Anti-CD3 ϵ (5 μ g/ml) und anti-CD28 (1 μ g/ml) wurden in PBS verdünnt und damit der Boden der Platte bedeckt. Die Bindung des hydrophoben Fc-Teils der Antikörper an das Plastik der Gewebekulturplatte erfolgte bei 4°C ÜN oder eine Stunde bei 37°C. Nach zweimaligem Waschen der Platte mit PBS konnten die T-Zellen in einer Dichte von 2×10^6 pro ml (12-well) oder 1×10^6 pro ml (24-well) in RPMI-Medium (10% FCS) ausgesät werden. Nach drei Tagen wurden die Zellen von der Platte abgenommen, einmal mit Medium gewaschen und auf frische Gewebekulturplatten überführt. Anschließend wurden die Zellen für vier weitere Tage zur Ruhe gebracht, bevor sie weiter verwendet wurden. Entsprechend der Fragestellung und der Art der T-Zellen (nTregs vs. Tconv) wurden verschiedene Interleukine und blockierende Antikörper dem Medium zugesetzt. Eine Restimulation der kultivierten T-Zellen erfolgte durch Transfer der Zellen auf frisch mit anti-CD3/CD28 beschichtete Näpfe (s.o.) für mindestens 4 h, höchstens aber ÜN. Alternativ wurden die Zellen auch durch TPA (10 ng/ml) und Ionomycin (5 nM) restimuliert.

5.2.1.20. Polarisierung von naiven T-Lymphozyten zu T_H-Zellen

Durch Zugabe von Interleukinen, Wachstumsfaktoren und neutralisierenden Antikörpern zur T-Zell-Kultur konnten naive Lymphozyten in verschiedene T_H-Zellen polarisiert und diverse T-Zellsubtypen kultiviert werden:

T_H0-Zellen	IL-2	20 U/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
	anti-IFN γ	10 µg/ml
T_H1-Zellen	IL-2	20 U/ml
	IL-12	10 ng/ml
	IFN γ	50 µg/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
T_H2-Zellen	IL-2	20 U/ml
	IL-4	20 U/ml
	anti-IFN γ	10 µg/ml
T_H17-Zellen	IL-6	50 ng/ml
	TGF β_1	2.5 ng/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
	anti-IFN γ	10 µg/ml
induzierte Tregs	IL-2	100 U/ml
	TGF β_1	5 ng/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
	anti-IFN γ	10 µg/ml
natürliche Tregs	IL-2	100 U/ml
	TGF β_1	1 ng/ml

5.2.1.21. Kultur und Stimulation von B-Lymphozyten

Die Kultur und Stimulation von B-Zellen erfolgte in Suspension (Zelldichte 1×10^6 pro ml) in X-Vivo-15 Medium (10% FCS). Durch Zugabe von 1 µg/ml anti-IgM F(ab)₂, 1 µg/ml LPS, 5 µg/ml anti-CD40L oder einer Kombination wurden die B-Zellen für 4 Stunden stimuliert.

5.2.1.22. Proliferationsbestimmung mittels [³H]-Thymidin

Um die Proliferation von Lymphozyten zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit die Inkorporation von [³H]-Thymidin gemessen. Dabei wird radioaktiv (Tritium [³H]) markiertes Thymidin in das Kulturmedium gegeben, welches von den Zellen aufgenommen und in die DNA eingebaut wird. Durch Ausmessen der radioaktiven Strahlung der Zellen wird dann die DNA-Syntheserate, entsprechend der Proliferation, bestimmt.

In 96-well Platten (U-Form) wurden pro Napf 1×10^5 Zellen in 200 µl Medium ausgesät und entsprechend der Fragestellung für zwei Tage stimuliert. Nach Zugabe von 1.5 µCi [³H]-Thymidin (in 25 µl Medium) pro Napf wurden die Zellen für weitere 18 h kultiviert und die Platte anschließend mit einem Mach 2 Harvester (Fa. Tomtec) vermessen. Dabei werden die Zellen durch Zugabe von hypotonem *Aqua bidest.* aufgeschlossen und auf ein Filterpapier

geerntet. Zellorganellen und Makromoleküle, wie etwa die DNA, verbleiben auch nach mehreren Waschschritten auf dem Filter, dessen Radioaktivität anschließend vermessen wird.

5.2.1.23. Standard Treg-Assay

Als Maß für die Fähigkeit von regulatorischen T-Zellen (Tregs) konventionelle T-Lymphozyten (Tconv) zu supprimieren, kann die Proliferation der T-Zellen in An- und Abwesenheit von Tregs, sowie deren IL-2 Produktion, gemessen werden (Treg-Assay).

In 96-well Platten (U-Boden) wurden 5×10^4 APCs (meist $CD19^+$ B-Zellen) in 50 μ l Medium vorgelegt und 2.5×10^4 $CD4^+CD25^-$ konventionelle T-Zellen zupipetiert. Anschließend wurden 2.5×10^4 $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen (1:1 Verhältnis Tregs : Tconv) je Napf zugegeben und mit der Endkonzentration von 1 μ g/ml anti-CD3 ϵ stimuliert. Das Gesamtvolumen je Napf betrug stets 200 μ l. Jeder Versuch wurde mindestens als Triplikat angesetzt und als Kontrollen unstimulierte Ansätze, Nöpfe ohne regulatorische T-Zellen (mock) sowie APCs alleine mitgeführt. Das Verhältnis von Tregs zu konventionellen T-Zellen wurde meist in verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16) eingestellt. Die Ansätze wurden so für zwei Tage bei 37°C im Brutschrank stimuliert, bevor 1.5 μ Ci [3 H]-Thymidin (in 25 μ l Medium) pro Napf zugegeben wurde und nach 18 h weiterer Kultur die Platte mit einem Mach 2 Harvester (Fa. Tomtec) vermessen werden konnte. Die Proliferation der APCs alleine wurde als Hintergrund von allen anderen Proben subtrahiert. Neben der Proliferationsmessung konnte alternativ der Gehalt an IL-2 im Mediumüberstand durch ELISA bestimmt werden.

5.2.1.24. Treg-Assay mit B-Lymphozyten

Neben dem Standard Treg-Assay wurde auch die suppressive Eigenschaft von regulatorischen T-Zellen auf B-Lymphozyten ermittelt. Dazu wurden in 96-well Platten (U-Boden) 5×10^4 negativ-angereicherte IgM^+ B-Zellen mit variablen Mengen an Tregs (Verhältnis 1:1 bis 1:16) in 200 μ l kultiviert. Da B-Lymphozyten kein für die Tregs notwendiges IL-2 sezernieren wurde dem Kulturmedium stets 50 U/ml IL-2 zugesetzt. Als Stimulus diente hier neben 1 μ g/ml anti-CD3 ϵ (für die Tregs) 1 μ g/ml anti-IgM F(ab) $_2$ und/oder 1 μ g/ml LPS für die B-Zellen. Nach zwei Tagen erfolgte die Zugabe von 1.5 μ Ci [3 H]-Thymidin (in 25 μ l Medium) pro Napf und 18 h später konnte die Proliferation bestimmt werden. Auch hier wurden alle Ansätze mindestens als Triplikate ausgeführt und durch entsprechende Kontrollen verifiziert.

5.2.1.25. Gen *knock down* mittels rekombinantem Cre-Fusionsprotein

Eine Möglichkeit, loxP-flankierte („gefloxt“) Gene *in vitro* auszuschneiden und somit zu inhibieren (*knock down*), ist die Behandlung der Zellen mit rekombinantem Cre-Fusionsprotein (HTNCre) (292, 293). Das HTNCre-Enzym besteht neben der Cre-Rekombinase aus einem N-terminalen Histidin-*tag*, welcher eine Aufreinigung mittels Nickel-Ionen-Affinitätschromatographie ermöglicht, einer TAT-Domäne, die für eine effiziente Aufnahme des Proteins in die Zelle verantwortlich ist und einem Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localization signal*), welches das HTNCre in den Zellkern einschleust. Die Expression und Aufreinigung von HTNCre Enzym wurde von Herrn Dr. Andris Avots in der Arbeitsgruppe durchgeführt und das gebrauchsfertige Fusionsprotein freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Um das *Nfatc1* Gen in frisch präparierten Knochenmarkszellen zu inaktivieren, wurde eine Zellsuspension aus Knochenmark vorbereitet und auf eine Dichte von 2×10^6 Zellen pro ml RPMI-Medium eingestellt. Nach Zugabe von 4 μ g HTNCre Protein je ml Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert und im Anschluss daran zweimal mit 10 ml RPMI (10% FCS) gewaschen. Die optimale Konzentration des Cre-Fusionsproteins wurde zuvor in einem Bioassay ermittelt: Verschiedene Konzentrationen an HTNCre wurden sowohl auf enzymatische Aktivität mittels PCR, als auch auf Toxizität getestet. Die entsprechend behandelten Zellen wurde wie beschrieben in eine GM-CSF Kultur genommen und die Effizienz der Gen-Rekombination durch HTNCre in einer spezifischen PCR-Reaktion überprüft.

5.2.1.26. Gen *knock down* mittels *short hairpin* RNA

Eine weitere Möglichkeit, die Expression eines Gens *in vitro* sequenzspezifisch zu inhibieren (*knock down*), stellt die RNA-Interferenz (RNAi) dar. Dazu werden kurze doppelsträngige (*short hairpin*) shRNA Moleküle in die Zelle eingeschleust, die durch Prozessierung am endogenen Ribonuklease-Komplex DICER in kürzere RNA-Stücke gespalten werden. Die erhaltene *small interfering* RNA (siRNA) wird in den RISC-Enzymkomplex (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut, wobei einer der RNA-Stränge dissoziiert und der verbleibende sequenzspezifische Strang mit der zellulären Ziel-mRNA hybridisiert. Der RISC-Komplex spaltet nun die komplementäre mRNA, welche anschließend degradiert wird, und hemmt somit post-transkriptionell die Genexpression.

In der vorliegenden Arbeit wurden *Nfatc1*-spezifische shRNA Retroviren verwendet, welche gebrauchsfertig von der Fa. Santa Cruz Biotechnologies bezogen wurden. Dabei dienten die retroviralen Partikel als Vektor, um die *Nfatc1*-shRNA effizient in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Zellen einer GM-CSF Kultur wurden in 12-well Platten mit 2×10^5 Zellen je Napf und ml an Tag 2 und 3 nach Präparation des Knochenmarks mit den Retroviren infiziert. Pro Napf wurden 20 μ l der gebrauchsfertigen Retroviren zugegeben und zur Unterstützung der Infektion 10 μ g/ml Polybrene beigefügt. Polybrene neutralisiert die ladungsbedingten Wechselwirkungen zwischen Zelloberfläche und Viruspartikel und erhöht somit die Infektionseffizienz. Der Ansatz wurde in der 12-well Platte, die mit Parafilm verschlossen war, für 90 min bei 32°C mit 12000 rpm zentrifugiert, im Anschluss daran einmal mit Medium gewaschen und bei 37°C ÜN im Brutschrank kultiviert. Am folgenden Tag wurde die Prozedur wiederholt und die Zellen nach einmaligem Waschen in frische 6 cm Petrischalen in 5 ml GM-CSF-Medium ausgesät. Die Effizienz des *Nfatc1* knock downs wurde an Tag 8 mittels RT-PCR verifiziert, wobei spezifische Primer für das *Nfatc1* Transkript verwendet wurden.

5.2.1.27. Durchflusszytometrie (FACS)

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS) beruht darauf, dass lebende Zellen nach Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften, aber auch nach ihren intrazellulären Zusammensetzung differenziert werden können. Viele dieser Anwendungen setzen hierbei eine Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern voraus. Die Messung in einem Durchflusszytometer beruht auf dem optischen Verhalten einer so markierten Zelle: wenn die Zellen das Gerät passieren, lassen sich anhand von Fluoreszenzemission und Streuung bestimmte zelluläre Parameter bestimmen.

Für jede FACS-Färbung wurden zunächst etwa 5×10^5 Zellen in kaltem FACS-Puffer gewaschen, der Überstand nach kurzer Zentrifugation (30 sec bei 13000 rpm) verworfen (dekantiert) und das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert.

FACS-Puffer	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2.6 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	BSA	0.1% (w/v)

Es folgte eine fünfminütige Inkubation der Zellen mit jeweils 10 µl Fc-Block (anti-CD16/CD32; 1:10 vorverdünnt in FACS-Puffer) auf Eis, um unspezifisch bindende Oberflächenproteine abzublocken. Die verwendeten Fluoreszenzantikörper wurden ebenfalls in FACS-Puffer vorverdünnt und davon jeweils 10 µl zu der Zellsuspension pipettiert (Endkonzentration gemäß den Angaben der Hersteller, meist aber 1:400). Die Ansätze verblieben etwa 20 min auf Eis (im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluorophore zu verhindern), bevor sie zweimal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen wurden. Bei biotinylierten Antikörpern schloss sich eine weitere Inkubation mit Fluoreszenz-markiertem Streptavidin an, gefolgt von zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer.

Intrazelluläre Färbungen wurden mit Hilfe des *Foxp3 Staining Kits* oder des *IC Staining Kits* (beide Fa. BD Pharmingen) nach Herstellerangaben durchgeführt: Nach 20 minütiger Fixierung in Fix/Perm-Lösung bei RT wurden die (zuvor) Oberflächen-gefärbten Zellen zweimal mit 1x Perm-Lösung gewaschen und anschließend in 100 µl Antikörperlösung (1:200 Verdünnung) resuspendiert. Nach 20 min wurden die Zellen erneut zweimal mit 1x Perm-Lösung gewaschen. Die so gefärbten Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und zeitnah gemessen oder durch Zugabe von 4% Formaldehyd für mehrere Tage konserviert. Die Analyse der Zellen erfolgte in einem FACScan, einem FACSCalibur oder einem LSR II Zytometer (alle Fa. BD Biosciences), für die Auswertung der Daten wurde die FlowJo Software (Fa. Tree Star) verwendet.

5.2.1.28. FACS-basierte Sortierung von Zellen

Neben der Methode der magnetischen Separation von Zellen wurden auch verschiedene Populationen mit Hilfe eines FACS-Sorters angereichert. Dazu müssen die Zellen wie für eine reguläre FACS-Messung zunächst mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt werden. Die Funktionsweise eines FACS-Zellsorters entspricht im Wesentlichen der eines normalen Durchflusszytometers, allerdings werden hierbei die einzelnen Zellen in kleinen Flüssigkeitströpfchen vereinzelt, die, elektrisch aufgeladen, in einem Magnetfeld voneinander separiert werden können. Die Software-gesteuerte Sortierung von definierten Zellfraktionen wird durch sog. *gates* gesteuert, welche die Zellpopulationen in den korrespondierenden Punktwolkendiagrammen vollautomatisch voneinander in verschiedene Auffangbehälter trennt. Da diese Methode einige Spezialkenntnisse und Erfahrung voraussetzt, sollte eine FACS-basierte Sortierung von Zellen nur mit fachmännischer Unterstützung durchgeführt werden. Daher wurden alle Sortierungen von Herrn Dr. Tobias Bopp am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Mainz mit Hilfe eines FACSAria II Sorters und der

entsprechenden FACSDiva Software (Fa. BD Biosciences) vorgenommen.

5.2.1.29. Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation durch Calcein *in vitro*

Zellen können durch direkten Zell-Zell-Kontakt kleine Signalmoleküle wie etwa cAMP durch Tunnel-ähnliche Strukturen (*gap junctions*) austauschen. Um diese Art der zellulären Kommunikation zu untersuchen, wurde der Vitalfarbstoff Calcein eingesetzt. Das zellwand-permeable Calcein-AM diffundiert als nicht-fluoreszierende Substanz in das Zytoplasma von Zellen und wird nach Hydrolyse eines Acetoxymethylesters durch zelluläre Esterasen in das fluoreszierende Calcein umgewandelt. Dieses kann nun nicht mehr durch die Zellwand diffundieren. Werden aber *gap junctions* zwischen zwei Zellen ausgebildet, kann das lösliche Calcein von einer Zelle in eine andere Zelle weitergegeben werden. Der Transfer von Calcein kann dann durchflusszytometrisch verfolgt werden. CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen wurden mit Calcein-AM (Fa. Molecular Probes) nach Herstellerangaben beladen und zusammen mit nicht gefärbten konventionellen T- oder B-Zellen in einem Treg-Assay für 4 h kultiviert. Nachfolgend wurden die nicht-beladenen Zielzellen (entsprechende FACS-Färbung definierten diese Populationen) hinsichtlich ihres Calcein-Gehaltes (Calcein-high vs. Calcein-low) in einem FACS Aria-Sorter isoliert. Sowohl die Beladung der Zellen mit Calcein, als auch das spätere FACS-basierte Sortieren der Zellen wurde von Herrn Dr. Tobias Bopp am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Mainz durchgeführt.

5.2.2. *In vivo* Experimente und Mausmodelle

5.2.2.1. Depletion von nTregs in DEREK-Mäusen und CD28SA-Behandlung

Um die spezifische Rolle von regulatorischen T-Zellen (Tregs) in einem Gesamtorganismus zu untersuchen, kann man diese in verschiedenen Mausmodellen ausschalten. Neben der natürlich vorkommenden Scurfy-Mausmutante (welche etwa der *Foxp3*^{-/-} Maus entspricht), die keine (funktionellen) Tregs aufweist und durch eine schwere systemische Autoimmunkrankheit gekennzeichnet ist, können regulatorische T-Zellen auch gezielt *in vivo* eliminiert werden. Zum einen kann dies durch Gabe von depletierenden anti-CD25 Antikörpern erreicht werden, wobei vorrangig die CD4⁺CD25⁺ nTregs durch die Antikörper gebunden und somit ausgeschaltet werden. Allerdings werden somit auch alle aktivierten (CD25⁺) konventionellen T-Zellen depletiert, was, je nach Fragestellung, aber Probleme bereiten kann. Eine weitaus elegantere Methode, regulatorische T-Zellen *in vivo* zu

dezimieren, ist die Verwendung der sog. DEREK-Maus (*Depletion of regulatory T cells*) (32). In diesem Tiermodell exprimieren Tregs sowohl den humanen Diphtherietoxin-Rezeptor, als auch ein GFP-Reporterprotein, unter der Kontrolle eines BAC-transgenen *Foxp3*-Genlokus. Da der humane DT-Rezeptor folglich einzig auf $Foxp3^+$ nTregs zu finden ist, können die regulatorischen T-Zellen gezielt und sehr effizient durch Injektion von Diphtherietoxin eliminiert werden.

DEREG-Mäusen wurden täglich 1 μg DT (Fa. Calbiochem) intraperitoneal (i.p.) injiziert und die Behandlung über eine Gesamtdauer von 5 Tagen wiederholt. Die Depletion der regulatorischen T-Zellen wurde mittels FACS-Analyse verifiziert, so dass typischerweise nach fünftägiger DT-Behandlung weniger als 0.3% $CD4^+CD25^+GFP^+(Foxp3^+)$ nTregs in Milz und LN der Tiere nachzuweisen waren. Eine Stimulation der T-Zellen in An- und Abwesenheit von nTregs (durch Gabe von DT) erfolgte anschließend durch i.p. Applikation von 100 μg anti-CD28 Superagonist-Antikörper (CD28SA, Klon D665). Dieser Antikörper hat im Gegensatz zu konventionellen CD28 Antikörpern die besondere Fähigkeit, ohne zusätzliche Stimulation des TCR eine volle Aktivierung von T-Zellen herbeizuführen (294). Drei Stunden nach Injektion des CD28SA wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und nach Koagulation des Blutes kurz abzentrifugiert. Im so gewonnenen Serum konnte der Gehalt an IL-2 und $TNF\alpha$ mittels ELISA bestimmt werden. Nach drei Tagen wurden die Mäuse getötet und die Organe für weitere Experimente präpariert. Alle DEREK-Tierversuche wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. Tea Gogishvili am Institut für Immunbiologie und Virologie der Universität Würzburg durchgeführt.

5.2.2.2. Untersuchung von Zell-Zell-Kommunikation durch Calcein *in vivo*

Eine Zell-Zell-Kommunikation mittels Calcein-Transfer kann, ähnlich dem *in vitro* Ansatz, auch in einer lebendigen Maus analysiert werden. Hierzu wurden *DO11.10* x *Rag2^{-/-}* x *Cd90.2⁺* Mäuse, welche einen TCR spezifisch für Ovalbumin (*DO11.10*) exprimieren, aber keine endogenen Tregs aufweisen (bedingt durch *Rag2^{-/-}*), mit 50 μg $OVA_{323-339}$ in CFA (*complete Freund's adjuvant*) subkutan (s.c.) über die hintere Fußsohle immunisiert. Sechs Stunden später wurden 1×10^7 *DO11.10* x *Cd90.1⁺* $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen, welche zuvor *in vitro* mit anti-CD3 und anti-CD28 aktiviert und mit Calcein-AM beladen waren, intravenös (i.v.) in die immunisierten Mäuse transferiert. Weitere 18 Stunden später wurden die Mäuse getötet und die afferenten Lymphknoten präpariert. Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Zellen für eine FACS-Analyse gefärbt, wobei die kongenen

Marker CD90.1 und CD90.2 zur Unterscheidung von nTregs und (endogenen) konventionellen T-Zellen dienen. CD90.2⁺ Zellen wurden anschließend hinsichtlich ihres Calcein-Gehaltes (Calcein-high vs. Calcein-low) mit Hilfe eines FACSAria Zellsorters (Fa. Biosciences) für weitere Versuche separiert. Die beschriebenen Mausversuche wurden von Herrn Dr. Tobias Bopp am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Mainz durchgeführt.

5.2.3. Arbeiten mit Proteinen

5.2.3.1. Herstellung von Proteinextrakten

Die Ernte von Zellen in 12-well Näpfen erfolgte durch Zugabe von 500 µl eiskaltem PBS, um alle biochemischen Reaktionen zu stoppen. Anschließend wurden die gegebenenfalls am Boden anhaftenden Zellen mit einem Kunststoffschaber von der Platte abgekratzt, in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und kurz abzentrifugiert (13000 rpm für 30 sec). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit drei Teilen Puffer C oder RIPA-Puffer versetzt.

Puffer C (Dignam)	Hepes (pH 7.5)	20 mM
	NaCl	420 mM
	MgCl ₂	1.5 mM
	EDTA (pH 8.0)	0.2 mM
	Glycerin	25% (v/v)
	Complete-Inhibitor	1 Tablette/10 ml
	PMSF	1 mM
	DTT	1 mM
RIPA-Puffer	Tris (pH 7.4)	50 mM
	NaCl	150 mM
	SDS	0.1% (w/v)
	Triton-X-100	1% (v/v)
	Complete-Inhibitor	1 Tablette/10 ml
	PMSF	1 mM
	DTT	1 mM

Möglichst zügig wurden die Extrakte anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die vollständige Lyse der Zellen erfolgte durch mechanischen Aufschluss. Dazu wurden die Zellen mehrfach in flüssigem Stickstoff schockgefroren, auf Eis wieder aufgetaut und dazwischen heftig aufsuspendiert (*freeze 'n' thaw*).

5.2.3.2. Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford

Die Methode nach Bradford beruht auf einer Absorptionsverschiebung des Coomassie-Blue Farbstoffs, wenn dieser mit basischen Aminosäuren in Reaktion tritt. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei von 465 nm auf 595 nm, d.h. je mehr Protein sich in den Extrakten befindet, desto größer ist auch die Absorption bei 595 nm. Für die Proteinbestimmungen in dieser Arbeit wurde ein gebrauchsfertiges Protein-Assay Reagenz (Fa. BioRad) verwendet. Für die Quantifizierung wurden dazu jeweils 2 µl der zu messenden Probe mit 1000 µl Bradford-Reagenz vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Vermessung erfolgte bei 595 nm in einem GeneQuant-Photometer der Fa. Amersham Biosciences. Als Nullwert diente jeweils der entsprechende proteinfreie Puffer. Um die reale Proteinkonzentrationen zu ermitteln, wurde zuvor eine Kalibrierreihe pipettiert, zu deren Erstellung BSA-Standards mit bekannten Konzentrationen zwischen 0,2 und 20 µg/µl verwendet wurden.

5.2.3.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine in einem Polyacrylamidgel nach ihrer Größe, erfolgte gemäß der Methode von Lämmli mit Hilfe einer Minigel-Apparatur der Fa. Hoefer oder BioRad. Für die Herstellung von Lämmli-Proteingelen wurden alle Komponenten gemäß der unten aufgeführten Tabelle (ausreichend für 2 Minigele) miteinander gemischt. APS und TEMED müssen unbedingt zuletzt zugegeben werden, da sie die Polymerisierungsreaktion starten. Dabei dient TEMED als Katalysator und APS als Startradikal für die Quervernetzung der Acrylamid- bzw. Bisacrylamidmoleküle.

Sammelgel (4.5%)	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2 ml
	40% Bis-/Acrylamid	0.9 ml
	20% SDS	100 µl
	Wasser	5.1 ml
	TEMED	10 µl
	10% APS	100 µl
Trenngel (10%)	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	4 ml
	40% Bis-/Acrylamid	4 ml
	20% SDS	160 µl
	Wasser	8 ml
	TEMED	16 µl
	10% APS	160 µl

Zuerst wurde das Trenngel fertig gestellt und zwischen die Glasplatten, welche bereits in der Gel-Apparatur aufgebaut waren, eingefüllt. Eine Überschichtung mit Isopropanol sorgte für eine möglichst glatte Grenzfläche. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol wieder entfernt und das Sammelgel darüber gegossen. Der Kamm für die Geltaschen wurde eingesetzt und nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels war das Gel gebrauchsfertig. Die Mini-Gele wurden in die Elektrophorese-Laufkammer eingesetzt und mit SDS-Laufpuffer befüllt. Vor der Beladung der Geltaschen wurden diese durch eine Spritze mit Puffer ausgespült. Die Stromstärke für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine betrug für ein Mini-Gel konstante 25 mA. Die Laufzeit war je nach Fragestellung unterschiedlich, wurde aber frühestens gestoppt, wenn die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

SDS-Laufpuffer	Tris-HCl (pH 8.5)	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0.1% (w/v)

5.2.3.4. Probenpräparation und Durchführung der SDS-PAGE

Die Probenlysate für die SDS-PAGE wurden aufgetaut und zunächst 5 min bei 13000 rpm im Kühlraum abzentrifugiert, um größere Zelltrümmer und Membranbestandteile zu entfernen. Anschließend wurden die Proteinextrakte (zwischen 20 und 100 µg Gesamtprotein je Probe) mit 5x Laemmli-Ladepuffer bis zu einem Endvolumen von 25% versetzt und bei 95°C für 10 min auf dem Heizblock denaturiert. Das im Laemmli-Puffer enthaltene SDS denaturiert die Proteinstruktur und das β -Mercaptoethanol reduziert dabei noch eventuell vorhandene Disulfidbrücken. Nach Entfaltung der dreidimensionalen Struktur können sich die anionischen SDS-Moleküle an die Proteine anlagern und ermöglichen so eine Auftrennung im elektrischen Feld, die durch Überlagerung der Eigenladung der jeweiligen Proteine nur über ihre Größe erfolgt. Durch den Siebeffekt des Gels wandern kleine Moleküle im elektrischen Feld schneller als große und können somit voneinander separiert werden.

Lämmli-Ladepuffer	Tris-HCL (pH 6.7)	125 mM
	SDS	4% (w/v)
	Glycerin	20% (w/v)
	Bromphenolblau	0.004% (w/v)
	β -Mercaptoethanol	10% (v/v)

5.2.3.5. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Um die in der SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine immunologisch nachweisen zu können, werden diese üblicherweise auf eine Membran transferiert. Dazu wurde das SDS-Gel gemäß der Anleitung des Herstellers (Fa. Hoefer oder Fa. BioRad) in die Transfer-Kammer eingelegt. Die aufgetrennten Proteine aus dem Gel wurden so in einem Nass-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Alle Schwämme, die Nitrocellulosemembran und Filterpapiere wurden zuvor in Transfer-Puffer äquilibriert. Um beim Transfer übermäßige Wärmeentwicklung zu vermeiden, erfolgte der Blot-Vorgang im Kühlraum. Der Transfer von Minigelen (8 bis 10%) auf eine Nitrocellulosemembran benötigte eine konstante Spannung von 100 V über einen Zeitraum von 90 min, der erfolgreiche Transfer wurde durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S verifiziert.

Transfer-Puffer	Tris-HCl (pH 8.4)	48 mM
	Glycin	40 mM
	SDS	14 mM
	Methanol	20% (v/v)
TBS-Tween	Tris-HCl (pH 7.5)	25 mM
	Glycin	150 mM
	Tween 20	0.2% (v/v)

Der Nachweis bestimmter Proteine auf der Membran kann mit Hilfe spezifische Antikörper erfolgen. Um zu vermeiden, dass die Antikörper unspezifisch binden, wurde die Membran für mindestens eine Stunde in Milchpulver oder BSA (5% in TBS-Tween) inkubiert. Die Milchpulverproteine besetzen dabei alle freien Bindungsstellen auf der Membran und verhindern so ein allzu starkes unspezifisches Hintergrundsignal.

Anschließend wurde die Membran kurz mit TBS-Tween gewaschen und nachfolgend mit spezifischen Erstantikörpern (gewonnen in Kaninchen oder Maus) in Verdünnungen nach Herstellerangaben bei 4°C ÜN inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBS-Tween (jeweils 15 min bei RT) konnten die spezifischen Antikörper mit anti-Kaninchen oder anti-Maus HRP-gekoppelten Zweitantikörpern nachgewiesen werden. Die Zweitantikörper tragen das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP), welches in der Lage ist, Luminol unter Lichtemission zu spalten. Dazu wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit den Zweitantikörpern (Verdünnung 1:10000) inkubiert und anschließend drei mal 15 min in TBS-Tween gewaschen. Zur Visualisierung der gesuchten Proteine wurde das *SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate* der Fa. Pierce verwendet. Die beiden Lösungen dieses

Systems wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran mit dem nun gebrauchsfertigen Reagenz vollständig benetzt. Nach einminütiger Inkubationszeit konnte anschließend im Dunkeln ein Röntgenfilm zur Detektion des Signals aufgelegt werden. Die Filme wurden je nach Fragestellung unterschiedlich lange exponiert, anschließend entwickelt und fixiert.

5.2.3.6. Strippen von Membranen

Zum Ablösen der Antikörper von Membranen, wurde diese über 20 min bei 50°C in Stripping-Puffer inkubiert und nachfolgend gründlich in TBS-Tween gewaschen. Anschließend mussten die freien Bindungsstellen auf der Membran erneut mit Milchpulver (5% in TBS-Tween) blockiert werden. Danach war eine weitere Antikörperinkubation möglich.

Stripping-Puffer	Tris-HCl (pH 6.8)	65 mM
	SDS	2% (w/v)
	β-Mercaptoethanol	100 mM

5.2.4. Immunologische Methoden

5.2.4.1. Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Konzentrationsbestimmung von Biomolekülen wie etwa Zytokinen oder Chemokinen werden bevorzugt Immuno-Assays verwendet. Das Prinzip dieser immunologischen Methode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, welche anhand des Substratumsatzes eines gekoppelten (Marker-) Enzyms quantifiziert werden kann.

Die hier angewandten ELISAs (*Enzym-linked Immunosorbent Assays*) wurden nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut. Dabei wird ein Fänger-Antikörper an eine feste Phase adsorbiert, welcher das gewünschte Antigen aus der Probe fischt (*capture*). Die spezifische Markierung des Antigens erreicht man schließlich durch die Zugabe eines Detektions-Antikörpers (*detection*). Dieser ist entweder direkt markiert oder muss in einem zweiten Schritt indirekt an einen Marker gebunden werden. Diese Marker können beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme sein. Im Falle eines Enzyms kann die Konzentration des Antigens anhand des spezifischen Substratumsatzes quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diverse ELISA-Systeme verschiedener Hersteller entsprechend den beigefügten Gebrauchsanweisungen eingesetzt:

IL-2 mouse ELISA Ready-SET-Go!	Fa. eBiosciences
IL-10 mouse ELISA Ready-SET-Go!	Fa. eBioscience
IL-23p19 mouse ELISA Ready-SET-Go!	Fa. eBiosciences
OptEIA Set mouse IL-6 ELISA	Fa. BD Biosciences
OptEIA Set mouse TNF α ELISA	Fa. BD Biosciences
OptEIA Set mouse IL-12p40 ELISA	Fa. BD Biosciences
Direct cAMP Enzyme Immunoassay	Fa. Assay Designs

Die Funktionsweisen aller verwendeten ELISA-Systeme sind grundsätzlich vergleichbar, mitgelieferte Komponenten, wie etwa Antikörper, Standards oder Substratlösungen wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Der erste Schritt ist die Beschichtung der 96-well Maxisorb Platten (Fa. Nunc) mit Fänger-Antikörpern (*coating*) bei 4°C ÜN. Dabei tritt der hydrophobe Fc-Teil des Fänger-Antikörpers mit der ebenfalls hydrophoben Polystyrolplatte in Wechselwirkung und die Immunglobuline binden nicht-kovalent an die Platte. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Antikörper abgenommen und die Platte mit 100 μ l Blocking-Puffer je Napf abgesättigt. Nach 2 Stunden bei RT wurde der Blockpuffer entfernt und die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Waschpuffer	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2.6 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	Tween 20	0.05% (w/v)
	Natriumazid	0.1% (w/v)
Blocking Puffer	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2.6 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	FCS	10% (v/v)
	Natriumazid	0.1% (w/v)

Als Proben dienten Zellkulturüberstände oder aus Blut gewonnene Seren, die je nach Gehalt an den zu analysierenden Zytokinen, unterschiedlich stark verdünnt werden mussten. Um eine exakte Quantifizierung vorzunehmen, wurden außerdem die mitgelieferten Standards von rekombinant-hergestellten Zytokinen in einer Verdünnungsreihe mit aufgetragen. Sowohl von den Proben, als auch von den Standards wurden jeweils 50 μ l pro well auf einem Schüttler inkubiert (ÜN, bei 4°C), bevor erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen wurde.

Die entsprechenden (biotinylierten) Detektions-Antikörper wurden in Blockpuffer (supplementiert mit 0.05% Tween-20) verdünnt und davon jeweils 50 µl pro Napf pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei RT wurden die Antikörper abgeschüttet und die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurde je nach System Streptavidin-AP (alkalische Phosphatase) oder Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*) in Blockpuffer verdünnt und davon 50 µl je well zugegeben. Streptavidin bindet mit sehr hoher Avidität Biotin und konjugiert so die Enzyme (alkalische Phosphatase oder Peroxidase) an den Proteinkomplex. Nach erneutem zehnmalem Waschen wurde das mitgelieferte Substrat frisch angesetzt und davon 100 µl zugegeben. Die AP spaltet das schwach gefärbte p-Nitrophenylphosphat in Phosphat und p-Nitrophenol. Das stark gelb gefärbte p-Nitrophenol dient als Nachweis für die Menge an gebundenem Antigen. ELISAs mit HRP-Detektion wurden eine gebrauchsfertige Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung zugegeben, dabei katalysiert die Peroxidase den Umsatz von TMB zu einem bläulich gefärbten Chromophor. Durch Zugabe von 50 µl 1 N H₂SO₄ konnte die Reaktion gestoppt und das blaue Produkt in eine intensiv gelbe Verbindung überführt werden. Die Platten wurde zeit-abhängig vom Fortschritt der Enzymreaktion im Dunkeln inkubiert und zu variablen Zeitpunkten bei 405 nm (AP-Substrat) oder 450 nm (HRP-Substrat) an einem 96-well ELISA-Reader (Fa. Molecular Devices) vermessen. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm SoftMAX Pro 4.3LS.

5.2.4.2. Immunpräzipitation (IP)

Unter dem Begriff Präzipitation versteht man allgemein die Ausfällung von löslichen Substanzen. Im Falle der Immunpräzipitation werden lösliche Proteine im Zelllysate durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern ausgefällt. Dies wird durch die Bindung des Fc-Teils der Antikörper an immobilisiertes Protein A oder Protein G erreicht. Protein A stammt aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* und bindet durch Interaktion mit der schweren Kette an die Fc-Region der Immunglobuline.

IP-Lysepuffer	Tris (pH 7.4)	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA (pH 8.0)	1 mM
	Triton-X-100	1% (v/v)
	Complete-Inhibitor	1 Tablette/10 ml
	evtl. NEM	10 mM

Für eine (Ko-) Immunpräzipitation wurden HEK 293T Zellen verwendet, die 48 Stunden nach Transfektion mit TPA (5 µg/ml) und Ionomycin (5 nM) für 4 Stunden stimuliert worden waren. Anschließend wurden die 10 cm Petrischalen einmal mit zimmerwarmen PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml IP-Lysepuffer auf einem Schüttler im Kühlraum lysiert. Das Zelllysate wurde in 1.5 ml Reaktionsgefäße aufgenommen, für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (4°C) und der klare Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt. Davon wurden 50 µl als Input (Lysatkontrolle) abgenommen, für 5 min mit 15 µl 5x Laemmli-Probenpuffer bei 95°C aufgeköcht und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Dem verbleibenden Überstand wurden 3 µg des präzipitierenden Antikörpers zugegeben und die Proben UN auf einem Überkopfschüttler bei 4°C durchmischt. Die Protein A/G Sepharosekügelchen (*beads*) wurden zunächst dreimal mit Lysepuffer gewaschen und anschließend 50 µl *beads* als Suspension (50 % *beads*) je Probe dem Lysat zugefügt. Es folgte eine Inkubation für zwei Stunden bei 4°C auf einem Überkopfschüttler, anschließend wurden die Proben vorsichtig abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Kügelchen dreimal mit IP-Lysepuffer gewaschen. Der verbleibende Puffer wurde genau abgenommen und die Kügelchen mit 40 µl 1x Laemmli-Probenpuffer für 10 min aufgeköcht. Die Denaturierung auf dem Heizblock spaltet die präzipitierten Proteine wieder von den Kügelchen bzw. von den Fänger-Antikörpern ab, so dass sie in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot detektiert werden können.

5.2.4.3. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) lässt sich die Bindung von Proteinen, meist Transkriptionsfaktoren, an definierte DNA-Abschnitte *in vivo* nachweisen. Dazu werden die Protein-DNA-Komplexe *in situ* fixiert, um das Chromatin dann mechanisch und enzymatisch in kleine Bruchstücke – typischerweise in ein oder mehrere Nukleosomenlängen – zu scheren. Die Komplexe können anschließend mit spezifischen Antikörpern an eine immobilisierte Matrix immun-präzipitiert werden. Nach Aufheben der Fixierung kann die gefällte DNA isoliert werden. Durch Analyse des DNA-Gehaltes mittels spezifischer PCR kann dann auf die Menge gebundener Proteine an diese DNA-Sequenz rückgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Systeme (ChIP-IT Express magnetic Chromatin Immunprecipitation Kit der Fa. Active Motif und SimpleChiP Enzymatic magnetic Chromatin IP Kit der Fa. Cell Signaling Technology) eingesetzt, die als Matrix Antikörperbindende magnetische Kügelchen verwenden. Auch die Spaltung der fixierten DNA-Protein-Komplexe geschieht in beiden Fällen mittels enzymatischer Katalyse. Die Chromatin-

Immunpräzipitation wurde im Wesentlichen nach Angaben der Hersteller durchgeführt, allerdings wurde nach der enzymatischen Spaltung der DNA eine dreimalige Sonifizierung der Kerne vorgenommen, um effizienter DNA-Bruchstücke gewünschter Größe zu erhalten. Das folgende Protokoll beschreibt die Vorgehensweise im Falle des Systems der Fa. Cell Signalling Technologies:

Mindestens 2×10^7 Zellen wurden im Medium durch Zugabe von Formaldehyd (1% Endkonzentration) für 7 min fixiert, bevor die Reaktion mittels Zugabe von 125 mM Glycin gestoppt wurde. Nach Waschen mit kaltem BSS/BSA wurden die Zellen für 10 min in 10 ml hypotonem Puffer A (mit Inhibitoren) resuspendiert, was zum Aufquellen des Zytoplasmas führt. Die präparierten Zellkerne wurden zweimal mit Puffer B (mit Inhibitoren) gewaschen und in 600 μ l Puffer B in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1.25 μ l Micrococcus Nuklease (die optimale Konzentration wurde zuvor ermittelt) und Inkubation für 20 min bei 37°C auf einem Schüttler konnte die DNA enzymatisch verdaut werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 μ l EDTA (5 M) abgestoppt, gefolgt von Waschen in Puffer B. Das Pellet wurde in 500 μ l ChIP-Puffer (mit Inhibitoren) aufgenommen und mittels Sonifikation auf Eis zusätzlich mechanisch geschert. Durch Zentrifugation (13000 rpm für 10 min) konnten die Trümmer depletiert, der das Chromatin enthaltende Überstand in ein frisches 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Gehalt an DNA im Photometer bei 260 nm vermessen werden. Die einzelnen Proben wurden mit ChIP-Puffer auf die gleiche DNA Konzentration eingestellt. Es wurden jeweils 15 μ l der Proben als Ladekontrolle (Input) abgenommen und 250 μ l Chromatin, zusammen mit 3 μ g präzipitierenden Antikörper (anti-ICER/CREM, anti-NFATc1, anti-Foxp3 oder anti-Smad3, als Kontrolle wurden stets Isotyp-Antikörper verwendet) in einem frischen 1.5 ml Reaktionsgefäß ÜN bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach 12 bis 16 Stunden wurden 30 μ l an magnetischen Kügelchen in Suspension zugegeben und für zwei weitere Stunden inkubiert. Um die Kügelchen vom Überstand zu trennen, wurden die Reaktionsgefäße in einen Magnethalter (Fa. Dynal) gesteckt, die Kügelchen wurden an der Seite des Magneten gebunden und der Überstand konnte mit einer Pipette abgenommen werden. Die Ansätze wurden jeweils dreimal mit *low-salt* und einmal mit *high-salt* Puffer gewaschen, wobei die Reaktionsgefäße aus dem Magneten entnommen, die Puffer zugegeben und kurz durchmischt (5 min), wieder zurück in den Magnethalter gesteckt wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurden sowohl die Kügelchen, als auch die Input-Kontrollen mit 150 μ l Elutionspuffer versetzt und bei 65°C für 30 min auf einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde das so eluierte Chromatin in frische Reaktionsgefäße überführt, mit 6 μ l NaCl (5 M) und 2 μ l Proteinase K versetzt und

für zwei weitere Stunden bei 65°C behandelt, um die Kreuzvernetzungen zu lösen. Nach Zugabe von 750 µl *DNA binding buffer* (Isopropanol) präzipitierte die DNA ohne Proteine und konnte auf *spin column* Filter-Zentrifugationssäulchen aufgetragen werden. Durch Zentrifugation (13000 rpm für 30 sec) wurde der Überstand entfernt. Es schloss sich ein Waschschritt mit *DNA wash buffer* (75% EtOH) an. Die Säulchen wurden in frische 1.5 ml Reaktionsgefäße gesteckt und die Chromatin-DNA mittels 50 µl *DNA elution buffer* (TE Puffer, RT) und anschließender Zentrifugation vom Filter eluiert. Die eluierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Mittels PCR und Sequenz-spezifischen Primern konnte die Menge an DNA-Fragmente, welche durch die Antikörper-Antigen-DNA-Komplexe präzipitierte wurden, amplifiziert und dadurch die Bindung eines Proteins an eine bestimmte DNA-Sequenz qualitativ und semi-quantitativ ermittelt werden.

5.2.5. Arbeiten mit Nukleinsäuren

5.2.5.1. Isolation von genomischer DNA aus Zellen oder Mausschwanz-Biopsien

Zur Bestimmung des Genotyps aus Mausschwanzbiopsien mittels PCR musste zunächst die DNA zugänglich gemacht werden. Dazu wurden die Biopsien (etwa 5 mm lange Mausschwanz-Stückchen) in 20 µl Lysepuffer bei 55°C inkubiert, bevor die enthaltene Proteinase durch Zugabe von 280 µl *Aqua bidest.* und Erhitzen auf 95°C inaktiviert wurde.

DNA-Lysepuffer	Tris (pH 8.5)	100 mM
	EDTA (pH 8.0)	5 mM
	NaCl	200 mM
	SDS	0.2%
	Proteinase K	1000 U/ml

Die Isolation von genomischer DNA aus Zellen erfolgte in ähnlicher Weise, wobei das eingesetzte Volumen Lysepuffer der Zellzahl angepasst wurde.

5.2.5.2. Isolation von Gesamt RNA aus Zellen mit Trizol

Für die Isolation von Gesamt RNA aus Zellen wurde Trizol der Fa. Invitrogen verwendet. Dabei wurden je Ansatz mindestens 2×10^6 Zellen geerntet, kurz abzentrifugiert und das Pellet mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 1 ml Trizol (hierbei handelt es sich um ein gebrauchsfertiges Reagenz, welches Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält). Die Methode basiert auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation der RNA von

DNA bzw. Proteinen durch das unterschiedliche Lösungsverhalten der Biomoleküle in wässrigen oder organischen Flüssigkeiten. Um die Zellen effektiv aufzuschließen, wurde das Zellpellet mehrfach durch eine dünne Kanüle gezogen und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Je eingesetztem Milliliter Trizol wurde 200 µl Chloroform zugegeben und die Proben kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurden die Ansätze 5 min bei 7500 rpm abzentrifugiert. Dies führte zur Trennung in 3 Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischen liegende Interphase. Die RNA befand sich in der wässrigen Phase: sie wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol pro eingesetztem Milliliter Trizol ausgefällt. Die RNA wurde bei 13000 rpm für 10 min (bei 4°C) pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Im Anschluss daran wurde die RNA einmal mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, bevor das RNA-Präzipitat an der Luft getrocknet wurde. Das Pellet konnte in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei 65°C gelöst werden. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -70°C.

5.2.5.3. Vermessung von RNA

Um die Menge an Gesamt-RNA in den Extrakten zu bestimmen, wurden 2 µl mit 98 µl (VF ist also 1:50) DEPC-Wasser gemischt und in eine Quarzküvette überführt. Die Vermessung der RNA erfolgte bei 260 nm im Photometer (Absorptionsmaximum von RNA). Die Konzentration in µg/µl der RNA wurde mit der folgenden Formel errechnet:

$$Konzentration[\mu g / \mu l] = \frac{OD_{[260nm]} \times VF \times Faktor40}{1000}$$

Außerdem konnte die Absorption bei 280 nm gemessen werden (Absorptionsmaximum von DNA). Das Verhältnis der beiden Absorptionen lieferte Informationen über die Reinheit der isolierten RNA.

$$Ratio = \frac{OD_{[260nm]}}{OD_{[280nm]}} \quad (\text{sollte zwischen 1,8 und 2,4 liegen})$$

5.2.5.4. Umschreiben von RNA in cDNA (Reverse Transkription)

Bei der reversen Transkription wird ausgehend von einer RNA-Matrize die entsprechende einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Sie kann in einer nachfolgenden PCR mit spezifischen Primern amplifiziert werden.

Das Umschreiben von RNA in cDNA wurde mit Hilfe des *iScript Synthesis Kits* der Fa. BioRad nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde 1 µg Gesamt-RNA je Probe eingesetzt und die Reaktion in einer PCR-Maschine mit folgendem Programm durchgeführt:

RT-Ansatz	RNA	1 µg
	RT-Puffer (5x)	4 µl
	Reverse Transkriptase	1 µl
	DEPC-Wasser	ad. 20 µl
RT-Programm	5 min bei 25°C	
	30 min bei 42°C	
	5 min bei 85°C	
	Lagerung bei 4°C	

Die erhaltene cDNA wurde 1:2 mit DEPC-Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.2.5.5. Amplifikation von DNA und cDNA mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Abschnitten zwischen zwei flankierenden Oligonukleotidprimern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Doppelstränge gebunden sind. Die Vervielfältigung erfolgte durch eine thermostabile DNA Polymerase (z.B. aus *Thermus aquaticus*) in einem zyklischen Prozess aus Hitze-Denaturierung, Primer-Anlagerung (*Annealing*) und Elongation in einem exponentiellen Reaktionsverlauf. Als Reaktionsansatz wurde ein 2x PCR-Mastermix der Fa. Fermentas verwendet, der bereits 0.05 U/µl *Taq* DNA-Polymerase, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und einen optimierten Salzpuffer enthält.

PCR-Ansatz	cDNA Matrize	2 µl
	2x PCR Master-Mix	12.5 µl
	Primer s (100 nM)	0.25 µl
	Primer as (100 nM)	0.25 µl
	Wasser	10 µl

Nach einer initialen Denaturierung für 5 min bei 94°C folgte eine variable Anzahl Denaturierungs-, Annealing- und Elongationszyklen, in der Regel aber zwischen 25 und 35 Zyklen. Nach dem letzten Schritt schloss sich eine abschließende Elongation für 10 min bei 72°C an. Die Annealing-Temperatur der Primer wurde wie folgt festgelegt:

$$Temp_{Annealing} = \left(\frac{Temp_{Primer1} + Temp_{Primer2}}{2} \right) - 5^{\circ}C$$

Die PCR wurden automatisiert in einem Thermozykler der Fa. MWG durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte meist gegen das ubiquitär exprimierte *Housekeeping*-Gen β -Aktin.

5.2.5.6. Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in einem Ethidiumbromid-versetztem Agarosegel (1-2% Agarose in 1x TAE) bei konstanten 150 V aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch Anregung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm unter einen UV-Transilluminator visualisiert und fotografisch dokumentiert. Zur Kontrolle der Fragmentgröße diente ein 1 kb DNA-Größenstandard.

5.2.6. Bildgebende Verfahren

5.2.6.1. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden spezielle Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) an Proteine oder andere Zellbestandteile (meist) mit Hilfe von Antikörpern gekoppelt. Durch Anregung dieser Farbstoffe mit einer bestimmten Wellenlänge emittieren diese Licht mit einer etwas größeren Wellenlänge (Stokes'sche Regel), beginnen also zu fluoreszieren. Der Einsatz von Fluoreszenzmikroskopen mit geeigneten Filtern ermöglicht eine Mehrfachfärbung, bei der verschiedene Farben aus einer Probe detektiert werden können. Das in dieser Arbeit verwendete konfokale Laser-scanning Mikroskop der Fa. Leica zeichnet sich gegenüber konventioneller Fluoreszenzmikroskope neben einer wesentlich stärkeren Lichtquelle (Laser), vor allem durch die Verwendung zweier Lochblenden (*pinholes*) aus, die unerwünschtes Streulicht aus der Probe ausblenden und somit die Auflösung erheblich steigern. Das Mikroskop wird dabei digital von einem Computer kontrolliert, welcher Filter, Lochblenden und das Photomultiplier-Detektionssystem steuert. Software-basiert kann man

die Probe in der gesamten Stärke durchrastern (*scanning*), d.h. prinzipiell auch einen dreidimensionalen Eindruck der Zellmorphologie gewinnen.

5.2.6.2. Probenvorbereitung von Zellen

Zur fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung von Zellen müssen diese auf dünnen Deckgläschen anwachsen oder durch Zentrifugation (Zytospin) auf die Objektträger aufgebracht werden. Die Deckgläschen (\varnothing 12 mm) wurden zuvor in einer Glaspetrischale autoklaviert, in 6-well Platten vorgelegt und vorsichtig mit einer sterilen Pipettenspitze am Boden des Napfes festgedrückt. Anschließend wurden HEK 293T Zellen ausgesät und entsprechend des Protokolls transfiziert. Die nun auf den Deckgläschen anhaftenden Zellen wurden einmal mit vorgewärmten PBS (37°C) gewaschen und mit 4% Formaldehyd für 30 min bei RT fixiert. Suspensionszellen wurden in einer Zytospin-Zentrifuge auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Dazu wurden 1×10^5 Zellen in einem Endvolumen von 100 μ l bei 360 rpm für 4 min auf die Objektträger abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit einem Diamantstift markiert, kurz an der Luft getrocknet und ebenfalls mit Formalin fixiert.

Fixierlösung (pH 7.4)	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2.6 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	(Para-)Formaldehyd	4% (v/v)
Permeabilisierungslsg.	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2.6 mM
	KH ₂ PO ₄	1.8 mM
	Triton X-100	0.2% (v/v)

Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit warmen PBS für 5 min gewaschen. Um die Zellmembran für Antikörper durchlässig zu machen, wurden die fixierten Zellen für genau 5 min mit Permeabilisierungslösung bei RT inkubiert und wiederum dreimal mit PBS gewaschen.

5.2.6.3. Vorbereitung von histologischen Proben

Organe für immun-histochemische Untersuchungen wurden freigelegt und sofort für mindestens 24 Stunden bei RT in Fixierlösung konserviert. Um das Gewebe für eine Einbettung in Paraffin vorzubereiten, müssen die Organe zunächst entwässert werden. Dazu

wurden den Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe das Wasser entzogen und letztlich durch 100% Xylol ersetzt. Die wasserfreien Organe wurden in dafür vorgesehene Kassetten gelegt und mit heißem Paraffinwachs durchtränkt, welches, nach Erstarren, haltbare Gewebeproben ergab. Die gesamte Prozedur wurde freundlicherweise von den Mitarbeitern des immun-histochemischen Labors der Pathologie übernommen.

Zum Anfertigen von Paraffinschnitten wurde ein Schlittenmikrotom der Fa. Leica verwendet, das Schnittdicken von etwa 2 µm liefert. Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Pinsel in ein Warmwasserbad übertragen, wobei sich die Proben entfalten. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Um die Schnitte immun-histochemisch anzufärben, müssen diese wieder in ein wässriges Milieu überführt werden. Die Proben wurden dazu für 25 min in Xylol eingelegt, dann je 5 min in einer absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80% und 70%) inkubiert, gefolgt von 10 min wässern in *Aqua bidest.* Anschließend wurden die Objektträger für 20 min in 10 mM Zitronensäure (pH 6.0) in einen Dampfkochtopf bei etwa 120°C gekocht, bevor die Schnitte mit PBS auf RT abgekühlt werden konnten.

5.2.6.4. Färben von Zellen und histologischen Schnitten (Immunfluoreszenz)

Nach der Initialen Fixierung der Proben mit (Para-) Formaldehyd und der nachfolgenden Permeabilisierung, wobei dies bei Paraffin-Schnitten durch die Xylol-Behandlung erreicht wird, konnte eine immunhistochemische Färbung durchgeführt werden. Alle nun folgenden Schritte fanden in einer Kammer mit gesättigter Luftfeuchtigkeit (*humid chamber*) statt, um Verdunstung vorzubeugen. Zur Absättigung aller unspezifischen Bindungsstellen wurden die Proben benetzend für 30 min bei RT mit Blockpuffer (5% *normal donkey serum*, *NDS* in PBS) überschichtet. In manchen Fällen kam auch ein kommerzieller Blockpuffer (*Antibody Diluent*) der Fa. Dako zum Einsatz. Anschließend wurde der Puffer vorsichtig abgesaugt und die Gewebe mit etwa 100 µl Antikörper-Verdünnung (in Blockpuffer) benetzt und für eine Stunde bei RT oder ÜN bei 4°C inkubiert. Die detektierenden Erstantikörper wurden entsprechend den Anweisungen der Hersteller angesetzt; waren dort keine Angaben zu finden, mussten zuvor mehrere Verdünnungen von 1:50 bis 1:1000 ausgetestet werden. Bei gleichzeitiger Färbungen mit mehreren Antikörpern wurde darauf geachtet, dass diese aus verschiedenen Tieren, wie etwa aus Maus, Ratte, Kaninchen, Ziege oder Hamster, stammten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min wurden die Proben mit Fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpern für eine Stunde bei RT gefärbt. Dazu wurden Sekundärantikörper der Firmen Invitrogen und Dianova eingesetzt, die 1:400 bzw. 1:100 in

PBS verdünnt wurden. Hier musste darauf geachtet werden, dass bei Mehrfachfärbungen die Zweitantikörper, die gegen die verschiedenen Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies gerichtet waren, unterschiedliche Fluorophore trugen. Überschüssige Fluoreszenzfarbstoffe wurden durch abschließendes dreimaliges Waschen im PBS entfernt. Für die Fixierung der Deckgläschen wurde auf fettfreie Objektträger ein kleiner Tropfen Fluoromount G Einbettungsmedium (Fa. Jackson Research) vorgelegt und die Gläschen mit den Zellen nach unten aufgelegt, ein wenig angedrückt und ÜN im Dunkeln getrocknet. Zur Visualisierung der Zellkerne mittels Färbung der DNA wurde dem Fluoromount G DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) in einer Verdünnung von 1:10000 zugesetzt. Waren Zellen oder Schnitte auf Objektträgern fixiert, wurde ein Tropfen Fluoromount G auf die Proben gegeben und Deckgläschen blasenfrei angedrückt. Die Lagerung der fertigen Objekte erfolgte stets bei 4°C im Dunkeln.

5.2.6.5. Analyse der Proben mittels konfokaler Mikroskopie

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbungen wurden mit Hilfe des konfokalen Laser-scanning Mikroskops TCS SP5 II der Fa. Leica durchgeführt. Das System wurde durch die Leica Software ImagePro Plus gesteuert und Aufnahmen im Format 1024x1024 dpi erstellt. Anschließend wurden die Bilder weiter mit Adobe Photoshop CS3 bearbeitet.

5.2.7. Statistische Analysen

Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen wurden mittels korreliertem oder nicht-korreliertem Student's t Test ermittelt. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean*) oder \pm SD (*standard deviation*) dargestellt, p-Werte ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

6. Ergebnisse

6.1. Die Rolle von ICER bei der nTreg-vermittelten Immunsuppression

6.1.1. Aktivierung von Tconv führt zur zytosolischen Lokalisation von ICER

Transkriptionsfaktoren werden durch verschiedene Mechanismen reguliert, wobei ihre subzelluläre Lokalisation ein wichtiger Aspekt ist. Besonders die nukleäre Translokation der NFAT-Faktoren stellt ein bekanntes zentrales Regulativ in T-Zellen dar. Deshalb sollte zunächst die Verteilung des transkriptionellen Repressors ICER im Vergleich zu NFATc1 in Immunzellen untersucht werden. Milzen von unbehandelten *wild type* Mäusen wurden in Paraffin eingebettet und die Schnitte anschließend mit Antikörpern gegen ICER/CREM, NFATc1 und CD196 gefärbt (siehe Abb. 6.1.1.). Die Färbung von CD196 (CCR6) machte eine Identifikation der Marginalzone bzw. Mantelzone der Follikel möglich, also ein Abgrenzen der B- und T-Zellbereiche. Der Antikörper, der gegen ICER (CREMSET4) generiert wurde, erkennt möglicherweise auch die in CREM-enthaltenen Epitope. Daher kann nicht zwischen ICER und CREM unterschieden werden.

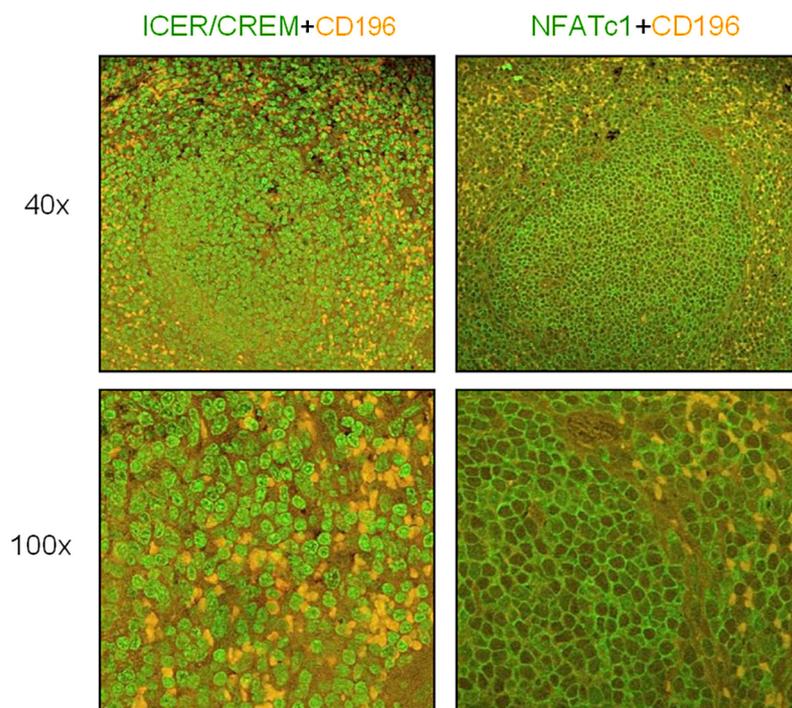


Abb. 6.1.1. Immun-histochemische Analyse der subzellulären Verteilung von ICER und NFATc1 in der Milz nicht immunisierter Mäuse. Paraffinschnitte von Milzen wurden mit Antikörpern gegen ICER/CREM, NFATc1 und CD196 gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. ICER/CREM ist in nahezu allen Zellen im Kern, NFATc1 hingegen im Zytoplasma lokalisiert.

In den histologischen Proben zeigte sich eine klare Kernfärbung für ICER/CREM, wobei NFATc1 erwartungsgemäß vorrangig im Zytoplasma der ruhenden Zellen lokalisiert. Wurden Zellen aus Milz und Lymphknoten isoliert, war dies sowohl für CD4⁺ T-Zellen als auch für Tregs zu beobachten (Abb. 6.1.2. A und B „fresh“).

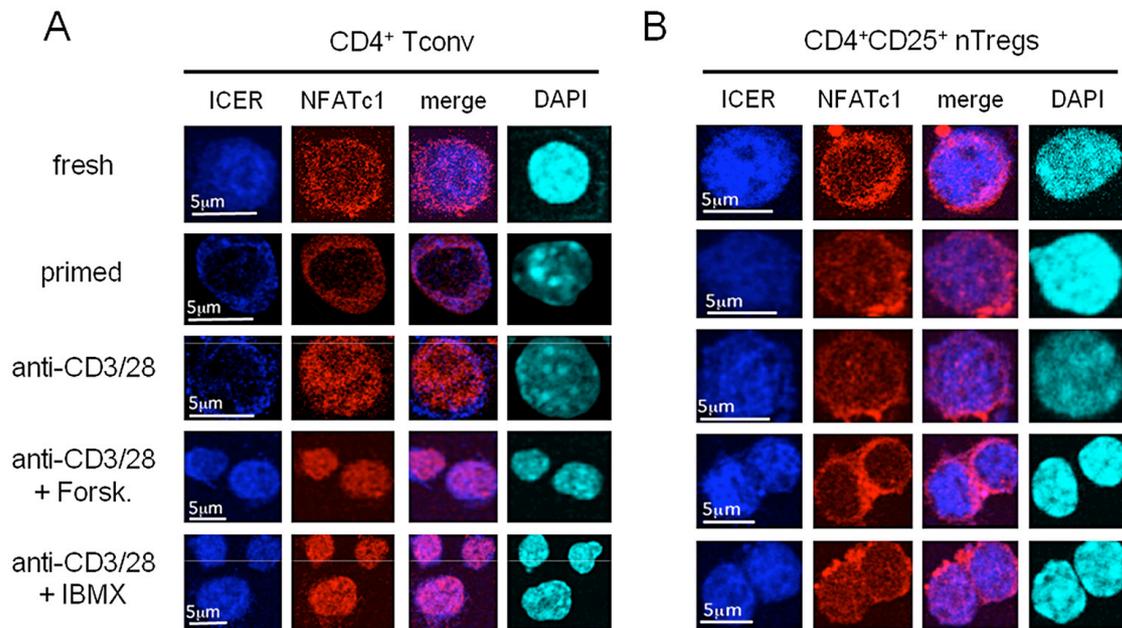


Abb. 6.1.2. ICER ist zytoplasmatisch in aktivierten konventionellen T-Zellen, aber nicht in nTregs. Konventionelle CD4⁺ T-Zellen (A) oder CD4⁺CD25⁺ nTregs (B) wurden isoliert, anschließend ICER/CREM (blau), NFATc1 (rot) sowie Chromatin (cyan) gefärbt und mit konfokaler Mikroskopie analysiert. Frisch isolierte („fresh“) Tconv und nTregs zeigen nukleäres ICER/CREM, NFATc1 hingegen ist in beiden Fällen zytoplasmatisch. Expansion dieser Zellen für 7 Tage („primed“) und Restimulation mittels anti-CD3/CD28 Antikörpern für 4 h („anti-CD3/28“) brachte ICER/CREM ins Zytoplasma von Tconv, in nTregs blieb ICER aber stets im Nukleus. Gleichzeitige Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Forskolin („Forsk.“) oder IBMX („IBMX“) führte hingegen zur Kerntranslokation von ICER/CREM in konventionellen T-Zellen. Stimulation von Tconv mit anti-CD3/CD28 Antikörpern führte (auch in Gegenwart von Forskolin und IBMX) zu einer klaren Kernlokalisierung von NFATc1. Dies war in regulatorischen T-Zellen nicht zu beobachten.

Eine siebentägige Expansion beider T-Zelltypen mittels anti-CD3/CD28 Stimulation („primed“) führte zu einer zytoplasmatischen Anreicherung von ICER/CREM in Tconv, in Tregs war ICER/CREM aber (weiter) im Kern lokalisiert. Auch eine Restimulation mittels monoklonaler anti-CD3/CD28 Antikörper („anti-CD3/28“) für 4 h änderte die subzelluläre Verteilung von ICER/CREM in beiden Zellpopulationen nicht. Über eine Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin, das zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt („anti-CD3/28+Forsk.“), wurde ICER/CREM in den Kern von aktivierten Tconv transloziert. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch durch IBMX (3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin) erzielt („anti-CD3/28+IBMX“). IBMX hemmt dabei die zellulären Phosphodiesterasen und führt ebenfalls zu einem (langsamen) Ansteigen des cAMP-Gehaltes

in der Zelle. In nTregs war ICER/CREM unter allen Bedingungen nukleär lokalisiert. Stimulation von Tconv mit anti-CD3/CD28 Antikörpern führte (auch in Gegenwart von Forskolin und IBMX) zu einer klaren Kernlokalisierung von NFATc1. Gegensätzlich dazu zeigten Tregs nur eine schwache NFATc1-Färbung im Nukleus nach Aktivierung mit anti-CD3/CD28. Um die in Abb. 6.1.2 gezeigten repräsentativen Mikrographien quantitativ auszuwerten, wurden etwa 100 Zellen von mindestens drei unabhängigen Versuchen analysiert und zusammengefasst (Abb. 6.1.3.).

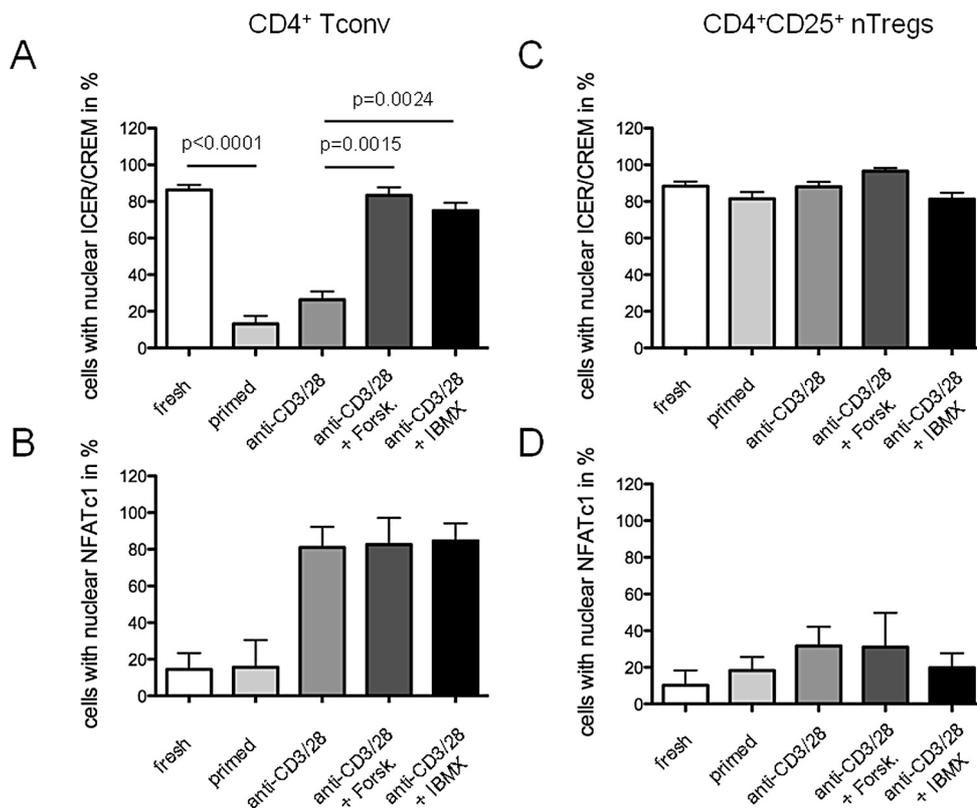


Abb. 6.1.3. Quantifizierung der Verteilung von ICER/CREM und NFATc1 in konventionellen und regulatorischen T-Zellen. Auswertung der unter Abb. 6.1.2 gezeigten mikroskopischen Daten (etwa 100 Zellen aus drei unabhängigen Versuchen). Die subzelluläre Lokalisation von ICER/CREM (A und C) und NFATc1 (B und D) ist in „Prozent der Zellen mit einer (deutlichen) Kernfärbung“ angegeben. Stimulation von Tconv (A und B) führte zu einer Änderung der ICER- bzw. NFATc1-Verteilung, in nTregs hingegen (C und D) war kaum eine nukleäre Translokation von NFATc1 oder ICER/CREM zu beobachten.

Dazu wurden mindestens 100 Zellen von drei unabhängigen Versuchen hinsichtlich der subzellulären Verteilung von ICER/CREM bzw. NFATc1 ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in Prozent als „Zellen mit deutlicher Kernfärbung von ICER oder NFATc1“ dargestellt (Abb. 6.1.3). Frisch isolierte Tconv sowie Tregs zeigen eine nukleäre Lokalisation von ICER/CREM (A und C, „fresh“). Expansion („primed“) oder Stimulation durch anti-

CD3/CD28 monoklonale Antikörper („anti-CD3/28“) translozierte ICER ins Zytoplasma in Tconv, in nTregs hingegen bleibt ICER stets im Kern. Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Forskolin („anti-CD3/28+Forsk.“) oder IBMX („anti-CD3/28+IBMX“) (re-) dirigiert ICER in den Nukleus. Aktivierung von Tconv mittels anti-CD3/CD28 Antikörpern (auch in Gegenwart von Forskolin und IBMX) transloziert NFATc1 in den Kern, in nTregs war dieser Effekt allerdings nicht zu beobachten.

6.1.2. Der Transport von ICER ins Zytoplasma wird durch CD28 beeinflusst

Um die Frage zu klären, inwiefern die Kostimulation durch CD28 an der Translokation von ICER/CREM ins Zytoplasma beteiligt ist, wurden T-Zellen von CD28-defizienten (*Cd28*^{-/-}) Mäusen verwendet. Isolierte konventionelle T-Lymphozyten (CD4⁺CD25⁻) von *wild type* und *Cd28*^{-/-} Mäusen wurden drei Tage mit anti-CD3 und anti-CD28 monoklonalen Antikörpern stimuliert. Nach Fixierung konnte die Verteilung von ICER/CREM bzw. NFATc1 mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert werden (Abb. 6.1.4.).

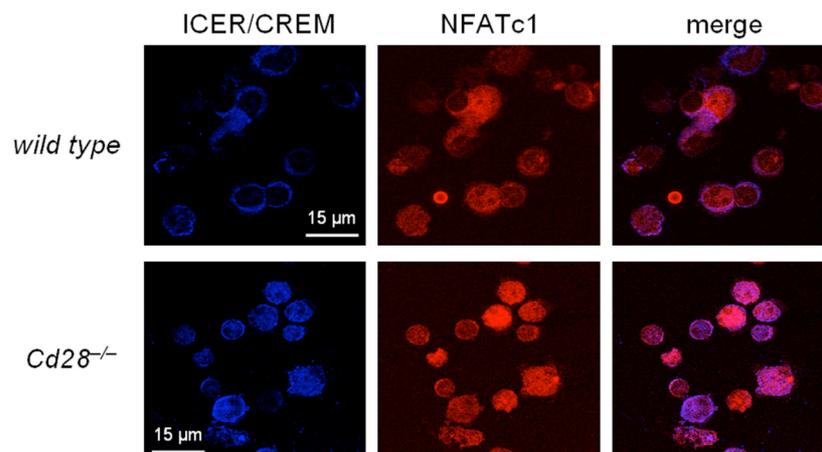


Abb. 6.1.4. Der Transport von ICER/CREM wird durch CD28-Kostimulation beeinflusst. Konventionelle T-Zellen von *wild type* und *Cd28*^{-/-} Mäusen wurden für drei Tage mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert (entspricht „primed“), anschließend fixiert und die Verteilung von ICER/CREM (blau) bzw. NFATc1 (rot) mikroskopisch analysiert. In den *wild type* Zellen zeigte sich eine deutliche zytoplasmatische Lokalisation von ICER, in den CD28-defizienten Zellen war dies nur teilweise zu beobachten. Die Lokalisation von NFATc1 war hingegen unverändert.

Entsprechend der Befunde unter 6.1.1. war in *wild type* T-Zellen ICER/CREM nach Primärstimulation nahezu vollständig im Zytoplasma detektierbar. In CD28-defizienten T-Zellen hingegen konnte nur eine teilweise zytoplasmatische Lokalisation von ICER nachgewiesen werden, ein großer Teil war (immer noch) im Kern. Die Verteilung von NFATc1 war in beiden Genotypen jedoch unverändert. Es ist also anzunehmen, dass

Kostimulation durch CD28 (teilweise) an der Regulation der subzellulären Verteilung von ICER beteiligt ist.

6.1.3. Erhöhte cAMP-Konzentration in regulatorischen T-Zellen

ICER ist ein cAMP-regulierter Transkriptionsfaktor, dessen subzelluläre Verteilung auch durch die Konzentration von intrazellulären cAMP bestimmt wird. In diesem Zusammenhang wurden konventionelle ($CD4^+CD25^-$) und regulatorische ($CD4^+CD25^+$) T-Zellen isoliert und, wie unter Punkt 6.1.1. beschrieben, stimuliert. Der intrazelluläre Gehalt an cAMP wurde anschließend mittels ELISA bestimmt (Abb. 6.1.5. A). nTregs wiesen im Vergleich zu Tconv (auch unstimuliert) einen deutlich erhöhten Gehalt an cAMP auf. Durch Stimulation mit Forskolin und IBMX ließ sich die cAMP-Konzentration in Tconv bis zu 20fach steigern. Dennoch erreichten diese nicht das hohe Niveau der nTregs.

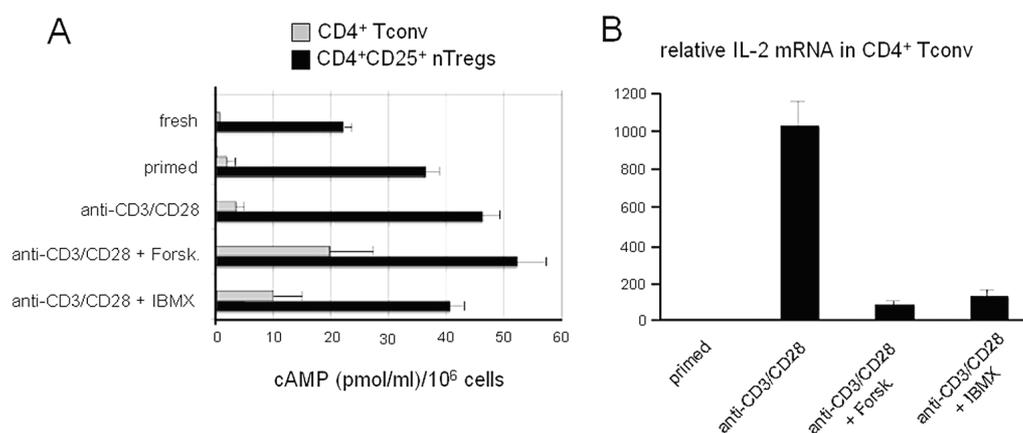


Abb. 6.1.5. Erhöhter cAMP-Gehalt in regulatorischen T-Zellen und Hemmung von *IL2* durch cAMP. (A) Konventionelle (graue Balken) und regulatorische T-Zellen (schwarze Balken) wurden, wie unter Punkt 6.1.1. beschrieben, stimuliert und der Gehalt an intrazellulärem cAMP mittels ELISA analysiert. Zwar kann durch Forskolin und IBMX die cAMP-Konzentration in Tconv erhöht werden, erreicht aber nicht die deutlich höheren Werte in nTregs. (B) cAMP supprimiert die *IL2* Transkription in Tconv. Konventionelle T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28 stimuliert und *IL2* mittels RT-PCR nachgewiesen. Gleichzeitige cAMP-Erhöhung durch Forskolin und IBMX hemmt die stimulations-abhängige IL-2 Produktion. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Tobias Bopp und Dr. Matthias Klein (Institut für Immunologie, Universität Mainz) durchgeführt.

Durch einen erhöhten intrazellulären cAMP-Gehalt kommt es in Tconv zu einer Hemmung der Proliferation und der *IL2* Synthese (279). Ob die Kerntranslokation von ICER/CREM mit einer Suppression korreliert, wurde anhand der *IL2* Transkription untersucht (Abb. 6.1.5.B). Nach Stimulation mit anti-CD3/CD28 monoklonalen Antikörpern kam es in Tconv zu einer deutlichen Induktion der *IL2* Transkription, während die gleichzeitige Erhöhung von cAMP durch Forskolin und IBMX hingegen zu einer Hemmung der IL-2 Synthese führte. Die

Stimulation von T-Zellen in Gegenwart von Forskolin oder IBMX erhöht also die cAMP Konzentration, woraufhin ICER in den Kern transloziert, was mit einer Hemmung von *Il2* korreliert.

6.1.4. Direkter Kontakt zu nTregs (re-) dirigiert ICER in den Kern von Tconv *in vivo*

Wie unter Punkt 6.1.3. gezeigt, weisen nTregs einen hohen Gehalt an cAMP auf. Durch direkten Zell-Zell-Kontakt können kleine Signalmoleküle, wie etwa cAMP, durch *gap junctions* ausgetauscht werden (126, 127). Um diese Art der zellulären Kommunikation zu untersuchen, wurde der Vitalfarbstoff Calcein eingesetzt: Das Zellwand-permeable Calcein diffundiert als nicht-fluoreszierende Substanz in das Zytoplasma von Zellen und wird nach Hydrolyse eines Acetoxymethylesters durch zelluläre Esterasen in das fluoreszierende Calcein umgewandelt. Dieses kann nun nicht mehr durch die Zellwand diffundieren. Werden aber *gap junctions* zwischen zwei Zellen ausgebildet, kann das lösliche Calcein von einer in eine andere Zelle weitergegeben werden. Der Transfer von Calcein kann dann durchflusszytometrisch verfolgt werden (Abb. 6.1.6.).

Anhand dieser Technik sollte der Effekt von cAMP auf ICER in einem experimentellen Mausmodell untersucht werden. Dazu wurden CD90.1⁺Rag2^{-/-}OT-II Mäuse, die OVA-spezifische T-Zellen, aber keine endogenen nTregs aufweisen, immunisiert, indem OVA₃₂₃₋₃₃₉ subkutan (s.c.) in die hintere Fußsohle appliziert wurde. Sechs Stunden später wurden Calcein-beladene CD90.2⁺ nTregs intravenös (i.v.) transferiert. 24 Stunden nach Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die afferenten (*draining*), sowie nicht beteiligte (*non-draining*) Lymphknoten präpariert und der Gehalt an Calcein in den CD90.1⁺ Tconv mittels FACS-Analyse bestimmt (Abb. 6.1.6. A, B und C). In den nicht an der Immunreaktion beteiligten *non-draining* Lymphknoten fand keine Übertragung von Calcein in Tconv statt (A), während in den afferenten Lymphknoten ein deutlicher Transfer von Calcein aus den nTregs in die Tconv zu messen war (Abb. 6.1.6. B). Ein Histogramm verdeutlicht den unterschiedlichen Gehalt an Calcein in CD90.1⁺ Tconv aus den afferenten (blaue Linie) und nicht beteiligten Lymphknoten (Abb. 6.1.6. C, rote Linie). Anschließend wurden die beiden Populationen (Calcein-high und Calcein-low, siehe Abb. 6.1.6. A) aus afferenten Lymphknoten mittels eines FACS-Sorters isoliert. Der Gehalt an intrazellulärem cAMP wurde in beiden Populationen durch ELISA bestimmt (Abb. 6.1.6. D). Desweiteren wurde die Expression von *Il2* mittels RT-PCR analysiert (Abb. 6.1.6. E).

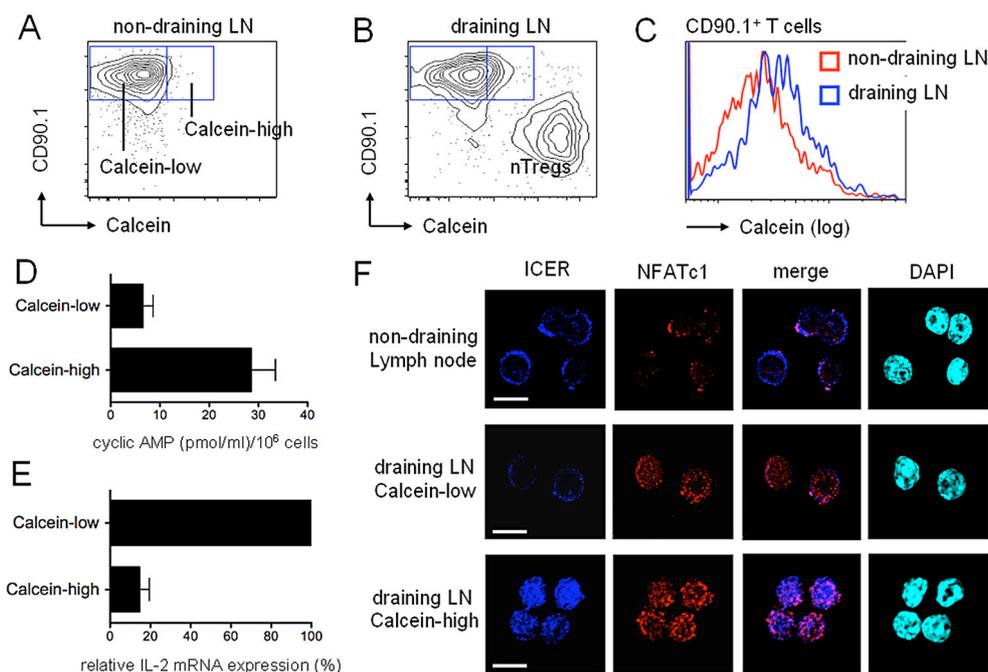


Abb. 6.1.6. Direkter Kontakt zu nTregs dirigiert ICER in einem cAMP-abhängigen Prozess in den Kern von Tconv. (A und B) Calcein-Transfer von nTregs in Tconv *in vivo*. CD90.1⁺Rag2^{-/-}OT-II Mäusen (besitzen keine endogenen nTregs) wurden OVA-Peptid in die Fußsohlen *s.c.* appliziert. 6 h später wurden congenene (CD90.2⁺) Calcein-beladene nTregs *i.v.* transfertiert. 24 h nach Immunisierung wurden die Mäuse getötet und der Gehalt an Calcein in CD90.1⁺ Tconv von afferenten (B) und unbeteiligten (A) Lymphknoten im FACS analysiert. (C) Histogramm-Darstellung des Calcein-Gehaltes von Tconv (CD90.1⁺) aus afferenten (*draining*) und unbeteiligten (*non-draining*) Lymphknoten. (D) Calcein-high und Calcein-low CD90.1⁺ Tconv wurden mit Hilfe eines FACS-Sorters isoliert und die Konzentration an intrazellulärem cAMP wurde mittels ELISA bestimmt. (E) Ebenso wurde die Expression von *Il2* durch RT-PCR analysiert. (F) Immunfluoreszenz von unbeteiligten Lymphozyten (*non-draining*), sowie isolierten Calcein-low und Calcein-high T-Zellen. Nur in den Calcein-high T-Zellen zeigte sich eine klare ICER/CREM bzw. NFATc1 Kernfärbung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein direkter Kontakt zu nTregs den cAMP-Gehalt in Tconv erhöht, gefolgt von einer *Il2* Suppression, sowie einer Kerntranslokation von ICER/CREM. Dieser Versuch wurde in enger Zusammenarbeit mit Dr. Tobias Bopp in Mainz durchgeführt.

Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Konzentration von cAMP in den Calcein-high Tconv, wobei die *Il2*-mRNA war in dieser Population hingegen stark reduziert war. Die isolierten Calcein-low und Calcein-high T-Zellpopulationen, sowie T-Zellen aus *non-draining* Lymphknoten, wurden auf Objektträger fixiert und anschließend hinsichtlich der subzellulären ICER/CREM- bzw. NFATc1-Verteilung mikroskopisch analysiert (F). Die nicht mit nTregs in Kontakt getretenen *non-draining* und Calcein-low Tconv wiesen eine klare zytoplasmatische Lokalisation von ICER/CREM auf, während die Calcein-high CD90.1⁺ Tconv eine deutliche ICER-Kernfärbung zeigten. NFATc1 war in beiden Populationen aus den afferenten Lymphknoten nukleär, in den nicht an einer Immunreaktion beteiligten *non-draining* Lymphozyten dagegen im Zytoplasma lokalisiert. Zusammenfassend

lässt sich feststellen, dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen nTregs und Tconv *in vivo* einen Transfer von Calcein und cAMP ermöglichte. Entsprechend zeigten Calcein-high Tconv einen erhöhten cAMP-Gehalt bei gleichzeitiger Suppression von *Il2*. Korrespondierend war ICER/CREM im Kern von supprimierten Tconv (Calcein-high) lokalisiert, während nicht-gehemmte Tconv (Calcein-low) eine zytoplasmatische Färbung von ICER zeigten.

6.1.5. Depletion von nTregs *in vivo* dirigiert ICER ins Zytoplasma von Tconv

Um die Funktion von Tregs *in vivo* zu untersuchen, wurden sogenannte DEREK-Mäuse (*Depletion of regulatory T cells*) generiert (32), in denen man Tregs systemisch eliminieren kann. Dieses Tiermodell exprimiert unter Kontrolle eines BAC-transgenen *Foxp3*-Genlokus sowohl den humanen Diphtherietoxin- (DT)-Rezeptor als auch ein GFP-Reporterprotein. Da der humane DT-Rezeptor folglich einzig auf $Foxp3^+$ nTregs zu finden ist, können die Tregs gezielt durch Injektion von DT eliminiert werden. Um nun die subzelluläre Verteilung von ICER in Abwesenheit von nTregs zu klären, wurde den DEREK-Mäusen täglich 1 μ g DT intraperitoneal (i.p.) injiziert und die Behandlung täglich über eine Gesamtdauer von fünf Tagen wiederholt. Die Depletion der nTregs wurde anschließend mittels FACS-Analyse verifiziert. Typischerweise waren nach fünftägiger DT-Behandlung weniger als 0.3% $CD4^+CD25^+GFP^+$ nTregs in Milz und Lymphknoten der Tiere nachzuweisen (Abb. 6.1.7). Eine Stimulation der T-Zellen in An- und Abwesenheit von nTregs (durch Gabe von DT) erfolgte durch i.p. Applikation von 100 μ g anti-CD28 superagonistischem Antikörper (CD28SA). Dieser Antikörper zeigt im Gegensatz zu konventionellen CD28 Antikörpern die besondere Fähigkeit, ohne zusätzliche Stimulation des TCR eine volle Aktivierung von T-Zellen herbeizuführen (294). Drei Tage nach CD28SA Injektion wurden die DEREK-Mäuse getötet und die $CD4^+GFP^-$ Tconv aus den Lymphknoten mittels FACS-Sortierung isoliert. Die Zellen wurden auf Objektträger fixiert und anschließend immun-histochemisch gefärbt. Die subzelluläre Verteilung von ICER/CREM bzw. NFATc1 wurde durch konfokale Mikroskopie analysiert (Abb. 6.1.8). Aktivierung der T-Zellen in Gegenwart von nTregs („CD28SA“) zeigte eine ausgeprägte Kernfärbung von ICER, Abwesenheit von nTregs während der CD28SA-Stimulation („DT+CD28SA“) führte hingegen zu einer zytoplasmatischen Verteilung.

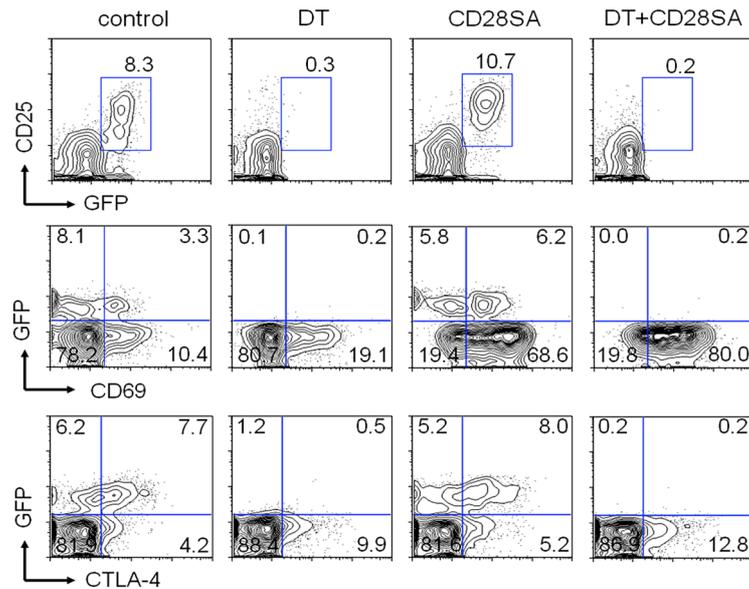


Abb. 6.1.7. Depletion von nTregs in DEREГ-Mäusen bei gleichzeitiger Aktivierung der T-Zellen durch CD28SA. Durch Gabe von Diphtherietoxin (DT) über fünf Tage wurden GFP⁺CD25⁺CTLA-4⁺ nTregs in DEREГ-Mäusen eliminiert. Gleichzeitige Injektion von CD28SA führte zu einer starken Expression des Aktivierungsmarkers CD69. Gezeigt sind FACS-Analysen von vorisolierten CD4⁺ T-Zellen. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Dr. Tea Gogishvili durchgeführt.

Dieser Befund wurde auch durch Analyse von etwa 30 CD4⁺ T-Zellen aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils vier Mäusen quantifiziert (Abb. 6.1.8. B und C). Die Ergebnisse sind als „Prozent der Zellen mit einer (deutlichen) ICER/CREM-Kernfärbung“ (B) und als „Stärke des ICER/CREM-Fluoreszenzsignals pro Zelle (MFI)“ (C) dargestellt. Interessanterweise war die Färbung von NFATc1 in allen Fällen zytoplasmatisch, jedoch fiel auf, dass in der Kohorte der CD28SA-behandelten Mäuse in Gegenwart von nTregs („CD28SA“) eine reduzierte NFATc1-Gesamtexpression zu beobachten war.

Um die Auswirkung der Treg-Depletion bei gleichzeitiger CD28SA-Behandlung *in vivo* zu untersuchen, wurde sowohl der Gehalt an IL-2 und TNF α als auch die Histologie der Milz analysiert. Drei Tage nach CD28SA-Injektion wurden die Milzen der DEREГ-Mäuse in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die anschließende Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Mikroschnitte gab Aufschluss über eine möglicherweise fehlgesteuerte Immunreaktion. Tatsächlich führte die Depletion der nTregs bei simultaner Aktivierung der T-Zellen durch CD28SA zu einer Vergrößerung der Marginalzonenbereiche (Abb. 6.1.9. A „DT+CD28SA“, gekennzeichnet durch zwei schwarze Pfeile).

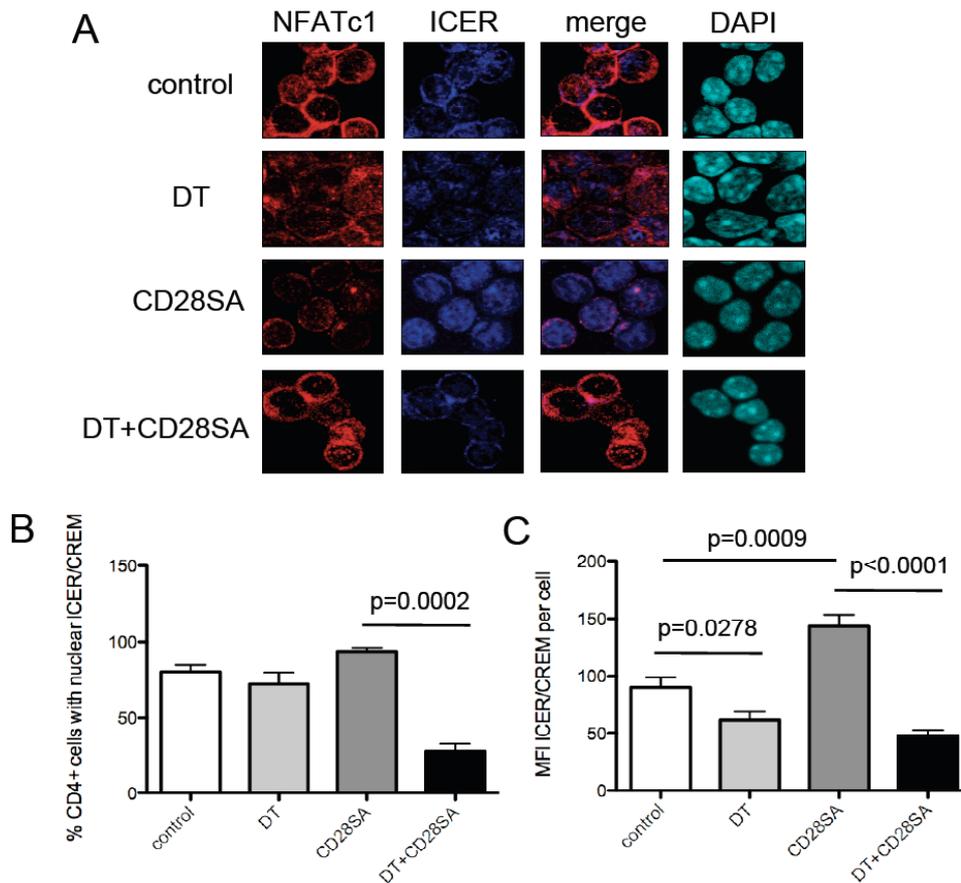


Abb. 6.1.8. nTregs dirigieren ICER/CREM in den Kern aktivierter T-Zellen.

(A) Regulatorische T-Zellen wurden in DEREK Mäusen durch Gabe von DT depletiert, anschließend wurde CD28SA injiziert. Nach drei Tagen wurden die Mäuse getötet und GFP⁻ Tconv mittels FACS-Sort aus den Lymphknoten isoliert. Die T-Zellen wurden fixiert und die Verteilung von ICER bzw. NFATc1 wurde anhand konfokaler Immunfluoreszenz analysiert. Tconv aus Treg-depletierten und CD28SA-behandelten Mäusen („DT+CD28SA“) zeigten eine zytoplasmatische Verteilung von ICER, in Gegenwart von nTregs („CD28SA“) war ICER/CREM hingegen im Kern. (B und C) Quantitative Auswertung der unter A gezeigten mikroskopischen Daten (etwa 30 Zellen aus zwei unabhängigen Versuchen). Die subzelluläre Lokalisation von ICER in „Prozent der Zellen mit einer (deutlichen) Kernfärbung“ (B) und die „Stärke des Fluoreszenzsignals pro Zelle (MFI)“ (C) wurden analysiert.

Die Expansion der Marginalzonen ließ auf eine „überschießende“ Immunreaktion nach Aktivierung in Abwesenheit von nTregs schließen, während die Applikation von CD28SA („CD28SA“) oder DT allein („DT“) der unbehandelten Kontrolle vergleichbar war. Weiterhin wurde den Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten (1.5, 3 und 4 Stunden nach CD28SA Injektion) Blut abgenommen und der Gehalt an IL-2 und TNF α im Serum mittels ELISA bestimmt (Abb. 6.1.9. B und C). Sowohl IL-2 als auch TNF α war bei den „DT+CD28SA“-behandelten Mäusen gegenüber den nur mit CD28SA-stimulierten Mäusen deutlich erhöht. Übereinstimmend mit einer überschießenden Immunreaktion wurde ICER/CREM im Zytoplasma zurückgehalten. Eine Aktivierung der T-Zellen in Anwesenheit von nTregs (ohne

DT) führte hingegen zu einer Kerntranslokation von ICER/CREM und dementsprechend moderaten Immunantwort.

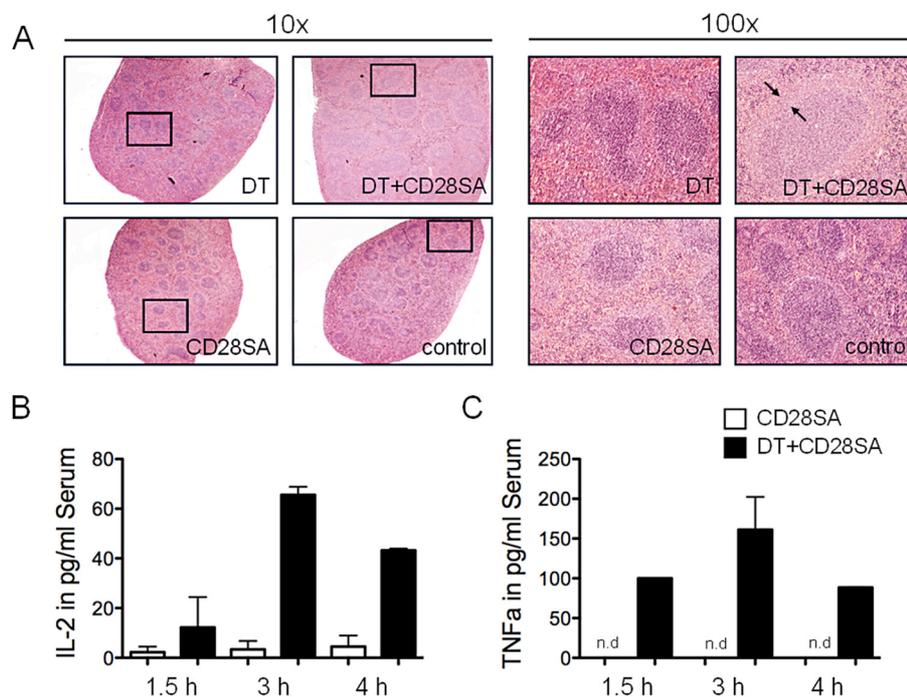


Abb. 6.1.9. Depletion von nTregs bei gleichzeitiger CD28SA-Behandlung führt zu einer verstärkten Immunreaktion. (A) Regulatorische T-Zellen wurden in DEREK-Mäusen durch Gabe von DT depletiert, anschließend wurde CD28SA injiziert. Architektur der Milz drei Tage nach CD28SA-Behandlung. Vergrößerung der Marginalzonen (schwarze Pfeile) in Treg-depletierten und CD28SA-behandelten Mäusen („DT+CD28SA“) deutet auf eine unkontrollierte Immunreaktion hin. (B und C) Analyse von IL-2 (B) und TNF α (C) im Serum mittels ELISA 1.5, 3 und 4 Stunden nach CD28SA-Injektion. Erhöhte IL-2 und TNF α Werte in den „DT+CD28SA“ Mäusen zeigten die supprimierende Funktion von nTregs bei einer CD28SA-provozierten Immunreaktion an (n.d.: nicht detektierbar).

6.1.6. Direkter Kontakt zu nTregs dirigiert ICER in den Kern von B-Zellen

Neben der Suppression von T-Lymphozyten sind nTregs auch in der Lage, die Funktion von B-Zellen zu beeinflussen (295, 296). Um zu überprüfen, ob eine *gap junction* bzw. cAMP-vermittelte Aktivierung von ICER auch für suppressierte B-Zellen zutrifft, sollte zunächst geklärt werden, inwiefern nTregs überhaupt mit B-Zellen in Kontakt treten können. Immunhistochemische Analysen von Milzen unbehandelter *wild type* Mäuse ergaben, dass sich zahlreiche Foxp3⁺ Tregs innerhalb der B-Zell-Zone befinden (Abb. 6.1.10, A, weiße Pfeile). CD20 ist auf B-Zellen exprimiert und ermöglichte über eine anti-CD20-Färbung die Abgrenzung der B-Zell-Follikel. Daraus lässt sich schließen, dass nTregs *in vivo* durchaus mit B-Zellen in Kontakt treten und folglich auch deren Effektorfunktionen hemmen können.

Um einen möglichen Einfluss von cAMP bei der nTreg-vermittelten Suppression von B-Zellen genauer zu untersuchen, wurde diesmal ein Calcein-Transfer von nTregs in B-Zellen analysiert (Abb. 6.1.10. B). Die allogene A20J B-Zelllinie (H^2K^d) wurden mit Calcein-beladenen und mit anti-CD3/CD28-aktivierten nTregs (H^2K^k) für vier Stunden kokultiviert. Anschließend wurde der Gehalt an Calcein in den B-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert: Eine deutliche Zunahme an Calcein-high B-Zellen wurde in Kokultur mit nTregs festgestellt, nicht aber in der Kontrolle ohne Tregs (Abb. 6.1.10.). Dies deutet auf eine direkte Zell-Zell-Kommunikation einschließlich eines möglichen cAMP-Transfers von nTregs in B-Lymphozyten hin.

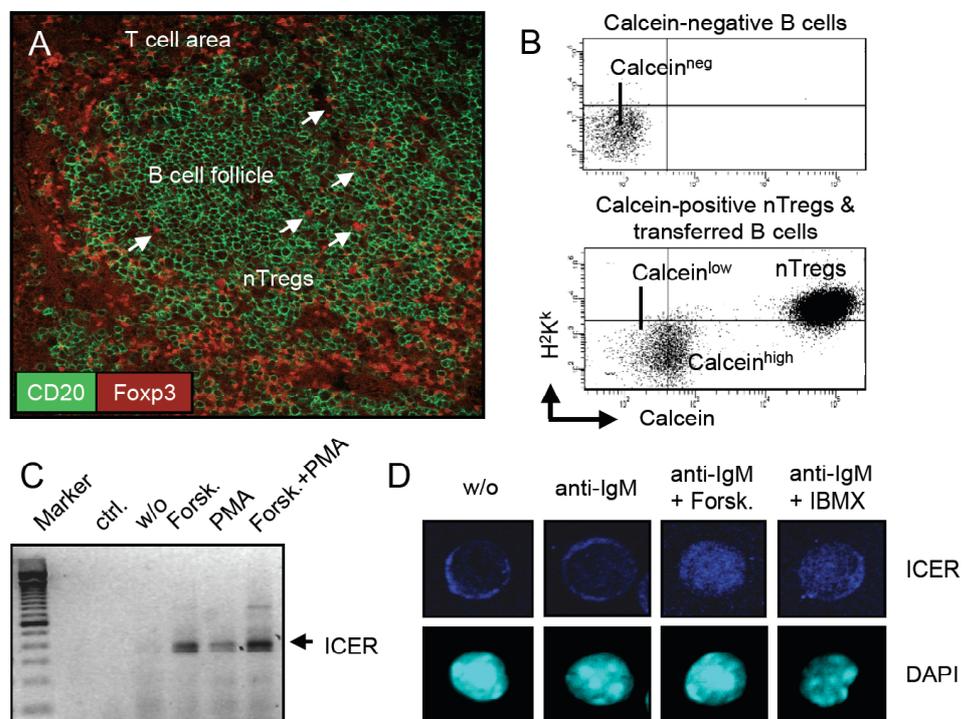


Abb. 6.1.10. Kommunikation zwischen nTregs und B-Zellen reguliert eine mögliche cAMP-induzierte Kerntranslokation von ICER. (A) Immun-histochemische Analyse einer Interaktion von Foxp3⁺ Tregs (rot, markiert durch weiße Pfeile), und CD20⁺ B-Zellen (grün). (B) Calcein-Transfer zwischen nTregs und allogenen B-Zellen *in vitro*. Calcein-beladene voraktivierte nTregs (H^2K^k) wurden mit A20J B-Zellen (H^2K^d) für 4 h kultiviert, der Transfer von Calcein wurde anschließend mittel FACS analysiert. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Tobias Bopp durchgeführt. (C und D) ICER kann durch eine erhöhte cAMP-Konzentration induziert und in den Kern transloziert werden. (C) RT-PCR der ICER Expression von CD19⁺ B-Zellen nach Stimulation mit PMA und/oder Forskolin. (D) Immunfluoreszenz der subzellulären Verteilung von ICER/CREM in aktivierten IgM⁺ B-Zellen. Erhöhter cAMP-Gehalt („anti-IgM+Forsk.“ oder „anti-IgM+IBMX“) führt zu einer Kerntranslokation von ICER in IgM-aktivierten B-Zellen.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine erhöhte cAMP-Konzentration in B-Zellen zur Induktion von ICER führt und/oder dessen subzelluläre Lokalisation beeinflusst. Isolierte

primäre CD19⁺ B-Zellen wurden mit Forskolin, PMA oder einer Kombination aus beiden drei Stunden stimuliert, und die Expression von ICER wurde anschließend mittels RT-PCR bestimmt (Abb. 6.1.10. C). In ruhenden B-Zellen war keine *Icer*-mRNA nachweisbar. Durch PMA, aber noch deutlicher durch Forskolin konnte eine Expression von ICER induziert werden. Die höchste Induktion an *Icer*-mRNA wurde durch die gleichzeitige Stimulation von PMA und Forskolin erreicht. Die Menge und Verteilung des ICER-Proteins wurde mit Hilfe konfokaler Immunfluoreszenz bestimmt (Abb. 6.1.10. D).

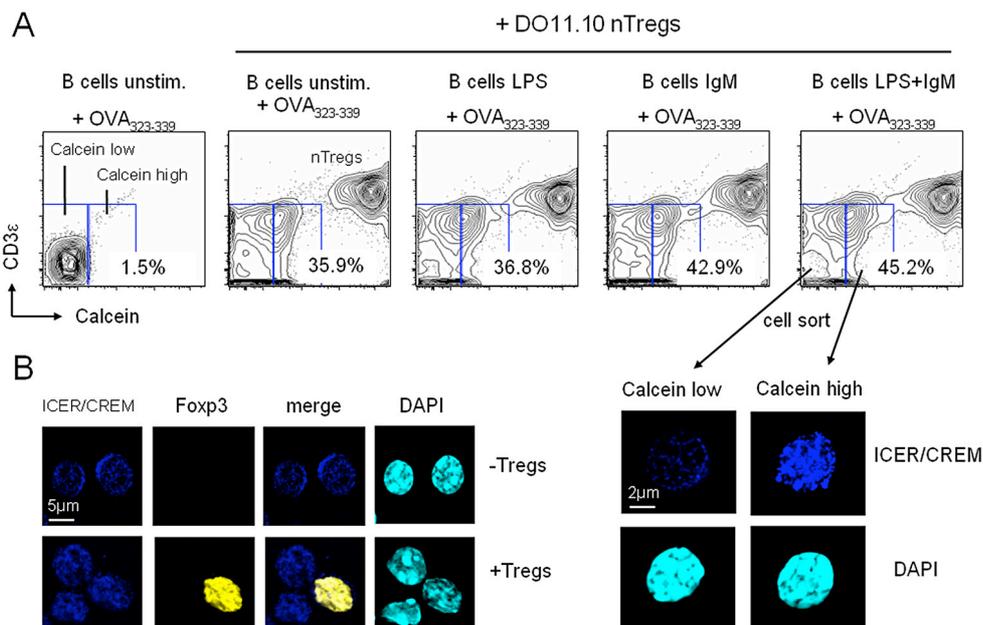


Abb. 6.1.11. Zell-Zell-Kommunikation zwischen nTregs und B-Zellen führt zur Kerntranslokation von ICER. (A) Calcein-Transfer zwischen nTregs und unterschiedlich aktivierten B-Zellen *in vitro*. OVA-spezifische DO11.10 nTregs wurden mit Calcein beladen, die B-Zellen UN mit LPS, anti-IgM oder einer Kombination aus beiden voraktiviert und anschließend mit Ovalbumin beladen. Der Transfer von Calcein aus den nTregs in B-Zellen wurde nach 4 h Kokultur mittels FACS analysiert. Calcein-low und Calcein-high B-Zellen der „LPS+ IgM“-stimulierten Kultur wurden anschließend mit Hilfe eines FACS-Sorters isoliert, und die subzelluläre Verteilung von ICER/CREM wurde analysiert. Die immun-histochemische Auswertung zeigte eine klare Kernfärbung von ICER in den Calcein-high B-Zellen, in den Calcein-low Zellen war ICER/CREM hingegen zytoplasmatisch. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Tobias Bopp durchgeführt. (B) Direkter Kontakt zu nTregs führt zur Kerntranslokation von ICER in B-Zellen. Kokultur von aktivierten Foxp3⁺ nTregs (gelbe Färbung) mit aktivierten B-Zellen führte zu einer Kernfärbung von ICER/CREM („+Tregs“), Kokultur mit Tconv zeigte hingegen eine zytoplasmatische Lokalisation von ICER („-Tregs“).

Isolierte IgM⁺ B-Zellen wurden vier Stunden über ihren BCR mit und ohne Induktion von cAMP („anti-IgM“, „anti-IgM+Forskolin“ oder „anti-IgM+IBMX“) stimuliert, anschließend auf Objektträger fixiert, und die Lokalisation von ICER/CREM wurde immun-histochemisch analysiert. Unstimulierte („w/o“) und anti-IgM-aktivierte B-Zellen zeigten ICER im Zytoplasma, während die gleichzeitige Behandlung mit Forskolin oder IBMX zu einer

deutlichen Kernfärbung von ICER/CREM führte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Zell-Zell-Kontakt-abhängige Kommunikation zwischen nTregs und B-Zellen wahrscheinlich ist und durch eine steigende cAMP-Konzentration in B-Zellen sowohl die Expression von ICER als auch dessen Kerntranslokation induziert.

Um die Treg-B-Zell-Kommunikation genauer zu untersuchen, wurden B-Zellen „negativ“ aufgereinigt und ÜN mit LPS, anti-IgM oder einer Kombination beider aktiviert. Die B-Zellen wurden 30 min mit dem Ovalbumin-Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladen und anschließend mit OVA-spezifischen DO11.10 nTregs kokultiviert. Die nTregs mussten vor dem Versuch mit dem Vitalfarbstoff Calcein beladen werden. Nach vier Stunden B-Zell-Treg-Kokultur wurde der Calcein-Transfer von Tregs in B-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 6.1.11. A). Ein deutlicher Anteil an B-Zellen war Calcein-high in Anwesenheit von nTregs. Waren die B-Zellen über den BCR stimuliert, nahm der Anteil an Calcein-high B-Zellen noch zu. Zusätzlich wurden aus der „anti-IgM+LPS“ Kultur die Calcein-low und Calcein-high B-Zell-Populationen mit Hilfe eines FACS-Sorters isoliert. Beide Populationen wurden auf Objektträger fixiert und anschließend hinsichtlich der subzellulären Verteilung von ICER/CREM analysiert. Konfokale Mikroskopie zeigte in den Calcein-low B-Zellen eine ausgeprägte zytoplasmatische, in den Calcein-high B-Zellen hingegen eine klare nukleäre Lokalisation (Abb. 6.1.11. A, unten). Weiter wurden aktivierte B-Zellen mit anti-CD3/CD28-stimulierten nTregs („+Tregs“) oder mit Tconv („-Tregs“) ÜN kokultiviert, fixiert, und die Lokalisation von ICER/CREM wurde immun-histochemisch analysiert (Abb. 6.1.11. B). Die Kokultur von Foxp3⁺ nTregs („+Tregs“, gelbe Färbung), nicht aber der Kontakt zu Tconv („-Tregs“), führte in B-Lymphozyten zu einer erkennbaren Kerntranslokation von ICER. nTregs können also über direkten Zell-Zell-Kontakt mit B-Zellen kommunizieren und sowohl die ICER-Expression als auch die ICER-Kerntranslokation induzieren.

6.1.7. nTregs hemmen die Proliferation und CD80-Expression von B-Zellen

Um eine ICER-vermittelte B-Zell-Immunsuppression durch nTregs weiter zu untersuchen, sollten die B-Zellen genauer charakterisiert werden. Dazu wurden IgM⁺-isolierte B-Zellen ÜN mit nTregs kokultiviert und anschließend die Expression der B7-Korezeptoren CD80/CD86 sowie das Proliferationsverhalten der B-Zellen analysiert (Abb. 6.1.12.). Anti-CD3/CD28-aktivierte nTregs wurden mit unstimulierten („unstim.“) oder anti-IgM-stimulierten B-Zellen („Treg“) im Verhältnis 1:1 ÜN kultiviert, als Kontrolle dienten anti-IgM-aktivierte B-Zellen ohne Tregs („mock“). Sowohl die Expression von CD80 als auch

CD86 nahm durch Stimulation mit anti-IgM zu. Die Expression von CD80 wurde durch Kokultur mit Tregs signifikant gehemmt (Abb. 6.1.12. A bis D).

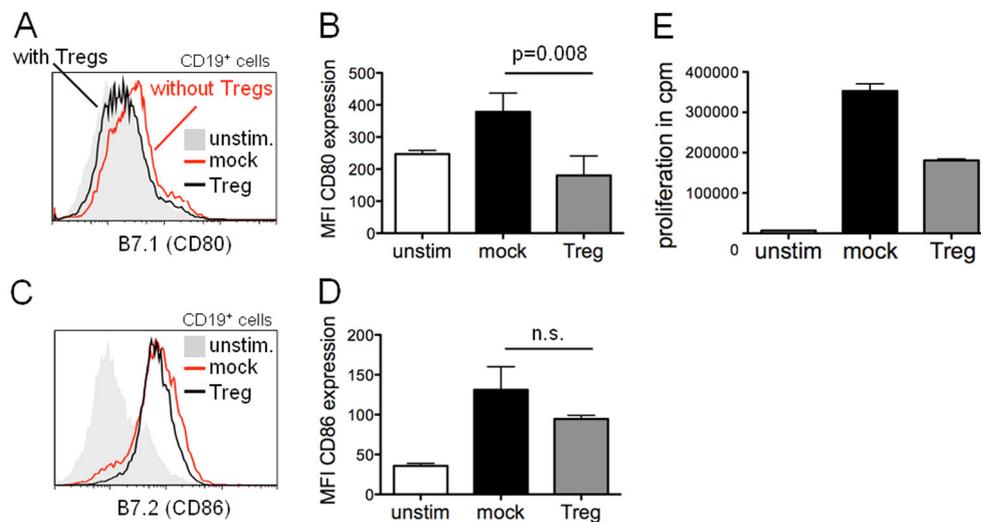


Abb. 6.1.12. nTregs hemmen die Proliferation und CD80-Expression von B-Zellen. (A bis D) Regulatorische T-Zellen wurden mit unstimulierten („unstim.“) oder anti-IgM-aktivierten B-Zellen („Treg“) \ddot{U} N kultiviert, und die Expression von CD80 und CD86 wurde analysiert. Als Kontrolle dienten aktivierte B-Zellen ohne nTregs („mock“). Dargestellt sind sowohl repräsentative FACS-Histogramme der CD80- (A) und CD86-Expression (C) auf CD19⁺ B-Zellen der Kokultur, als auch eine Quantifizierung der MFI von CD80 (B) und CD86 (D) dreier unabhängiger Versuche. (E) Die Proliferation von aktivierten B-Zellen wird durch nTregs gehemmt, wie anhand des [³H]-Thymidin-Einbaus gemessen wurde.

Dargestellt sind repräsentative FACS-Histogramme der CD80- (A) und CD86-Expression (C), sowie eine Quantifizierung deren *mean fluorescence intensity* (MFI) aus drei unabhängigen Versuchen (B und D). In parallelen nTreg-B-Zell-Kokulturen wurde die Proliferation anhand von [³H]-Thymidin-Einbau bestimmt. Dabei ergab sich, dass die Anwesenheit von nTregs die Proliferation von B-Zellen beeinträchtigen kann (Abb. 6.1.12. E). nTregs können also die Expression des Korezeptors CD80 sowie die Proliferation von B-Zellen unterdrücken.

6.1.8. Erhöhung von cAMP durch nTregs hemmt den *Nfatc1* P1 Promotor

Die Expression von NFATc1 ist in aktivierten konventionellen B- und T-Lymphozyten stark induzierbar und eng mit deren Effektorfunktion verknüpft (176, 180). In diesem Zusammenhang sollte der Einfluss erhöhter cAMP-Konzentration auf den induzierbaren P1 Promotor des *Nfatc1*-Gens untersucht werden. Dazu wurden CD4⁺CD25⁻ Tconv isoliert und 24 Stunden sowohl mit anti-CD3 allein oder anti-CD3/CD28 als auch beide Konditionen in Gegenwart von Forskolin stimuliert. Die Expression von NFATc1, ausgehend vom

induzierbaren „P1“ oder konstitutiven „P2“ Promotor, wurde mittels RT-PCR analysiert (Abb. 6.1.13. A). Es konnte eine deutliche Induktion des P1-Produkts („NFATc1 P1“) nach Aktivierung der T-Zellen mit anti-CD3 und anti-CD3/CD28 beobachtet werden. Gleichzeitige Stimulation mit Forskolin zeigte dagegen eine Hemmung der induzierten *Nfatc1* P1-Expression. Die Transkription des P2-Produkts („NFATc1 P2“) war unverändert.

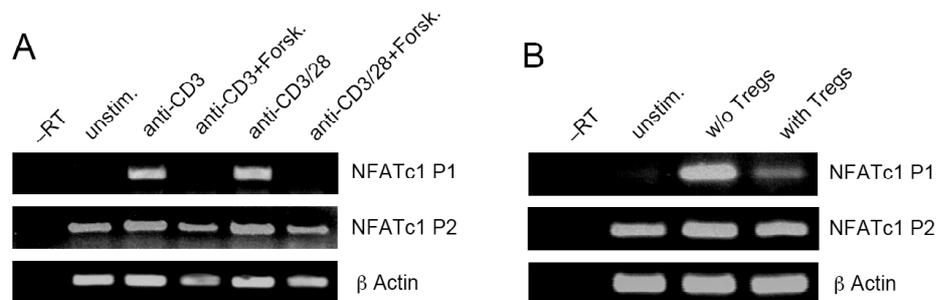


Abb. 6.1.13. cAMP und nTregs hemmen die Induktion des *Nfatc1* P1 Promotors. (A) $CD4^+CD25^-$ Tconv wurden mit anti-CD3, anti-CD3/CD28 und einer Kombination mit Forskolin stimuliert. Nach 24 h wurde die Expression von NFATc1 ausgehend vom *Nfatc1* P1 („NFATc1 P1“) oder P2 Promotor („NFATc1 P2“) mittels RT-PCR analysiert. Erhöhter cAMP-Gehalt durch Forskolin hemmte dabei die anti-CD3 und anti-CD3/CD28-induzierte P1-Aktivität, nicht aber die von P2. (B) Direkter Kontakt zu nTregs supprimiert die *Nfatc1* P1-Expression in Tconv. Treg-Assay mit unstimulierten und anti-CD3/CD28-aktivierten T-Zellen in Abwesenheit („w/o Tregs“) oder Gegenwart von nTregs („with Tregs“) wurde wie unter A hinsichtlich der Aktivität von *Nfatc1* P1 untersucht.

Auch der direkte Kontakt zu nTregs führte in Tconv zu einer Suppression von *Nfatc1* P1 (Abb. 6.1.13. B). Aus einem Treg-Assay mit unstimulierten („unstim.“) und anti-CD3/CD28-aktivierten T-Zellen in Abwesenheit („w/o Tregs“) oder Gegenwart von nTregs („with Tregs“) wurde nach 24 Stunden Kokultur die mRNA extrahiert und anschließend die Expression ausgehend von *Nfatc1* P1 und P2 durch RT-PCR analysiert. Ähnlich wie die erhöhte cAMP-Konzentration durch Forskolin führte auch der direkte Kontakt zu nTregs zu einer Suppression der *Nfatc1* P1 Transkription. Die Expression von P2 blieb hingegen unverändert.

6.1.9. ICER hemmt die Autoregulation von NFATc1/ α A

Der induzierbare P1 Promotor von *Nfatc1* wird über mehrere Signale reguliert, benötigt aber mindestens ein starkes Calcium-Signal und Kostimulation, die beispielsweise durch CD28 und nachfolgende Aktivierung von PKC oder MAP-Kinasen erreicht werden kann. Außerdem unterliegt der *Nfatc1* P1 Promotor einer positiven Autoregulation (174, 181). ICER zeigt eine enge strukturelle Verwandtschaft mit den beiden AP-1 Proteinen c-Jun und c-Fos und kann

diese möglicherweise aus einem NFAT/AP-1 Komplex verdrängen (160). Ob eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen NFATc1 und ICER tatsächlich stattfindet, sollte durch eine Koimmunpräzipitation (CoIP) beider Faktoren geklärt werden. Dazu wurden die mit einem ER-Tag versehenen NFATc1 Isoformen NFATc1/A und NFATc1/C sowie deren nicht-SUMOylierbare Mutante K349/702/914R mit Myc-ICER in HEK 293T Zellen überexprimiert. Die anschließende Präzipitation mittels eines anti-Myc-Antikörpers, gefolgt von einer Detektion durch anti-ER, bewies die Interaktion beider Proteine (Abb. 6.1.14. A). Sowohl die kurze (NFATc1/A) als auch die beiden langen NFATc1 Isoformen (NFATc1/C und K349/702/914R) interagierten – zumindest in Überexpression – direkt mit ICER.

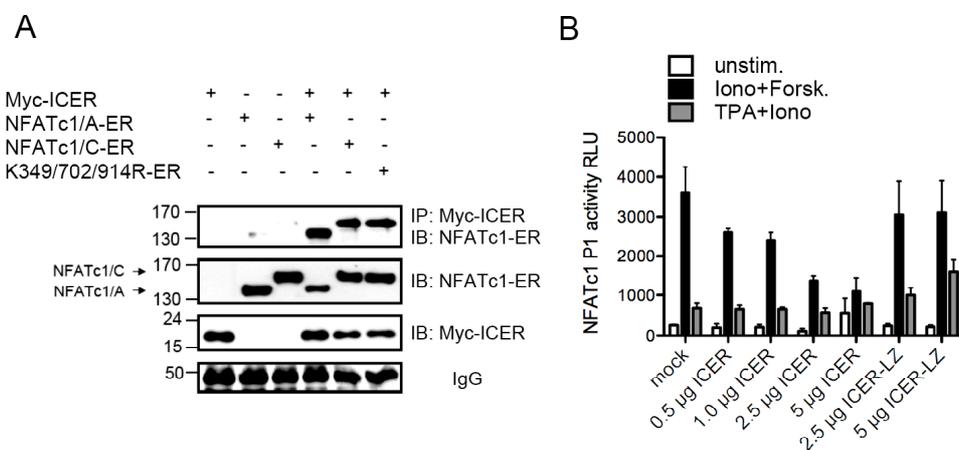


Abb. 6.1.14. Direkte NFATc1-ICER-Interaktion hemmt die autoregulierte Expression des *Nfatc1* P1 Promotors. (A) CoIP von NFATc1 und ICER. Die Isoformen NFATc1/A-ER, NFATc1/C-ER sowie die nicht SUMOylierbare Mutante K349/702/914R-ER wurden zusammen mit Myc-ICER in 293T-HEK-Zellen überexprimiert. Die Protein-Protein-Interaktion wurde anschließend durch CoIP von Myc und Immunoblot mittels anti-ER analysiert. ICER interagiert mit allen NFATc1-Isoformen. (B) ICER hemmt die Expression von *Nfatc1* P1 im Luciferase-Assay. EL-4 Zellen wurden mit einem *Nfatc1* P1-kontrollierten Luciferase Reportergenkonstrukt, zusammen mit variablen Mengen eines ICER-Plasmids, transfiziert. Als Negativkontrolle dienten Konstrukte ohne *leucine zipper* („ICER-LZ“). Konzentrations-abhängig konnte eine Hemmung von *Nfatc1* P1 durch ICER nachgewiesen werden.

Inwieweit diese NFATc1/ICER-Komplexe die Aktivität des *Nfatc1* P1 Promotors beeinflussen, sollte in einem Luciferase-Assay geklärt werden. Dazu wurden EL-4 Zellen, die eine hohe endogene NFATc1/ α A-Expression aufweisen, mit unterschiedlichen Konzentrationen eines ICER-Expressionsvektors zusammen mit einem *Nfatc1* P1 kontrollierten Luciferase-Reportergenkonstrukt kotransfiziert. Als Negativkontrolle dienten ICER-Mutanten, die durch Deletion des *leucine zippers* („ICER-LZ“) nicht mehr in der Lage sind, an DNA zu binden. Es konnte eine konzentrationsabhängige Suppression der „TPA+Forskolin“-induzierten *Nfatc1* P1-Luciferaseaktivität durch ICER gezeigt werden (Abb. 6.1.14. B). Anhand dieser Resultate lässt sich schlussfolgern, dass ein möglicher

NFATc1/ICER-Komplex die Aktivität des *Nfatc1* P1 Promotors reprimiert und dadurch mit der positiven NFATc1-Autoregulation interferiert.

6.1.10. ICER bindet direkt an den *Nfatc1* P1 Promotor

Ob ein direkter oder indirekter Effekt von ICER auf die Suppression des *Nfatc1* P1 Promotors vorliegt, sollte ebenfalls untersucht werden. Zunächst wurde ein Gelretardationsversuch (EMSA) mit Sonden aus dem proximalen (CRE-Motiv –150) und dem distalen (CRE-Motiv –660) P1 Element durchgeführt (Abb. 6.1.15. A). Aufgereinigtes rekombinantes ICER und/oder NFATc1 Protein wurde hinsichtlich einer möglichen Bindung an die beiden *Nfatc1* P1 Motive getestet. Zur Identifikation der Protein/DNA-Komplexe wurden mit Hilfe von anti-NFATc1 oder anti-ICER/CREM Antikörpern zusätzlich *supershift*-Analysen durchgeführt (Abb. 6.1.15. A). Sowohl an das CRE-Motiv –150 als auch an das –660 Element ließ sich klare Bindung von ICER nachweisen.

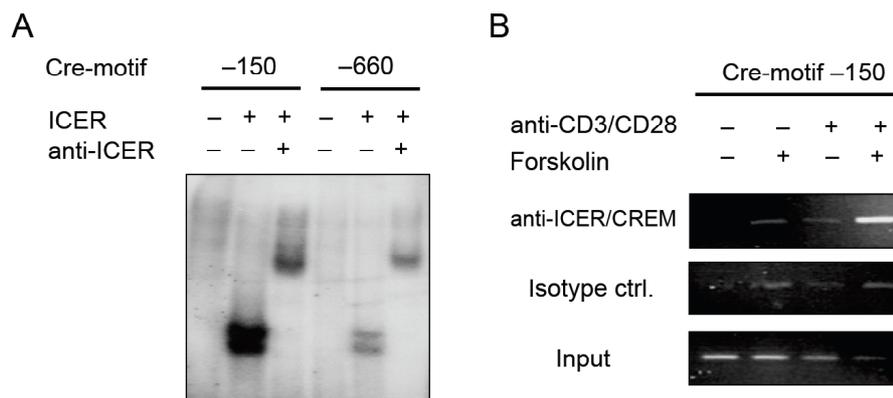


Abb. 6.1.15. ICER bindet *in vitro* und *in vivo* an den *Nfatc1* P1 Promotor. (A) EMSA und *supershift*-Analysen zeigten eine direkte Bindung von ICER am distalen (-150) und proximalen (-660) CRE-Motiv im *Nfatc1* P1 Promotor *in vitro*. Rekombinantes ICER-Protein bindet an beide Elemente und kann spezifisch durch AK retardiert werden. (B) Bindung von ICER an *Nfatc1* P1 *in vivo*. Chromatin-Immunpräzipitation von ICER/CREM in primären CD4⁺ T-Zellen zeigte nach anti-CD3/CD28 plus Forskolin Stimulation eine starke Bindung an *Nfatc1* P1, nicht aber nach alleiniger anti-CD3/CD28 oder Forskolin Behandlung. Als Spezifitätskontrolle diente ein ChIP mit einem Isotyp-Antikörper. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Josef Bodor durchgeführt.

Ob ICER/CREM *in vivo* direkt an das proximale CRE-Motiv (–150) bindet, sollte anhand von Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) überprüft werden. Dazu wurden primäre CD4⁺CD25⁻ T-Zellen vier Stunden mit anti-CD3/CD28, Forskolin oder einer Kombination aus beiden stimuliert. Nach Fixierung und Kreuzvernetzung der Protein/DNA-Komplexe wurde ein ChIP-assay mit anti-ICER/CREM Antikörper durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Isotyp-Antikörper (Abb. 6.1.15. B). Nur nach Behandlung der Zellen mit anti-CD3/CD28 plus

Forskolin konnte eine starke Bindung von ICER an das proximale *Nfatc1* P1 Element nachgewiesen werden. Eine Stimulation von anti-CD3/CD28 oder Forskolin allein reichte nicht aus, um eine DNA-Bindung zu induzieren. Es konnte somit gezeigt werden, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine ICER-Bindung an die beiden CRE-Motive von *Nfatc1* P1 stattfindet, was mit der Repression des induzierbaren P1 Promotors korreliert.

6.1.11. Direkter Zell-Zell-Kontakt zu nTregs induziert ICER und supprimiert die Induktion von NFATc1/ α A in konventionellen T-Zellen

Abschließend sollte die Annahme, dass nTregs die Transkription des *Nfatc1* P1 Promotors und folglich die Expression von NFATc1/ α A in Tconv unterdrücken mittels konfokaler Immunfluoreszenz überprüft werden. Dazu wurde ein Standard Treg-Assay durchgeführt und nach einer ÜN Kultur durch Zugabe von Formaldehyd *in situ* fixiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht und die Verteilung und Expression von ICER/CREM, NFATc1 und Foxp3 immun-histochemisch analysiert (Abb. 6.1.16).

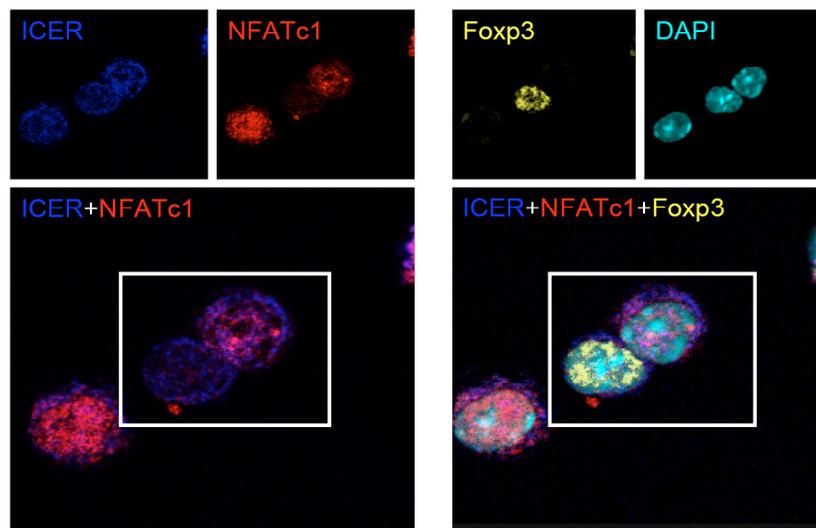


Abb. 6.1.16. Direkter Kontakt zu nTregs induziert ICER und hemmt die Expression von NFATc1 in konventionellen T-Zellen. Detektion von ICER, NFATc1 und Foxp3 bei der Treg-vermittelten Immunsuppression in einem *in vitro* Treg-Assay. Direkter Zell-Zell-Kontakt (die beiden Zellen im weißen Rahmen) zu Foxp3⁺ nTregs (gelbe Färbung) führte zu einer Induktion und Kerntranslokation von ICER/CREM (blaue Färbung) in Tconv. Die Expression von NFATc1 (rote Färbung) war im Vergleich zu einer nicht beteiligten T-Zelle (links unten) deutlich reduziert.

Ein direkter Zell-Zell-Kontakt zu Foxp3⁺ nTregs führte somit zu einer erhöhten Expression und zur Kerntranslokation von ICER/CREM in konventionellen T-Zellen. Entsprechend war die Expression von NFATc1 in diesen Zellen stark reduziert. Die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie bestätigten eine nTreg-induzierte Kerntranslokation von ICER und der daraus resultierenden Suppression des *Nfatc1* P1 Promotors. Dies lässt auf einen zentralen Mechanismus der nTreg-vermittelten Immunsuppression schließen.

6.2. Die Rolle von NFAT in natürlichen und induzierten Tregs

6.2.1. Charakterisierung der konditionellen NFATc1-Deletion in CD4⁺ T-Zellen

Inaktivierung von *Nfatc1* in der Keimbahn führt bereits *in utero* (ab Tag 13.5) zur letalen Fehlbildung der Herzklappen und –septen (297). Um dennoch die Funktion von NFATc1 *in vivo* zu untersuchen, wurde der Einsatz konditioneller *Nfatc1-knock-out* Mäuse notwendig. Das Cre (*causes/circular recombination*)-LoxP-System erlaubt es, Ort und Zeitpunkt der eigentlichen Deletion zu bestimmen und somit die Letalität in der Embryonalentwicklung zu umgehen. Dazu wurde das Exon 3 von *Nfatc1* mittels homologer Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen mit loxP-Sequenzen flankiert (Abb. 6.2.1.). Die Keimbahntransmission und die Erzeugung der gentechnisch-veränderten Mäuse wurden im Labor von Prof. A. Rao an der Harvard-Universität in Boston (USA) durchgeführt.

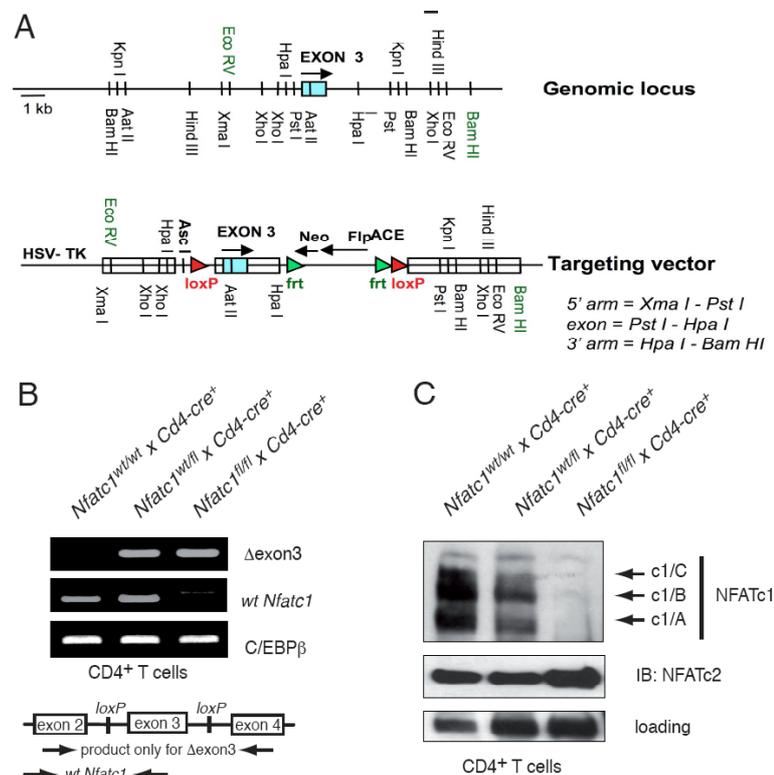


Abb. 6.2.1. Konditionelle Deletion des *Nfatc1*-Exon3 in CD4⁺ T-Zellen.

(A) Schematische Darstellung des genomischen *Nfatc1*-Lokus und des *targeting vectors*. Exon 3 von *Nfatc1* konnte mittels dieses Vektors in murinen embryonalen Stammzellen mit loxP-Sequenzen flankiert werden. Die Keimbahntransmission und die Erzeugung gentechnisch-veränderter Mäuse wurden im Labor von Prof. A. Rao an der Harvard-Universität in Boston (USA) durchgeführt. (B und C) Deletion des geflochtenen Exon 3 von *Nfatc1* in CD4⁺ T-Zellen durch Verpaarung der *Nfatc1^{fl/fl}*-Mäuse mit *Cd4-cre⁺* Deleter-Mäuse. (B) PCR-Analysen von *wild type*, heterozygoten und homozygoten *Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4-cre⁺* Tieren zeigten eine klare Reduktion der Expression des *Nfatc1*-Gens. Die erfolgreiche Deletion des Exons 3 („ Δ exon3“) wurde ebenfalls nachgewiesen. (C) Western Blot Analysen bestätigten außerdem den Verlust von NFATc1 auf Proteinebene.

Das Exon 3 ist die erste kodierende Sequenz, welche von beiden *Nfatc1* Promotoren (P1 und P2) exprimiert wird. Eine Deletion dieses relativ großen Exons sollte also alle *Nfatc1*-Transkripte „ausschalten“. Durch homologe Rekombination wurde das Exon 3 von *Nfatc1* mit loxP-Sequenzen flankiert, eine Neomycin-Kassette, die später wieder entfernt wurde, diente zur Selektion positiver embryonaler Stammzellklone (Abb. 6.2.1. A). Die derart erzeugten *Nfatc1^{fl/fl}*-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Anjana Rao (Harvard-Universität Boston, USA) zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse wurden mit dem T-Zell-spezifischen deleter-Stamm *Cd4-cre⁺* (298) verpaart. Die F1-Nachkommen dieser Kreuzung waren zunächst heterozygot (*Nfatc1^{w^t/fl}* x *Cd4-cre⁺*), und die Verpaarung der F1-Nachkommen untereinander resultierte schließlich in homozygoten Tieren in der F2-Generation (*Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4-cre⁺*). Die erfolgreiche Rekombination des Exon 3 von *Nfatc1* wurde mittels PCR-Analysen von *wild type*, heterozygoten und homozygoten *Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4-cre⁺* Tieren überprüft (Abb. 6.2.1. B). Neben dem Verlust des *Nfatc1*-Gens („wt *Nfatc1^c*“), konnte auch die erfolgreiche Deletion des Exons 3 („ Δ exon3“) in *Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4-cre⁺* in CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Der Verlust des NFATc1-Proteins in CD4⁺ T-Zellen wurde mittels Western-Blot bestätigt (Abb. 6.2.1. C). In homozygoten T-Zellen konnte keine der NFATc1-Isoformen detektiert werden. NFATc2 hingegen war nicht beeinträchtigt.

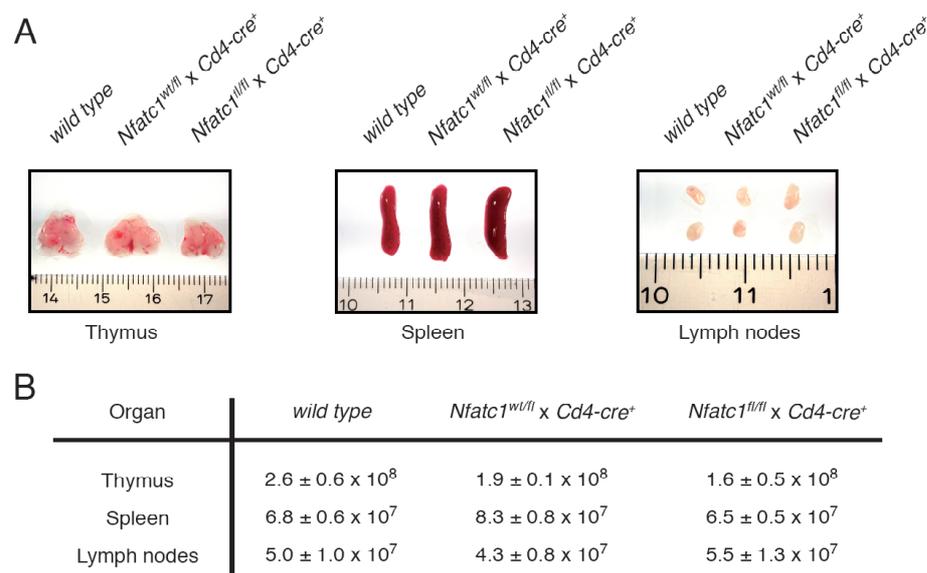


Abb. 6.2.2. Phänotyp der konditionellen Inaktivierung von *Nfatc1* in CD4⁺ T-Zellen. (A) Repräsentative photographische Dokumentation der lymphoiden Organe von *wild type*, heterozygoten und homozygoten *Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4-cre⁺* Mäusen. (B) Gesamtzellzahlen von Thymus, Milz und Lymphknoten acht verschiedener Tiere zeigten ebenfalls keine grundsätzlichen Auffälligkeiten der Organogenese.

Die Entwicklung der lymphoiden Organe dieser Mäuse zeigte weder morphologische noch größere zelluläre Auffälligkeiten (Abb. 6.2.2. und Abb. 6.3.3.). Sowohl die Gesamtzahl der Zellen in Thymus, Milz und Lymphknoten (Abb. 6.2.2. B) als auch das Verhältnis der B- und T-Zellen (Abb. 6.2.3. C) war in *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺* Mäusen nahezu unverändert. Lediglich in der Milz, nicht aber in den Lymphknoten, war der Anteil an CD4⁺ T-Zellen leicht reduziert. Auch die Verteilung der CD4⁺ Helfer-T-Zellen und CD8α⁺ zytotoxischen T-Zellen in Thymus, Milz und Lymphknoten konnte als „normal“ betrachtet werden (Abb. 6.2.3. D). Die Entwicklung und Funktion der nTregs von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺* Mäusen entsprach *wild type* Tieren (weiterführend auch in Punkt 6.2.3. besprochen).

6.2.2. Charakterisierung des Phänotyps *Nfatc1Nfatc2*-doppel-defizienter T-Zellen

In peripheren T-Zellen werden vorrangig die NFAT-Familienmitglieder NFATc1 und NFATc2 exprimiert (179, 297). Um überlappende und sich dadurch kompensierende Funktionen von NFATc1 und NFATc2 zu erkennen, wurden die *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺* Mäuse mit *Nfatc2^{-/-}* Tieren verpaart. Nachkommen dieser Kreuzungen (*Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}*) wiesen *Nfatc1Nfatc2*-defiziente T-Zellen auf. Western-Blot-Analysen zeigten den gleichzeitigen Verlust des NFATc1- und NFATc2-Proteins in doppel-positiven Thymozyten, während die Expression von NFATc3 weiter nachweisbar war (Abb. 6.2.3. A). Die Gesamtzellzahl in Milz und Lymphknoten war unverändert in *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* Mäusen (Abb. 6.2.3. B). Allerdings war – einhergehend mit einer drastisch erhöhten Apoptoserate der CD4^{dim}CD8^{dim} Zellpopulation – die Zellzahl im Thymus auf etwa die Hälfte reduziert (Daten nicht gezeigt). Die peripheren Organe von Mäusen mit *Nfatc1Nfatc2*-doppeldefizienten T-Lymphozyten zeigten eine reduzierte Zahl von T-Zellen, wobei dieses Phänomen in der Milz deutlicher ausgeprägt war als in den Lymphknoten (Abb. 6.2.3. C). Der Verlust der T-Zellen wurde insbesondere durch Reduktion der CD4⁺-Helfer-T-Zellen manifestiert. Die Zahl der CD8α⁺ zytotoxischen T-Zellen war demgegenüber nahezu unverändert (Abb. 6.2.3. D). Eine erhöhte Apoptoserate konnte *in situ* weder für die CD4⁺ noch für die CD8⁺ T-Zellen in Milz oder Lymphknoten nachgewiesen werden. Jedoch zeigten bei TGFβ-Stimulation *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* T-Zellen eine leicht erhöhte Apoptoserate (Daten nicht gezeigt).

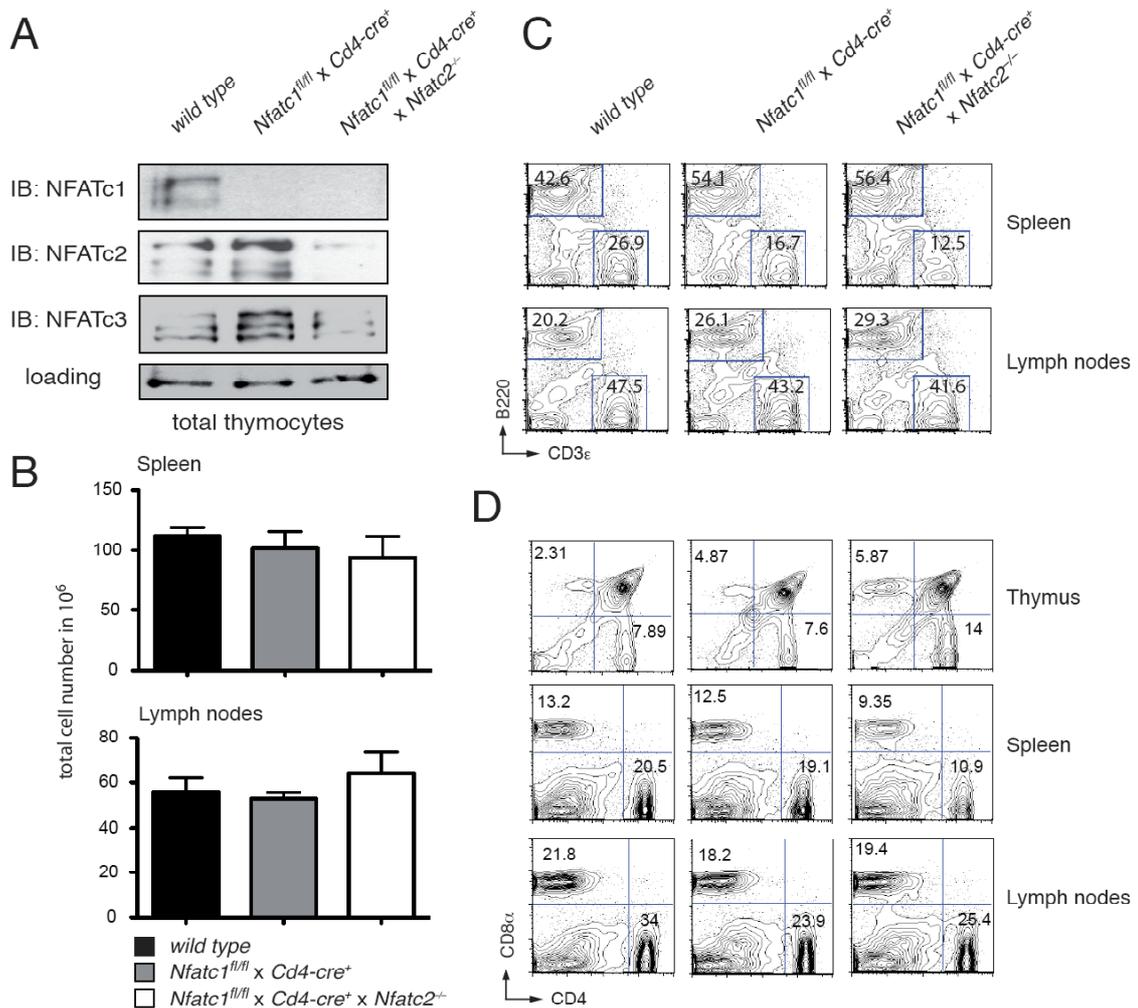


Abb. 6.2.3. Zellulärer Phänotyp der gleichzeitigen Inaktivierung von *Nfatc1* und *Nfatc2* in CD4⁺ T-Zellen. (A) Western Blot Analysen bestätigten den gleichzeitigen Verlust von NFATc1 und NFATc2 in Thymozyten. (B) Die Gesamtzellzahlen von Milz und Lymphknoten war in *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* Mäusen unverändert. (C) FACS-Analysen zeigten einen reduzierten Anteil an CD4⁺ T-Zellen in der Milz von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* Mäusen. (D) Analyse der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Thymus, Milz und Lymphknoten.

Isolierte *Nfatc1Nfatc2*-doppel-defiziente CD4⁺ T-Zellen zeigten *ex vivo* nach Aktivierung durch anti-CD3/CD28 eine drastisch reduzierte IL-2 Produktion (Abb. 6.2.4.). Der Verlust von NFATc1 führte bereits zu einer verminderten Sekretion von IL-2. Gleichzeitiges Fehlen von NFATc1 und NFATc2 resultierte in nicht-nachweisbaren Mengen von IL-2 im Zellkulturüberstand (Daten nicht gezeigt). Inwiefern die IL-2-Konzentration im Serum naiver *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* Mäuse verändert war, konnte mangels eines ausreichend sensitiven ELISAs nicht bestimmt werden.

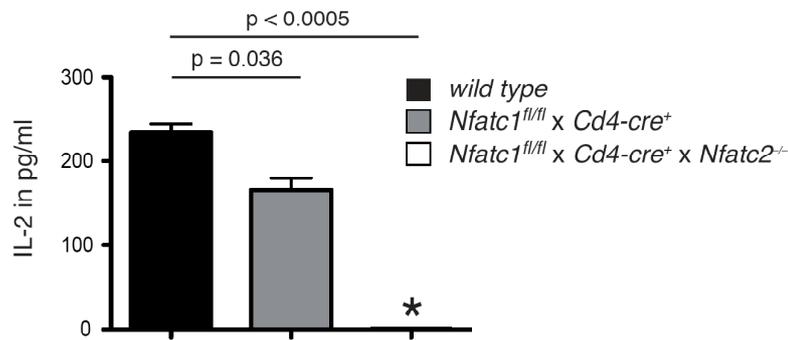


Abb. 6.2.4. Drastisch reduzierte IL-2-Produktion in *Nfatc1Nfatc2*-doppel-defizienten CD4⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden 24 h mit anti-CD3/CD28 stimuliert, und anschließend die Konzentration von IL-2 im Überstand mittels ELISA bestimmt. T-Zellen von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺* Mäusen zeigten eine deutlich reduzierte IL-2 Sekretion. Im Überstand kultivierter *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* T-Zellen war bei einer 1:5 Verdünnung IL-2 nicht mehr nachweisbar (*).

6.2.3. Die Entwicklung von nTregs ist unabhängig von NFAT-Faktoren

Die Funktion von IL-2 bei der Entwicklung von nTregs ist nicht endgültig geklärt. Sicher ist aber, dass IL-2 essentiell für die Homöostase und suppressive Funktion von nTregs in der Peripherie ist (34, 60, 122). Inwiefern eine möglicherweise veränderte IL-2 Sekretion, insbesondere aber auch der Verlust eines oder mehrerer NFAT-Familiemitglieder, die Entwicklung von Tregs beeinflusst, wurde sowohl in *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* als auch *Nfatc2^{-/-} x Nfatc3^{-/-}* Mäusen untersucht. Überraschenderweise konnte kein veränderter Anteil an CD25⁺Foxp3⁺ nTregs in der CD4⁺ Population NFAT-defizienter Tiere festgestellt werden (Abb. 6.2.5.). Die Frequenz der nTregs innerhalb der CD4⁺ Zellen in Thymus, Milz und Lymphknoten war weder in *Nfatc1Nfatc2*- (wobei hier NFATc1 nur in den T-Lymphozyten fehlt, Abb. 6.2.5. A und B), noch in *Nfatc2Nfatc3*-doppel-defizienten (Abb. 6.2.5. C) Mäusen beeinträchtigt. Dennoch ist festzustellen, dass *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* Mäuse insgesamt weniger CD4⁺ T-Zellen aufweisen und somit auch die absolute Zahl an nTregs reduziert ist (siehe auch Punkt 6.2.2.). Das Verhältnis von nTregs zu Tconv war aber vergleichbar zu den *wild type* Kontrolltiere. Entsprechend konnten keine Anzeichen einer möglichen Autoimmunreaktion in diesen Mäusen – die bis zu einem Alter von zehn Monaten analysiert wurden – beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

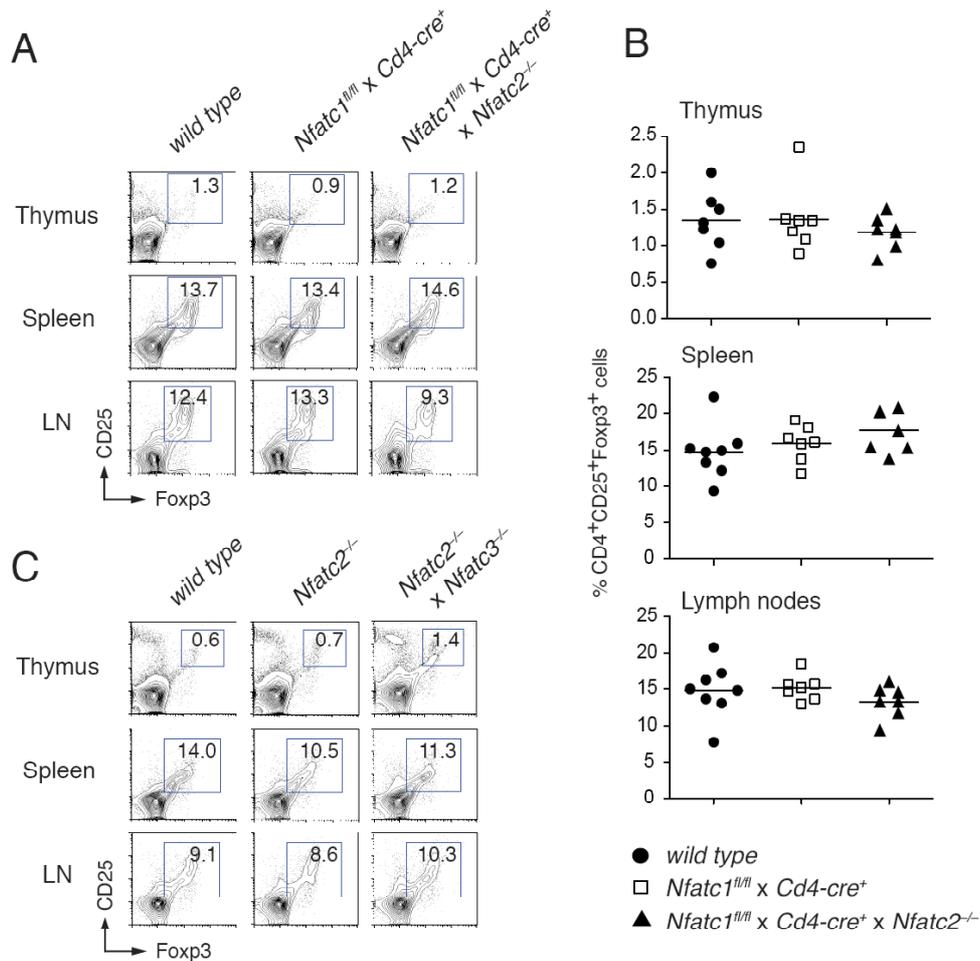


Abb. 6.2.5. Tregs sind unverändert in *Nfatc1Nfatc2* oder *Nfatc2Nfatc3*-doppel-defizienter T-Zellen. (A und B) FACS-Analysen zeigten keine Veränderung des CD25⁺Foxp⁺ nTreg-Anteils innerhalb des CD4⁺ Kompartiments in *Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4-cre⁺* x *Nfatc2^{-/-}* Mäusen. Repräsentative Punktwolkendiagramme der CD4⁺ T-Zellen (A) von Thymus, Milz und Lymphknoten sowie eine Zusammenfassung des prozentualen Anteils an Tregs (B) von mindestens sechs unabhängigen Versuchen. (C) Die Zahl von CD25⁺Foxp⁺ nTregs blieb auch in Thymus, Milz und Lymphknoten von *Nfatc2^{-/-}*/*Nfatc3^{-/-}* Mäusen unverändert.

Obwohl die Frequenz der Foxp3⁺ nTregs in Thymus, Milz und Lymphknoten von *Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4-cre⁺* x *Nfatc2^{-/-}* Mäusen unauffällig war, sollte die Verteilung der nTregs in diesen Organen untersucht werden. Paraffinschnitte von Milz und Lymphknoten bestätigten einen reduzierten Gesamt-T-Zellanteil in der Milz (nicht aber in den Lymphknoten) von *Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4-cre⁺* x *Nfatc2^{-/-}* Mäusen (Abb. 6.2.6. grüne Färbung). Die Frequenz und die Verteilung der nTregs (Foxp3⁺) innerhalb der T-Zellbereiche war hingegen unverändert (Abb. 6.2.6. rote Färbung). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass weder die *Nfatc1Nfatc2*-Defizienz, noch der gleichzeitige Verlust von NFATc2 und NFATc3 die Entwicklung von nTregs beeinträchtigt. Auch die möglicherweise reduzierte Menge an IL-2 im Serum der *Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4-cre⁺* x *Nfatc2^{-/-}* Mäuse scheint für die Entwicklung von nTregs unwichtig zu sein.

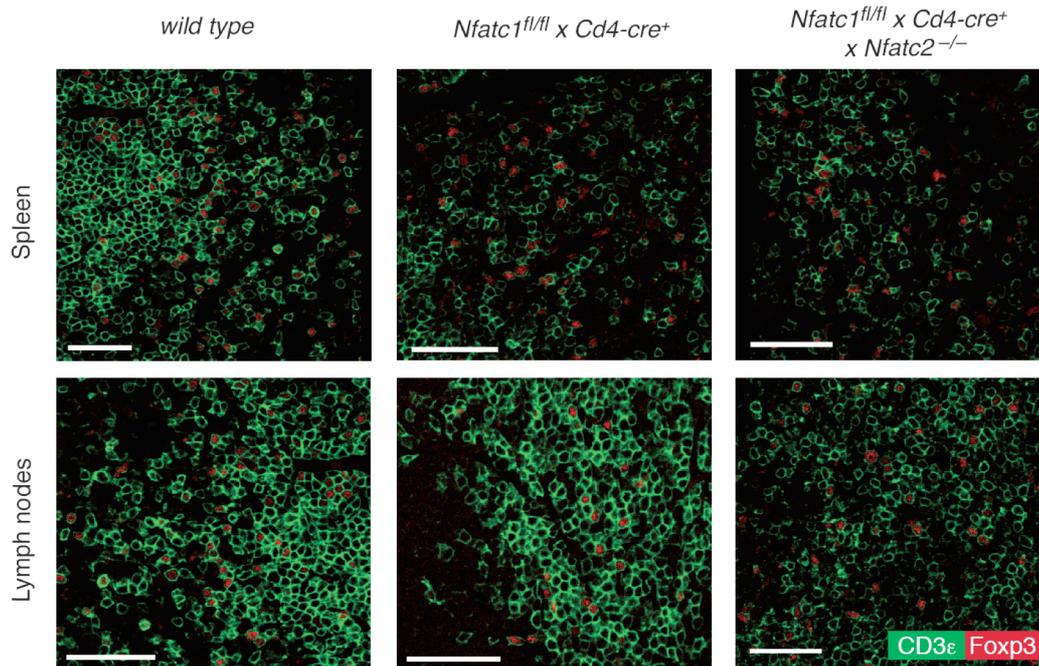


Abb. 6.2.6. Normale Verteilung von $Nfatc1Nfatc2$ -doppel-defizienten Foxp3⁺ nTregs in Milz und Lymphknoten innerhalb der T-Zellpopulation. Paraffinschnitte der Milz und Lymphknoten wurden mit Antikörpern gegen Foxp3 (rot) und CD3 ϵ (grün) gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Es zeigten sich keine Unterschiede in der nTreg Lokalisation bei NFAT-Defizienz. Gleichwohl konnte insgesamt eine Abnahme von T-Zellen (CD3 ϵ ⁺) in der Milz von $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4-cre^+ \times Nfatc2^{-/-}$ Mäusen bestätigt werden (siehe auch Abb. 6.2.3.).

Um auszuschließen, dass ein überlagernder Phänotyp der $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4-cre^+$ Mäuse, bedingt durch den Verlust der NFATc1-Expression in allen T-Zellen, mögliche Treg-spezifische Effekte maskiert, wurden $Nfatc1^{fl/fl}$ -Mäuse auch mit dem Treg-spezifischen *deleter* Stamm $Foxp3-IRES-Cre^+$ (142) gekreuzt. Die daraus resultierenden $Nfatc1^{fl/fl} \times Foxp3-IRES-Cre^+$ Mäuse zeigten ebenfalls normale nTreg-Populationen in Thymus, Milz und Lymphknoten (Abb. 6.2.7.). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine gleichzeitige Defizienz zweier NFAT-Familienmitglieder (d.h. von NFATc1 und NFATc2 oder NFATc2 und NFATc3) keinerlei Auswirkung auf die Entwicklung natürlicher Tregs hat. Auch durch eine Treg-spezifische Deletion von NFATc1 konnte keine Beeinträchtigung der nTregs festgestellt werden.

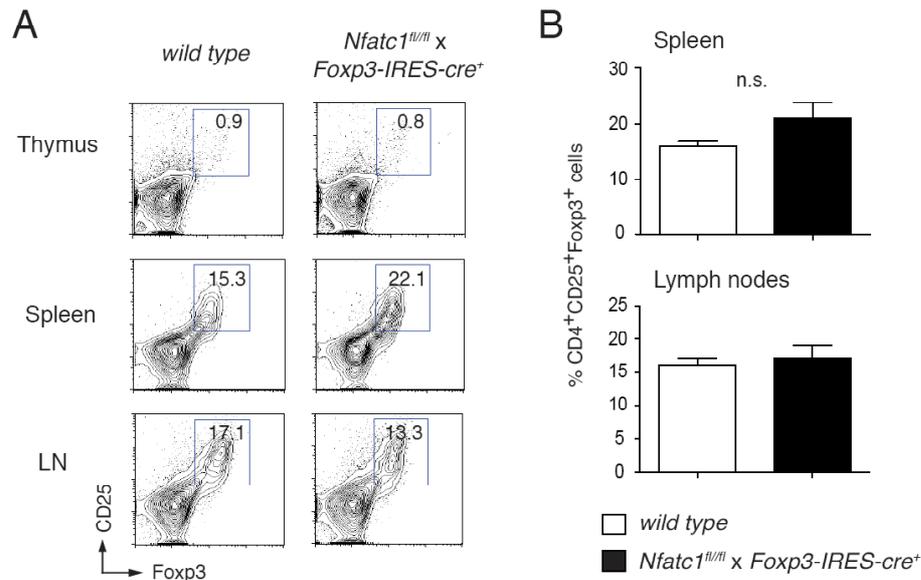


Abb. 6.2.7. Treg-spezifische Inaktivierung von *Nfatc1* beeinflusst die Entwicklung von nTregs nicht. (A) FACS-Analysen zeigten keine Veränderung des CD25⁺Foxp⁺ nTreg-Anteils innerhalb des CD4⁺-Kompartiments in Thymus, Milz und Lymphknoten von *Nfatc1^{fl/fl} x Foxp3-IRES-cre⁺* Mäusen. (B) Zusammenfassung dreier unabhängiger Versuche.

6.2.4. NFAT-defiziente nTregs supprimieren normal *in vitro* und *in vivo*

Obwohl die Entwicklung von Tregs in NFAT-defizienten Mäusen normal verlief und sich keine Anzeichen einer Autoimmunreaktion in diesen Tieren fanden, sollte dennoch die Funktion der nTregs untersucht werden. Als Maß für die Fähigkeit von Tregs, Tconv zu supprimieren, kann die Proliferation der T-Zellen *in vitro* in An- und Abwesenheit von Tregs bestimmt werden (Treg-Assay). Dazu wurden nTregs aus *wild type*, *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺*, *Nfatc2^{-/-}*, *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}*, und *Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}* Mäusen isoliert und deren Suppression auf *responder* T-Zellen einer *wild type* Maus getestet (Abb. 6.2.8.). Als Negativkontrolle wurden unstimulierte T-Lymphozyten und als Positivkontrolle T-Zellen ohne nTregs (1:0) mitgeführt. Das Verhältnis von Tconv zu Tregs wurde außerdem in verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:0.5, 1:0.25, und 1:0.125) eingestellt. Alle verwendeten NFAT-defizienten Tregs zeigten unveränderte suppressive Fähigkeiten in diesem *in vitro* Assay (Abb. 6.2.8.).

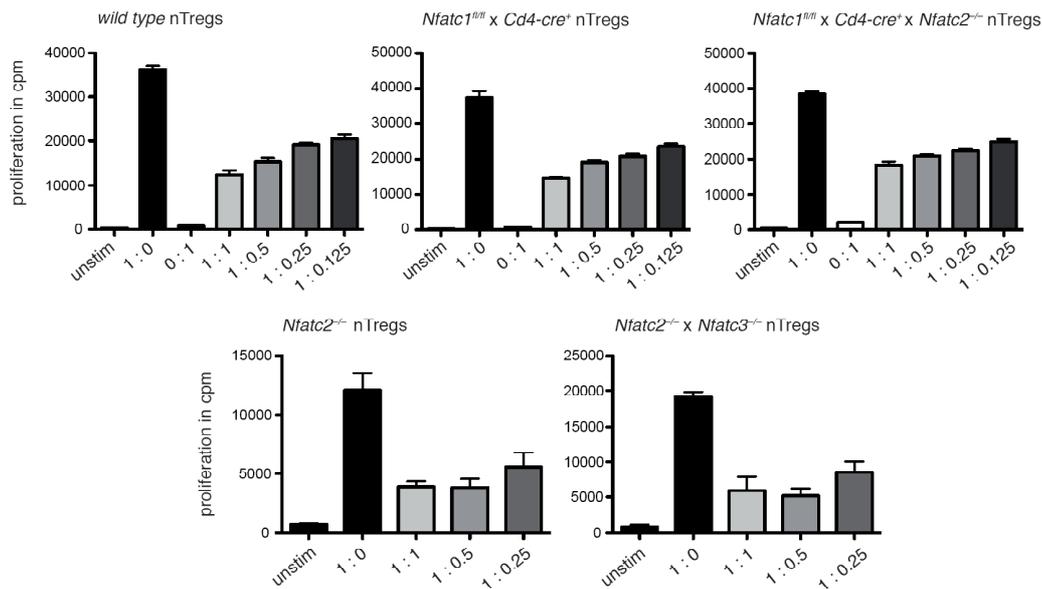


Abb. 6.2.8. NFAT-defiziente nTregs supprimieren normal *in vitro*. Standard-Treg-Assays mit nTregs von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺*, *Nfatc2^{-/-}*, *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}*, und *Nfatc2^{-/-} Nfatc3^{-/-}* Mäusen mit *wild type* APCs und *responder* T-Zellen. Als Negativkontrolle wurden stets unstimulierte T-Zellen („unstim“), als Positivkontrolle T-Zellen ohne nTregs (1:0) und nTregs alleine (0:1) mitgeführt. Das Verhältnis von Tconv zu Tregs wurde außerdem in verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:0.5, 1:0.25 und 1:0.125) eingestellt. Alle NFAT-(doppel)defizienten nTregs zeigten eine unveränderte Suppressionsfähigkeit.

Obwohl *Nfatc1*-defiziente nTregs eine unveränderte Suppressorfunktion *in vitro* zeigten, wurde diese Eigenschaft zusätzlich *in vivo* bestätigt (Abb. 6.2.9). Durch Injektion des CD28SA (Klon D665) können Tregs in Mäusen spezifisch expandiert werden (299, 300). Drei Tage nach CD28SA-Applikation wurde die CD28SA-vermittelte Proliferation der *Foxp3⁺* nTregs in Milz und Lymphknoten von *Nfatc1^{fl/fl} x Foxp3-IRES-cre⁺* Mäusen analysiert (Abb. 6.2.9. A). Es zeigte sich keine Veränderung bezüglich der Expansion von nTregs nach CD28SA-Injektion. Dies kann als Anzeichen für ein „normales“ Proliferations- und Suppressionsverhalten von *Nfatc1*-defizienten nTregs gewertet werden. Drei Stunden nach Applikation von 100 µg CD28SA wurde den Mäusen außerdem Blut aus der Schwanzvene entnommen und der Gehalt an IL-2 im Serum mittels ELISA bestimmt (Abb. 6.2.9. B). Es konnte dabei kein Unterschied zwischen den *wild type* und den *Nfatc1^{fl/fl} x Foxp3-IRES-cre⁺* Mäusen hinsichtlich der Suppression der CD28SA-induzierten IL-2 Sekretion festgestellt werden. Bestünde eine verringerte oder gar fehlende Suppressionsfähigkeit *Nfatc1*-defizienter nTregs, würde die Konzentration an IL-2 dramatisch ansteigen ((299) und Abb. 6.1.9.). Entsprechend der „normalen“ Menge an IL-2 im Serum der *Nfatc1^{fl/fl} x Foxp3-IRES-cre⁺* Mäuse kann von einer unveränderten Suppressionsfähigkeit der

nTregs *in vivo* ausgegangen werden. Zusammenfassend wird weder durch eine *Nfatc1/Nfatc2*-Defizienz noch durch den gleichzeitigen Verlust von NFATc2 und NFATc3 die suppressive Fähigkeit von nTregs *in vitro* beeinträchtigt. Daneben zeigten *Nfatc1*-defiziente nTregs auch *in vivo* ein unverändertes Verhalten. Demzufolge spielen NFAT-Transkriptionsfaktoren sowohl in der Entwicklung von nTregs als auch für deren Effektorfunktion eine untergeordnete Rolle.

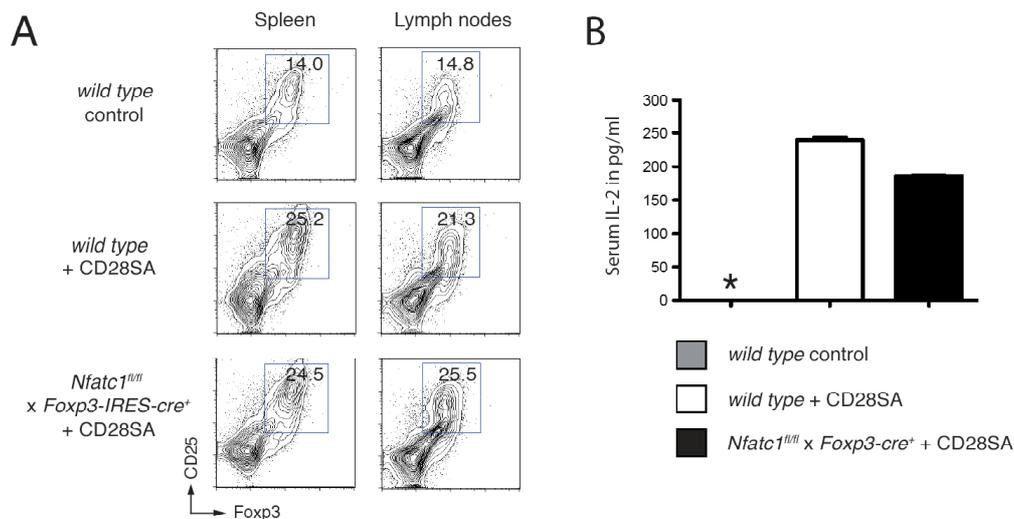


Abb. 6.2.9. *Nfatc1*-defiziente nTregs proliferieren und supprimieren normal *in vivo*. (A) Injektion von 100 µg CD28SA (D665) i.p. führte zu einer „normalen“ Expansion der Fopx3⁺ Tregs in *Nfatc1*^{fl/fl} x *Foxp3-IRES-cre*⁺ Mäusen. FACS-Analyse nach drei Tagen CD28SA-Behandlung zeigte keinen Unterschied der nTreg-Population zwischen *wild type* und *Nfatc1*^{fl/fl} x *Foxp3-IRES-cre*⁺ Mäusen. (B) *Nfatc1*-defiziente nTregs supprimieren unverändert die CD28SA-induzierte IL-2 Produktion *in vivo*. ELISA-Messungen zeigten keine Unterschiede der IL2-Konzentration im Serum von *wild type* und *Nfatc1*^{fl/fl} x *Foxp3-IRES-cre*⁺ Mäusen drei Stunden nach CD28SA-Behandlung. In den Kontrolltieren war bei einer 1:1 Verdünnung kein IL-2 im Serum nachweisbar (*).

6.2.5. NFAT-Faktoren regulieren die Foxp3-Expression in iTregs

Obwohl NFAT-Transkriptionsfaktoren bei der Entwicklung von nTregs sowie für deren immun-suppressive Funktion vernachlässigbar sind, sollte dennoch ein möglicher Einfluss von NFAT-Faktoren auf induzierte regulatorische T-Zellen überprüft werden. Grundsätzlich können Foxp3⁺ (auch T_H3-Zellen genannt) oder Foxp3⁻ iTregs (T_R1 genannt) unterschieden werden. Eine Polarisation zu T_R1-Zellen geschieht dabei unter dem Einfluss von IL-10, die Differenzierung zu Foxp3⁺ T_H3 Tregs ist hingegen abhängig von TGFβ und IL-2 (36, 40).

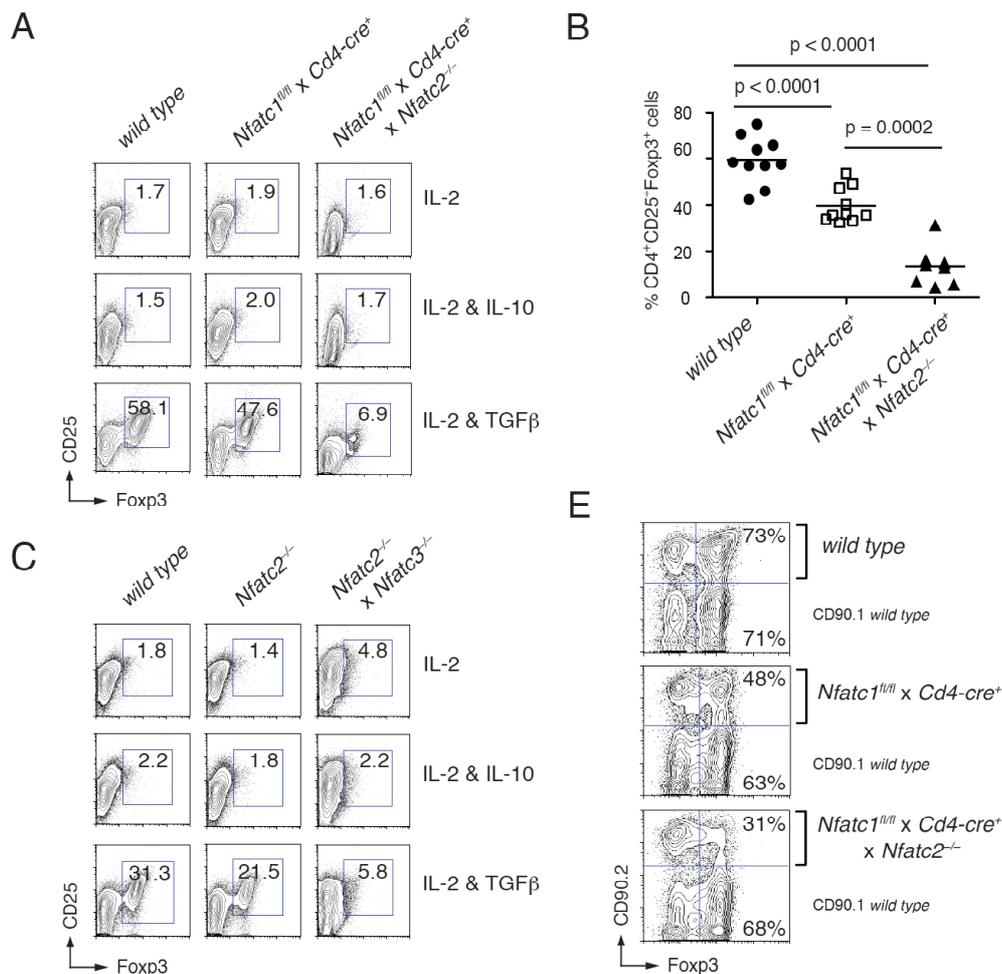


Abb. 6.2.10. NFAT-Transkriptionsfaktoren regulieren die iTreg-Differenzierung. (A und B) *Nfatc1Nfatc2*-doppel-defiziente CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zeigen eine drastisch reduzierte Foxp3-Expression unter Einfluss von TGFβ. (A) Repräsentative FACS-Analysen von *wild type*, *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺*, *Nfatc2^{-/-}*, *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* T-Zellen nach 7 Tagen Differenzierung unter iTreg-Bedingungen. (B) Zusammenfassung von mindestens 8 unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen. (C) Auch *Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}* T-Zellen zeigen eine deutliche Beeinträchtigung der TGFβ-induzierten Foxp3-Expression. (E) CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺*, *Nfatc2^{-/-}*, *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* Mäusen wurden 1:1 mit kongenen *wild type* (CD90.1⁺) T-Zellen gemischt und unter iTreg-Bedingungen polarisiert. Deutlich ist eine reduzierte Foxp3-Expression der *Nfatc1*- und *Nfatc1Nfatc2*-defizienten T-Zellen zu sehen. Die in der gleichen Kultur gehaltenen CD90.1⁺ Zellen dienen als interne Kontrolle.

CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von *wild type*, *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺*, *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* Mäusen wurden aufgereinigt, drei Tage mit anti-CD3/CD28 stimuliert und anschließend vier Tage zur Ruhe gebracht. Diese Zellen wurden entweder nur durch IL-2 zu Effektorzellen (Tconv oder T_{H0}-Zellen), durch IL-2 und IL-10 zu Foxp3⁻ T_R1-Zellen oder durch IL-2 und TGFβ zu „klassischen“ Foxp3⁺ iTregs polarisiert (Abb. 6.2.10.). Bereits in den *Nfatc1*-defizienten T-Zellen konnte eine deutliche Abnahme der Foxp3-Expression beobachtet werden. Bei gleichzeitigem Verlust von NFATc1 und NFATc2 sank der Anteil an Foxp3⁺ Zellen auf etwa ein Zehntel der *wild type* Zellen (Abb. 6.2.10. A und B). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei *Nfatc2^{-/-}* und *Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}* T-Zellen beobachtet: der Verlust von einem Mitglied der NFAT-Faktoren, i. e. von NFATc2, führte zu einer klaren Reduktion der Foxp3-Expression, eine gleichzeitige Defizienz von NFATc2 und NFATc3 verringerte den Anteil an iTregs weiter (Abb. 6.2.10. C). Die Erkenntnis, dass bereits der Verlust eines NFAT-Familienmitgliedes (entweder NFATc1 oder NFATc2) zu einer Verringerung der Foxp3⁺ Zellen führt und eine gleichzeitige Defizienz zweier NFAT-Faktoren (von NFATc1 und NFATc2 oder NFATc2 und NFATc3) die iTreg-Population nahezu gegen null tendieren lässt, zeigt eine Redundanz dieser Transkriptionsfaktoren bei der Regulation des *Foxp3*-Gens. Weiterhin wurde klar, dass *Foxp3* nicht in nTregs (siehe Punkt 6.2.3.), wohl aber in iTregs durch NFAT reguliert wird.

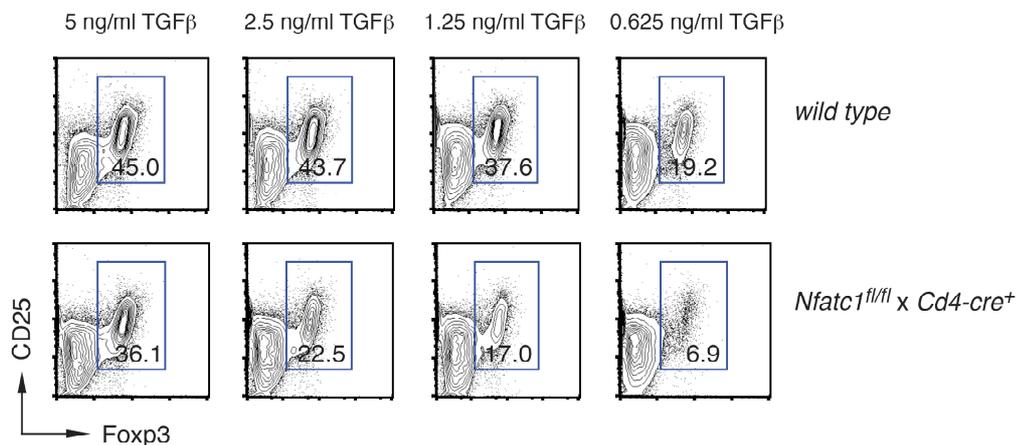


Abb. 6.2.11. NFAT-Faktoren regulieren die iTreg-Differenzierung durch TGFβ. Titration von TGFβ bei der Differenzierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus *wild type* und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺* Mäusen zu iTregs bei konstanter IL-2-Konzentrationen (50 U/ml). Besonders bei geringen Konzentrationen von TGFβ werden die Unterschiede der Foxp3-Expression zwischen *wild type* und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺* iTregs recht deutlich.

Inwiefern sich die Konzentration von TGF β , bei gleich bleibender Menge an IL-2, auf die reduzierte Foxp3-Expression in *Nfatc1*-defizienten T-Zellen auswirkt, wurde ebenfalls untersucht (Abb. 6.2.11.). Bei Verwendung sehr geringer Konzentrationen von TGF β (etwa 0.625 ng/ml) war der Anteil an Foxp3⁺ iTregs in *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺* T-Zellen am deutlichsten reduziert, bei höheren Konzentrationen an TGF β (etwa 5 ng/ml) war der Unterschied weniger stark ausgeprägt. Um auszuschließen, dass diese Befunde auf sekundäre Effekte von isolierten *in vitro* Kulturen zurückzuführen sind, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺*, *Nfatc2^{-/-}*, *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* Mäusen mit congenen *wild type* T-Zellen (CD90.1⁺) im Verhältnis 1:1 gemischt und unter iTreg-Bedingungen polarisiert (Abb. 6.2.10. E). Deutlich war eine graduelle Abnahme der Foxp3⁺ iTregs bei NFAT-defizienten T-Zellen zu beobachten, nicht aber bei den in derselben Kultur gehaltenen CD90.1⁺ *wild type* Kontrollzellen. Daher ist die Regulation der Foxp3-Expression durch NFAT-Faktoren ein intrinsischer Effekt, und sekundäre Wirkmechanismen, wie etwa eine verringerte IL-2 Produktion oder ein mögliches Fehlen notwendiger Oberflächenproteine, können ausgeschlossen werden.

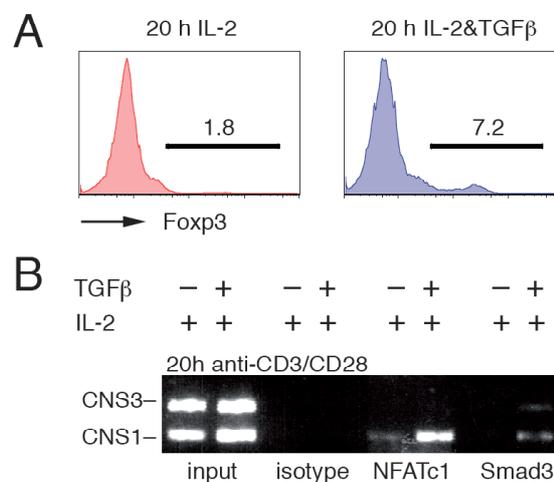


Abb. 6.2.12. NFATc1 bindet direkt an CNS1 im *Foxp3*-Lokus.

(A) CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden 20 h mit anti-CD3/CD28 mit oder ohne TGF β stimuliert, und die einsetzende Foxp3-Expression wurde mittels FACS bestimmt. (B) Die unter A generierten Zellen wurden in einem ChIP-Experiment hinsichtlich der Bindung von NFATc1 und Smad3 an den *Foxp3* Lokus analysiert. Deutlich war eine Bindung beider Faktoren an CNS1 nach TGF β -Behandlung detektierbar. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Berberich-Siebelt durchgeführt.

Um die Annahme zu untermauern, dass NFAT-Faktoren das *Foxp3*-Gen direkt regulieren, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt (Abb. 6.2.12.). Dazu wurden $CD4^+CD25^-$ T-Zellen nur 20 Stunden mit anti-CD3/CD28 mit oder ohne TGF β stimuliert, und die beginnende Foxp3-Expression wurde mittels FACS bestimmt (Abb. 6.2.12. A). Die so behandelten Zellen wurden in einem ChIP-Experiment hinsichtlich der Bindung von NFATc1 und Smad3 an den *Foxp3*-Lokus analysiert (Abb. 6.2.12. B). Deutlich konnte eine Bindung beider Faktoren an CNS1 (*enhancer 1*) des *Foxp3*-Gens nach TGF β -Behandlung nachgewiesen werden. Das Bindungsmuster von Smad3 ließ ebenfalls eine Beteiligung an der Regulation des CNS3-Elements vermuten. Am Promotor von *Foxp3* hingegen konnte weder eine Bindung von NFATc1 noch von Smad3 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Bindung von NFATc1 an CNS1 spricht wiederum für einen intrinsischen Wirkmechanismus, d.h. die Transkription von *Foxp3* wird direkt durch NFAT-Transkriptionsfaktoren kontrolliert.

6.2.6. Kostimulation spielt eine geringe Rolle bei der iTreg-Differenzierung

Für die Entwicklung von natürlichen Tregs im Thymus ist die Kostimulation durch CD28 oder ICOS unabdingbar (45, 46). In welchem Maße auch peripher induzierte Foxp3⁺ T-Zellen von diesen kostimulatorischen Signalen abhängig sind, wurde anhand CD28-defizienter (*Cd28*^{-/-}) T-Zellen untersucht (Abb. 6.2.13. A).

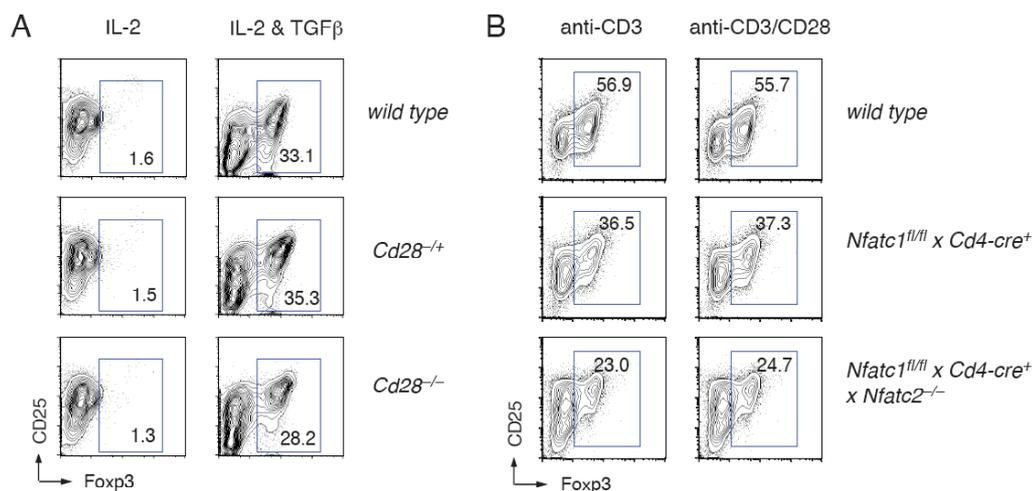


Abb. 6.2.13. CD28-Kostimulation ist für die iTreg-Differenzierung vernachlässigbar. (A) FACS-Analysen von anti-CD3/CD28 plus TGF β -stimulierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen von *wild type* oder *Cd28*^{-/-} Mäusen zeigten keine Unterschiede an Foxp3⁺ iTregs zwischen beiden Mauslinien. (B) CD28-Kostimulation ist nicht in der Lage, die geringere Zahl *Nfatc1**Nfatc2*-doppel-defizienter iTregs zu erhöhen. Differenzierung von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu TGF β -generierten iTregs durch anti-CD3 oder anti-CD3 plus anti-CD28 von *wild type*, *Nfatc1*^{fl/fl} x *Cd4-cre*⁺, *Nfatc2*^{-/-}, *Nfatc1*^{fl/fl} x *Cd4-cre*⁺ x *Nfatc2*^{-/-} Mäusen.

CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von *wild type*, *Cd28*^{+/-} und *Cd28*^{-/-} Mäusen wurden mit anti-CD3/CD28 aktiviert und sieben Tage unter iTreg-Bedingungen bzw. nur mit IL-2 polarisiert. Anschließend wurde die Foxp3-Expression durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 6.2.13. A). In diesem Ansatz (mit 50 U/ml IL-2 im Medium!) konnte kein Unterschied hinsichtlich der Foxp3-Expression in CD28-defizienten iTreg-Zellen beobachtet werden. Dieser Befund steht im klaren Gegensatz zu nTregs, deren Zahl sowohl im Thymus als auch in den peripheren lymphoiden Organen (Milz und Lymphknoten) der *Cd28*^{-/-} Mäuse drastisch reduziert war (Daten nicht gezeigt). Inwieweit eine Kostimulation den Verlust von NFAT-Faktoren kompensieren kann, wurde ebenfalls untersucht (Abb. 6.2.13. B). Dazu wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von konditionellen *Nfatc1*- und *Nfatc1Nfatc2*-defizienten Mäusen mit anti-CD3 allein oder anti-CD3 plus anti-CD28 unter iTreg-Bedingungen stimuliert, und nach sieben Tagen wurde die Foxp3-Expression ermittelt. Auch in diesem Fall konnte kein Unterschied zwischen den nur mit anti-CD3 und den mit anti-CD3 plus anti-CD28 aktivierten iTregs festgestellt werden. Demnach kann CD28-Kostimulation die reduzierte Foxp3-Expression NFAT-defizienter T-Zellen nicht kompensieren. Dass durch CD28 eine funktionelle Kostimulation erreicht wurde, konnte sowohl an der erhöhten Sekretion von IL-2 als auch an der anti-apoptotischen Wirkung demonstriert werden (Daten nicht gezeigt). Daher wird die *Foxp3*-Transkription in iTregs vor allem durch das TCR-Signal (CD3-Stimulation) und die daraus resultierende NFAT-Aktivierung kontrolliert. Ein zusätzliches Signal, wie durch Kostimulation vermittelt, ist in diesem Zusammenhang offenbar vernachlässigbar.

6.2.7. NFAT-Transkriptionsfaktoren regulieren die iTreg-Differenzierung *in vivo*

Die Konversion von Tconv zu iTregs *in vivo* wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Beispielsweise balancieren die Qualität des Antigens, die immun-modulatorischen Eigenschaften der DCs und das umgebende Lymphokininmilieu eine entzündliche oder tolerante Immunreaktion. Die Differenzierung von iTregs *in vivo* wird somit von komplexen Regulationsmechanismen beeinflusst und mag sich durchaus von den *in vitro* Bedingungen unterscheiden. Da sowohl natürliche als auch induzierte Tregs Foxp3 exprimieren, ist eine Unterscheidung beider Zelltypen anhand dieses Transkriptionsfaktors ausgeschlossen. Eine Möglichkeit, iTregs von nTregs abzugrenzen, ist durch die Expression des Transkriptionsfaktor Helios gegeben, wobei nTregs stets Foxp3⁺Helios⁺, iTregs hingegen (meist) Foxp3⁺Helios⁻ sind (6). Allerdings wird diese Abgrenzung kontrovers diskutiert, da mit ausgewählten Mausmodellen widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden (siehe dazu (301)). Ungeachtet dessen wurde versucht, in den mesenterischen Lymphknoten von

wild type, $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4-cre^+$ und $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4-cre^+ \times Nfatc2^{-/-}$ Mäusen eine solche Differenzierung zwischen nTregs und iTregs vorzunehmen (Abb. 6.2.14.). Die mesenterischen Lymphknoten regulieren die mukosale Immunität bei gleichzeitiger oraler Toleranz. Daher werden in diesen lymphoiden Organen ständig iTregs gebildet (302). Der Anteil von $Foxp3^+Helios^+$ nTregs in NFAT-defizienten Mäusen war unverändert (in Einklang mit den in Punkt 6.2.3. beschriebenen Befunden). Die $Foxp3^+Helios^-$ iTregs hingegen waren sowohl in den $Nfatc1$ - insbesondere aber in den $Nfatc1Nfatc2$ -defizienten T-Zellen klar reduziert (Abb. 6.2.14.). Auch die Induktion von iTregs durch allogene Bluttransfusion und gleichzeitige Blockierung des CD4-Korezeptors *in vivo*, welche in Kooperation mit dem Labor von Prof. Birgit Sawitzki durchgeführt wurde, bestätigten diese Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Es ist somit festzuhalten, dass die Foxp3-Expression und damit die Differenzierung von iTregs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von NFAT-Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden.

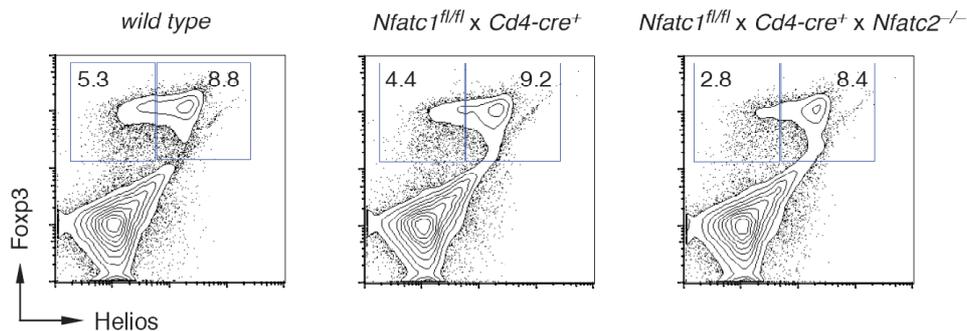


Abb. 6.2.14. NFAT-Transkriptionsfaktoren regulieren die iTreg-Differenzierung *in vivo*. FACS-Analyse der $CD4^+$ -Gesamtzellen aus den mesenterischen Lymphknoten von *wild type*, $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4-cre^+$, $Nfatc2^{-/-}$, $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4-cre^+ \times Nfatc2^{-/-}$ Mäusen. Der Transkriptionsfaktor Helios wurde als Marker herangezogen zwischen natürlichen ($Helios^+Foxp3^+$) und induzierten ($Helios^-Foxp3^+$) Tregs zu unterscheiden (6). Deutlich war eine Abnahme der iTreg, nicht aber der nTregs, in NFAT-defizienten Mäusen zu beobachten.

6.2.8. Verringerte Kerntranslokation von NFAT-Faktoren in Foxp3⁺ T-Zellen

Obwohl NFAT-Proteine für die Differenzierung von iTregs essentiell sind, scheinen diese Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung und die Funktion von nTregs eine untergeordnete Rolle zu spielen. Darüber hinaus zeigte sich, dass *Nfatc1*-defiziente Foxp3⁺ iTregs trotz ihrer stark beeinträchtigten Entwicklung unveränderte suppressive Eigenschaften *in vivo* besitzen (in Kooperation mit Prof. Birgit Sawitzki). Daher wurde evaluiert, in wieweit NFAT-Transkriptionsfaktoren, die in Effektorzellen nach TCR-Stimulation rasch in den Kern transloziert werden, in natürlichen und induzierten Foxp3⁺ Tregs aktiviert werden. Dies wurde mittels konfokaler Immunfluoreszenz ermittelt (Abb. 6.2.15. bis Abb. 6.2.17.).

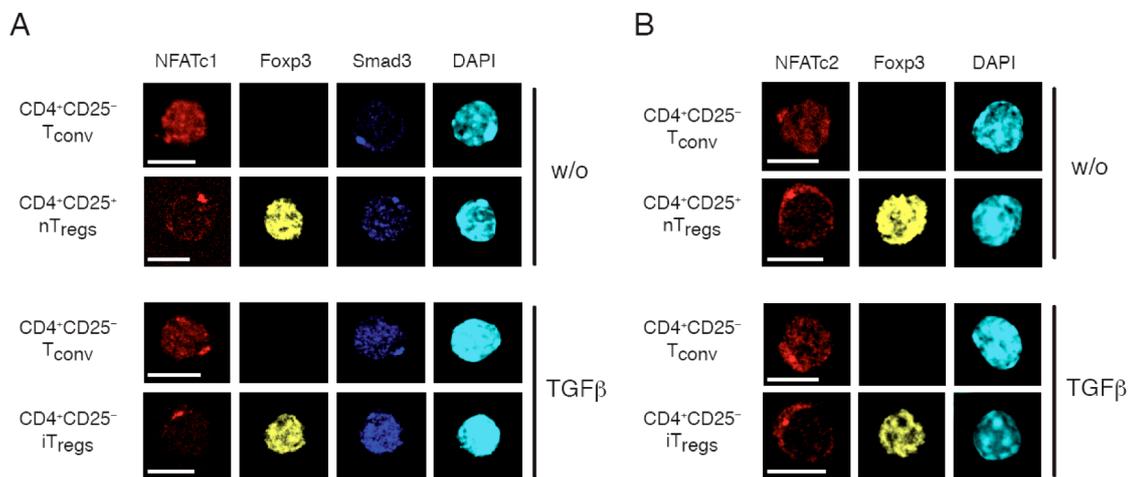


Abb. 6.2.15. NFATc1 und NFATc2 zeigen kaum Kerntranslokation in aktivierten Foxp3⁺ T-Zellen. (A und B) CD4⁺CD25⁻ Tconv oder CD4⁺CD25⁺ nTregs wurden isoliert und 6 h mit anti-CD3/CD28 (ohne TGFβ) stimuliert. Anschließend wurden NFAT (rot), Foxp3 (gelb), Smad3 (blau) sowie Chromatin (cyan) gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (A und B, oberer Teil: „w/o“). TGFβ-induzierte Foxp3⁺ iTregs und Tconv (der gleichen Kultur) nach 24 h Stimulation mit anti-CD3/CD28 wurden, wie oben beschrieben, analysiert (A und B, unterer Teil: „TGFβ“). Sowohl NFATc1 (A) als auch NFATc2 (B) zeigten eine beeinträchtigte Kerntranslokation in Foxp3⁺ T-Zellen.

Um die subzelluläre Verteilung von NFATc1, NFATc2 und Smad3 in Tconv und nTregs genauer zu analysieren, wurden diese T-Zelltypen isoliert (CD4⁺CD25⁻ oder CD4⁺CD25⁺) und getrennt sechs Stunden mit anti-CD3/CD28 stimuliert (Abb. 6.2.15. A und B, oberer Teil: „w/o“). Eine Analyse von TGFβ-generierten iTregs erfolgte nach 24 Stunden anti-CD3/CD28-Stimulation in Gegenwart von 5 ng/ml TGFβ (Abb. 6.2.15. A und B, unterer Teil: „TGFβ“). Die Zellen wurden auf Objektträger fixiert, und anschließend wurde die Lokalisation von NFATc1 (Abb. 6.2.15. A), NFATc2 (Abb. 6.2.15. B) (beide rot), Foxp3 (gelb) und Smad3 (blau) mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie analysiert. Sowohl in den Foxp3⁺ iTregs als auch in den Foxp3⁺ nTregs konnte im Vergleich zu Tconv

nur eine sehr geringe Kerntranslokation von NFATc1 und NFATc2 beobachtet werden (Abb. 6.2.15. und quantifiziert in Abb. 6.2.17.). Dies entspricht den Daten, die im Zusammenhang mit der Lokalisation von ICER in nTregs erhoben wurden, erweitert aber diese Beobachtung auf iTregs (siehe Punkt 6.1.1 bzw. Abb. 6.1.2. und Abb. 6.1.3.). Übereinstimmend mit einer TGF β -Signalgebung konnte auch eine Zunahme der Smad3-Expression sowie dessen Kerntranslokation unter Einfluss von TGF β beobachtet werden. Dies zeigte sich auch bei stimulierten nTregs, die konstitutiv TGF β sezernieren, welches wiederum autokrin wirken kann. Um die in Abb. 6.2.15. gezeigten repräsentativen Mikrographien quantitativ auszuwerten, wurden etwa 30 Zellen von mindestens drei unabhängigen Versuchen analysiert und in den Abb. 6.2.17. A und B zusammengefasst.

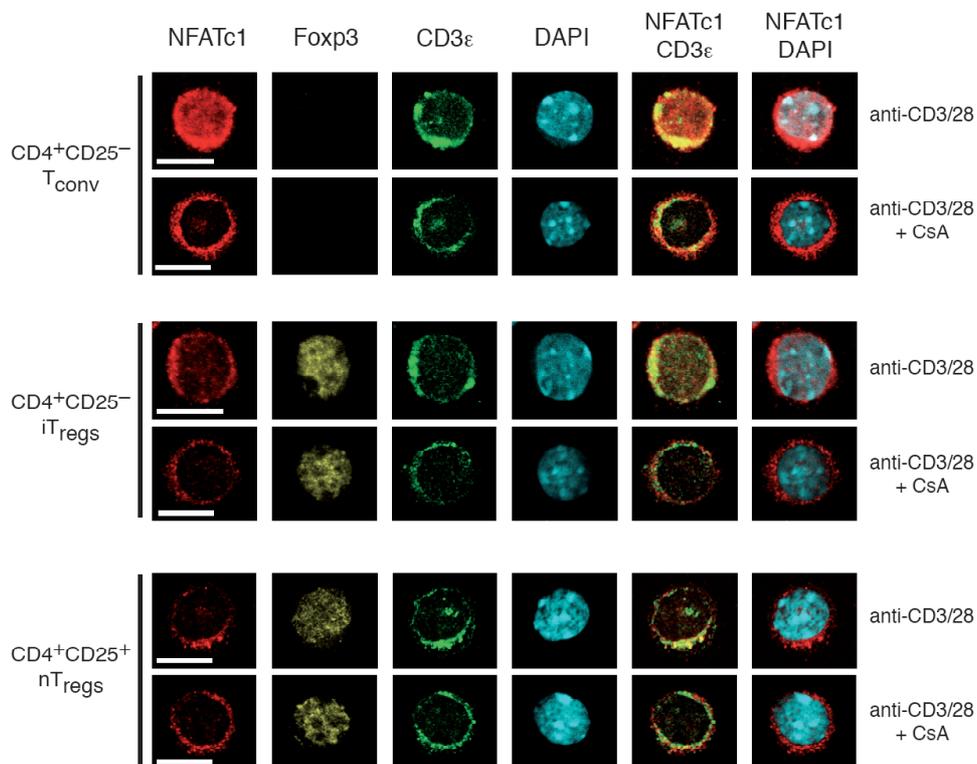


Abb. 6.2.16. NFATc1 transloziert kaum in den Kern von aktivierten Foxp3⁺ T-Zellen. Konfokale Mikroskopie der NFATc1 Kerntranslokation in Tconv, TGF β -generierten iTregs und nTregs. Die verschiedenen T-Zelltypen wurden nach 7 Tagen Differenzierungs-Kultur 6 h mit anti-CD3/CD28 restimuliert (mit oder ohne 10 nM CsA). In Foxp3⁺ iTregs und nTregs (gelb) zeigte sich eine klare Beeinträchtigung der Kerntranslokation von NFATc1 (rot). Die Färbung von CD3 ϵ (grün) diente zur Abgrenzung des Zytoplasmas zum Kern (cyan). CsA-behandelte T-Zellen zeigten erwartungsgemäß keine Kerntranslokation von NFATc1.

Die Zellen wurden hinsichtlich der subzellulären Verteilung von NFATc1 in Foxp3⁺ iTreg und nTregs im Vergleich zu Foxp3⁻ Tconv ausgewertet und die Ergebnisse anschließend in „Prozent der Zellen mit deutlicher Kernfärbung von NFATc1“ dargestellt (Abb. 6.2.17. B).

Weiterhin konnte eine reduzierte NFATc1- und NFATc2-Kerntranslokation nach Primärstimulation mit anti-CD3/CD28 in murinen und humanen nTregs durch Immunoblot-Experimente bestätigt werden (Daten nicht gezeigt und HD Dr. Helmut Jonuleit, persönliche Mitteilung). Zusätzlich zur Beeinträchtigung der NFAT-Kerntranslokation bei der Primärstimulation von Tregs sollte dieses Phänomen auch bei Restimulation *in vitro* überprüft werden. Dazu wurden sowohl $CD4^+CD25^+$ nTregs als auch $CD4^+CD25^-$ Tconv isoliert, drei Tage mit anti-CD3/CD28 stimuliert und anschließend weitere vier Tage zur Ruhe gebracht. Durch Zugabe von 5 ng/ml TGF β und IL-2 zur Kultur wurden die T-Zellen zu Foxp3 $^+$ iTregs polarisiert. Eine Restimulation dieser Zellen erfolgte sechs Stunden durch anti-CD3/CD28. Der Zusatz von CsA diente dabei jeweils als Negativkontrolle der NFAT-Aktivierung (Abb. 6.2.16). Erwartungsgemäß zeigten sowohl die Foxp3 $^+$ nTregs als auch die Foxp3 $^+$ iTregs kaum eine Kerntranslokation von NFATc1.

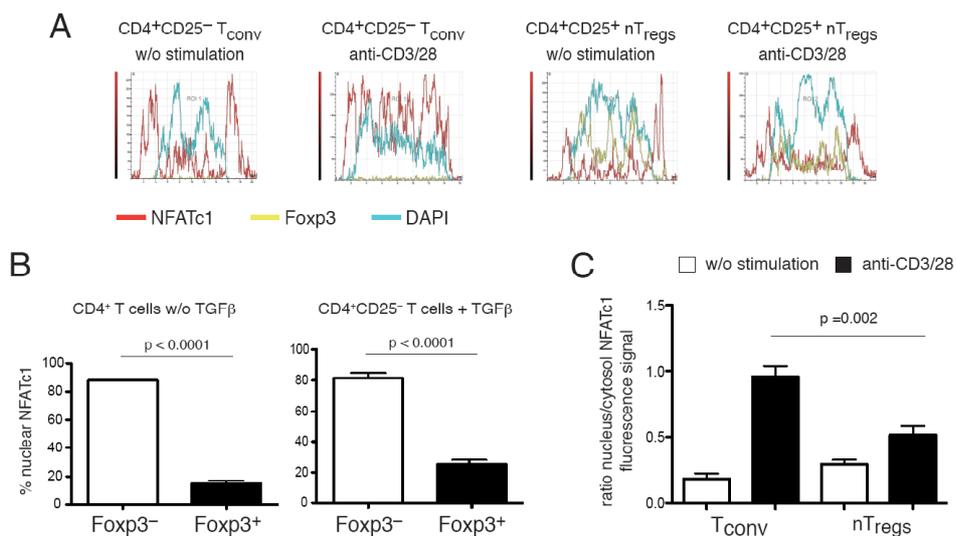


Abb. 6.2.17. Quantifizierung der NFATc1-Translokation nach Stimulation in Foxp3 $^+$ Tregs.

(A) Quantitative Auswertung der in Abb. 6.2.15 und Abb. 3.2.16 gezeigten mikroskopischen Aufnahmen anhand von Histogrammen. (B) Quantifizierung von etwa 30 Zellen aus drei unabhängigen Versuchen: Die subzelluläre Lokalisation von NFATc1 ist in „Prozent der Zellen mit einer (deutlichen) Kernfärbung“ angegeben. Dabei repräsentieren die $CD4^+$ Foxp3 $^-$ T-Zellen „w/o TGF β “ die nTregs (links), die $CD4^+$ Foxp3 $^+$ T-Zellen „+ TGF β “ die iTregs (rechts). (C) Auswertung der subzellulären NFATc1-Verteilung der unter Abb. 6.2.16. gezeigten nTregs und Tconv als „Ratio des Kern- gegen Zytoplasma-Fluoreszenzsignals“.

CD3 ϵ (grüne Färbung) diente, als Bestandteil des TCR-Komplexes, als Marker für die Plasmamembran. Eine Überlagerung von NFATc1 (rot) mit CD3 ϵ (Zytoplasma) und dem Kern, gefärbt mit DAPI (cyan), gab Aufschluss über die subzelluläre NFATc1-Verteilung. Eine Quantifizierung von jeweils etwa 30 Zellen als „Ratio des Kern- gegen Zytoplasma-

Fluoreszenzsignals“ bestätigte eine auffällig reduzierte NFATc1-Kerntranslokation in Tregs (Abb. 6.2.17 C).

6.2.9. Foxp3 hemmt die Autoregulation von NFATc1/ α A in Tregs

Die Transkription der Isoformen von NFATc1 wird durch zwei Promotoren reguliert und ermöglichen die Expression von sechs verschiedenen Proteinen (177, 179, 199). Für die kürzeste Isoform NFATc1/ α A wurde außerdem eine positive Autoregulation beschrieben (174, 181). Der vor dem Exon 1 gelegene Promotor „P1“ zeichnet sich insbesondere durch eine starke Induzierbarkeit aus (174, 178, 181). In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass nTregs eine deutlich verringerte Expression von NFATc1/ α A nach Stimulation mit anti-CD3/CD28 aufweisen (179). In welchem Maße der Repressor Foxp3 die Aktivität des *Nfatc1* P1 Promotors hemmt und somit zu einer möglichen negativen Rückkopplung beiträgt, sollte untersucht werden.

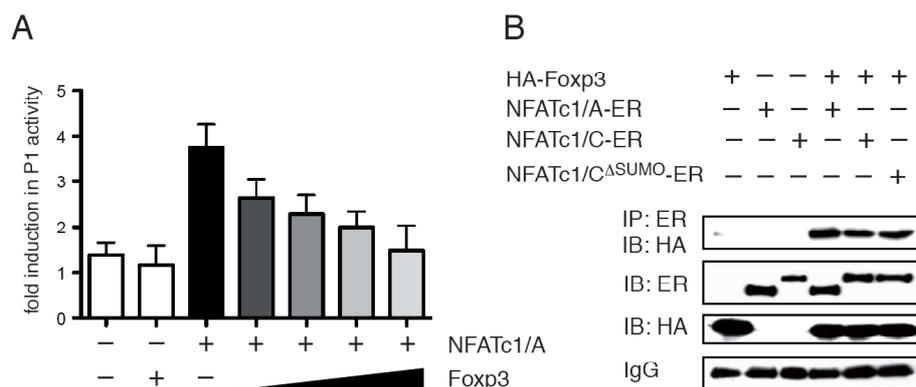


Abb. 6.2.18. Foxp3 reprimiert den autoregulierten NFATc1 P1 Promotor. (A) Foxp3 hemmt die Expression von *Nfatc1* P1 im Luciferase-Assay. HEK-Zellen wurden mit einem *Nfatc1* P1-kontrollierten Luciferase Reporter-gen-Konstrukt zusammen mit NFATc1- und zunehmenden Mengen eines Foxp3-Expressionsvektors transfiziert. Konzentrations-abhängig konnte eine Hemmung der *Nfatc1* P1 Promotoraktivität durch Foxp3 nachgewiesen werden. (B) CoIP von NFATc1 und Foxp3. Die Isoformen NFATc1/A-ER, NFATc1/C-ER sowie die nicht SUMOylierbare Mutante NFATc1^{ΔSUMO}-ER wurden zusammen mit HA-Foxp3 in HEK-Zellen überexprimiert. Die Protein-Protein-Interaktion wurde anschließend durch CoIP von ER und Detektion mittels eines HA-Antikörpers analysiert. Foxp3 interagiert dabei mit allen drei NFATc1-Isoformen.

Zunächst wurde die Suppression des *Nfatc1* P1 Promotors durch Foxp3 in einem Luciferase-Assay geklärt: HEK 293T Zellen wurden sowohl mit einem NFATc1-Expressionsvektor und steigenden Mengen eines Foxp3-Plasmids als auch mit einem *Nfatc1* P1-kontrollierten Luciferase-Reporter-genkonstrukt transfiziert (Abb. 6.2.18. A). Es konnte dabei eine konzentrationsabhängige Repression der *Nfatc1* P1-Luciferaseaktivität durch Foxp3 gezeigt

werden. Anhand dieser Resultate lässt sich schlussfolgern, dass ein möglicher NFATc1/Foxp3-Komplex die Aktivität des *Nfatc1* P1 Promotors reguliert und dadurch mit der positiven NFATc1-Autoregulation interferiert. In welchem Umfang eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen NFATc1 und Foxp3 stattfindet sollte weiterführend durch eine Koimmunpräzipitation (CoIP) beider Faktoren geklärt werden. Dazu wurden die mit einem ER-Tag versehenen NFATc1-Isoformen NFATc1/A und NFATc1/C sowie deren nicht-SUMOylierbare Mutante NFATc1/C^{ΔSUMO} mit HA-Foxp3 in HEK 293T Zellen überexprimiert. Die anschließende Präzipitation mit anti-ER, gefolgt von einer Detektion mit anti-HA Antikörpern, zeigte die Interaktion beider Proteine (Abb. 6.2.18. B). Sowohl die kurze (NFATc1/A) als auch die beiden langen NFATc1 Isoformen (NFATc1/C und NFATc1/C^{ΔSUMO}) interagierten folglich direkt mit Foxp3.

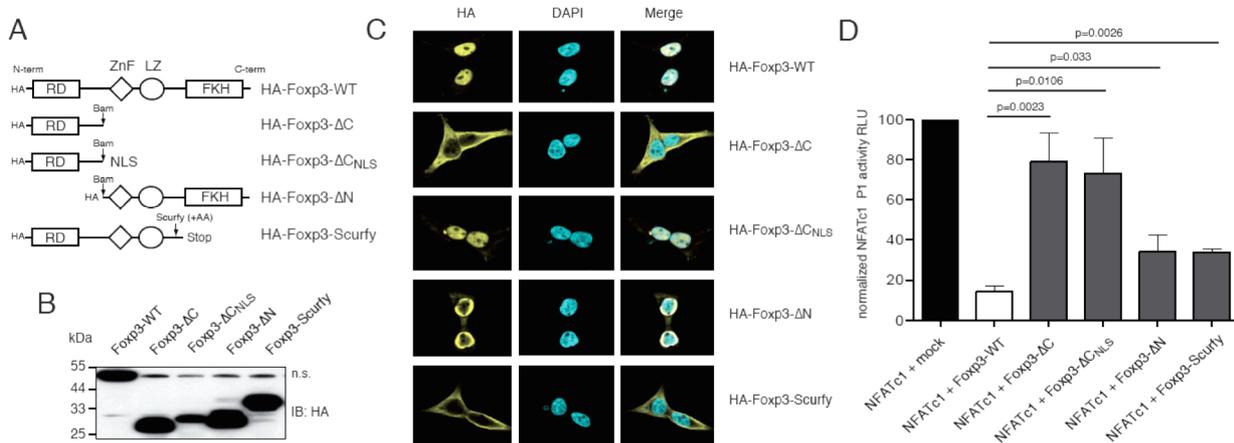


Abb. 6.2.19. Der C-Terminus von Foxp3 ist essentiell für die Repression des *Nfatc1* P1 Promotors.

(A) Schematische Darstellung der verschiedenen verwendeten Foxp3-Deletionsmutanten. (B und C) Verifizierung der Proteinexpression und –größe im Western-Blot (B), sowie Analyse der subzellulären Verteilung der Foxp3-Mutanten in HEK-293T-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie (C). (D) Der C-Terminus ist essentiell für die Repression des *Nfatc1* P1 Promotors. HEK-Zellen wurden mit einem *Nfatc1* P1-kontrollierten Luciferase-Reportergenkonstrukt zusammen mit NFATc1- und den verschiedenen Foxp3-Expressionsvektoren transfiziert. Deletionen am C-Terminus von Foxp3 (ΔC oder ΔC_{NLS}) zeigten keine Suppressionsfähigkeit für *Nfatc1* P1. Die Klonierungsarbeiten der Foxp3-Mutanten wurden freundlicherweise von Dr. Berberich-Siebelt durchgeführt.

Um zu evaluieren, welche Domänen von Foxp3 an der Suppression des *Nfatc1* P1 beteiligt sind, wurden mehrere Foxp3-Deletionsmutanten erzeugt: Foxp3ΔC (ohne Zink-Finger, *leucine zipper* und die C-terminale Forkhead-Domäne), Foxp3ΔC_{NLS} (wie Foxp3ΔC, aber mit einem zusätzlichen NLS, um die Kerntranslokation zu ermöglichen), Foxp3ΔN (Deletion der Forkhead-Domäne) und Foxp3-Scurfy (natürlich-vorkommende Mutation, die eine Leserasterverschiebung im Foxp3-Gen verursacht) (Abb. 6.2.19. A). HEK 293T-Zellen

wurden mit Expressionskonstrukten des *wild type* Foxp3 (als Positivkontrolle) und den verschiedenen Foxp3-Mutanten transfiziert. Anschließend wurde sowohl deren Expression im Western-Blot (Abb. 6.2.19. B) als auch die subzelluläre Verteilung der verschiedenen Konstrukte mittels konfokaler Mikroskopie verifiziert (Abb. 6.2.19. C). Alle Foxp3-Mutanten wurden entsprechend ihrer postulierten Größe exprimiert, wobei Foxp3 Δ C und Foxp3-Scurfy erwartungsgemäß keine Kerntranslokation zeigten. Um den Einfluss der verschiedenen Deletionsmutanten auf die Aktivität des *Nfatc1* P1 Promotors zu untersuchen, wurden Luciferase-Assays durchgeführt (Abb. 6.2.19. D). Dazu wurden HEK 293T-Zellen mit einem *Nfatc1* P1-kontrollierten Luciferase-Reportergenkonstrukt zusammen mit NFATc1- und den verschiedenen Foxp3-Expressionsvektoren transfiziert. Alle Deletionsmutanten zeigten eine signifikant reduzierte Suppressionsfähigkeit der P1-Aktivität. Insbesondere der Verlust des C-Terminus (und damit auch der Forkhead-Domäne), zusammen mit den für die Dimerisierung notwendigen Zink-Finger und *leucine zipper* Motiven (Foxp3 Δ C und Foxp3 Δ C_{NLS}), führte zu einem totalen Verlust der *Nfatc1* P1 Repression (Abb. 6.2.19. D). Ausgehend von diesen Ergebnissen lässt sich die Bildung eines NFATc1/Foxp3-Komplexes am *Nfatc1* P1 Promotor vermuten, der dem für den *Il2*-Promotor beschriebenen NFATc2/Foxp3-Komplex vergleichbar ist (218, 219). Es existiert also eine negative Rückkopplung von Foxp3 auf *Nfatc1*, da zunächst die Foxp3-Expression während der Differenzierung in iTregs von NFAT abhängig ist, nachfolgend das induzierte Foxp3 aber den *Nfatc1* P1 Promotor reprimiert.

Um zu überprüfen, ob Foxp3 *in vivo* direkt an die regulatorischen Elemente des *Nfatc1*-Gens bindet, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt (Abb. 6.2.20.). Dazu wurden zunächst aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen über sieben Tage Tconv (nur mit IL-2) und Foxp3⁺ iTregs (mit IL-2 und TGF β) differenziert und deren Foxp3-Expression durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 6.2.20. A). Beide Zelltypen wurden unstimuliert und nach Restimulation durch anti-CD3/CD28 hinsichtlich der Bindung von NFATc1, Foxp3 und Smad3 an den *Nfatc1* P1 Promotor mittels ChIP untersucht (Abb. 6.2.20. B). Sowohl in Tconv als auch in iTregs konnte eine Bindung von NFATc1 an den eigenen Promotor nach Restimulation gezeigt werden, womit die (positive) Autoregulation bestätigt wurde. In den TGF β -behandelten Zellen konnte zusätzlich die Bindung von Foxp3 und Smad3 an P1 nachgewiesen werden. Allerdings schien dies von Restimulation unabhängig zu sein. Es zeigte sich also, dass Foxp3 an den *Nfatc1* P1 Promotor bindet und nach (Re-)Stimulation mit NFAT Komplexe bildet. Inwiefern diese NFAT/Foxp3-Dimere eine *Nfatc1* P1-gesteuerte Transkription supprimieren und somit die Expression von NFATc1/ α A in Tregs dämpfen, sollte mittels konfokaler Mikroskopie (Abb. 6.2.21) und Immunoblot-Verfahren (Abb.

6.2.22.) weiter untersucht werden. Zunächst wurden naive T-Zellen sieben Tage durch IL-2 und TGF β zu iTregs polarisiert, wobei etwa die Hälfte der Zellen Foxp3 exprimiert (Abb. 6.2.21. und Daten nicht gezeigt).

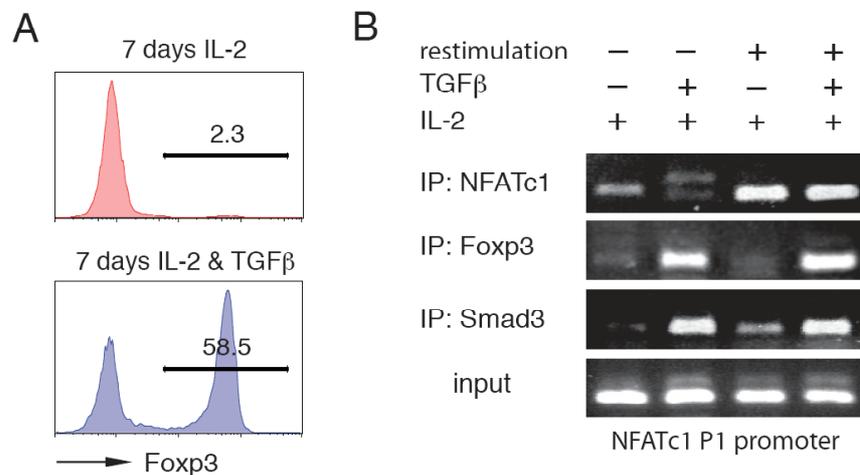


Abb. 6.2.20. Foxp3 bindet direkt an den NFATc1 P1 Promotor. (A) CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden 7 Tage mit anti-CD3/CD28 mit (iTregs) oder ohne TGF β stimuliert, und die Foxp3-Expression beider Zelltypen wurde mittels FACS bestimmt. (B) Die in A generierten Zellen wurden in einem ChIP-Experiment hinsichtlich der Bindung von Foxp3, Smad3 und NFATc1 an den *Nfatc1* P1 Promotor analysiert. Deutlich war eine Bindung von Foxp3 (und Smad3) an den *Nfatc1* P1 Promotor in TGF β -generierten iTregs detektierbar. Nach Restimulation konnte auch die Bindung von NFATc1 nachgewiesen werden. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Berberich-Siebelt

Anschließend wurden die Zellen in frisches Medium überführt und 12 Stunden mit anti-CD3/CD28 restimuliert, bevor die Zellen auf Objektträger fixiert wurden. Um die individuelle Expression von NFATc1/ α in Foxp3⁻ (Tconv) und Foxp3⁺ (iTregs) T-Zellen zu ermitteln, wurde ein gegen das NFATc1/ α -Peptid gerichteter Antikörper (Fa. ImmunoGlobe) verwendet. Dieser erkennt nur die α -Peptid-enthaltenen NFATc1-Isoformen, wobei insbesondere NFATc1/ α A nach (Re-) Stimulation in Lymphozyten exprimiert wird (158, 174, 177, 179, 180). Konfokale Immunfluoreszenz zeigte bezüglich der Expression von NFATc1/ α und Foxp3 eine klare Reduktion der NFATc1-Expression in Foxp3⁺ Zellen (Abb. 6.2.21). Dabei ist hervorzuheben, dass es sich um Foxp3⁻ und Foxp3⁺ T-Zellen derselben IL-2- und TGF β -polarisierten Kultur handelte, was unerwünschte sekundäre Nebeneffekte ausschloss. So konnte die verminderte NFATc1/ α -Expression auf Einzelzellniveau direkt mit der Expression von Foxp3 korreliert werden (Abb. 6.2.21. A und B). Eine Quantifizierung der unter Abb. 6.2.21 gezeigten mikroskopischen Aufnahmen von etwa 30 individuellen Zellen aus drei unabhängigen Versuchen bestätigte die Repression von NFATc1/ α in Foxp3⁺ iTregs

(Abb. 6.2.21 C). Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit natürlichen Tregs auf RNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

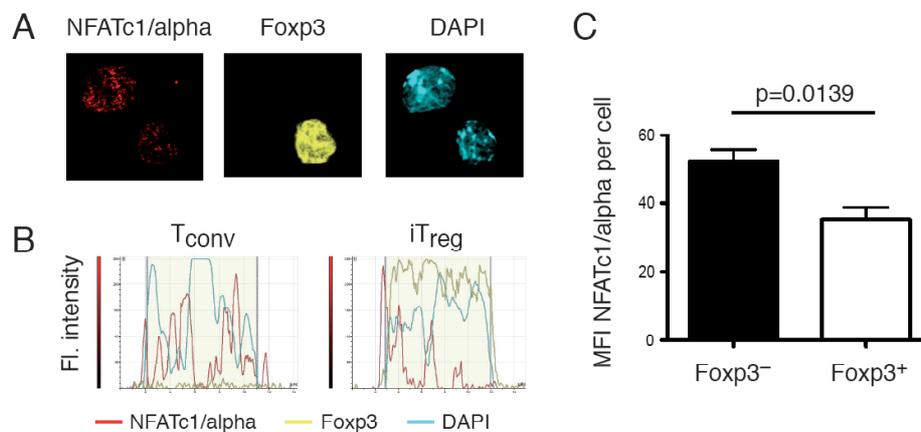


Abb. 6.2.21. Foxp3⁺ iTregs zeigen weniger NFATc1/α-Expression. (A und B) Analyse der NFATc1/α-Expression (rot) in Tconv und Foxp3⁺ iTregs (gelbe Färbung) mittels konfokaler Mikroskopie (A). Repräsentative Histogramme der beiden Zelltypen verdeutlichen die reduzierte NFATc1/α-Expression (B). (C) Quantitative Auswertung von etwa 30 Zellen aus drei unabhängigen Versuchen der unter A gezeigten mikroskopischen Aufnahmen: Die Expression von NFATc1/α ist als „Intensität des Fluoreszenzsignals (MFI) pro Zelle“ angegeben.

Western-Blot-Experimente dienten zu einer weiterführenden Analyse der reduzierten NFATc1-Proteinexpression in Tregs (Abb. 6.2.22.). Dazu wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen drei Tage mit anti-CD3/CD28 aktiviert und vier weitere Tage zur Ruhe gebracht. Die T-Zellen wurden dabei unter iTreg-Bedingungen bzw. nur mit IL-2 polarisiert, anschließend wurde die Foxp3-Expression beider Bedingungen durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 6.2. 22. A). Es konnten üblicherweise über 80% Foxp3⁺ T-Zellen durch IL-2 plus TGFβ generiert werden. Nur diese hochreinen iTreg-Kulturen wurden nachfolgend für Immunoblot-Analysen verwendet (Abb. 6.2.22. A). Sowohl Tconv (nur IL-2) als auch iTregs (IL-2 und TGFβ), wurden mit anti-CD3 allein, mit anti-CD3/CD28 oder mit anti-CD3/CD28 plus Cyclosporin A (CsA) 12 Stunden restimuliert, lysiert und im Western-Blot hinsichtlich der Expression von NFATc1 analysiert (Abb. 6.2.22. B und C). CsA hemmte dabei die Calcineurin-abhängige NFAT-Aktivierung und interferierte demzufolge mit der autoregulierten NFATc1-Expression. Durch Restimulation mit anti-CD3/CD28 konnte in Tconv eine maximale NFATc1(α)-Expression erreicht werden. Stimulation mit anti-CD3 allein führte zu auffällig verringerten NFATc1-Mengen. Regulatorische T-Zellen hingegen zeigten nahezu keine NFATc1/α-Expression (Abb. 6.2.22 B). Auch die Gesamtmenge an NFATc1 war stark reduziert (Abb. 6.2.22. C). Bezüglich der Größe der NFATc1(α)-Banden im Gel darf man annehmen, dass

insbesondere die kurze induzierbare Isoform NFATc1/ α A in (i)Tregs reduziert ist. Diese Isoform wird unter Kontrolle des *Nfatc1* P1 Promotors transkribiert (158, 174, 177, 179, 180). Dementsprechend korreliert die Suppression von NFATc1/ α A mit der Repression von P1 durch Foxp3 (Abb. 6.2.18. bis 3.2.20.). Weiterhin konnte eine beeinträchtigte NFAT-Kerntranslokation nach Aktivierung von Foxp3⁺ nTregs und Foxp3⁺ iTregs nachgewiesen werden (siehe Punkt 6.2.8.). Die Expression von NFATc1/ α A wird dabei positiv durch Autoregulation beeinflusst (174, 176). Die verringerte Translokation von NFAT in den Kern nach Stimulation von Foxp3⁺ T-Zellen führt letztlich ebenfalls zu einer reduzierten *Nfatc1* P1-Aktivität. Es liegt also nahe, dass in Tregs die Expression von NFATc1/ α A auf zwei Ebenen reguliert wird: Sowohl durch die direkte Foxp3-Repression von *Nfatc1* P1 als auch indirekt, durch Hemmung der NFAT-Kerntranslokation. Folglich wird die Menge an NFATc1/ α A in Tregs niedrig gehalten, um auf diese Weise deren regulatorische Eigenschaften zu gewährleisten.

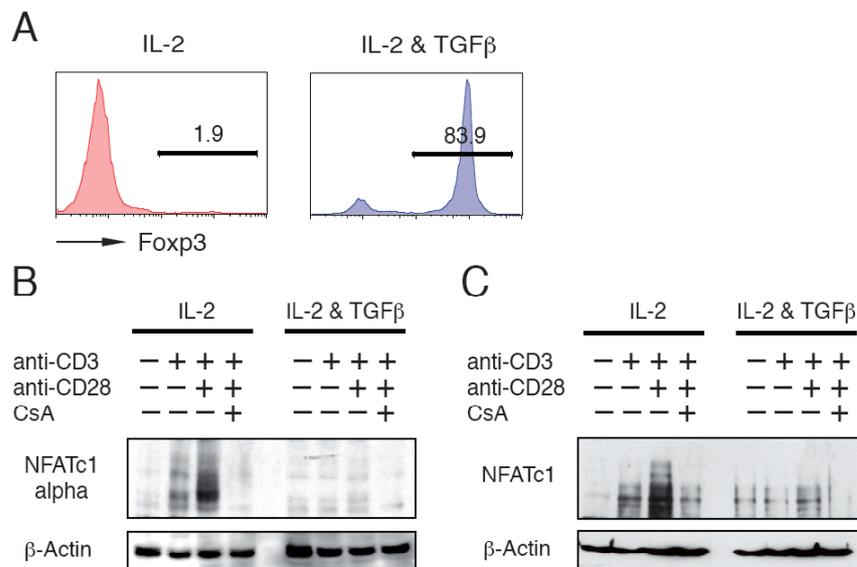


Abb. 6.2.22. Foxp3⁺ iTregs zeigen weniger NFATc1/ α A-Expression. (A) CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden 7 Tage mit anti-CD3/CD28 mit TGF β (iTregs) oder ohne TGF β (Tconv) stimuliert, und die Foxp3-Expression beider Zelltypen wurde mittels FACS bestimmt. (B und C) Die unter A generierten Zellen wurden im Western-Blot hinsichtlich der Proteinexpression von NFATc1/ α A (B) und von Gesamt-NFATc1 (C) analysiert. Es zeigte sich nahezu keine Expression von NFATc1/ α A in anti-CD3/CD28 restimulierten iTregs. Demzufolge war auch die Gesamtmenge an NFATc1 in diesen Zellen deutlich reduziert.

6.3. Expression und Funktion von NFAT in dendritischen Zellen

6.3.1. NFATc1 wird in DCs hauptsächlich vom *Nfatc1* P2 Promotor transkribiert

Um die Beteiligung von verschiedenen NFAT-Faktoren und Isoformen bei der Reifung und Funktion dendritischer Zellen (DCs) zu untersuchen, sollte die Expression von NFATc1 genauer analysiert werden. Wie bereits mehrfach betont wurde wird NFATc1 durch zwei Promotoren (*Nfatc1* P1 und *Nfatc1* P2), alternatives *splicen* und verschiedene Polyadenylierungs-Muster reguliert. Dadurch wird die Expression von (mindestens) sechs verschiedenen Isoformen ermöglicht (177, 179, 199). Der vor dem Exon 1 gelegene P1 Promotor zeichnet sich durch eine starke Induzierbarkeit aus, der (im Intron) vor dem Exon 2 angeordnete P2 Promotor ist dagegen eher konstitutiv (siehe Schema Abb. 6.3.1. C) (174, 178, 181). Transkripte, ausgehend von P1, enthalten ein sogenanntes α -Peptid, P2-Transkripte hingegen exprimieren Proteine mit einem etwas kürzeren β -Peptid (Schema Abb. 6.3.1. D).

Die Expression von (Gesamt-) NFATc1 in DCs wurde zunächst mit Hilfe einer BAC-transgenen NFATc1-GFP-Reportermaus untersucht. Das Knochenmark dieser Reportermaus wurde acht Tage in GM-CSF-Kultur zu dendritischen Zellen polarisiert, und die Expression von GFP wurde täglich durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 6.3.1. A). Es zeigte sich dabei eine deutliche Zunahme der GFP-Intensität in den ersten vier Tagen der Kultur, während danach ein Expressions-Plateau erreicht wurde. Eine Zusammenfassung der GFP *mean fluorescence intensity* (MFI) über acht Tage ist in Abb. 6.3.1. B dargestellt. Eine genauere Analyse der NFATc1-Expression wurde mittels RT-PCR vorgenommen (Abb. 6.3.1. C und D). Dazu wurden *wild type* Knochenmarkszellen durch GM-CSF zu dendritischen Zellen gereift, und die Transkription von NFATc1 wurde – ausgehend von *Nfatc1* P1 („P1 product“) und vom *Nfatc1* P2 („P2 product“) Promotor – untersucht. Unterschiedliche Zyklenzahlen der RT-PCR (28x, 32x, 35x) zeigten, dass NFATc1 hauptsächlich vom konstitutiven P2 Promotor transkribiert wird (Abb. 6.3.1.C). Expression – ausgehend vom P2 Promotor – kodiert für ein N-terminales β -Peptid, während P1-Transkripte ein α -Peptid enthalten. Variable C-Termini (NFATc1/A, -/B und -/C), in Kombination mit α - oder β -Peptid, definieren so sechs Isoformen (Schema Abb. 6.3.1. D) (174, 177, 178). In Übereinstimmung mit der Annahme, dass NFATc1 in dendritischen Zellen hauptsächlich von *Nfatc1* P2 transkribiert wird, konnten nur β -Peptid-enthaltende NFATc1-Isoformen detektiert werden (Abb. 6.3.1. D). In welchem Maße die Expression von NFATc1 an der Reifung von dendritischen Zellen beteiligt ist, sollte auch mittels konfokaler Mikroskopie untersucht werden. Knochenmarkszellen aus einer Tag fünf GM-CSF-Kultur (Maximum der NFATc1-Expression) wurden weitere 12 Stunden in GM-CSF-Medium oder in Medium ohne GM-CSF

kultiviert. Daneben wurde ein Ansatz auch mit LPS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträger fixiert, und die subzelluläre Verteilung von NFATc1 wurde analysiert (Abb. 6.3.1. E). In der GM-CSF-Kultur und – etwas weniger deutlich ausgeprägt – auch in der Medium-Kultur konnte eine Kernfärbung von NFATc1 detektiert werden. Aktivierung der Zellen mit LPS führte hingegen zur zytoplasmatischen Verteilung von NFATc1 (siehe dazu auch Punkt 6.3.4.). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass NFATc1 während der GM-CSF-Kultur überwiegend von *Nfatc1* P2 transkribiert wird und – ausgehend von der Kernlokalisation – in Gegenwart von GM-CSF möglicherweise an der Reifung und Proliferation von BMDCs beteiligt ist.

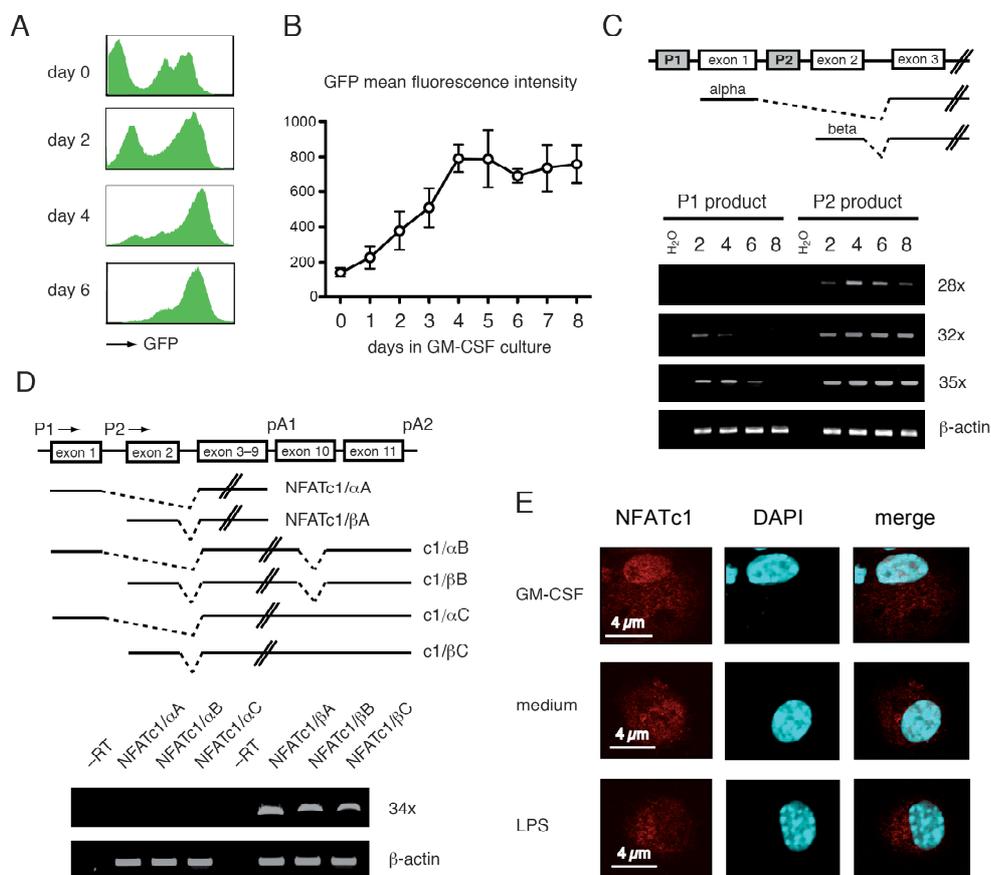


Abb. 6.3.1. NFATc1 wird während der Reifung von dendritischen Zellen hauptsächlich vom *Nfatc1* P2 Promotor transkribiert. (A und B) Expression von NFATc1 in DCs BAC-transgener NFATc1-GFP-Reportermaße. Repräsentative FACS-Analyse der GFP-Expression von BMDCs in GM-CSF-Kultur über 8 Tage (A) und Zusammenfassung dreier unabhängiger Versuche (B). (C und D) NFATc1 wird hauptsächlich vom konstitutiven *Nfatc1* P2 Promotor transkribiert. RT-PCR von DCs an Tag 2, 4, 6, und 8 in GM-CSF-Kultur: Überwiegend wurde NFATc1 vom P2 Promotor („P2 product“) transkribiert. Die Expression vom P1 Promotor („P1 product“) konnte nur mit sehr hohen Zyklenzahlen (35x) detektiert werden (C). (D) Entsprechend konnten hauptsächlich β-Peptid-enthaltene NFATc1-Isoformen (entspricht der P2 Transkription) durch RT-PCR nachgewiesen werden. (E) Immunfluoreszenz der subzellulären NFATc1-Lokalisation in BMDCs mit („GM-CSF“) und ohne GM-CSF („medium“) oder stimuliert mit LPS. Stimulation mit GM-CSF führte zu einer Kerntranslokation von NFATc1, während Aktivierung durch LPS eine zytoplasmatische Verteilung zeigte (siehe auch Punkt 6.3.4.)

6.3.2. Gegensätzliche Funktion von NFATc1 und NFATc2 bei der Generierung und Proliferation dendritischer Zellen

Durch die Verwendung von BMDCs, in denen entweder *Nfatc1* *in vitro* oder *Nfatc2* *in vivo* inaktiviert worden war, sollte die Funktion der einzelnen NFAT-Familienmitglieder bei der Generierung und Reifung dendritischer Zellen untersucht werden. Eine Möglichkeit, loxP-flankierte („gefloxte“) Gene *in vitro* auszuschneiden und somit „auszuschalten“ (*knock down*), ist die „Behandlung“ der Zellen mit rekombinantem Cre-Fusionsprotein (HTNCRE) (292, 293). Um NFATc1 in frischen Knochenmarkszellen von *Nfatc1^{fl/fl}*-Mäusen zu inaktivieren, wurde eine Zellsuspension durch Zugabe von HTNCRE-Protein für eine Stunde inkubiert, und die so behandelten Zellen wurden nachfolgend acht Tage in GM-CSF Kultur genommen. Die Effizienz der Gen-Rekombination durch HTNCRE wurde in einer spezifischen PCR-Reaktion überprüft (Abb. 6.3.2. A).

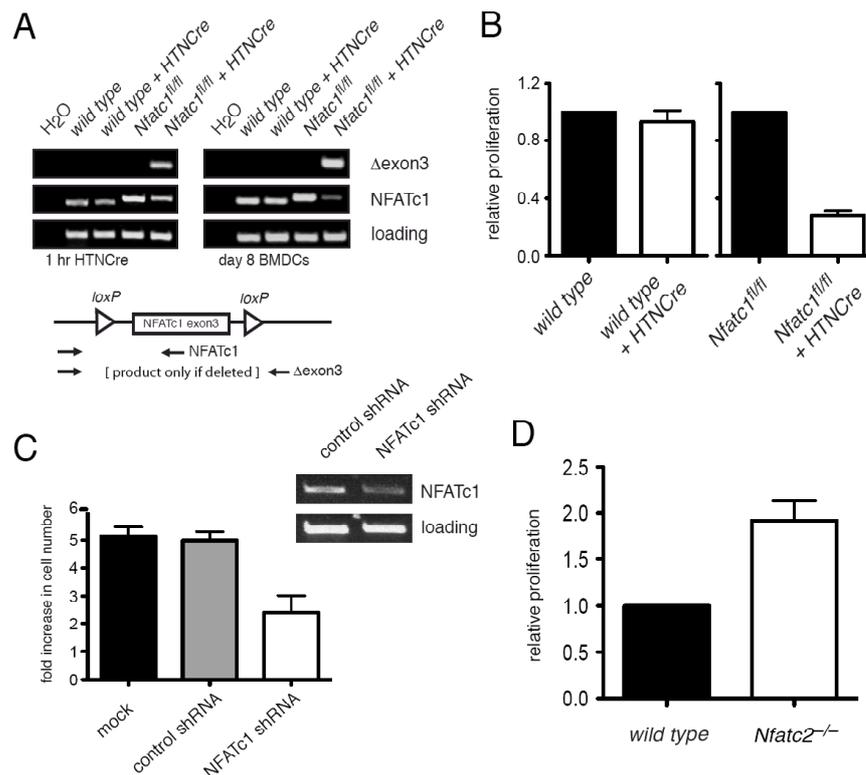


Abb. 6.3.2. NFATc1 und NFATc2 besitzen gegensätzliche Funktionen bei der Proliferation von BMDCs. (A) *In vitro* Deletion des gefloxten Exon 3 von *Nfatc1* in Knochenmarkszellen durch HTNCRE. PCR-Analysen 1 h nach HTNCRE-Behandlung (links) und nach 8 Tagen GM-CSF-Kultur (rechts) zeigten eine klare Reduktion des *Nfatc1*-Gens in *Nfatc1^{fl/fl}*-Knochenmarkszellen und die erfolgreiche Deletion des Exons 3 („Δexon3“). (B) Verlust von NFATc1 führt zu einer reduzierten Proliferation der GM-CSF-Kultur. Knochenmarkszellen wurden wie unter A beschrieben behandelt und zu DCs gereift, die Deletion von *Nfatc1* führte zu einer deutlich reduzierten Ausbeute an BMDCs („relative proliferation“). (C) *Knock-down* von *Nfatc1* mittels shRNA beeinträchtigte ebenfalls die Proliferation von BMDCs. (D) GM-CSF-generierte BMDCs von *Nfatc2^{-/-}* Mäusen zeigten hingegen eine erkennbar gesteigerte Proliferation.

Die Rekombination, also das Ausschneiden des geflochtenen Exon 3 von *Nfatc1* durch HTNCCre-Gabe zu *Nfatc1^{fl/fl}*-Zellen, war bereits nach einer Stunde detektierbar und nach acht Tagen GM-CSF-Kultur nahezu vollständig (Abb. 6.3.2. A). Ein für das deletierte Exon 3 von *Nfatc1* („ Δ Exon3“) sensitiver PCR-Assay zeigte ebenfalls die erfolgreiche Excision. Die Zahl der Zellen nach acht Tagen GM-CSF-Kultur gab Aufschluss über das Proliferationsverhalten der behandelten Zellen. Deletion von *Nfatc1* durch HTNCCre führte zu einer drastischen Reduktion der Zellzahl auf etwa 30%, im Vergleich zu unbehandelten oder *wild type* Zellen (Abb. 6.3.2. B).

Eine weitere Möglichkeit, die Funktion bestimmter Gene zu untersuchen, ist ein *knock-down* mit Hilfe spezifischer *short-hairpin RNA* (shRNA). Hierzu wurden Zellen einer GM-CSF-Kultur an Tag zwei und drei nach Präparation des Knochenmarks mit Retroviren, welche eine *Nfatc1*-spezifische shRNA tragen, zweimal infiziert. Die Effizienz des shRNA-vermittelten *Nfatc1* *knock-downs* wurde an Tag acht der Kultur mittels RT-PCR verifiziert, wobei spezifische Primer für das *Nfatc1* Transkript verwendet wurden (Abb. 6.3.2. C, rechts oben). Vergleichbar mit dem *knock-down* von *Nfatc1* durch HTNCCre konnte durch den Einsatz der *Nfatc1*-spezifischen shRNA eine auffällige Reduktion der Proliferation beobachtet werden (Abb. 6.3.2.).

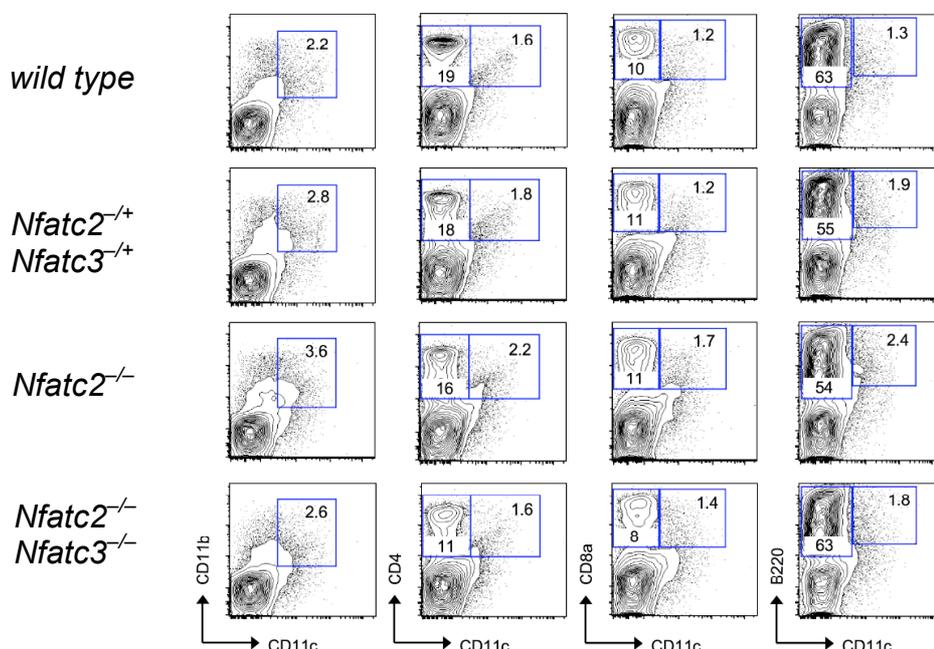


Abb. 6.3.3. Hyperproliferation von DCs in *Nfatc2^{-/-}* Mäusen. FACS-Analysen unterschiedlicher DC-Subpopulationen in der Milz von *wild type*, *Nfatc2^{-/-}* und *Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}* Mäusen zeigten eine Zunahme der DCs in allen analysierten Kompartimenten von *Nfatc2^{-/-}* Mäusen. Defizienz von NFATc2 und NFATc3 (*Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}*) führte hingegen nicht zu einer Hyperproliferation der DC-Populationen.

Die Funktion von NFATc2 bei der Generierung und Proliferation von DCs *in vitro* wurde durch eine GM-CSF-Kultur von *Nfatc2*^{-/-} Knochenmarkszellen ermittelt (Abb. 6.3.2. D). Im Gegensatz zum Verlust von NFATc1 zeigten NFATc2-defiziente dendritische Zellen eine nahezu verdoppelte Proliferation. Um Einblicke in die Regulation der dendritischen Zellen auch *in vivo* zu gewinnen, wurden verschiedene DC-Subpopulationen in Milzen un behandelter *wild type*, *Nfatc2*^{-/-} und *Nfatc2*^{-/-}*Nfatc3*^{-/-} Mäuse mittels FACS analysiert (Abb. 6.3.3.). Der Anteil dendritischer Zellen in der Milz NFATc2-defizienter Mäuse war sowohl bei den myeloiden Subpopulationen (CD11c⁺CD11b⁺, CD11c⁺CD4⁺ und CD11c⁺CD8α⁺) als auch bei plasmazytoiden DCs (CD11c⁺B220⁺) erhöht. *Nfatc2*^{-/-}*Nfatc3*^{-/-} Mäuse zeigten hingegen keine weitere Steigerung, sondern vielmehr eine „Rückkehr“ auf Normalniveau der prozentualen DC-Verteilung.

Es lässt sich somit grundsätzlich eine gegenläufige Funktion von NFATc1 und NFATc2 bei der Generierung und Proliferation von DCs durch GM-CSF *in vitro* ableiten. Dabei scheint NFATc1 eine positive, NFATc2 hingegen eine negative Wirkung auf DC-Bildung und die Proliferation zu haben. Ansatzweise ließ sich dies auch *in vivo* bestätigen, wobei NFATc3, ähnlich NFATc1, eine positive Wirkung auf die Proliferation zeigte.

6.3.3. Calcium- und NFAT-Signale regulieren die Reifung von BMDCs

Signale durch Calcium und NFAT regulieren eine Vielzahl von zellulären Differenzierungs- und Aktivierungsprozessen. Dementsprechend sollte der Einfluss von Calcium und der damit verbundenen NFAT-Signaltransduktion auf die Reifung von dendritischen Zellen untersucht werden. Dazu wurden Knochenmarkszellen von *wild type* Mäusen in GM-CSF-Kultur in Gegenwart von 5 nM Ionomycin („5 nM iono“), das den intrazellulären Gehalt an Calcium erhöht, acht Tage zu dendritischen Zellen gereift (Abb. 6.3.4. A und B). Bereits nach zwei Tagen in Kultur mit Ionomycin zeigten diese Zellen einen typischen „dendritischen“ Phänotyp (Daten nicht gezeigt), der normalerweise erst nach etwa sechs bis acht Tagen zu erkennen ist. Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von CD11c (als Marker für dendritische Zellen) an Tag zwei und vier der Kultur zeigte, dass die Ionomycin-behandelten BMDCs eine frühere und insgesamt höhere Expression von CD11c aufweisen (Abb. 6.3.4. A). Auch nach acht Tagen Kultur zeigten die Ionomycin-stimulierten Zellen einen deutlich „reiferen“ Phänotyp hinsichtlich der Expression von CD11b und CD11c (Abb. 6.3.4. B). Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (durch Ionomycin) führte somit zu einer beschleunigten Reifung von dendritischen Zellen *in vitro*. Inwiefern NFAT-Transkriptionsfaktoren an dieser Differenzierung beteiligt sind, wurde anhand NFATc2-

defizienter BMDCs untersucht (Abb. 6.3.4. C). *Nfatc2*^{-/-} BMDCs zeigten eine deutliche Hyperproliferation (siehe auch Punkt 6.3.2.). Die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu dendritischen Zellen war indes verzögert. Die Analyse von CD11b⁺CD11c⁺ BMDCs über acht Tage in GM-CSF-Kultur zeigte eine verzögerte und insgesamt geringere Differenzierung zu CD11c⁺ dendritischen Zellen. Daraus lässt sich ableiten, dass NFATc2 bei der Entwicklung von BMDCs die Proliferation unterdrückt und gleichzeitig die Differenzierung reguliert.

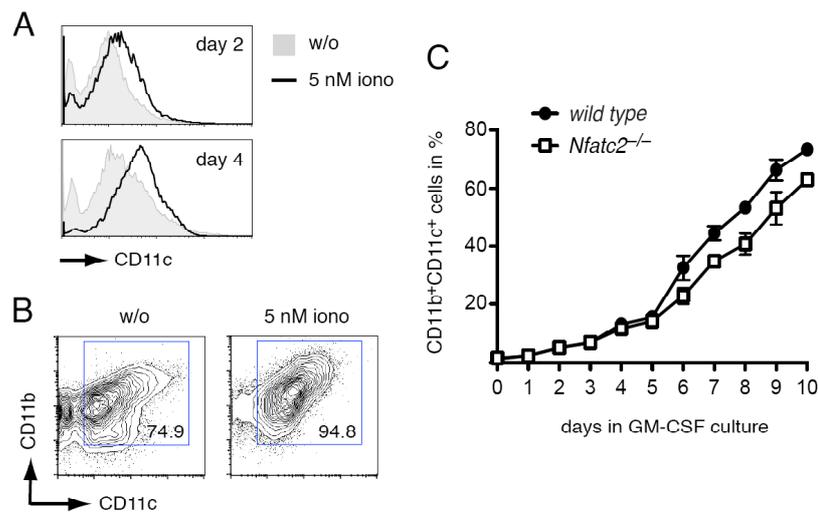


Abb. 6.3.4. Calcium und NFAT regulieren die Reifung von BMDCs. (A und B) Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Ionomycin („5 nM iono“) führte zu einer beschleunigten und höheren CD11c-Expression (A) auf BMDCs in GM-CSF-Kultur. (B) Stimulation von BMDCs durch Ionomycin resultierte in einem „reiferen“ Phänotyp von DCs nach 8 Tagen GM-CSF Kultur. (C) NFATc2-defiziente DCs zeigten hingegen eine verlangsamte Reifung. Vier unabhängige FACS-Analysen von *wild type* und *Nfatc2*^{-/-} BMDC-Kulturen, hinsichtlich reifer CD11b⁺CD11c⁺ DCs, wurden als Wachstumskurve zusammengefasst.

Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) binden zelluläre Immunophiline und hemmen mit diesen die Calcineurin-vermittelte Aktivierung von NFAT-Transkriptionsfaktoren. Durch Zugabe von CsA oder FK506 zu GM-CSF-Knochenmarkskulturen über acht Tage konnte eine Dosis-abhängige Suppression der Proliferation beobachtet werden (Abb. 6.3.5. A und B). Gleichzeitig führte die Blockade von Calcineurin und damit von NFAT zu einer beeinträchtigten Differenzierung zu CD11b⁺CD11c⁺ dendritischen Zellen (Abb. 6.3.5. C). Bereits relativ geringe Konzentrationen an CsA (5 ng/ml) oder FK506 (1 ng/ml) inhibierten effizient die Reifung von BMDCs. Die Hemmung der Proliferation – zusammen mit einer Beeinträchtigung der Differenzierung durch diese Inhibitoren – spricht für eine zentrale Rolle der Calcium- und NFAT-Signaltransduktion bei der Entwicklung dendritischer Zellen.

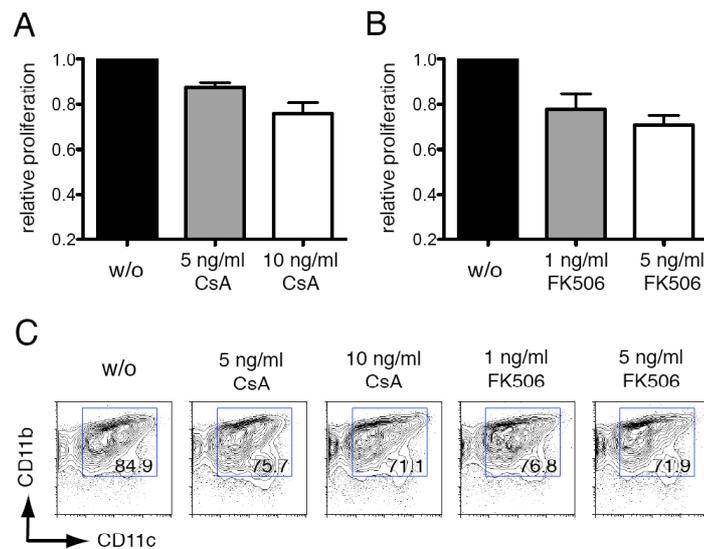


Abb. 6.3.5. Blockade der NFAT-Aktivierung durch CsA oder FK506 beeinflusst die Proliferation sowie die Reifung von BMDCs. (A und B) Analyse der Proliferation von CsA- (A) und FK506-behandelten (B) BMDCs nach acht Tagen in GM-CSF-Kultur, gemessen an der Zunahme der Gesamt-Zellzahl. (C) Die Reifung von BMDCs wird durch CsA und FK506 gehemmt. Durchflusszytometrische Analyse der CD11b⁺CD11c⁺ DCs nach acht Tagen GM-CSF-Kultur in Gegenwart von CsA und FK506.

6.3.4. Die Expression von NFATc1 und NFATc2, nicht aber von NFATc3, wird durch Aktivierung in BMDCs gehemmt

Um eine (potentielle) Rolle von NFAT-Transkriptionsfaktoren bei der Effektorfunktion von dendritischen Zellen zu ermitteln, sollte zunächst deren Expression nach Aktivierung untersucht werden. BMDCs wurden dazu an Tag acht einer GM-CSF-Kultur in frischem (und GM-CSF-freiem) Medium aufgenommen und mit verschiedenen Stimulantien \ddot{U} N aktiviert. Zymosan und LPS aktivieren DCs über die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) zwei und vier, Zymosan ist außerdem in der Lage, an Dectin-1 zu binden. Sowohl die Stimulation von DCs mit LPS als auch mit Zymosan führte zu einem Verlust der NFATc1- und NFATc2-Expression (Abb. 6.3.6.). Die Transkription von NFATc3 war davon jedoch nicht betroffen (Abb. 6.3.6. B). Die Hemmung der (an sich schon relativ geringen) NFATc1- und NFATc2-Proteinexpression durch Zymosan und LPS wurde durch Western-Blot-Verfahren (Abb. 6.3.6. A) und zusätzlich durch RT-PCR bestätigt (Abb. 6.3.6. B). Die Expression von NFATc1 in LPS-aktivierten DCs wurde außerdem mit Hilfe einer BAC-transgenen NFATc1-GFP-Reportermaus untersucht. Durchflusszytometrische Analysen von BMDCs dieser Reportermaus zeigten eine klare Reduktion der GFP-Expression nach LPS Stimulation (Abb.

6.3.6. C). Die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc2, welche wahrscheinlich an der Entwicklung und Differenzierung von dendritischen Zellen beteiligt sind, werden durch Aktivierung der Zellen durch TLR-Stimulation gehemmt. Die Transkription von NFATc3 dagegen bleibt (unverändert) bestehen, was für eine mögliche Funktion in aktivierten dendritischen Zellen sprechen könnte.

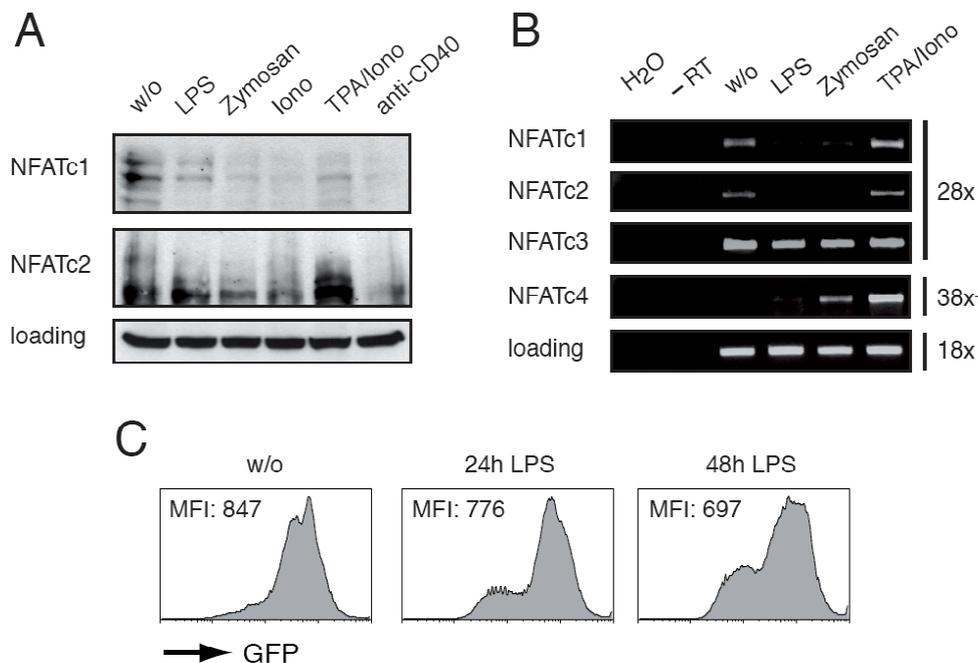


Abb. 6.3.6. Aktivierung von DCs durch TLR-Stimulation führt zu einer Hemmung der NFATc1- und NFATc2-, nicht aber der NFATc3-Expression. (A und B) Western-Blot (A) und RT-PCR (B) zeigten eine Hemmung der NFATc1- und NFATc2-Expression nach Stimulation mit LPS und Zymosan. Die Transkription von NFATc3 blieb hingegen unverändert (B). (C) FACS-Analysen der GFP-Expression in BMDCs von BAC-transgenen NFATc1-GFP-Reportermäusen zeigten eine klare Reduktion der GFP-Expression nach 24 h und 48 h LPS-Stimulation.

6.3.5. NFATc3 reguliert die Dectin-1-vermittelte Zytokinexpression

Alle NFAT-Familienmitglieder (mit Ausnahme von NFAT5/TonEBP) werden durch den Calcium/Calcineurin-Signalweg reguliert (160, 173, 182, 183). In ruhenden Zellen liegen die NFAT-Proteine phosphoryliert im Zytoplasma vor. Rezeptoren, welche die Calcium-Freisetzung in der Zelle bewirken, aktivieren durch Dephosphorylierung die NFAT-Transkriptionsfaktoren (183). Unlängst wurde für den C-Typ Lektin Rezeptor Dectin-1, welcher auf vielen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird, eine ähnliche Eigenschaft, Calcium freizusetzen, beschrieben (154). Eine intrazelluläre Calcium-Mobilisation durch Stimulation dendritischer Zellen mit Zymosan wurde in Echtzeit im Durchflusszytometer bestätigt (Abb. 6.3.7. A). Dazu wurden Zellen mit dem Calcium-

sensitiven Vitalfarbstoff INDO-AM beladen und während einer FACS-Messung (schwarzer Pfeil) mit einer Konzentration von 50 μg oder 100 μg pro ml Zymosan aktiviert. Kommt es zu einem Calcium-Einstrom in die Zelle, bindet Calcium an INDO und verschiebt dessen Emission von Grün zu Violett. Das Verhältnis beider Farben reflektiert den Calcium-Einstrom in die Zelle und zeigte eine Dosis-abhängige Calcium-Mobilisation in DCs nach Stimulation mit Zymosan.

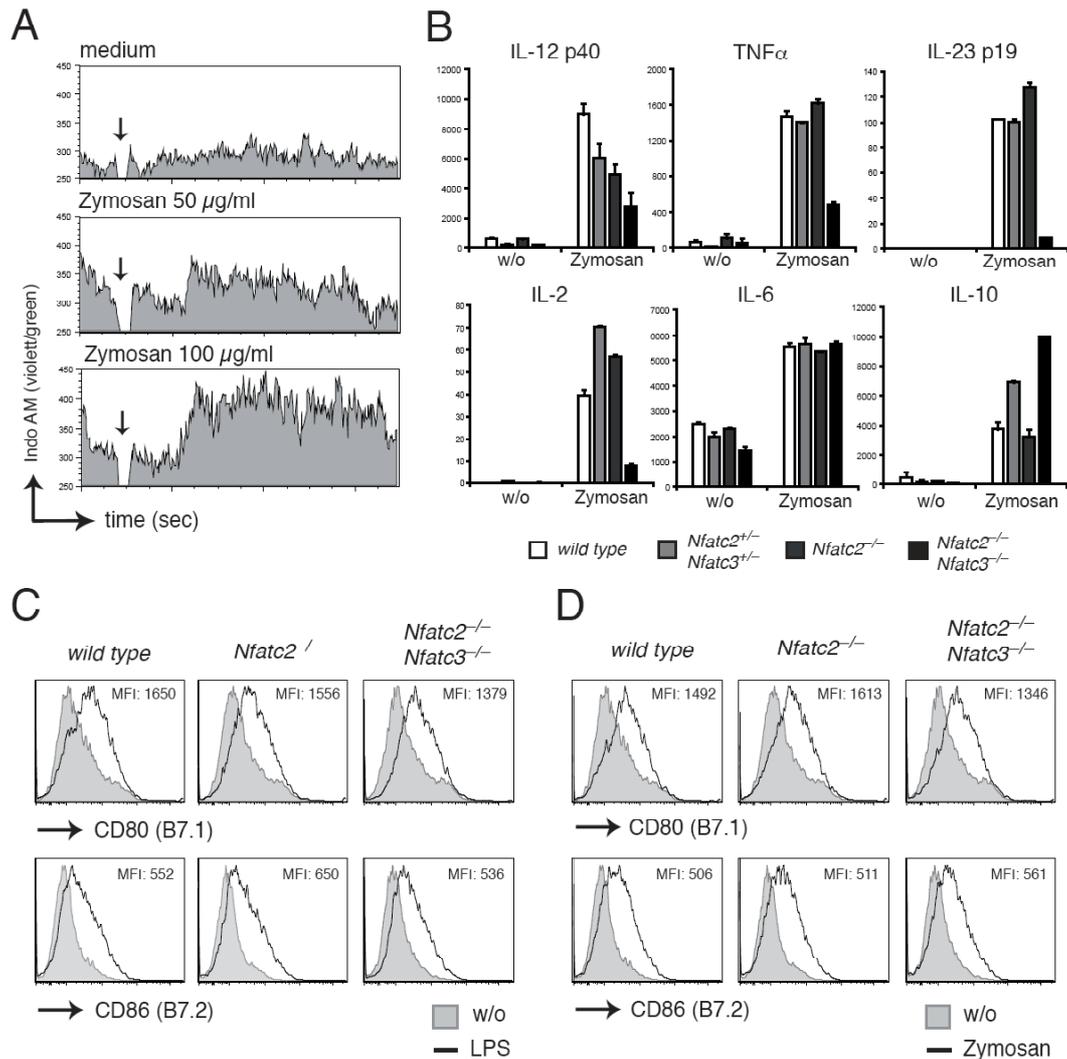


Abb. 6.3.7. NFATc3 reguliert die Dectin-1-vermittelte Zytokinproduktion, aber nicht die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86. (A) Stimulation mit Zymosan führte in DCs zu einem starken Calcium-Einstrom. FACS-Analyse des Farbumschlages INDO-AM beladener BMDCs über 3 min, dargestellt als Histogramm. (B) NFATc3 reguliert die Expression von IL-12, TNF α , IL-23, IL-2 und IL-10 nach Aktivierung mit Zymosan. DCs von *wild type*, *Nfat2*^{-/-} und *Nfat2*^{-/-}/*Nfat3*^{-/-} Mäusen wurden 12 h mit Zymosan stimuliert, und die Lymphokin-Sekretion wurde anschließend mittels ELISA bestimmt. *Nfat2*^{-/-}/*Nfat3*^{-/-} BMDCs zeigten reduzierte Mengen an IL-12, TNF α , IL-23 und IL-2, immun-suppressives IL-10 war hingegen erhöht. (C) Die Expression der Korezeptoren CD80/CD86 ist nicht beeinträchtigt in NFAT-defizienten BMDCs. FACS-Messung der CD80/CD86-Expression zeigte keine Unterschiede in DCs von *wild type*, *Nfat2*^{-/-} und *Nfat2*^{-/-}/*Nfat3*^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit LPS und Zymosan.

Ligation von Dectin-1 mit Zymosan führt in BMDCs zu einer raschen Expression verschiedener Lymphokine und zu einer verstärkten Oberflächenexpression der B7-Korezeptoren CD80 und CD86. Ausgehend von der Calcium-Mobilisation nach Zymosan-Stimulation könnten diese Prozesse auch durch NFAT-Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Dementsprechend wurde die Sekretion ausgewählter Zytokine von BMDCs, differenziert aus Knochenmark von *wild type*, *Nfat2^{-/-}* und *Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}* Mäusen, nach Stimulation mit Zymosan bestimmt (Abb. 6.3.7. B). *Nfatc2*- und *Nfatc3*-defiziente (*Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}*) dendritische Zellen zeigten eine deutliche Reduktion der IL-12p40, TNF α , IL-23p19 und der IL-2 Expression. IL-6 wird nicht durch NFAT-Faktoren reguliert und blieb entsprechend unverändert. Das immun-suppressive Zytokin IL-10 war in Zymosan-aktivierten *Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}* BMDCs hingegen erhöht. Korrelierend mit der Tatsache, dass die NFATc2-Expression nach Aktivierung von dendritischen Zellen herunterreguliert war, zeigten die *Nfatc2^{-/-}* BMDCs kaum einen Unterschied zu *wild type* Zellen nach Zymosan-Stimulation. Vorrangig scheinen diese Interleukine also durch NFATc3 kontrolliert zu werden. Eine veränderte Oberflächenexpression der Korezeptoren CD80 (B7.1) und CD80 (B7.2) nach Aktivierung mit LPS und Zymosan konnte in NFAT-defizienten DCs indes nicht beobachtet werden (Abb. 6.3.7. C). Dectin-1-Stimulation von dendritischen Zellen mit Zymosan führt zu einem raschen Calcium-Einstrom, freie Calciumionen aktivieren die Phosphatase Calcineurin, die wiederum NFAT reguliert. Die Zytokin-Sekretion wird dabei offenbar vorrangig durch NFATc3 reguliert, während die Expression der B7-Korezeptoren von NFAT-Faktoren unbeeinflusst bleibt.

7. Diskussion

7.1. Die Rolle von ICER bei der Treg-vermittelten Immunsuppression

Regulatorische T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Immunantwort und verhindern schädliche (Auto-) Immunreaktionen (2, 24, 27, 44, 231). Dementsprechend führt der Verlust von (funktionellen) Tregs zu einer systemischen und tödlich verlaufenden Autoimmunerkrankung, die beim Menschen als IPEX bezeichnet wird (29, 30, 32, 220, 303). Die verschiedenen molekularen Mechanismen, welche regulatorische T-Zellen befähigen, andere Immunzellen zu supprimieren, sind allerdings noch unzureichend verstanden. Neben immun-suppressiven Zytokinen und weiteren löslichen Mediatoren spielen insbesondere Zellkontakt-abhängige Wirkmechanismen eine herausragende Rolle (24, 25, 101, 102, 231). In der hier vorgestellten Arbeit sollte die nTreg-vermittelte Immunsuppression durch Transfer von cAMP auf molekularer Ebene genauer charakterisiert werden.

Natürliche regulatorische T-Zellen weisen gegenüber konventionellen T-Zellen eine massiv erhöhte Konzentration an intrazellulärem cAMP auf, das durch *gap junctions* auf andere (Immun-) Zellen übertragen werden kann (126, 127). Welche Mechanismen zu der gesteigerten cAMP-Konzentration in Tregs führen, ist noch nicht endgültig geklärt. Wahrscheinlich wird in Tregs das cAMP-abbauende Enzym Phosphodiesterase 3b (PDE3b) durch den Repressor Foxp3 supprimiert. Dies führt langfristig zu einer intrazellulären Akkumulation von cAMP (34, 127). Dementsprechend wurde in Mäusen mit GFP-markiertem, aber nicht-funktionellem (*scurfy*) Foxp3-Protein in regulatorischen T-Zellen – sog. *wanna-be* Tregs – eine reduzierte intrazelluläre cAMP-Konzentration nachgewiesen, die mit einer beeinträchtigten Suppressorfunktion dieser Zellen einhergeht (303). Auch die beiden miRNAs miR-155 und miR-142-3p werden durch Foxp3 in Tregs reguliert: miR-155 reprimiert die *PKA inhibitory subunit α* (PKI α) und PDE3a (280), während miR-142-3p die Translation der Adenylatzyklase 9 hemmt (281). Folglich kommt es auch durch die Kontrolle dieser miRNAs zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in regulatorischen T-Zellen (280, 281).

Neben dem direkten Einfluss von Foxp3 auf den cAMP-Haushalt von Tregs werden auch verschiedene andere Mechanismen für die gesteigerte cAMP-Konzentration diskutiert. Insbesondere wird vermutet, dass Rezeptoren, die cAMP als *second messenger* nutzen, differenziell auf Tconv und Treg exprimiert werden. Verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, z. B. A2A und A2B, modulieren die intrazelluläre Konzentration von cAMP und sind – neben aktivierten Effektorzellen – auch auf Tregs selbst exprimiert (304). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Ligand von CD4 mit dem hoch-affinen HIV gp120-Protein in Tregs eine

gesteigerte intrazelluläre cAMP-Konzentration hervorruft (304-306). Wahrscheinlich wird cAMP in Tregs somit durch verschiedene molekulare Mechanismen reguliert: Zum einen wird die gesteigerte cAMP-Konzentration direkt (intrinsisch) durch Foxp3 selbst, zum anderen über Rezeptoren, die eine Reaktion auf die sich verändernde Umgebung ermöglichen, gewährleistet.

cAMP kann von Tregs direkt in cAMP-„ärmere“ Zellen „gepumpt“ werden und führt in diesen Zellen zur Suppression der Proliferation und der IL-2 Synthese (126, 127). Obwohl die Beteiligung von sog. *gap junction intercellular communication* (GJIC) am cAMP-Transfer ebenfalls kontrovers diskutiert wird, finden sich eindeutige Hinweise – wenn nicht gar Beweise – für deren Existenz. Eine Blockade der *gap junctions* durch chemische Inhibitoren führte zu einer klaren Beeinträchtigung der nTreg-vermittelten Immunsuppression (126, 262). Deletion der beiden Proteine Dab-2 (*disabled-2*) und Connexin43, welche an der Ausbildung von *gap junctions* beteiligt sind, reduziert ebenfalls die durch Tregs-vermittelte Immunsuppression (282, 307). Wird die Hydrolyse von cAMP (vor allem in den supprimierten Effektorzellen) durch den Inhibitor Rolipram verhindert, zeigt sich hingegen eine deutlich verstärkte Suppressionsfähigkeit von Tregs (127). In Kooperation mit Dr. Viacheslav Nikolaev konnte außerdem auf Einzelzellniveau und in Echtzeit der cAMP-Transfer von nTregs in konventionelle T-Zellen dargestellt werden (unpublizierte Daten). In diesen Experimenten wurden Effektorzellen, welche mittels eines transgenen cAMP-sensitiven FRET-Sensors (Epac) Änderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Fluoreszenzemission anzeigen (308-310), mit Hilfe der *patch clamp* Technik in direkten Kontakt zu regulatorischen T-Zellen gebracht. Die Fluoreszenzänderung der konventionellen T-Zellen, gleichbedeutend mit einer erhöhten Konzentration an intrazellulärem cAMP, entsprach in Kinetik und Stärke einer Übertragung von cAMP der nTreg zur CD4⁺-Zelle über GJIC (Dr. Viacheslav Nikolaev, persönliche Mitteilung).

ICER (*inducible cAMP early repressor*) ist ein dominant-negativ wirkendes Mitglied der CREB/CREM Transkriptionsfaktorfamilie. Durch erhöhte Konzentrationen von intrazellulärem cAMP wird ICER induziert und fungiert aufgrund seiner Strukturhomologie zu CREM und CREB als kompetitiver transkriptioneller Repressor (251, 257). Neben der transkriptionellen Regulation von ICER durch cAMP zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse außerdem eine Steuerung der subzellulären Verteilung dieses Repressors: Ruhende Lymphozyten wiesen eine deutliche Kernlokalisation von ICER auf, während ICER nach Aktivierung der Zellen in das Zytoplasma verlagert wurde. In T-Zellen scheint insbesondere die Signaltransduktion durch CD28 an dieser Umverteilung beteiligt zu sein. Gleichzeitige

Erhöhung von cAMP (etwa durch Forskolin oder IBMX) (re-) dirigierte ICER in den Nukleus aktivierter Immunzellen. Dies kann als *in vitro* Modell für die Immunsuppression durch Tregs verstanden werden. Direkter Kontakt zu nTregs ermöglicht die Übertragung von cAMP in aktivierten Lymphozyten, woraufhin die erhöhte cAMP-Konzentration die Expression und Kerntranslokation von ICER induziert. Als Repressor interferiert ICER nachfolgend mit der Transkriptionsmaschinerie aktivierter Lymphozyten und führt so zu einer „Abschaltung“ ihrer Effektorfunktion(en).

Um diese Annahmen weiter zu untermauern wurden zwei *in vivo* Modelle analysiert. Das erste Modell ermöglichte durch Verwendung von DEREK-Mäusen (*depletion of regulatory T cells*) eine systemische Elimination von nTregs. Alle T-Zellen wurden durch Injektionen von CD28SA aktiviert, wobei IL-2 als autokriner Wachstumsfaktor von den aktivierten konventionellen T-Zellen produziert wird. Gleichzeitig wird IL-2 aber auch parakrin den Tregs, deren regulatorische Eigenschaften und Überleben maßgeblich von IL-2 abhängig sind, zur Verfügung gestellt (102, 108, 122). CD28SA zeigt im Gegensatz zu konventionellen anti-CD28 Antikörpern die besondere Fähigkeit, ohne Kreuzvernetzung des TCR eine volle Aktivierung von T-Zellen herbeizuführen (294). Dies führt in konventionellen T-Zellen zur Sekretion von IL-2, das synergistisch zur CD28-Stimulation von Tregs wirkt (299). Wegen der großen Abhängigkeit regulatorischer T Zellen vom CD28-Kostimulus wird speziell diese T-Zellpopulation durch CD28SA aktiviert und expandiert (299, 300). Um eine mögliche Beteiligung von ICER bei der nTreg-vermittelten Immunsuppression zu untersuchen, wurden nTregs *in vivo* depletiert und anschließend eine systemische Immunreaktion durch CD28SA provoziert. In Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen war ICER in konventionellen T-Zellen zytoplasmatisch lokalisiert, und dementsprechend fanden sich im Serum dieser Mäuse pathologisch erhöhte Konzentrationen an IL-2 und TNF α . Auch konnten Anzeichen für eine überschießende Immunreaktion in der Milz durch massive Expansion der Marginalzonenbereiche festgestellt werden. CD28SA-Stimulation – in Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen – führte hingegen zu einer deutlichen Kerntranslokation von ICER. Damit einhergehend konnte eine moderate (nicht pathologische) Immunreaktion beobachtet werden. Dies macht deutlich, dass nTregs auch *in vivo* ICER in den Kern aktivierter Lymphozyten (re-) dirigieren können. Entsprechend korreliert diese Kerntranslokation mit der Suppression konventioneller T-Zellen.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch ein weiteres *in vivo* Modell, das die Analyse einzelner durch nTregs-supprimierter Zellen ermöglicht. Dabei wurden regulatorische T-Zellen mit dem Vitalfarbstoff Calcein beladen und zusammen mit OVA-spezifischen

konventionellen T-Zellen in OVA-immunisierte *Rag2^{-/-}* Mäuse transferiert. Calcein kann dabei – analog zu cAMP – durch *gap junctions* von nTregs auf aktivierte konventionelle T-Zellen übertragen werden. Dieser Transfer kann durchflusszytometrisch verfolgt werden und ermöglicht anschließend eine Sortierung der konventionellen T-Zellen hinsichtlich ihrer Calcein-Färbung: Calcein-positive Zellen müssen über *gap junctions* direkten Kontakt zu nTregs gehabt haben, während die Calcein-negativen Lymphozyten nicht von nTregs supprimiert wurden. Die Analyse der beiden Populationen ergab, dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration sowie die Kernlokalisierung von ICER mit dem Calcein-Gehalt korrelierten; entsprechend war die Transkription von *Ii2* in Calcein-positiven Zellen gehemmt. Calcein-negative Lymphozyten zeigten dagegen eine klare zytoplasmatische Verteilung von ICER und eine erhöhte Produktion von IL-2. Dieses *in vivo* Modell veranschaulicht auf Einzelzellniveau den direkten Transfer von cAMP aus nTregs in konventionelle T-Zellen sowie die damit einhergehende Induktion von ICER.

Interessanterweise konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Immunsuppression von nTregs durch cAMP-Transfer und Induktion von ICER nicht auf T-Lymphozyten beschränkt ist, sondern auch in B-Zellen stattfindet. In Anbetracht zahlreicher *Foxp3⁺* Tregs innerhalb der B-Zell-Follikel (311, 312) kann eine Kommunikation zwischen regulatorischen T-Zellen und B-Lymphozyten angenommen werden. Erhöhung von cAMP (wie durch Forskolin) führte in B-Zellen nicht nur zu einer gesteigerten Expression, sondern auch zur Kerntranslokation von ICER. Weitere Calcein-Experimente bestätigten, dass nTregs in vergleichbarer Weise cAMP auf B-Zellen übertragen können. Entsprechend fand sich auch hier eine verstärkte Expression und Kerntranslokation von ICER in Calcein-positiven, nicht aber in Calcein-negativen Zellen. Dabei scheinen aktivierte B-Lymphozyten deutlich besser als ruhende B-Zellen mit nTregs zu interagieren und sind somit weitaus „anfälliger“ für eine Treg-vermittelte Immunsuppression. Unlängst wurde gezeigt, dass der Mechanismus des cAMP-Transfers auch der Immunsuppression dendritischer Zellen dient (262). Eine erhöhte Konzentration von intrazellulärem cAMP in dendritischen Zellen führt zur Sekretion des immun-suppressiven Zytokins IL-10, wobei gleichzeitig die Expression der B7-Korezeptoren gehemmt wird. Eine reduzierte Oberflächenexpression von CD80 und CD86 wurde auch in Treg-supprimierten B-Zellen bestätigt. Zusammengenommen können Tregs neben T-Zellen auch mit anderen Zellen des Immunsystems interagieren und dementsprechend durch GJIC cAMP zu transferieren. Die Regulation von Effektorzellen durch cAMP und ICER scheint

also ein grundlegender und zentraler molekularer Mechanismus der nTreg-vermittelten Immunsuppression zu sein.

Neben der GJIC kann die Konzentration an intrazellulärem cAMP und ICER in Effektorzellen auch durch verschiedene andere Mechanismen reguliert werden. Das auf nTregs konstitutiv exprimierte CTLA-4 bindet mit sehr hoher Affinität die beiden B7 Moleküle CD80 [B7.1] und CD86 [B7.2] (25) und führt in konventionellen T-Zellen zur Induktion von ICER. Demzufolge sind B7-defiziente konventionelle T-Zellen nur mäßig durch nTregs hemmbar (256, 283). Darüber hinaus exprimieren regulatorische T-Zellen die beiden Ektoenzyme CD39 (eine ATPase/ADPase) und CD73 (eine 5'-Ektonukleosidase), welche extrazelluläres ATP/ADP zu Adenosin hydrolysieren (128, 129). Das perizelluläre Adenosin bindet an G-Protein-gekoppelte A2A- und A2B-Rezeptoren und führt in konventionellen Lymphozyten letztlich zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP (130-132). Es ist nahe liegend, dass nTregs neben der GJIC weitere molekulare Mechanismen zur Modulation von cAMP und ICER nutzen, um eine möglichst potente und nachhaltige Immunsuppression zu bewirken.

7.1.1. ICER hemmt die Induktion von NFATc1/ α A

Ein Kennzeichen aktivierter Lymphozyten ist die massive Aktivitätssteigerung des *Nfatc1* P1 Promotors. Dementsprechend kommt es zu einer raschen Akkumulation der kurzen Isoform NFATc1/ α A (174, 176, 180, 181). Die Induktion von NFATc1 ist dabei maßgeblich an der Proliferation und Effektorfunktion von Lymphozyten beteiligt, wie z.B. an der Produktion von Zytokinen (158, 176, 180). Paradoxerweise lässt sich in EL4-Tumorzelllinien ein P1-Reportergenkonstrukt durch cAMP (massiv) induzieren, während in primären T-Lymphozyten eine intrazelluläre cAMP-Konzentrationserhöhung einen suppressiven Effekt auf die Aktivität des endogenen *Nfatc1* P1 Promotors bewirkt (174). Eine Hemmung der *Nfatc1* P1 Aktivität kann demzufolge in primären T-Zellen sowohl durch Forskolin als auch durch aktivierte Tregs erreicht werden. Die konstitutive Transkription des *Nfatc1* P2 Promotors ist indes nicht durch cAMP beeinflussbar. Der P1 Promotor enthält ein distales (-150) sowie ein proximales (-660) CRE- (*cAMP responsive element*) Motiv und ermöglicht in Folge dessen die Bindung cAMP-regulierter Transkriptionsfaktoren. Neben CREM, CREB und ATF-2 kann auch ICER an diese CRE-Sequenzen binden (174, 201). Regulatorische T-Zellen erhöhen – wie oben geschildert – durch GJIC die intrazelluläre Konzentration von cAMP in konventionellen T- und B-Zellen. Da insbesondere ICER durch eine erhöhte cAMP Konzentration induziert und in den Kern transportiert wird, verschiebt sich das Gleichgewicht

zu einer Repression vieler CREM- und CREB-kontrollierter Gene (251, 264). Sowohl *in vitro* (mittels EMSA) als auch *in vivo* (mittels ChIP) konnte gezeigt werden, dass ICER an die beiden CRE-Elemente des *Nfatc1* P1 Promotors bindet und dessen Aktivität hemmt. Entsprechend war in (nTreg-) supprimierten Lymphozyten kaum eine Expression von NFATc1/ α A nachzuweisen. Im proximalen wie auch im distalen Element des *Nfatc1* P1 Promotors finden sich außerdem mehrere NFAT-Bindungsstellen, so dass die Expression von *Nfatc1* P1 durch positive Autoregulation über NFAT selbst reguliert wird (174, 176, 179, 205). Eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen NFATc1(/ α A) und ICER konnte – zumindest *in vitro* – ebenfalls gezeigt werden. Dies kann als Hinweis auf die Bildung eines möglichen (negativen) NFAT/ICER-Proteinkomplex am *Nfatc1* P1 Promotor gelten, der dem beschriebenen NFATc2/Foxp3-Komplex des *Il2* Promotors ähnlich ist (218, 219). Sowohl Foxp3 als auch ICER vermögen offensichtlich die AP-1-Faktoren c-Jun und c-Fos zu verdrängen und anstelle des aktivierenden NFAT/AP-1-Komplexes ein Repressosom ausbilden. Insbesondere *CD28-responsive elements* (CD28REs), welche aus CRE-Sequenzen und NFAT oder NF- κ B Bindungsmotiven bestehen, können durch ICER reprimiert werden (257). Dabei interagiert ICER höchstwahrscheinlich direkt mit der *Rel-homology domain* (RHD), die in NFAT-Proteinen für die DNA-Bindung, aber auch Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich ist (170, 171), und hemmt dadurch die Transkription vieler NFAT-regulierter Gene, wie etwa *Il2*, *Il4*, *Il13*, *Csf2* (GM-CSF), *Tnf*, oder *Faslg* (252, 257, 273-276), aber wohl auch das *Nfatc1*-Gen selbst. Die mangelnde Fähigkeit von ICER, CBP/p300 und dadurch die RNA-Polymerase II zu rekrutieren, bei gleichzeitiger Hemmung von *fos* kann an zahlreichen CD28REs zur Ausbildung von repressiven NFAT/ICER-Proteinkomplexen führen. Die Bindung von ICER an NFAT interferiert sicherlich mit der NFAT/AP-1-Interaktion und folglich deren aktivierender Funktion (257, 276). Die Suppression der Effektorfunktion von konventionellen T-Zellen durch ICER wird demzufolge auf zwei Ebenen kontrolliert: Zum einen werden zahlreiche NFAT-regulierte Gene, wie etwa Zytokine, durch ICER gehemmt, zum anderen wird die Expression von NFATc1 selbst reprimiert. Damit übereinstimmend ist die Repression der kurzen Isoform NFATc1/ α A nicht nur in anergen und (Treg-) supprimierten konventionellen, sondern auch in regulatorischen T-Zellen selbst von großer Bedeutung (179, 206). In Tregs war ICER stets im Kern lokalisiert. Es ist daher anzunehmen dass ICER – neben Foxp3 (206) – in diesen Zellen an der Repression des *Nfatc1* P1 Promotors beteiligt ist. Diese Annahme wird auch durch Studien der Adenylatzyklase-Aktivität in Tregs gestützt: Hemmung der Adenylatzyklase 9 durch den Inhibitor MDL führte zu einem Zusammenbrechen der erhöhten cAMP-Konzentration in

Tregs. Damit einhergehend war eine gesteigerte NFATc1-Kerntranslokation sowie eine verstärkte NFATc1/ α A-Expression nach TCR-Stimulation zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Korrespondierend zeigten humane regulatorische T-Zellen einen massiven Verlust ihrer suppressiven Eigenschaften nach Blockade der Adenylatzyklase (Dr. Christian Becker, Manuskript in Revision).

Abschließend kann festgestellt werden, dass der Transfer von cAMP und die Induktion von ICER einen grundlegenden Mechanismus der nTreg-vermittelten Immunsuppression darstellen (Abb. 7.1.1). Zweifellos existieren daneben weitere Strategien der peripheren Toleranz, so dass die GJIC sicherlich als ein Mechanismus *inter pares* verstanden werden darf. Insbesondere wird durch ICER eine neuralgische molekulare Maschinerie in Effektorzellen „sabotiert“. Die Hemmung von NFAT-regulierten Genen durch ICER zum einen und die Repression von NFATc1/ α A zum anderen interferiert nachhaltig und wirkungsvoll mit dem transkriptionellen Programm von Effektorzellen. Die Tatsache, dass diese Strategie nicht auf T-Zellen beschränkt ist und auch bei anderen lymphoiden und myeloiden Immunzellen Anwendung findet, unterstreicht einmal mehr die elementare Bedeutung dieser Immunsuppression.

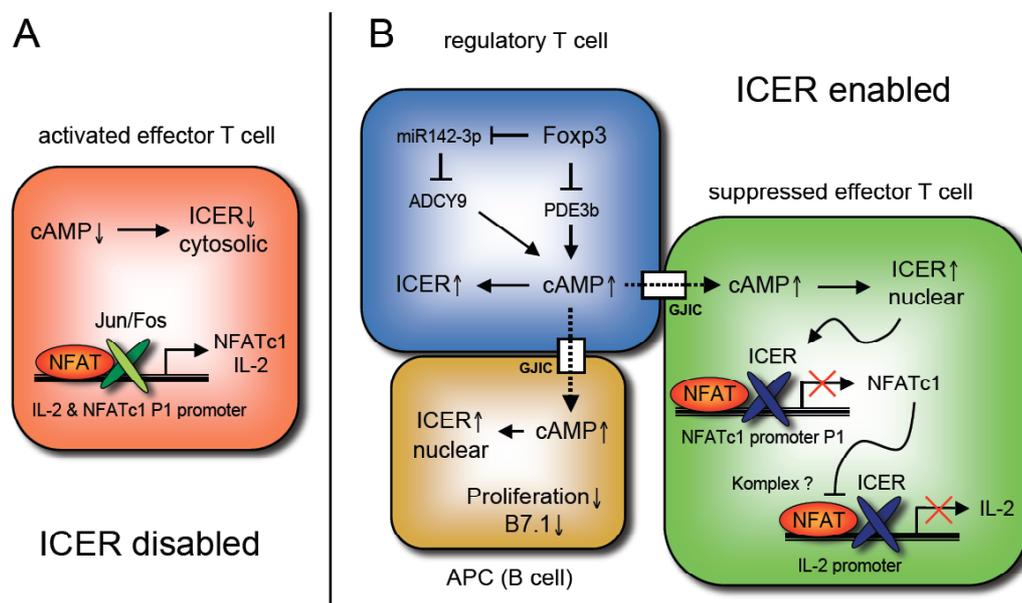


Abb. 7.1. Schematische Darstellung der Rolle von cAMP und ICER bei der Treg-vermittelten Immunsuppression. (A) Aktivierte (nicht suppressierte) konventionelle T-Zellen zeigen eine zytoplasmatische Verteilung von ICER. Die Genregulation (wie der *Il2*- oder *Nfatc1*-Gene) wird vorrangig durch (aktive) NFAT/AP-1-Komplexe kontrolliert. (B) Immunsuppression von T-Zellen und B-Lymphozyten durch Tregs und cAMP. Foxp3 hemmt die Transkription von PDE3b und miR142-3p und führt so zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von cAMP. Durch *gap junction intercellular communication* (GJIC) kann cAMP übertragen werden und reguliert in Effektorzellen die Expression und Kerntranslokation von ICER. Die Suppression von Lymphozyten durch GJIC erfolgt dabei auf zwei Ebenen: Zum einen werden zahlreiche NFAT-regulierte Gene (wie z. B. *Il2*) durch ICER gehemmt, zum anderen wird die Expression von *Nfatc1* selbst reprimiert. Möglicherweise verdrängen dabei (negative) NFAT/ICER-Repressosome die (positiven) NFAT/AP-1-Komplexe.

7.2. Die Rolle von NFAT in natürlichen und induzierten Tregs

Neben der zentralen Toleranz, welche im Thymus potentiell autoreaktive Lymphozyten eliminiert, existieren periphere Toleranzmechanismen (11-13). Diese werden im Gewebe z. B. durch immunologische Anergie- und Ignoranzmechanismen gewährleistet, insbesondere aber mittels aktiver Immunsuppression durch Tregs (2, 101, 103, 231). Zusätzlich zu den im Thymus generierten nTregs (36, 37, 39, 40) werden iTregs in der Peripherie unter dem Einfluss von TGF β und IL-2 durch Konversion naiver CD4⁺ T-Zellen induziert (39, 40). Sowohl nTregs als auch iTregs (T_H3) exprimieren den Transkriptionsfaktor Foxp3 (27, 28). Aufgrund der herausragenden Rolle von Foxp3 für die Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen wurden in den vergangenen Jahren große Anstrengungen unternommen, die molekularen Mechanismen der *Foxp3*-Genregulation besser zu verstehen. Dabei erschweren die unterschiedlichen Kontrollmechanismen in natürlichen und induzierten Tregs sowie die Diskrepanz zwischen murinen und humanen T-Zellen das Bestreben, ein „molekulares Gesamtbild“ zu erstellen (62, 229-231). Insbesondere ist die Rolle der Calcium-regulierten NFAT-Transkriptionsfaktoren ungeklärt. Dass aber die Signaltransduktion durch Calcium entscheidend für die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen ist, wurde durch eine Reihe von Experimenten nachgewiesen. Die Behandlung von Thymozyten mit Cyclosporin A (CsA) – bevor diese adoptiv in athymische Nacktmäuse transferiert wurden – resultierte in einer schweren systemischen Autoimmunreaktion (75, 78). Zur Zeit dieser Studie (1988 waren regulatorische T-Zellen noch weitgehend unbeschrieben!) wurde gefolgert, dass CsA, welches die Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin blockiert, die Entwicklung bzw. Funktion von sogenannten „Thymus-generierten Suppressorzellen“ hemmt (75, 78). Durch genetische Manipulation konnte später die Rolle von Calcium für die Foxp3-Expression in Mausmodellen bestätigt werden. Eine Punktmutation im *linker of activated T cells* (LAT^{Y136F}), welche die Interaktion mit PLC γ 1 unterdrückt, führt zu einem deutlich reduzierten Calciumeinstrom in die Zelle. Daraus resultiert eine drastisch verringerte Foxp3-Expression und eine gestörte nTreg-Entwicklung (77). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Deletion der beiden Calcium-Sensoren STIM1 und STIM2 (*stromal interaction molecule*) in T-Zellen zum totalen Verlust der Foxp3-Expression führt (75, 76). Interessanterweise scheinen somit regulatorische T-Zellen insgesamt deutlich stärker von Calcium-Signalen abhängig zu sein als konventionelle T-Lymphozyten (76). Durch die Erhöhung der Calcium-Konzentration im Zytoplasma wird die Serin-/Threonin-Phosphatase Calcineurin aktiviert, welche die NFAT-Transkriptionsfaktoren reguliert. Paradoxerweise konnte – unter Beteiligung unserer Arbeitsgruppe – von Bopp *et al.* gezeigt werden, dass in *Nfatc2Nfatc3*-

defizienten Mäusen eine völlig normale Entwicklung von nTregs stattfindet (79). Da in Thymozyten – wie auch in peripheren Lymphozyten – drei NFAT-Proteine (NFATc1, NFATc2 und NFATc3) exprimiert werden, ist es denkbar, dass NFATc1 den Verlust der anderen beiden Faktoren in *Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}* Mäusen kompensiert. Davon ausgehend war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Regulation der *Foxp3*-Genexpression durch individuelle NFAT-Familienmitglieder in induzierten und natürlichen regulatorischen T-Zellen besser verstehen zu lernen.

7.2.1. NFAT reguliert die *Foxp3*-Expression in induzierten Tregs

Die Differenzierung von naiven T-Zellen zu verschiedenen Effektor-T-Zell-Subtypen, beispielsweise zu T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} oder auch iTregs, setzt – neben einem geeigneten Lymphokinmilieu – eine TCR-Stimulation voraus (313). Aktivierung von T-Lymphozyten initiiert eine Phosphorylierungs-Kaskade (über mehrere Kinasen und Adaptermoleküle, beispielsweise ZAP-70 und LAT), welche zur Aktivierung der PLC γ führt (162, 163). PLC γ hydrolysiert das membranständige Phospholipid PtdIns(4,5)P $_2$ zu InsP $_3$ und Diacylglycerol. Freies InsP $_3$ bindet anschließend an Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER), gefolgt von einem raschen Calcium-Ausstrom ins Zytoplasma (160, 163, 182). Intrazelluläres Calcium bindet das niedermolekulare Calcium-bindende Protein Calmodulin, das die Phosphatase Calcineurin aktiviert (169). Interaktion der NFAT-Faktoren mit Calcineurin führt zu einer Dephosphorylierung zahlreicher Serin- und Threonin-Reste, wodurch eine Konformationsänderung und Freilegung des Kernlokalisationssignals bewirkt wird. Dies ermöglicht eine Translokation in den Zellkern (160, 182). Im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren, die durch Kostimulation und/oder Zytokine reguliert werden können, werden zahlreiche (Effektor-) Gene kontrolliert und so die „Identität“ der Lymphozyten festgelegt (16). Diese Gene können beispielsweise für Zytokine und Chemokine sowie deren Rezeptoren kodieren. Dabei spielt die Kontrolle von Linien-spezifischen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *Foxp3*, eine herausragende Rolle (313).

Unlängst konnte in EL-4 Thymomzellen gezeigt werden, dass die Expression von *Foxp3* direkt durch NFAT und Smad3 kontrolliert wird (99). Obwohl in dieser Studie eine (zeitliche) Kooperation beider Transkriptionsfaktoren an *Foxp3* CNS1 gezeigt werden konnte, kann die Verwendung von EL-4 Zellen (Klon LAF) die Regulation von *Foxp3* in primären T-Zellen nicht hinreichend erklären. In welchem Ausmaß NFAT-Transkriptionsfaktoren tatsächlich an der Regulation des *Foxp3*-Gens in sich entwickelnden Thymozyten oder peripheren CD4 $^+$ T-Zellen beteiligt sind, kann nur mit NFAT-defizienten primären Zellen *in*

vitro oder im Mausmodell *in vivo* untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene NFAT-defiziente Mauslinien hinsichtlich der Foxp3-Expression und der Entwicklung induzierter und natürlicher regulatorischer T-Zellen analysiert.

Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass *Foxp3* in TGF β -generierten iTregs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch NFAT-Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird. Der Verlust von NFATc1, NFATc2 oder NFATc3 führte jeweils zu einer signifikanten Reduktion der Foxp3⁺ iTregs, und die simultane Deletion von zwei NFAT-Proteinen (NFATc1/NFATc2 oder NFATc2/NFATc3) machte eine TGF β -vermittelte Foxp3-Expression nahezu unmöglich. Es lässt sich daraus auf eine Abhängigkeit von NFAT für die periphere Foxp3-Expression, aber auch auf eine Redundanz der einzelnen NFAT-Familienmitglieder bei der Regulation des *Foxp3*-Gens schließen. *In vivo* Experimente konnten die Regulation von *Foxp3* in iTregs weiter bestätigen. Eine Möglichkeit, iTregs von nTregs abzugrenzen, ist die Charakterisierung durch den Transkriptionsfaktor Helios, wobei natürliche Tregs stets Foxp3⁺Helios⁺ sind, induzierte Tregs hingegen als Foxp3⁺Helios⁻ erscheinen (6). Obwohl diese Identifikation von iTregs in der Literatur kontrovers diskutiert wird (301), konnte eine Foxp3⁺Helios⁻ Population in den mesenterischen Lymphknoten *ex vivo* nachgewiesen werden. Dabei war die Foxp3⁺Helios⁻ T-Zellpopulation (iTregs) in *Nfatc1*-, insbesondere aber bei *Nfatc1Nfatc2*-mutierten Mäusen klar reduziert. Interessanterweise blieb die Zahl der Foxp3⁺Helios⁺ nTregs innerhalb der T-Zellpopulation unverändert (siehe Punkt 7.2.2.). Die mesenterischen Lymphknoten sind hierbei von besonderem Interesse, da sie sowohl Immunität als auch die (orale) Toleranz regulieren (302). In Zusammenarbeit mit Frau Prof. Birgit Sawitzki (Institut für medizinische Immunologie, Charité Berlin) konnte zusätzlich eine beeinträchtigte iTreg-Differenzierung in *Nfatc1*-defizienten Mäusen *in vivo* nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Hierzu wurden iTregs durch allogene Bluttransfusion bei gleichzeitiger Gabe eines CD4-blockierenden Antikörpers generiert (94, 314). Den Versuchstieren wurde intravenös ein anti-CD4 Antikörper injiziert, der die Signaltransduktion durch den Korezeptor blockiert, die T-Zellen aber nicht depletiert. Am folgenden Tag wurde den Mäusen erneut anti-CD4 appliziert, gleichzeitig aber eine zusätzliche allogene Bluttransfusion verabreicht (DST, *donor specific blood transfusion*). Diese allogene T-Zell-Aktivierung bei gleichzeitiger Blockade einer adäquaten CD4-Kostimulation begünstigt die Differenzierung von (allogen-spezifischen) iTregs. Durchflusszytometrische Analysen bestätigten anschließend, dass die Generierung von CD25⁺Foxp3⁺ iTregs in *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺* Mäusen stark beeinträchtigt war. Interessanterweise zeigten die so differenzierten

Nfatc1-defizienten iTregs – obgleich in ihrer Zahl um etwa 50% reduziert – ein normales Suppressionsverhalten pro Zelle *in vivo* (Prof. Birgit Sawitzki, persönliche Mitteilung).

Weiterführend konnten diese Erkenntnisse mittels eines lymphopenischen Colitis-Mausmodells bestätigt werden. Transfer von naiven und (n)Treg-depletierten $CD4^+CD25^-$ $Foxp3^-CD62L^+$ T-Zellen in *Rag1*^{-/-} Mäuse führt innerhalb weniger Wochen zu einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (vergleichbar mit *Colitis ulcerosa* und/oder *Morbus Crohn*). In diesem Entzündungsmilieu werden verstärkt iTregs gebildet, welche das Fortschreiten der Krankheit maßgeblich beeinflussen (315, 316). *Nfatc1*-defiziente T-Zellen zeigten in diesem murinen Modell für Colitis eine signifikant reduzierte Population an (induzierten) $Foxp3^+$ Zellen (Kooperation mit Sonja Reißig, Institut für molekulare Medizin der Universität Mainz).

In den Arbeiten von Tone *et al.* wurde eine kooperative Bindung von NFAT und Smad3 am Enhancer CNS1 des *Foxp3*-Gens nachgewiesen (99, 230). Allerdings scheint dies eher eine sequentielle statt gleichzeitige Kooperation dieser Transkriptionsfaktoren zu sein. Dementsprechend wurde gezeigt, dass durch TGF β aktiviertes Smad3 das Chromatin des CNS1 „geöffnet“ wird, bevor NFAT dort bindet (oder binden kann) (99, 230, 236). TGF β bewirkt in aktivierten T-Zellen (höchstwahrscheinlich durch Smad3 und/oder Smad2 vermittelt) eine Histon-Acetylierung und eine Demethylierung von CpG-Sequenzen, die Voraussetzung für die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren sind (99, 317).

Dass es sich bei der Kontrolle der *Foxp3*-Expression durch NFAT-Faktoren um einen intrinsischen (und somit direkten) Effekt handelt – und nicht etwa um sekundäre Regulationsmechanismen – konnte in der vorliegenden Arbeit anhand einer Kokultur von NFAT-defizienten mit congenen ($CD90.1^+$) *wild type* T-Zellen nachgewiesen werden. Ergänzend konnte die direkte Bindung von NFATc1 an CNS1 von *Foxp3* mittels Chromatin-Immunpräzipitation in primären iTregs bestätigt werden: Bereits eine 20-stündige Stimulation von naiven $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (in Gegenwart von TGF β) führte zu einer deutlichen DNA-Bindung von NFATc1 und Smad3. Eine Bindung von NFAT an den Promotor oder weitere regulatorischen Elemente von *Foxp3* konnte hingegen nicht festgestellt werden. Für die Kontrolle von *Foxp3* in TGF β -induzierten regulatorischen T-Zellen scheint also vor allem das TCR-Signal und die daraus resultierende Calcium- bzw. NFAT-Aktivierung – im Zusammenspiel mit TGF β -reguliertem Smad3 – wichtig zu sein (99, 230). Beide Transkriptionsfaktoren binden an *Foxp3* CNS1 (Enhancer I) (99, 240), wobei dieses Element entscheidend für die *Foxp3*-Expression in den (peripheren) iTregs ist, nicht aber für die *Foxp3*-Expression in nTregs (99, 100, 230). In einem (zeitlich) konzertierten Prozess wird

dabei zunächst die Wirkung von TGF β durch Smad3 und nachfolgend das TCR-Signal über NFAT in eine transiente Foxp3-Expression „übersetzt“ (99, 230).

Dagegen scheinen die Elemente CNS2 („Stabilitätselement“) und CNS3 (an welchem das *c-Rel enhanceosome* bindet) für die Expression von Foxp3 in iTregs von untergeordneter Bedeutung zu sein (100, 232). CNS2, welches auch als *Treg-specific de-methylated region* (TSDR) bezeichnet wird, enthält zahlreiche CpG Motive, deren Methylierungszustand mit der *Foxp3*-Expression und Stabilität korreliert (229, 235). Tatsächlich scheint CNS2 nur in nTregs komplett de-methyliert zu sein, in TGF β -generierten Foxp3⁺ iTregs oder aktivierten humanen Foxp3⁺ T-Zellen dagegen nicht (229, 236). Eine Bindung der Transkriptionsfaktoren CREB, ATF, Ets-1 sowie STAT5 findet nur an de-methyliertem CNS2 statt (235), wobei diese Faktoren ursächlich für eine stabile (!) Foxp3-Expression sind. An methyliertes CNS2 (in iTregs und konventionellen T-Zellen) kann keine Bindung stattfinden, so dass nur eine transiente *Foxp3*-Transkription stattfindet (236, 237). CNS3 weist „klassische“ Kennzeichen eines Enhancer-Elements auf (231, 232), wobei insbesondere *c-Rel* an dieses Motiv bindet (weshalb der an CNS3-bindende Proteinkomplex auch *c-Rel enhanceosome* genannt wird) (62-64, 232, 233). Mäuse, defizient für CNS3, weisen zwar eine drastisch reduzierte Zahl von nTregs im Thymus auf, *in vitro* TGF β -generierte iTregs scheinen aber „normal“ gebildet zu werden (62, 232, 234).

In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss einer CD28-Kostimulation und der daraus resultierenden Aktivierung der NF- κ B-, MAPK- und Akt-Signalwege näher untersucht. Die Differenzierung von iTregs während einer Immunreaktion setzt zwar eine starke TCR-Stimulation (entspricht Signal 1) voraus, eine (starke) Kostimulation (Signal 2), die zu einer vollständigen Aktivierung der T-Zelle führen würde, hemmt jedoch die Bildung von Foxp3⁺ iTregs (90, 318, 319). Inhibitorische Signale, etwa durch CTLA-4, scheinen dagegen die Bildung von iTregs zu unterstützen (90, 91, 318, 319). Obwohl die Zahl der nTregs in *Cd28*^{-/-} Mäusen drastisch reduziert ist (45, 46), waren TGF β -generierte Foxp3⁺ iTregs dieser Tiere nicht beeinträchtigt. Dies unterstreicht einmal mehr die unterschiedliche transkriptionelle Regulation der Foxp3-Expression in natürlichen und induzierten Tregs. Dabei ist die durch Kostimulation vermittelte NF- κ B/*c-Rel*-Aktivierung für Thymus-generierte nTregs essentiell, während die Foxp3-Regulation in iTregs unabhängig von CD28 reguliert wird (45-47, 64, 319). Zudem zeigte sich, dass eine starke (CD28-) Kostimulation nicht nur vernachlässigbar ist, sondern die reduzierte Foxp3-Expression in NFAT-defizienten T-Zellen nicht kompensieren kann. Obwohl zwischen NF- κ B- und NFAT-Faktoren in bestimmten Situationen eine gewisse Redundanz der biologischen Funktion existiert (161), ist

dies bezüglich der Foxp3-Expression nicht der Fall. Dennoch ist anzumerken, dass Kostimulation durch CD28 sowohl zu einer erhöhten Sekretion von IL-2 führt als auch eine anti-apoptotische Funktion in T-Zellen erfüllt (64). Die *Foxp3*-Transkription in iTregs wird daher vor allem durch das TCR-Signal und die daraus resultierende NFAT-Aktivierung kontrolliert. Ein (zusätzliches) Signal – wie durch Kostimulation vermittelt – scheint dabei vernachlässigbar zu sein.

7.2.2. Die Entwicklung und Funktion von nTregs ist unabhängig von NFAT-Faktoren

Trotz der deutlich reduzierten Zahl an TGF β -generierten Foxp3⁺ iTregs von NFAT-defizienten T-Zellen war die Entwicklung der nTregs unverändert. Es konnten weder eine Abnahme der nTreg-Population(en) in Thymus, Milz und Lymphknoten von *Nfatc1*-, *Nfatc2*- oder *Nfatc3*-defizienten Mäusen festgestellt werden, noch führte eine gleichzeitige Deletion von zwei NFAT-Proteinen (NFATc1/NFATc2 oder NFATc2/NFATc3) in Thymozyten und T-Zellen zu einer reduzierten Anzahl an nTregs. Um auszuschließen, dass der Verlust der NFAT-Expression in allen T-Zellen mögliche Treg-spezifische Effekte maskiert, wurde ergänzend eine Treg-spezifische Deletion von NFATc1 untersucht. Auch diese Mäuse wiesen eine vollkommen unveränderte Population von nTregs im Thymus und in den peripheren lymphoiden Organen auf. Eine normale Entwicklung von natürlichen regulatorischen T-Zellen in *Nfatc2Nfatc3*-defizienten Mäusen wurde schon zuvor – unter Beteiligung unserer Arbeitsgruppe – von Bopp *et al.* gezeigt (79). Dennoch sollte angemerkt werden, dass eine Deletion aller im Thymus und lymphoiden Zellen exprimierten NFAT-Familienmitglieder (NFATc1, NFATc2 und NFATc3) bisher nicht vorgenommen wurde. NFATc3 wird im Thymus besonders stark exprimiert und mag so den Verlust von NFATc1 und NFATc2 in *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* Mäusen kompensieren (320-322). Ebenso ist es möglich, dass NFATc1 in *Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}* Mäusen für die Treg-Differenzierung ausreichend ist. Die Erzeugung einer (T-Zell-spezifischen) Maus, in der alle NFAT-Proteine in Thymozyten und peripheren T-Zellen deletiert sind, erscheint daher ein erstrebenswertes Ziel. Allerdings bereitet die Verpaarung aller – konditionellen und totalen – NFAT-defizienten Tiere große Probleme, da insbesondere *Nfatc3^{-/-}* Mäuse einen generellen reproduktiven Defekt aufweisen. Ausgehend von den reduzierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen in *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4-cre⁺ x Nfatc2^{-/-}* Mäusen und der zentralen Rolle von NFAT-Faktoren in Lymphozyten ist es allerdings vorstellbar, dass die Elimination aller NFAT-Faktoren generell die T-Zellentwicklung hemmt und keine Rückschlüsse auf die Entwicklung von nTregs mehr erlauben würde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass NFAT-Transkriptionsfaktoren eine eher untergeordnete – oder keine – Rolle bei der Entwicklung natürlicher regulatorischer T-Zellen spielen. Eher scheint eine (zu starke) NFAT-Aktivität die Differenzierung von nTregs zu stören, denn Mäuse mit einer hyper-aktivierbaren Mutante von NFATc2 zeigen weniger Foxp3⁺ nTregs im Thymus (323).

Die Kontrolle der Foxp3-Expression wird in nTregs – im Vergleich zu iTregs – nicht durch NFAT, sondern von anderen Transkriptionsfaktoren gewährleistet, wobei den NF-κB-Faktoren eine herausragende Rolle zukommt (62-64). In Mäusen mit einer konditionellen Deletion der für die NF-κB notwendigen Signalmoleküle, beispielsweise von PKC-θ, Bcl-10, CARMA1 oder IKK2, und insbesondere von c-Rel, wurde eine beeinträchtigte Entwicklung von nTregs beobachtet (64-69). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz einer klaren Calcium-Regulation der Foxp3-Expression, ohne Beteiligung von NFAT (siehe Punkt 7.2.), könnte eine (synergistische) Aktivierung von NF-κB durch Calcium sein, wobei speziell der NF-κB-Regulator IKKβ durch Calcineurin beeinflusst werden kann (80). Unlängst wurde auch gezeigt, dass Calcineurin eine Dephosphorylierung von Bcl-10 an Serin138 bewirken kann (324), die anschließend zu einer Komplexbildung von CARMA1, Bcl-10 und MALT1 führt (81, 324). Dieser sogenannte CBM-Komplex ist – durch Regulation von IKKβ – entscheidend an der Aktivierung von NF-κB beteiligt (324, 325). Paradoxe Weise zeigen natürliche regulatorische T-Zellen – obwohl sie klar von Calciumsignalen abhängig sind (75-77) – einen reduzierten Calciumeinstrom nach TCR-Ligation sowie eine daraus resultierende geringere Calcineurin-Aktivität (34, 326). Mathematische Simulationen deuten allerdings darauf hin, dass gerade ein reduziertes Calciumsignal bevorzugt NF-κB aktiviert, eine NFAT-Aktivierung hingegen erst bei hohen Calciumkonzentrationen erreicht wird (327). Die zentrale Rolle von NF-κB für die Foxp3-Expression in nTregs wird auch durch die (extreme) Abhängigkeit von CD28-Kostimulation im Thymus unterstrichen (45, 46). Ausgehend von der CD28-Kostimulation wird – neben verschiedenen anderen Signalwegen – insbesondere der NF-κB-Signalweg aktiviert (328-330). Dennoch muss erwähnt werden, dass in der Promotorregion von *Foxp3* drei NFAT-Bindungsmotive konserviert sind, wobei zwei davon in unmittelbarer Nähe von AP-1 Motiven liegen (100, 217). In humanen konventionellen T-Zellen konnte nach Aktivierung eine Bindung von NFATc2 an den *Foxp3*-Promotor nachgewiesen werden, und eine Hemmung der NFAT-Aktivität durch CsA zeigte entsprechend eine reduzierte Foxp3 Expression (217). Die Behandlung von humanen nTregs mit CsA hatte jedoch keinen Einfluss auf die Foxp3-Expression (217). Auch in murinen nTregs scheint NFAT keine Rolle bei der Regulation des *Foxp3*-Promotors zu spielen: Zum

einen findet keine Foxp3-Expression in aktivierten konventionellen T-Zellen der Maus statt (230, 231), zum anderen konnte auch in der vorliegenden Arbeit zu keinem Zeitpunkt eine Bindung von NFAT an die Promotorregion von *Foxp3* in (i)Tregs detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Foxp3-Expression in nTregs unabhängig von NFAT-Faktoren stattfindet, während *Foxp3* in iTregs durch NFAT – insbesondere am CNS1-Element – reguliert wird.

Neben dem potentiellen Einfluss der NFAT-Transkriptionsfaktoren auf die Differenzierung von nTregs im Thymus gab es Hinweise auf eine Beteiligung von NFAT-Faktoren bei der Funktion regulatorischer T-Zellen. Insbesondere die Arbeiten von Wu *et al.*, die einen heterotrimeren Foxp3/NFATc2/Foxp3 Komplex beschreiben, deuten auf eine zentrale Rolle von NFAT bei der Treg-Funktion hin (218, 219). Dieses Foxp3/NFATc2-Repressosom soll an zahlreichen Genloci binden und deren Transaktivierung hemmen. Paradoxaerweise zeigten nTregs von *Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}* Mäusen aber ein normales Suppressionsverhalten gegenüber wildtypischen *responder* T-Zellen *in vitro* (79). Ausgehend von dieser Diskrepanz war anzunehmen, dass NFATc1 – wie für NFATc2 experimentell gezeigt (218) – einen solchen repressiven Komplex mit Foxp3 bildet und daher den Verlust von NFATc2 (und NFATc3) kompensieren kann. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit eine solche Interaktion von Foxp3 mit der kurzen und langen Isoform von NFATc1 nach Transfektion von HEK 293T Zellen gezeigt werden. Dem gegenüber waren jedoch keinerlei Anzeichen einer (systemischen) Autoimmunreaktion bei den NFATc1-defizienten Mäusen festzustellen (Daten nicht gezeigt). Entsprechend zeigten auch nTregs von *Nfatc1*-, *Nfatc2*- oder *Nfatc3*-einzel-defizienten Mäusen sowie von *Nfatc1Nfatc2*- und *Nfatc2Nfatc3*-doppel-defizienten Tieren ein vollkommen normales Suppressionsverhalten *in vitro*. Zusätzlich konnte die unveränderte Suppression von *Nfatc1*-defizienten nTregs auch durch mehrere *in vivo* Modelle bestätigt werden: Zum einen wurde nach Injektion eines anti-CD28 superagonistischen-Antikörpers (CD28SA) (299, 300) nicht nur eine „normale“ Expansion von Foxp3⁺ nTregs beobachtet, sondern auch die Suppression der (CD28SA-provozierten) IL-2 Sekretion im Serum dieser Mäusen war unverändert. Zum anderen konnten *Nfatc1*-defiziente nTregs die Abstoßung eines allogenen Hauttransplantats in einem adoptiven Transfermodell erfolgreich verhindern (in Kooperation mit Prof. Birgit Sawitzki). Eine normale Funktion von nTregs aus *Nfatc2^{-/-}Nfatc3^{-/-}* Mäusen (*in vitro*) wurde bereits beschrieben. Dennoch entwickeln diese Tiere mit zunehmenden Alter eine mäßig ausgeprägte Lymphadenopathie (297). Die Schwellung von Milz und Lymphknoten sowie die pathologische Infiltration von Lymphozyten in verschiedene Organe wird allerdings nicht

durch reduzierte oder funktionell beeinträchtigte nTregs bedingt, sondern vielmehr durch Hyperproliferation sowie ein gestörtes Apoptoseverhalten der konventionellen T-Zellen (297). Außerdem sind die T-Zellen von *Nfatc2Nfatc3*-defizienten Mäusen resistent gegenüber einer nTreg-vermittelten Immunsuppression (79).

Diese Resultate scheinen – zumindest auf den ersten Blick – den Arbeiten von Wu *et al.* (218), die eine Interaktion von NFATc2 und Foxp3 als zentralen Mechanismus der Treg-Funktion fordern, zu widersprechen. Inzwischen wurden diese Erkenntnisse von derselben Arbeitsgruppe relativiert: Foxp3/NFATc2/Foxp3-Heterotrimere scheinen nur bedingt für die suppressive Eigenschaft von nTregs verantwortlich zu sein, vielmehr ist die Ausbildung von *domain-swapped* Foxp3-Homodimeren entscheidend (219). Eine Erklärung der zwar unerwarteten, aber vollkommen normalen Suppressionsfähigkeit der nTregs aus NFAT-defizienten Mäusen, könnte die Tatsache darstellen, dass in diesen Zellen die Komplexbildung zwischen NFAT und Foxp3 nicht notwendig ist, da die Repression allein durch Foxp3-Homodimere gewährleistet werden kann. Dies schließt die Bildung von NFAT/Foxp3-Komplexen in wildtypischen nTregs keineswegs aus, zeigt aber, dass Foxp3 allein für die normale Funktionalität ausreichend ist. Vielmehr scheint die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Foxp3 und NFAT dazu zu dienen, die NFAT-regulierte Genexpression zu limitieren oder zu verhindern. In NFAT-defizienten T-Zellen aus den in dieser Arbeit verwendeten Mäusen wird dieser Mechanismus zweifellos hinfällig. Diese Annahme findet durch den Befund Unterstützung, dass nTregs unabhängig von einer vorausgehenden Antigenstimulation supprimieren können (331). Dies lässt sich zum einen durch den grundsätzlich „voraktivierten“ Zustand von nTregs begründen, zum anderen könnte eine durch TCR-Stimulation erfolgende NFAT-Aktivierung nicht notwendig sein. Studien mit Mutationen im ZAP-70-Protein (AS, YYAA und SKG), die nur noch eine Adapter-, aber keine katalytische Funktion mehr zulassen, demonstrierten eine Calcium- und damit auch NFAT-unabhängige Wirkungsweise von nTregs (332-334). Darüber hinaus zeigen Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen eine reduzierte Calcium-Mobilisierung und deutlich reduzierte NFAT-Kerntranslokation nach TCR-Stimulation (siehe auch Punkt 7.2.3.) (201, 326, 335, 336). Dementsprechend scheint auch die Funktion (!) von nTregs durch den Calcineurin-Inhibitor CsA nicht beeinträchtigt zu werden (217, 326, 337-339). Somit bleibt festzuhalten, dass nicht nur die Entwicklung und die Stabilität von natürlichen Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen, sondern auch deren Funktion – entgegen früherer Vermutungen – unabhängig von NFAT-Transkriptionsfaktoren ist.

7.2.3. Reduzierte Kerntranslokation von NFAT-Faktoren in Foxp3⁺ Tregs

Während NFAT-Faktoren für die Entwicklung und die Funktion von nTregs kaum eine Rolle spielen, konnte von uns deutlich gezeigt werden, dass NFAT für die Differenzierung von iTregs essentiell ist. Dennoch zeigten *Nfatc1*-defiziente iTregs – obwohl zahlenmäßig deutlich reduziert – ein normales Suppressionsverhalten pro Zelle *in vivo* (Prof. Birgit Sawitzki, persönliche Mitteilung). Weiterhin konnte in *Nfatc1*- und *Nfatc1Nfatc2*-defizienten iTregs – wenn einmal zu iTregs differenziert – keine Veränderung der Stabilität von Foxp3 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von diesen Erkenntnissen scheinen die NFAT-Faktoren zwar die Expression von Foxp3 zu kontrollieren, für die Funktion und Aufrechterhaltung des „regulatorischen“ Phänotyps aber nicht wichtig zu sein. Dies lässt sich auch durch die Regulation des *Foxp3*-Lokus belegen. Nach einer initialen Bindung von NFAT und Smad3 bei der Primärstimulation konnte nach sieben Tagen Foxp3 selbst an den regulatorischen Elementen CNS1 und CNS3 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Einhergehend mit dem Öffnen des Chromatins am *Foxp3*-Locus scheint die Bindung von Foxp3 (möglicherweise auch in Kooperation mit NFAT) als eine Art „cellular memory module“ zu wirken, um die „Identität“ von iTregs zu erhalten. Übereinstimmend mit der Unabhängigkeit von NFAT zeigten ausdifferenzierte Tregs eine reduzierte Kerntranslokation und damit Aktivierung von NFATc1 und NFATc2 nach TCR-Stimulation. Es wäre daher denkbar, dass nach Foxp3-Expression in nTregs oder iTregs dieser Schlüsselfaktor die transkriptionelle Regulation der Zelle übernimmt und somit ausdifferenzierte Tregs von NFAT unabhängig werden.

Aber nicht nur eine „Unabhängigkeit“ der differenzierten (i)Tregs von NFAT, sondern darüber hinaus eine Beeinträchtigung der Funktion durch hohe NFAT-Aktivität ist sehr wahrscheinlich. So konnte eine sehr geringe Kernlokalisation von NFATc1 und NFATc2 auch für humane Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen bestätigt werden (Dr. Helmut Jonuleit, persönliche Mitteilung). Ausgehend von dem bereits angesprochenen NFATc2/Foxp3 Komplex (218), der für die Abschaltung NFAT-regulierte Gene notwendig ist, muss eine ausgeglichene Stöchiometrie dieser beiden Faktoren gewährleistet werden (siehe auch Punkt 7.2.4.), um eine unkontrollierte Effektor-T-Zell-typische Genexpression durch zu hohe NFAT-Aktivität zu verhindern. Dafür spricht auch, dass Mäuse mit einer hyper-aktivierbaren Mutante von NFATc2 sowohl eine reduzierte Population von nTregs im Thymus als auch veränderte iTregs aufweisen (323). Tatsächlich scheint Foxp3 selbst auf mehreren Ebenen mit der Calcium-Signaltransduktion zu interferieren. Regulatorische T-Zellen zeigen nach TCR-Stimulation eine gehemmte proximale Phosphorylierungs-Kaskade. Insbesondere sind die

PKC- und Ras-MAPK-Signalwege beeinflusst (335, 336). Auch ist nach Aktivierung in Foxp3⁺ T-Zellen ein deutlich reduzierter Calcium-Ausstrom und demzufolge auch eine geringere Calcineurin-Aktivität zu verzeichnen (326). Dagegen konnte eine verstärkte Expression (und Aktivität) der NFAT-phosphorylierenden Kinasen GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und CKII α (*casein kinase II α*) in regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden (326). Die (Re-) Phosphorylierung von NFAT reguliert die Ausschleusung aus dem Kern. Eine veränderte Expression der dazu notwendigen Exportine konnte jedoch nicht festgestellt werden (326). Nicht zuletzt ist die Expression von NFAT selbst verändert. Regulatorische T-Zellen zeigen insgesamt eine reduzierte Transkription der verschiedenen NFAT-Faktoren (340), wobei insbesondere die induzierbare Expression von NFATc1 betroffen zu sein scheint (siehe dazu auch Punkte 7.1.1. und 7.2.4.) (179, 206). Entsprechend dieser Annahmen ist es möglich, durch partielle (aber nicht vollständige!) Blockade des Calcium- bzw. Calcineurin-Signalweges in konventionellen T-Zellen einen regulatorischen Phänotyp zu erzeugen bzw. „echte“ regulatorische T-Zellen – auch *in vivo* – gezielt zu expandieren (326, 337-339).

Kennzeichen konventioneller Lymphozyten ist eine rasche Kerntranslokation der NFAT-Proteine nach TCR-Stimulation. Deren Proliferation und die Sekretion von Zytokinen wird durch NFAT maßgeblich kontrolliert (158, 176, 180). Regulatorische T-Zellen hingegen zeigen – zumindest *in vitro* – ein reduziertes Proliferationsverhalten und sezernieren keine (oder nur ausgewählte) Effektor-Lymphokine (42, 341, 342). Möglicherweise wird deren aneurer, regulatorischer Phänotyp durch dieses „Abschalten“ der NFAT-Funktion(en) aufrechterhalten. Die transkriptionelle „Identität“ von natürlichen und induzierten regulatorischen T-Zellen wird insbesondere durch Foxp3 bestimmt, wobei die Hemmung des Calcium/Calcineurin-Signalweges in regulatorischen T-Zellen als notwendig erscheint, eine mögliche „De-Differenzierung“ zu konventionellen Effektor-T-Zellen zu verhindern.

7.2.4. Foxp3 hemmt die Autoregulation von NFATc1/ α A in Tregs

Durch eine Aktivitätssteigerung des *Nfatc1* P1 Promotors nach TCR-Ligation kommt es zu einer raschen Akkumulation der kurzen Isoform NFATc1/ α A (174, 176, 180, 181). Die Induktion von NFATc1/ α A ist dabei maßgeblich an der Proliferation und Effektorfunktion von aktivierten konventionellen Lymphozyten beteiligt (158, 176, 180). So werden zahlreiche Zytokine – allen voran IL-2 – durch NFATc1/(α A) kontrolliert. Regulatorische T-Zellen hingegen produzieren diese Lymphokine üblicherweise nicht. Interessanterweise weisen natürliche regulatorische T-Zellen eine auffällig reduzierte Expression dieser NFATc1-

Isoform auf (179, 206). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass auch in induzierten regulatorischen T-Zellen der *Nfatc1* P1 Promotor reprimiert wird. Molekularbiologische Analysen identifizierten Foxp3 als potenten Repressor der *Nfatc1* P1 Aktivität. Dies mag zum Teil durch die Interferenz mit dem Calcium-/Calcineurin-Signalweg erklärt werden (siehe Punkt 7.2.3.). Andererseits konnte aber auch eine direkte Bindung und Hemmung des *Nfatc1* P1 Promotors durch Foxp3 gezeigt werden. ChIP-Analysen bestätigten eine Bindung von Foxp3 sowohl am distalen als auch am proximalen Bereich des P1 Promotors *in vivo*. Obwohl im proximalen Element eine kombinierte, aber überlappende NFAT/Foxp3 Bindungssequenz zu finden ist – die möglicherweise für die Suppression der NFATc1/ α A-Expression verantwortlich ist (206) – zeigten Punktmutationen dieser Sequenz in Luciferase-Reporter-Gen-Analysen keinen Effekt (Dr. Stefan Klein-Hessling, unveröffentlichte Daten). Computer-basierte Sequenzanalysen des *Nfatc1* P1 Promotors konnten keine optimalen Bindungsmotive für Foxp3-Homodimere (343) oder Foxp3/NFAT-Heterodimere (218, 219) im distalen oder proximalen Element des *Nfatc1* P1 Promotors nachweisen. Die Expression von NFATc1/ α A wird anhand positiver Autoregulation durch NFAT(c1) reguliert (174, 176, 179, 205). Eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen NFATc2 und Foxp3 konnte mittels Röntgen-Kristallstrukturanalysen nachgewiesen werden (218, 219), und in vergleichbarer Weise interagieren NFATc1 und Foxp3. Dabei scheint vor allem der C-Terminus von Foxp3, welcher im Wesentlichen der *forkhead* Domäne entspricht, essentiell für die Wechselwirkung zu sein (2, 218). Im Gegensatz zu dem am *Il2* Promotor beschriebenen DNA/NFATc2/Foxp3-Repressorkomplex (218, 219) wird Foxp3 am *Nfatc1* P1 Promotor möglicherweise nur über NFAT gebunden, so dass eine direkte DNA-Bindung von Foxp3 nicht notwendig ist.

Die gegenüber Effektorzellen veränderte Signaltransduktion in regulatorischen T-Zellen scheint auch die Repression der NFATc1/ α A-Expression einzuschließen. Letztere könnte unerlässlich sein, um den anergen, regulatorischen Phänotyp von Tregs aufrechtzuerhalten. Gerade in den relativ instabilen iTregs mag die Suppression der *Nfatc1* P1-Aktivität notwendig sein, um ein Dedifferenzieren in Effektor-Lymphozyten zu verhindern. Zwischen Foxp3 und NFAT existiert daher ein negativer Rückkopplungsmechanismus, welcher nicht nur die Plastizität, sondern auch die Stabilität der Helfer-T-Zell-Differenzierung steuert.

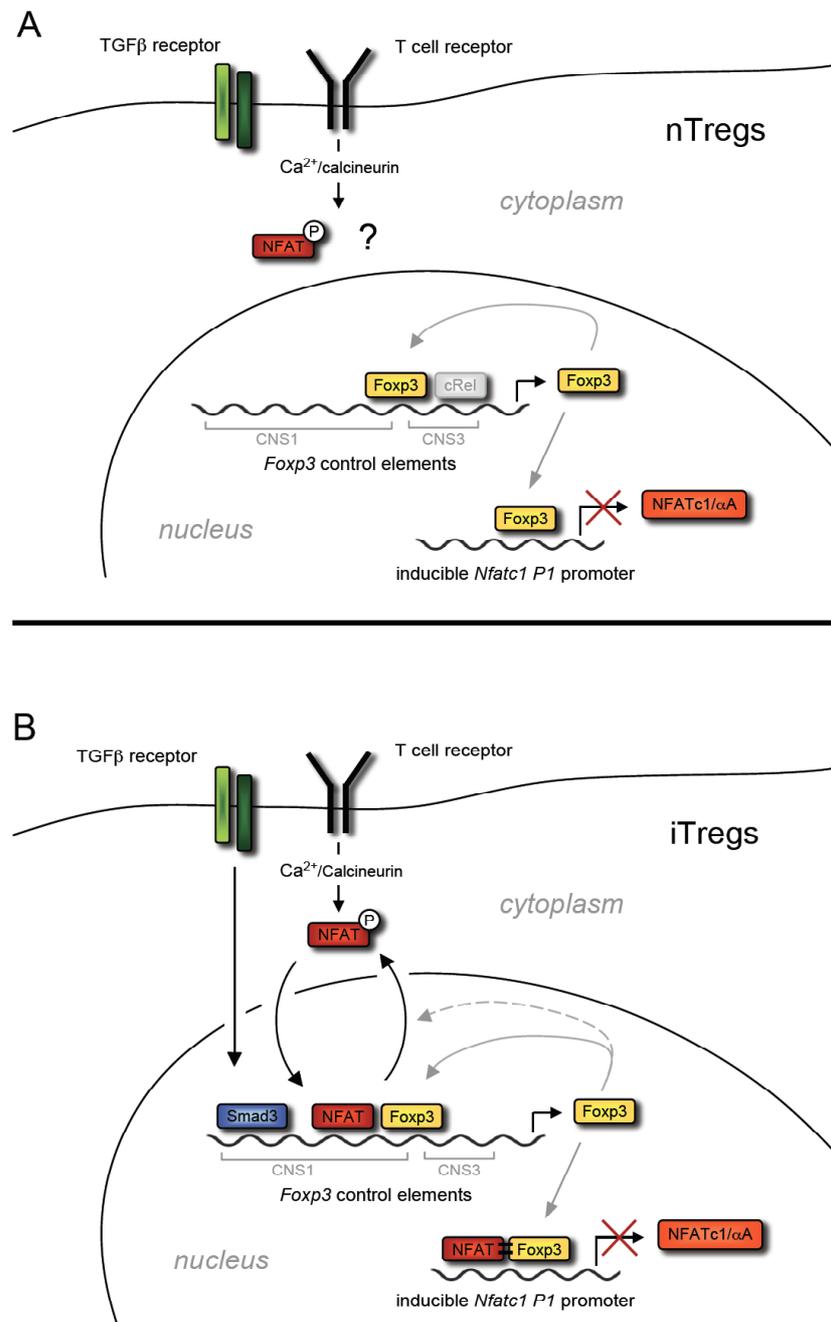


Abb. 7.2. Die Regulation von *Foxp3* durch NFAT unterscheidet iTregs von nTregs (A) Die Expression von *Foxp3* in nTregs wird hauptsächlich durch NF-κB (c-Rel) kontrolliert. Außerdem reprimiert *Foxp3* die Expression der (pro-inflammatorischen) NFATc1/αA-Isoform. (B) Die *Foxp3*-Expression wird in iTregs über das *Foxp3* CNS1 durch eine konzertierte Smad3/NFAT-Bindung reguliert. Stimulation des TCR führt zu einem Calcium-Einstrom in die Zelle, welcher die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Anschließende Dephosphorylierung von NFAT führt zur Kerntranslokation. Zusammen mit TGFβ-abhängigem Smad3 wird *Foxp3* an CNS1 reguliert. Sobald *Foxp3* in der Zelle vorliegt, stabilisiert es seine eigene Expression durch Bindung an CNS1 und CNS3 und hemmt andere Gene durch Ausbildung eines repressiven NFAT/*Foxp3*-Komplexes. Eine solche Suppression findet auch am *Nfatc1* P1 Promotor statt um die Expression, der pro-inflammatorischen NFATc1/αA-Isoform zu verhindern. Zusätzlich scheint *Foxp3* die Aktivität der NFAT-Transkriptionsfaktoren durch ein verändertes Kerntranslokationsverhalten zu regulieren.

7.3. Expression und Funktion von NFAT-Faktoren in dendritischen Zellen

Dendritische Zellen stellen ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Als Antigen-präsentierende Zellen nehmen sie (körperfremde) Proteine durch Phagozytose oder Pinozytose auf und präsentieren nach lysosomaler Degradation die aus den Antigenen resultierenden Peptide über MHC II-Moleküle an der Zelloberfläche. Eine zusätzliche Stimulation durch *pattern recognition receptors* (PRRs), wie beispielsweise durch TLRs oder Dectin-1, führt zur einer vollständigen Ausreifung der DCs und damit einhergehend zu einer verstärkten Oberflächenexpression von kostimulatorischen Molekülen. Außerdem reagieren dendritische Zellen auf eine Aktivierung mit der Sekretion von Zytokinen, welche zum eine pro-inflammatorische (wie IL-12, IL-6, TNF α , IL-2, IL-23), zum anderen aber auch eine immun-suppressive Wirkung entfalten können (etwa IL-10, TGF β). Die daraus resultierende T-Zell-Antwort wird insbesondere durch die komplexen Reifungsstadien der DCs beeinflusst, wobei Kostimulation und Interleukine die Stärke und Qualität der gesamten Immunreaktion steuern. Entsprechend nehmen dendritische Zellen eine zentrale Rolle bei der peripheren Toleranz ein, da sie sowohl tolerogene (meist unreife DCs) als auch inflammatorische Eigenschaften (aktivierte/reife DCs) aufweisen.

7.3.1. NFATc1 und NFATc2 kontrollieren die Reifung von BMDCs

Myeloide hämatopoetische Stammzellen differenzieren im Knochenmark unter dem Einfluss von GM-CSF zu Monozyten und/oder unreifen (*immature*) DCs, bevor diese über den Blutstrom das periphere Gewebe erreichen. Ein Modell für die Entwicklung von murinen *bone marrow-derived dendritic cells* (BMDCs) *in vitro* ist die Differenzierung von Knochenmarkszellen zu mDCs durch Behandlung mit GM-CSF (plus IL-4) über acht Tage (344, 345). Um eine mögliche Funktion der einzelnen NFAT-Familienmitglieder bei der Differenzierung der BMDCs zu ermitteln, wurde zunächst deren Expression während der Entwicklung *in vitro* untersucht. Mit Hilfe von BAC-transgenen NFATc1-Reportermausen sowie mittels RT-PCR konnte eine (stark) zunehmende Expression von NFATc1 während der ersten Tage in Kultur festgestellt werden. Interessanterweise ließ sich für NFATc1 hauptsächlich eine Expression vom *Nfatc1* P2, nicht aber vom *Nfatc1* P1 Promotor feststellen. Der P2 Promotor ist in T- und B-Lymphozyten konstitutiv aktiv und führt vorrangig zur Expression der (langen) Isoformen NFATc1/ β B und NFATc1/ β C. Entsprechend konnten auch in BMDCs nur β -Peptid-enthaltene *Nfatc1*-Transkripte nachgewiesen werden. Die Expression von NFATc2 und NFATc3 war während der Differenzierung hingegen

unverändert (Daten nicht gezeigt). Während die Stimulation von T- und B-Zellen durch den Antigenrezeptor den *Nfatc1* P1 Promoter – u. a. über positive Autoregulation – aktiviert, scheint dies in DCs nicht stattzufinden. Das lässt sich zunächst Mangels eines adäquaten Antigenrezeptors erklären, welcher eine rasche Calcium-Freisetzung bewirken könnte. Außerdem führt eine künstlich herbeigeführte Calcium-Mobilisierung, wie durch Ionomycin, nicht zu einer normalen Differenzierung, sondern zu einer unumkehrbaren und vollständigen Aktivierung der DCs (152, 154-156). Dies erscheint insofern kritisch, da es nicht der physiologischen Situation entspricht, welche eine Balance zwischen unreifen (tolerogenen) und aktivierten (inflammatorischen) DCs für eine angemessene Immunreaktion benötigt. Daraus lässt sich ableiten, dass die Differenzierung zu unreifen, aber aktivierbaren BMDCs eine fein abgestimmte Expression von NFAT-Transkriptionsfaktoren benötigt, um eine unkontrollierte T-Zell-Aktivierung zu vermeiden.

Analysen der subzellulären Verteilung von NFATc1 zeigten eine auffällige Kernlokalisierung während der Entwicklung der BMDCs durch GM-CSF. Dies deutet auf eine Beteiligung von NFATc1 bei der Differenzierung von dendritischen Zellen hin. Durch pharmakologische Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration mittels Ionomycin konnte eine stark beschleunigte Reifung sowie eine verstärkte Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 und CD40 induziert werden. Obwohl eine entscheidende Rolle von Calcium für die Entwicklung von dendritischen Zellen bereits ausführlich beschrieben wurde (152, 154-156), ist die Funktion der einzelnen Calcium/Calcineurin-regulierten NFAT-Transkriptionsfaktoren ungeklärt. Eine unlängst publizierte Studie von Vukcevic *et al.* offenbarte eine spontane Calcium-Oszillation in unreifen, aber nicht in (LPS-) aktivierten, dendritischen Zellen (156). Als molekularer Mechanismus dieser permanenten Calcium-Mobilisation wird die Signaltransduktion durch InsP_3 vermutet (156). Aktivierung von (unreifen) DCs durch PRRs führt allerdings zum Zusammenbrechen dieser Calcium-Oszillation, die von einem vollständigen Ausreifen der dendritischen Zellen gefolgt wird. Übereinstimmend mit den hier vorgestellten Daten konnte diese Arbeitsgruppe eine konstante Kernlokalisierung von NFATc1 in unreifen DCs feststellen, wobei eine Aktivierung der Zellen durch LPS zur zytosolischen Verteilung von NFAT führte (156). Daraus lässt sich schließen, dass – obwohl in der Entwicklung der BMDCs kein Rezeptor ein „klassisches“ starkes Calcium-Signal induziert – die permanente Oszillation des Calciums in der Zelle ausreicht, Calcineurin und damit auch NFAT zu aktivieren. Ein Zusammenbrechen dieser Oszillation führt zur Aktivierung der DCs und somit zu einem „Abschalten“ einer NFAT-vermittelten Differenzierung (siehe unten). Es ist anzunehmen, dass

die Aktivierung über PRRs vorrangig NF- κ B triggert und NFATc1 und/oder NFATc2 bei der Differenzierung der BMDCs keine große Rolle spielen (346, 347). Inwiefern individuelle NFAT-Familienmitglieder die Entwicklung von BMDCs (unterschiedlich) beeinflussen, wurde von uns ebenfalls untersucht. Die Analyse *Nfatc2*- und *Nfatc3*-defizienter Mäuse sowie *knock-down* Experimente für *Nfatc1* zeigten, dass NFATc1 und NFATc3 die Entwicklung von BMDCs positiv regulieren, wohingegen NFATc2 die Differenzierung hemmt. Dabei ist die Entwicklung und Reifung von DCs eng an die Proliferation der myeloiden Vorläuferzellen gekoppelt. Entsprechend zeigten *Nfatc1-knock down* oder *Nfatc3*^{-/-} Knochenmarkszellen eine deutlich reduzierte Generierungseffizienz *in vitro*, dendritische Zellen von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen wiesen hingegen – *in vitro* und *in vivo* – eine überschießende Proliferation auf. Eine solche gegensätzliche Funktion von NFATc1 und NFATc2 bezüglich der Proliferation konnte bisher insbesondere bei Tumorzellen festgestellt werden (348-351). Dabei fungiert NFATc1 als eine Art (Proto-) Onkogen, während NFATc2 als Tumorsuppressor angesehen wird (351). Zumindest für Pankreaskarzinomzellen konnte auch eine gegenläufige Regulation von c-Myc durch NFATc1 und NFATc2 nachgewiesen werden (348, 349, 351). Eine generelle Dysregulation von c-Myc in *Nfatc2*^{-/-} DCs (oder anderen Zellen des Immunsystems) war allerdings nicht eindeutig zu beantworten (Daten nicht gezeigt), sondern scheint eher ein Phänomen von Tumorzellen zu sein. Während *Nfatc2*-defiziente dendritische Zellen insgesamt eine deutliche Hyperproliferation aufwiesen, war die Differenzierung dieser Knochenmarkszellen verzögert. Die Analyse der „Reifungsmarker“ CD11b⁺ und CD11c⁺ während der GM-CSF-Kultur zeigte eine verzögerte und insgesamt geringere Differenzierung von *Nfatc2*^{-/-} BMDCs. Die Differenzierung von *Nfatc1-knock down* DCs war hingegen nicht beeinflusst. Daraus lässt sich ableiten, dass NFATc2 bei der Entwicklung dendritischer Zellen die Proliferation hemmt, aber gleichzeitig die Differenzierung unterstützt. Entsprechend zeigte eine biochemische Blockade der NFAT-Aktivierung durch CsA oder FK506 (Tacrolimus) einen „überlappenden Phänotyp“. Bereits relativ geringe Konzentrationen der beiden Inhibitoren führten zu einer reduzierten Proliferation bei gleichzeitiger Beeinträchtigung der DC-Reifung. Dies spricht für eine zentrale Rolle der Calcium- und NFAT-Signaltransduktion bei der Entwicklung dendritischer Zellen, wobei verschiedene NFAT-Familienmitglieder spezifische Funktionen erfüllen.

7.3.2. NFATc3 reguliert die Dectin-1-vermittelte Zytokinexpression

Aktivierung von (unreifen) dendritischen Zellen durch Antigenkontakt und gleichzeitiger Stimulation über PRRs führt zu deren vollständiger Ausreifung und Aktivierung. Insbesondere die Stimulation durch PRRs als „*danger signal*“ entscheidet über die Stärke und die Qualität der nachfolgenden T-Zell-Immunantwort (352, 353). Neben der großen Gruppe von TLRs zählen die Virus-erkennenden RIG-1 und Mda5 Helikasen (354), TREM- (*triggering receptors expressed on myeloid cells*) und Siglec-Proteine (355) sowie die Familie von C-Type Lektinen (356) zu den PRRs. Die C-Typ Lektine (CTLs) stellen eine eigene Gruppe von Calcium-abhängigen Rezeptoren dar, welche üblicherweise Kohlenhydratverbindungen erkennen (356-358). Auch Dectin-1 (alternativ CLEC7A genannt) als Rezeptor für verschiedene β -Glukan-Verbindungen wird zu den C-Typ Lektinen (genauer CTL Klasse V) gezählt und dient insbesondere der Abwehr von Pilzinfektionen (357-360).

Obwohl für die NFATc1- und NFATc2-Transkriptionsfaktoren eine Beteiligung bei Differenzierung und Reifung von BMDCs nachgewiesen werden konnte, scheinen gerade diese beiden NFAT-Proteine nach Aktivierung von dendritischen Zellen keine entscheidende Funktion zu übernehmen. Die Aktivierung von unreifen DCs führt zu einer zytoplasmatischen Verteilung von NFATc1 (156). Zusätzlich konnte eine reduzierte Gesamtexpression von NFATc1 und NFATc2 nach Aktivierung der BMDCs mit LPS oder Zymosan gezeigt werden. Im Gegensatz dazu war NFATc3 nach Stimulation der dendritischen Zellen unverändert stark exprimiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass NFATc1 und NFATc2 vorrangig die Differenzierung von BMDCs beeinflussen, NFATc3 hingegen eine Funktion bei der Aktivierung übernimmt. Eine ähnliche Regulation wird auch für Makrophagen vermutet (361).

Stimulation von Dectin-1 resultierte nicht nur in einer raschen intrazellulären Calcium-Mobilisierung, sondern wohl auch in einer Aktivierung von NFATc3. Eine Calcium- und PLC γ -Signaltransduktion in DCs durch Ligation von Dectin-1 mit Zymosan oder Curdlan wurde bereits beschrieben (150, 154, 362, 363), wobei die Beteiligung von NFAT-Faktoren allerdings nur indirekt – mittels NFAT-Luciferasereporter – gezeigt wurde (150, 364). Dectin-1 initiiert insbesondere eine T_H17- und/oder T_H1-vermittelte Immunantwort (150, 154, 360, 362, 363, 365). NFATc3 scheint hierbei die Produktion von IL-12, TNF α , IL-23 und IL-2 zu ermöglichen, gleichzeitig aber die Expression des immun-suppressiven IL-10 zu hemmen. Eine repressive Eigenschaft von NFAT-Faktoren auf IL-10 wurde ebenfalls in T- und B-Lymphozyten gezeigt ((180) und Dr. Shankar Bhattachayya, persönliche Mitteilung). Obwohl auch für die Aktivierung von DCs mit LPS eine Calcium-Mobilisation impliziert wurde (151,

155), konnten diese Daten von uns nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Studien von Zaroni *et al.* deuten auf eine LPS- bzw. CD14-vermittelte Aktivierung von Src-Kinasen und PLC γ hin (151, 155), und ein anschließender intrazellulärer Calcium-Ausstrom soll die Aktivität von NFATc2 regulieren. Dies mag – zumindest teilweise – der Elimination von differenzierten DCs durch Apoptose und damit zur Vermeidung von Autoimmunreaktionen dienen (151, 155). Eigene Studien mit *Nfatc2*^{-/-} und *Nfatc2*^{-/-}*Nfatc3*^{-/-} dendritischen Zellen zeigten jedoch keine Veränderung der Zytokinexpression nach LPS-Stimulation (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass NFAT-Faktoren auch in dendritischen Zellen eine wichtige Rolle spielen. Während NFATc1 und NFATc2 die Differenzierung und Proliferation dendritischer Zellen beeinflussen, reguliert NFATc3 deren Dectin-1-vermittelte Zytokinexpression und steuert somit auch die nachfolgende T-Zell-Polarisation.

7.4. Epilog: ICER, NFAT und Foxp3 als Regulatoren der peripheren Toleranz

Das Immunsystem ist ein kompliziertes „Organ“, das durch die Beteiligung vieler verschiedener Zellen und Gewebetypen sowie löslicher Stoffe, wie Antikörper, die schwierige Aufgabe erfüllt, den Körper vor Infektionen zu schützen. Gleichzeitig muss aber der Organismus selbst vor einer Überreaktion des Immunsystems bewahrt werden, da es sonst zu schwerwiegenden auto-aggressiven Immunreaktionen kommt. Trotz der Elimination von selbstreaktiven Lymphozyten im Zuge der zentralen Toleranz existieren zusätzliche Mechanismen, welche eine periphere Toleranz gewährleisten.

Die Kenntnis der Regulationsmechanismen der daran beteiligten Gene ist die Voraussetzung, um einen derart vielschichtigen Prozess zu verstehen. Die Kontrolle der Genexpression wird dabei auf mehreren Ebenen und durch ein kompliziertes Netzwerk von Regulatoren – insbesondere von Transkriptionsfaktoren – gesteuert. Kommt es hier zu einer „Fehlsteuerung“, kann dies fatale Folgen haben, wie etwa eine Immunschwäche oder lebensbedrohliche Autoimmunreaktionen zeigen.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Kontrolle der peripheren Toleranz durch die Transkriptionsfaktoren ICER, NFAT und Foxp3 untersucht. Alle drei Transkriptionsfaktoren werden von niedermolekularen *second messenger* Botenstoffen, wie Calcium und cAMP, beeinflusst. Interessanterweise verursachen Calcium und cAMP oft divergierende Effekte und bewirken, je nach zellulärem Kontext, vollkommen unterschiedliche und z. T. gegensätzliche biologische Funktionen. Ein Teilaspekt dieser Dissertation befasste sich mit dem zellulären Austausch von cAMP zwischen regulatorischen T-Zellen und anderen (Effektor-) Lymphozyten. Dabei wurde festgestellt, dass durch cAMP nicht nur in Tregs, sondern auch in Effektorzellen der Transkriptionsfaktor ICER induziert wird, der seinerseits durch Suppression des *Nfat1* P1 Promotors die Expression hoher Mengen an NFAT unterdrückt. Andererseits bestimmt die Konzentration an NFAT-Faktoren die Effizienz der Foxp3-Induktion in TGF β -induzierten iTregs. Sowohl für NFAT mit ICER als auch für NFAT mit Foxp3 konnte eine direkte Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen werden, was in beiden Fällen die transaktivierenden Eigenschaften von NFAT unterdrückt. Die Komplexe dieser Transkriptionsfaktoren scheinen bei der immunologischen Toleranz eine wichtige Rolle zu spielen. In wieweit die jeweiligen hochmolekularen Proteinkomplexe – sogenannte Repressosome – sich unterscheiden und damit nur überlappende Aufgaben erfüllen, kann z. Z. nur spekuliert werden. Eindeutig ist es für eine effiziente Toleranzinduktion aber von Vorteil, wenn letztendlich eine zu hohe NFAT-Aktivität vermieden wird.

Teil des komplexen Bildes ist es, dass die gleichen Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Zelltypen und Situationen oft völlig verschiedene Funktionen erfüllen. Beispielsweise wird die Differenzierung über die Induktion von *Foxp3* in iTregs durch NFATc1, NFATc2 und NFATc3 gleichmäßig und wohl nur in der Gesamtmenge entscheidend kontrolliert, während diese NFAT-Faktoren in dendritischen Zellen hingegen spezifische Funktionen für deren Entwicklung erfüllen. Dies wird in den jeweiligen Lymphozyten sicherlich über die differentiell exprimierten Interaktionspartner sowie die verschieden arrangierten Kontrollelemente innerhalb der Zielgene bestimmt. Andererseits können dieselben Gene in unterschiedlichen Zelltypen verschieden reguliert werden: Während *Foxp3* in TGF β -induzierten iTregs durch NFAT-Faktoren kontrolliert wird, scheint die Expression von *Foxp3* in nTregs vollkommen unabhängig von NFAT zu erfolgen. Dies wird nicht nur über die Expression und Aktivität der jeweiligen Transkriptionsfaktoren, sondern auch über den Status des Chromatins reguliert. So sind die NFAT-regulierten Kontrollelemente des *Foxp3* Locus während der Entwicklung der nTregs unzugänglich, so dass eine NFAT-Aktivierung für die *Foxp3*-Regulation zu diesem Zeitpunkt unnötig erscheint.

Die Komplexität wird schon anhand der auf verschiedensten Ebenen regulierten Expression von NFAT deutlich. Während *Nfatc1* in Effektor-Lymphozyten vorrangig vom induzierbaren P1 Promotor – was zu einer hohen Menge an transaktivierendem NFATc1/ α A führt – transkribiert wird, zeigen regulatorische oder supprimierte konventionelle T-Zellen, aber auch dendritische Zellen eine sehr schwache Expression dieser Isoform. Warum DCs keine Expression der kurzen Isoform zulassen, ist ungeklärt. In supprimierten Effektor- bzw. Tregs wird die Repression durch die NFAT-Interaktionspartner ICER und *Foxp3* gewährleistet. Da dieses Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren auch über die Grenzen von Zellmembranen hinweg stattfindet, sind mehrere Möglichkeiten für DCs gegeben. So konnte eine direkte „Kommunikation“ zwischen Zellen mittels cAMP-Transfer und ICER nachgewiesen werden. Aber auch Zytokine und Chemokine werden durch Transkriptionsfaktoren reguliert und können auto-, juxta- und parakrin auf andere Zellen des Immunsystems einwirken. Dabei nehmen dendritische Zellen eine Schlüsselposition ein, indem sie durch Polarisation von naiven T-Zellen eine pro-inflammatorische oder tolerante Immunantwort initiieren können. So werden durch NFAT die Zytokine IL-12, TNF α und IL-2 in DCs kontrolliert, welche eine T_H1-Immunantwort begünstigen. Gleichzeitig wird NFAT aber auch in naiven T-Zellen für genau diese Differenzierung zu T_H1-Zellen benötigt. Dabei

können Foxp3 und/oder ICER die Funktion(en) von NFAT unterdrücken und so eine – allzu starke – Immunantwort verhindern.

Es lässt sich somit abschließend festhalten, dass die Kontrolle der Genregulation durch die drei Transkriptionsfaktoren NFAT, ICER und Foxp3 ein äußerst feinmaschiges Netzwerk darstellt, welches durch den biologischen und zellulären Kontext beeinflusst wird. Diese drei Faktoren erfüllen dabei jeweils Funktionen in der Immunität, regulieren aber gleichzeitig auch Aspekte der peripheren Toleranz. Daher erscheint es erstaunlich, dass dieses molekulare Zusammenspiel – in den meisten Fällen – reibungslos funktioniert. Ein genaueres Grundlagenverständnis der wechselseitigen Beziehung von Transkriptionsfaktoren ist unverzichtbar, um eine verbesserte Spezifität und Qualität zukünftiger Therapieansätze bei Autoimmunität oder Immunschwäche zu gewährleisten.

8. Anhang

8.1. Kongressteilnahmen

4th Spring School on Immunology in Ettal, Deutschland (2-7. März 2008)

3rd Network Meeting of the DFG graduate schools GK520, GK592 and GK794 in Wildbad bei Rothenburg ob der Tauber, Deutschland (6-8. Juli 2008)

Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies in Wien, Österreich (3-6. September 2008)

2nd International GK Symposium; Regulators of Adaptive Immunity in Erlangen, Deutschland (17-18. Oktober 2008)

1st Annual Meeting of the SPP 1365; The UbF Network in Berlin, Deutschland (4-6. März 2009)

12th German Meeting on T Cells Subsets and Functions research in Marburg, Deutschland (25-26. Mai 2009)

European congress of immunology (ECI) in Berlin, Deutschland (13-16. September 2009)

13th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS) Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes in Weimar, Deutschland (28-30. Oktober 2009)

4th Network Meeting of the DFG graduate schools GK520, GK592 and GK794 in Kloster Schöntal, Deutschland (15-17. November 2009)

4th Retreat of Transregio TR52 in Mainz, Deutschland (10-11. Juni 2010)

13th German Meeting on T Cells Subsets and Functions research in Marburg, Deutschland (30th Juli 2010)

5th International Symposium of the Graduate School of Life Sciences (Chiasma) in Würzburg, Deutschland (13-14. Oktober 2010).

3rd International GK Symposium; Regulators of Adaptive Immunity in Erlangen, Deutschland (17-18. Oktober 2008)

5th Network Meeting of the DFG graduate schools GK520, GK592 and GK794 in Kloster Schöntal, Deutschland (7-9. November 2010)

International Workshop of the DFG-Transregional Research Center TR52: Transcriptional Programming in the Immune System in Würzburg, Deutschland (17-20. November 2010)

14th German Meeting on T Cells Subsets and Functions research in Marburg, Deutschland (20-21. Juni 2010)

8.2. Veröffentlichungen

8.2.1. Wissenschaftliche Originalpublikationen

Arnab Nayak, Judith Glöckner-Pagel, Martin Vaeth, Julia E. Schumann, Mathias Buttmann, Tobias Bopp, Edgar Schmitt, Edgar Serfling, and Friederike Berberich-Siebelt (2009).

SUMOylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and IL2 repression by HDAC. *J Biol Chem* 284:10935-10946

Martin Vaeth, Tea Gogishvili, Tobias Bopp, Matthias Klein, Friederike Berberich-Siebelt, Stefan Gattenloehner, Andris Avots, Tim Sparwasser, Nadine Grebe, Edgar Schmitt, Thomas Huenig, Edgar Serfling, and Josef Bodor (2011).

Regulatory T cells facilitate the nuclear accumulation of inducible cAMP early repressor (ICER) and suppress nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:2480-2485

Sankar Bhattacharyya, Jolly Deb, Amiya K. Patra, Duong Anh Thuy Pham, Wen Chen, Martin Vaeth, Friederike Berberich-Siebelt, Stefan Klein-Hessling, Edward D. Lamperti, Kurt Reifenberg, Julia Jellusova, Astrid Schweizer, Lars Nitschke, Ellen Leich, Anderas Rosenwald, Cornelia Brunner, Swen Engelmann, Ursula Bommhardt, Andris Avots, Martin R. Müller, Eisaku Kondo, and Edgar Serfling (2011).

NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin-NFAT signalling network. *J Exp Med* 208:823-839

Josef Bodor, Tobias Bopp, Martin Vaeth, Edgar Serfling, Thomas Hünig, and Edgar Schmitt (2011). **Cyclic AMP underpins suppression by regulatory T cells.** Übersichtsartikel (*review*), Manuskript akzeptiert (*Eur J Immunol*).

Martin Vaeth, Ulrike Schießer, Sonja Reissig, Kazuki Satoh, Martin Müller, Ari Waisman, Helmut Jonuleit, Edgar Serfling, Birgit Sawitzki and Friederike Berberich-Siebelt (2011). **NFAT and Foxp3 shape a feedback loop in TGF β -induced regulatory T cells.** Manuskript in Revision (*Immunity*).

Matthias Klein, Martin Vaeth, Tobias Scheel, Ria Baumgrass, Friederike Berberich-Siebelt, Tobias Bopp, Edgar Schmitt, and Christian Becker (2011). **Repression of cAMP up-regulation disarms and expands human Tregs.** Manuskript in Revision (*J Immunol*).

8.2.2. Vorträge bei Konferenzen

Martin Vaeth, Andris Avots, Manfred B. Lutz, Edgar Serfling, and Friederike Berberich-Siebelt (2009). **Redundant and specific roles of NFAT transcription factors in generation and function of dendritic cells.**

European congress of immunology (ECI) (13-16. September 2009) in Berlin, Deutschland

Martin Vaeth, Stefan Klein-Hessling, Andris Avots, Manfred B. Lutz, Edgar Serfling, and Friederike Berberich-Siebelt (2009). **Dual roles of NFATc1 and NFATc2 in the generation, proliferation and maturation of dendritic cells.**

4th Network Meeting of the DFG graduate schools GK520, GK592 and GK794 (15-17. November 2009) in Kloster Schöntal, Deutschland

Martin Vãeth, Arnab Nayak, Julia Schumann, Tobias Bopp, Ronald Rudolf, Edgar Serfling, and Friederike Berberich-Siebelt (2010). **Functional consequences of NFATc1 SUMOylation on T cell activation, differentiation, and anergy *in vivo*.**

2nd Annual Meeting of DFG SPP 1365 (14-16. April 2010) in Berlin, Deutschland

Martin Vaeth, Birgit Sawitzki, Edgar Serfling, and Friederike Berberich-Siebelt (2010). **TGF β -induced iTregs, but not nTregs are highly dependent on NFATs.**

4th Retreat of Transregio TR52 (10-11. Juni 2010) in Mainz, Deutschland

Martin Vaeth, Birgit Sawitzki, Helmut Jonuleit, Edgar Serfling, Anjana Rao, and Friederike Berberich-Siebelt (2010). **TGF β -induced iTregs, but not nTregs are highly dependent on NFATs.**

13th Meeting on T cells, subsets and functions (30. Juli 2010) in Marburg, Deutschland

Martin Vaeth, Ulrike Schießer, Birgit Sawitzki, Helmut Jonuleit, Edgar Serfling, Anjana Rao, and Friederike Berberich-Siebelt (2010). **Foxp3⁺ iTreg differentiation is crucially dependent on NFAT activity.**

5th international symposium of the graduate school of life sciences (13.-14. Oktober 2010) in Würzburg, Deutschland

Martin Vaeth, Ulrike Schießer, Birgit Sawitzki, Kazuki Satoh, Helmut Jonuleit, Edgar Serfling, Anjana Rao, and Friederike Berberich-Siebelt (2011). **NFAT proteins induce Foxp3 during iTreg differentiation, and subsequently Foxp3 inhibits NFAT.**

14th Meeting on T cells, subsets and functions (20. Juni 2011) in Marburg, Deutschland

8.2.3. Posterpräsentationen bei Konferenzen

Martin Vaeth, Arnab Nayak, Judith Glöckner-Pagel, Mathias Buttmann, Tobias Bopp, Edgar Schmitt, Edgar Serfling and Friederike Berberich-Siebelt (2008). **Functional consequences of NFATc1 SUMOylation in T cell differentiation, activation and anergy.**

Joint annual meeting of immunology of the Austrian and German societies (3-6. September 2008) in Wien, Österreich

Martin Vaeth, Edgar Serfling and Friederike Berberich-Siebelt (2009). **Dual roles of NFATc1 and NFATc2 in generation, proliferation and maturation of dendritic cells.**

4th International Symposium Revolution Research (26-27. März 2009) in Würzburg, Deutschland

Martin Vaeth, Tea Gogishvili, Tobias Bopp, Friederike Berberich-Siebelt, Edgar Schmitt, Thomas Hünig, Edgar Serfling and Josef Bodor (2009). **Cyclic AMP-mediated shuffling of ICER alters NFAT-dependent suppression by nTreg cells.**

13th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS) (28-30. Oktober 2009) in Weimar, Deutschland

Martin Vaeth, Tea Gogishvili, Tobias Bopp, Tim Sparwasser, Friederike Berberich-Siebelt, Edgar Schmitt, Thomas Hünig, Edgar Serfling and Josef Bodor (2010). **Direct contact with regulatory T cells induce cAMP-dependent nuclear localization of ICER in effector CD4⁺ T and B cells.**

5th Network Meeting of the DFG graduate programs from Würzburg, Tübingen, and Erlangen (7-9. November 2010) in Schöntal, Deutschland

8.3. Curriculum Vitae

8.4. Abkürzungsverzeichnis

A. Allgemeine Abkürzungen

α	anti
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	<i>Activating Protein 1</i>
APC	Allophycocyanin
APCs	antigen presenting cells
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF-1	<i>activating transcription factor 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BALB/c	standardisierter albino Mausstamm
BCR	B-Zell Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BL/6	<i>Black Six</i> , standardisierter Mausstamm
BMDCs	<i>bone marrow derived dendritic cells</i>
BSA	Bovines Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CARE	<i>cAMP autoregulatory elements</i>
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CD28REs	<i>CD28-responsive elements</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CK	<i>casein kinase</i>
CNS	<i>conserved noncoding sequence</i>
CRAC	<i>Calcium release activated channel</i>
Cre	<i>causes/circular recombination</i>
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CREM	<i>cAMP responsive element modulator</i>
CoIP	Koimmunpräzipitation
CsA	Cyclosporin A
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
DAG	Diacylglycerol
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DEREG	<i>depletion of regulatory T cells</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothieitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)

FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GSK3β	Glykogen-Synthase Kinase 3 β
HDAC	Histon-Deazetylase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICER	<i>inducible cAMP early repressor</i>
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
InsP₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
Iono	Ionomycin
IPEX	<i>immunodysregulation, polyendokrinopathy X-linked syndrom</i>
IRAK	<i>interleukin receptor-associated kinase</i>
IRF	Interferon regulierender Faktor (<i>interferon regulatory factor</i>)
ITAM	<i>immunereceptor tyrosine-based activation motifs</i>
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zelle
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KO	<i>knock out</i>
LAG	<i>lymphocyte activation gene 3</i>
LAT	<i>linker of activated T cells</i>
LPS	Lipopolysaccharid, Ligand des TLR 4
MAPK	MAP Kinase (<i>mitogen activated protein kinases</i>)
mDCs	myeloide dendritische Zellen
MHC	major histocompatibility complex
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NHR	<i>NFAT homology region</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	Nukleärer Faktor κ B
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nTreg	Natürliche regulatorische T-Zelle
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PI	Propidiumjodid
PBS	Phosphat-Puffer (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PLCγ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PolyI:C	Polyinosin-Polycytidin, virale dsRNA und Ligand des TLR 3
PRRs	<i>Pattern-recognition Receptors</i>
(ds/ss) RNA	(doppelsträngige/einzelsträngige) Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> , ein Zellkulturmedium
RSD	<i>rel similarity domain</i>
Rag	<i>recombination gene</i>
rpm	<i>rotations per minutes</i>
RT	Raumtemperatur ($\sim 20^{\circ}\text{C}$)

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sh	short hairpin
SRRs	serine rich repeats
STIM	stromal interaction molecule
TAD	Transaktivierungsdomäne (transactivation domain)
TBS	Tris-Puffer (<i>Tris-buffered saline</i>)
TCR	T-Zell Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tconv	Konventionelle T-Zelle
T_H	Helfer-T-Zelle
TGFβ	transforming growth factor β
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
TonEBP	<i>tonicity element binding protein</i>
TPA	Phorbolster (12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol-13-acetat)
TRE	<i>TPA responsive element</i>
Tconv	Konventionelle T-Zelle
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSDR	Treg-specific de-methylated region
ÜN	Über Nacht
<i>wt</i>	<i>wild type</i>
ZAP-70	<i>ξ-associated protein 70 kDa</i>

B. Physikalische und chemische Abkürzungen

A	Ampère
°C	Grad Celcius
Ci	Curie
d	Tag (<i>day</i>)
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunden
[³H]	radioaktives Isotop des Wassertoffs (Tritium)
l	Liter
M	Molar (mol pro Liter)
min	Minuten
mol	Teilchenzahl in 12g Kohlenstoff (Isotop ¹² C)
[³²P]	radioaktives Isotop des Phosphors
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
V	Volt

C. Präfixe physikalischer Einheiten

k	Kilo (10 ³)
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Milli (10 ⁻³)
n	Nano (10 ⁻⁹)
p	Piko (10 ⁻¹²)

9. Literaturverzeichnis

1. Mills, K. H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4:841-855.
2. Ziegler, S. F. 2006. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 24:209-226.
3. Muller, M. R., and A. Rao. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* 10:645-656.
4. Serfling, E., S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, T. Bopp, M. Stassen, and E. Schmitt. 2006. NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance. *Eur J Immunol* 36:2837-2843.
5. Bodor, J., J. Bodorova, and R. E. Gress. 2000. Suppression of T cell function: a potential role for transcriptional repressor ICER. *J Leukoc Biol* 67:774-779.
6. Thornton, A. M., P. E. Korty, D. Q. Tran, E. A. Wohlfert, P. E. Murray, Y. Belkaid, and E. M. Shevach. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 184:3433-3441.
7. Medzhitov, R., and C. A. Janeway, Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300.
8. Lichtman, A. a. 2003. *Cellular and molecular Immunology (5th ed.)*. Saunders, Philadelphia.
9. Germain, R. N. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2:309-322.
10. von Boehmer, H. 2000. T-cell lineage fate: instructed by receptor signals? *Curr Biol* 10:R642-645.
11. von Boehmer, H., and P. Kisielow. 2006. Negative selection of the T-cell repertoire: where and when does it occur? *Immunol Rev* 209:284-289.
12. von Boehmer, H. 2009. Central tolerance: essential for preventing autoimmune disease? *Eur J Immunol* 39:2313-2316.
13. von Boehmer, H., and F. Melchers. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol* 11:14-20.
14. Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3:756-763.
15. Kawahata, K., Y. Misaki, M. Yamauchi, S. Tsunekawa, K. Setoguchi, J. Miyazaki, and K. Yamamoto. 2002. Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol* 168:4399-4405.
16. Zhu, J., and W. E. Paul. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev* 238:247-262.
17. El-behi, M., A. Rostami, and B. Ciric. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5:189-197.
18. Staudt, V., E. Bothur, M. Klein, K. Lingnau, S. Reuter, N. Grebe, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, A. Ulges, C. Taube, N. Dehzad, M. Becker, M. Stassen, A. Steinborn, M. Lohoff, H. Schild, E. Schmitt, and T. Bopp. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* 33:192-202.
19. Fernbach, B. R., H. Kirchner, G. D. Bonnard, and R. B. Herberman. 1976. Suppression of mixed lymphocyte response in mice bearing primary tumors induced by murine sarcoma virus. *Transplantation* 21:381-386.
20. Hardin, J. A., T. M. Chused, and A. D. Steinberg. 1973. Suppressor cells in the graft vs host reaction. *J Immunol* 111:650-651.

21. Hodgson, H. J., J. R. Wands, and K. J. Isselbacher. 1978. Decreased suppressor cell activity in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 32:451-458.
22. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. Pillars Article: Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor $\{\alpha\}$ -Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *J. Immunol.* 1995. 155: 1151-1164. *J Immunol* 186:3808-3821.
23. Nishizuka, Y., and T. Sakakura. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753-755.
24. Bluestone, J. A., and Q. Tang. 2005. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 17:638-642.
25. Paust, S., and H. Cantor. 2005. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol Rev* 204:195-207.
26. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
27. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
28. Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepfer, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
29. Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance, and H. D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
30. Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M. E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27:18-20.
31. Stephens, L. A., D. Gray, and S. M. Anderton. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17418-17423.
32. Lahl, K., and T. Sparwasser. In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods Mol Biol* 707:157-172.
33. Hill, J. A., M. Feuerer, K. Tash, S. Haxhinasto, J. Perez, R. Melamed, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27:786-800.
34. Gavin, M. A., J. P. Rasmussen, J. D. Fontenot, V. Vasta, V. C. Manganiello, J. A. Beavo, and A. Y. Rudensky. 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445:771-775.
35. Lin, W., D. Haribhai, L. M. Relland, N. Truong, M. R. Carlson, C. B. Williams, and T. A. Chatila. 2007. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* 8:359-368.
36. Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M. K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
37. Roncarolo, M. G., and M. K. Levings. 2000. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 12:676-683.

38. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
39. Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204:1757-1764.
40. Horwitz, D. A., S. G. Zheng, and J. D. Gray. 2008. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)/CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 29:429-435.
41. Liston, A., K. M. Nutsch, A. G. Farr, J. M. Lund, J. P. Rasmussen, P. A. Koni, and A. Y. Rudensky. 2008. Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11903-11908.
42. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22:329-341.
43. Bienvenu, B., B. Martin, C. Auffray, C. Cordier, C. Becourt, and B. Lucas. 2005. Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol* 175:246-253.
44. Feuerer, M., J. A. Hill, D. Mathis, and C. Benoist. 2009. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 10:689-695.
45. Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2005. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 6:152-162.
46. Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
47. Bour-Jordan, H., and J. A. Bluestone. 2009. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev* 229:41-66.
48. Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23:515-548.
49. Sharpe, A. H., and G. J. Freeman. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2:116-126.
50. Boden, E., Q. Tang, H. Bour-Jordan, and J. A. Bluestone. 2003. The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Novartis Found Symp* 252:55-63; discussion 63-56, 106-114.
51. Tang, Q., K. J. Henriksen, E. K. Boden, A. J. Tooley, J. Ye, S. K. Subudhi, X. X. Zheng, T. B. Strom, and J. A. Bluestone. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171:3348-3352.
52. Hsieh, C. S., Y. Zheng, Y. Liang, J. D. Fontenot, and A. Y. Rudensky. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7:401-410.
53. Pacholczyk, R., H. Ignatowicz, P. Kraj, and L. Ignatowicz. 2006. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 25:249-259.
54. Wong, J., R. Obst, M. Correia-Neves, G. Losyev, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 178:7032-7041.

55. Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen, and C. C. Goodnow. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 4:350-354.
56. van Santen, H. M., C. Benoist, and D. Mathis. 2004. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* 200:1221-1230.
57. DiPaolo, R. J., and E. M. Shevach. 2009. CD4+ T-cell development in a mouse expressing a transgenic TCR derived from a Treg. *Eur J Immunol* 39:234-240.
58. Bautista, J. L., C. W. Lio, S. K. Lathrop, K. Forbush, Y. Liang, J. Luo, A. Y. Rudensky, and C. S. Hsieh. 2009. Intraclonal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus. *Nat Immunol* 10:610-617.
59. Burchill, M. A., J. Yang, K. B. Vang, J. J. Moon, H. H. Chu, C. W. Lio, A. L. Vegoe, C. S. Hsieh, M. K. Jenkins, and M. A. Farrar. 2008. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28:112-121.
60. Lio, C. W., and C. S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.
61. D'Cruz, L. M., and L. Klein. 2005. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6:1152-1159.
62. Ruan, Q., V. Kameswaran, Y. Tone, L. Li, H. C. Liou, M. I. Greene, M. Tone, and Y. H. Chen. 2009. Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* 31:932-940.
63. Isomura, I., S. Palmer, R. J. Grumont, K. Bunting, G. Hoyne, N. Wilkinson, A. Banerjee, A. Proietto, R. Gugasyan, L. Wu, A. McNally, R. J. Steptoe, R. Thomas, M. F. Shannon, and S. Gerondakis. 2009. c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J Exp Med* 206:3001-3014.
64. Deenick, E. K., A. R. Elford, M. Pellegrini, H. Hall, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. c-Rel but not NF-kappaB1 is important for T regulatory cell development. *Eur J Immunol* 40:677-681.
65. Schmidt-Supprian, M., J. Tian, E. P. Grant, M. Pasparakis, R. Maehr, H. Ovaa, H. L. Ploegh, A. J. Coyle, and K. Rajewsky. 2004. Differential dependence of CD4+CD25+ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4566-4571.
66. Schmidt-Supprian, M., G. Courtois, J. Tian, A. J. Coyle, A. Israel, K. Rajewsky, and M. Pasparakis. 2003. Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity* 19:377-389.
67. Barnes, M. J., P. Krebs, N. Harris, C. Eidenschenk, R. Gonzalez-Quintial, C. N. Arnold, K. Crozat, S. Sovath, E. M. Moresco, A. N. Theofilopoulos, B. Beutler, and K. Hoebe. 2009. Commitment to the regulatory T cell lineage requires CARMA1 in the thymus but not in the periphery. *PLoS Biol* 7:e51.
68. Gupta, S., S. Manicassamy, C. Vasu, A. Kumar, W. Shang, and Z. Sun. 2008. Differential requirement of PKC-theta in the development and function of natural regulatory T cells. *Mol Immunol* 46:213-224.
69. Molinero, L. L., J. Yang, T. Gajewski, C. Abraham, M. A. Farrar, and M. L. Alegre. 2009. CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 182:6736-6743.
70. Sato, S., H. Sanjo, T. Tsujimura, J. Ninomiya-Tsuji, M. Yamamoto, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira. 2006. TAK1 is indispensable for development of T cells and prevention of colitis by the generation of regulatory T cells. *Int Immunol* 18:1405-1411.

71. Wan, Y. Y., H. Chi, M. Xie, M. D. Schneider, and R. A. Flavell. 2006. The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat Immunol* 7:851-858.
72. Haxhinasto, S., D. Mathis, and C. Benoist. 2008. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med* 205:565-574.
73. Battaglia, M., A. Stabilini, and M. G. Roncarolo. 2005. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 105:4743-4748.
74. Sauer, S., L. Bruno, A. Hertweck, D. Finlay, M. Leleu, M. Spivakov, Z. A. Knight, B. S. Cobb, D. Cantrell, E. O'Connor, K. M. Shokat, A. G. Fisher, and M. Merkenschlager. 2008. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7797-7802.
75. Oh-hora, M., and A. Rao. 2008. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20:250-258.
76. Oh-Hora, M., M. Yamashita, P. G. Hogan, S. Sharma, E. Lamperti, W. Chung, M. Prakriya, S. Feske, and A. Rao. 2008. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol* 9:432-443.
77. Koonpaew, S., S. Shen, L. Flowers, and W. Zhang. 2006. LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *J Exp Med* 203:119-129.
78. Sakaguchi, S., and N. Sakaguchi. 1988. Thymus and autoimmunity. Transplantation of the thymus from cyclosporin A-treated mice causes organ-specific autoimmune disease in athymic nude mice. *J Exp Med* 167:1479-1485.
79. Bopp, T., A. Palmethofer, E. Serfling, V. Heib, S. Schmitt, C. Richter, M. Klein, H. Schild, E. Schmitt, and M. Stassen. 2005. NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201:181-187.
80. Trushin, S. A., K. N. Pennington, A. Algeciras-Schimmich, and C. V. Paya. 1999. Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *J Biol Chem* 274:22923-22931.
81. Palkowitsch, L., U. Marienfeld, C. Brunner, A. Eitelhuber, D. Krappmann, and R. B. Marienfeld. The Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin controls the formation of the Carma1-Bcl10-Malt1 complex during T cell receptor-induced NF- κ B activation. *J Biol Chem* 286:7522-7534.
82. Huehn, J., K. Siegmund, J. C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G. F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G. K. Przybylski, U. Niesner, M. de la Rosa, C. A. Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* 199:303-313.
83. Sather, B. D., P. Treuting, N. Perdue, M. Miazgowicz, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, and D. J. Campbell. 2007. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med* 204:1335-1347.
84. Koch, M. A., G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl, and D. J. Campbell. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10:595-602.
85. Lu, L. F., M. P. Boldin, A. Chaudhry, L. L. Lin, K. D. Taganov, T. Hanada, A. Yoshimura, D. Baltimore, and A. Y. Rudensky. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142:914-929.
86. Zheng, Y., A. Chaudhry, A. Kas, P. deRoos, J. M. Kim, T. T. Chu, L. Corcoran, P. Treuting, U. Klein, and A. Y. Rudensky. 2009. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458:351-356.

87. Rengarajan, J., K. A. Mowen, K. D. McBride, E. D. Smith, H. Singh, and L. H. Glimcher. 2002. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* 195:1003-1012.
88. Cretney, E., A. Xin, W. Shi, M. Minnich, F. Masson, M. Miasari, G. T. Belz, G. K. Smyth, M. Busslinger, S. L. Nutt, and A. Kallies. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol* 12:304-311.
89. Diaconu, C. C., A. I. Neagu, R. Lungu, G. Tardei, I. Alexiu, C. Bleotu, M. C. Economescu, R. S. Bumbacea, I. Pele, and D. Bumbacea. Plasticity of regulatory T cells under cytokine pressure. *Roum Arch Microbiol Immunol* 69:190-196.
90. Zheng, S. G., J. H. Wang, W. Stohl, K. S. Kim, J. D. Gray, and D. A. Horwitz. 2006. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol* 176:3321-3329.
91. Kocak, E., K. Lute, X. Chang, K. F. May, Jr., K. R. Exten, H. Zhang, S. F. Abdessalam, A. M. Lehman, D. Jarjoura, P. Zheng, and Y. Liu. 2006. Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity. *Cancer Res* 66:7276-7284.
92. Taylor, P. A., R. J. Noelle, and B. R. Blazar. 2001. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 193:1311-1318.
93. Kingsley, C. I., M. Karim, A. R. Bushell, and K. J. Wood. 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168:1080-1086.
94. Sawitzki, B., C. I. Kingsley, V. Oliveira, M. Karim, M. Herber, and K. J. Wood. 2005. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *The Journal of experimental medicine* 201:1925-1935.
95. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
96. Yang, L., D. E. Anderson, C. Baecher-Allan, W. D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo, and D. A. Hafler. 2008. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454:350-352.
97. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
98. Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
99. Tone, Y., K. Furuuchi, Y. Kojima, M. L. Tykocinski, M. I. Greene, and M. Tone. 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 9:194-202.
100. Xu, L., A. Kitani, and W. Strober. Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *Mucosal Immunol* 3:230-238.
101. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.
102. Shevach, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30:636-645.
103. von Boehmer, H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6:338-344.
104. Hawrylowicz, C. M., and A. O'Garra. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 5:271-283.

105. Annacker, O., C. Asseman, S. Read, and F. Powrie. 2003. Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis. *J Autoimmun* 20:277-279.
106. Joetham, A., K. Takeda, C. Taube, N. Miyahara, S. Matsubara, T. Koya, Y. H. Rha, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2007. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* 178:1433-1442.
107. Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 201:737-746.
108. Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg, and D. A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
109. Garin, M. I., C. C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait, and R. I. Lechler. 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109:2058-2065.
110. Kubach, J., P. Lutter, T. Bopp, S. Stoll, C. Becker, E. Huter, C. Richter, P. Weingarten, T. Warger, J. Knop, S. Mullner, J. Wijdenes, H. Schild, E. Schmitt, and H. Jonuleit. 2007. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 110:1550-1558.
111. Shevach, E. M. 2006. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25:195-201.
112. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629-644.
113. Green, E. A., L. Gorelik, C. M. McGregor, E. H. Tran, and R. A. Flavell. 2003. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10878-10883.
114. Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi. 2008. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10113-10118.
115. Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, and T. Yamaguchi. 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21:1105-1111.
116. Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21:589-601.
117. Grossman, W. J., J. W. Verbsky, B. L. Tollefsen, C. Kemper, J. P. Atkinson, and T. J. Ley. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 104:2840-2848.
118. Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, and T. J. Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635-646.
119. Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, and R. J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783-1786.
120. Ren, X., F. Ye, Z. Jiang, Y. Chu, S. Xiong, and Y. Wang. 2007. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ* 14:2076-2084.

121. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296.
122. de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34:2480-2488.
123. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6:1142-1151.
124. Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8:1353-1362.
125. Oberle, N., N. Eberhardt, C. S. Falk, P. H. Krammer, and E. Suri-Payer. 2007. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25+ T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* 179:3578-3587.
126. Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204:1303-1310.
127. Bopp, T., N. Dehzad, S. Reuter, M. Klein, N. Ullrich, M. Stassen, H. Schild, R. Buhl, E. Schmitt, and C. Taube. 2009. Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression. *J Immunol* 182:4017-4024.
128. Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom, and S. C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265.
129. Kobie, J. J., P. R. Shah, L. Yang, J. A. Rebhahn, D. J. Fowell, and T. R. Mosmann. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 177:6780-6786.
130. Sitkovsky, M., and D. Lukashev. 2005. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol* 5:712-721.
131. Sitkovsky, M. V., and A. Ohta. 2005. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol* 26:299-304.
132. Sitkovsky, M. V. 2009. T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response. *Trends Immunol* 30:102-108.
133. Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:1206-1212.
134. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4:762-774.
135. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars. 2000. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 30:1538-1543.
136. Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, G. Zhu, P. Mottram, H. Xu, L. Chen, and W. Zou. 2006. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* 177:40-44.
137. Lewkowich, I. P., N. S. Herman, K. W. Schleifer, M. P. Dance, B. L. Chen, K. M. Dienger, A. A. Sproles, J. S. Shah, J. Kohl, Y. Belkaid, and M. Wills-Karp. 2005. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med* 202:1549-1561.

138. Huang, C. T., C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H. I. Levitsky, J. D. Powell, D. M. Pardoll, C. G. Drake, and D. A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21:503-513.
139. Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali, and R. Clynes. 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 180:5916-5926.
140. Workman, C. J., and D. A. Vignali. 2005. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol* 174:688-695.
141. Workman, C. J., Y. Wang, K. C. El Kasmi, D. M. Pardoll, P. J. Murray, C. G. Drake, and D. A. Vignali. 2009. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol* 182:1885-1891.
142. Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322:271-275.
143. Qureshi, O. S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E. M. Schmidt, J. Baker, L. E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T. Z. Hou, C. E. Futter, G. Anderson, L. S. Walker, and D. M. Sansom. Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell Extrinsic Function of CTLA-4. *Science*.
144. Qureshi, O. S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E. M. Schmidt, J. Baker, L. E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T. Z. Hou, C. E. Futter, G. Anderson, L. S. Walker, and D. M. Sansom. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332:600-603.
145. Baecher-Allan, C., E. Wolf, and D. A. Hafler. 2006. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol* 176:4622-4631.
146. Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr, and A. G. Betz. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28:402-413.
147. Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille, and M. L. Dustin. 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 203:505-511.
148. Tang, Q., and M. F. Krummel. 2006. Imaging the function of regulatory T cells in vivo. *Curr Opin Immunol* 18:496-502.
149. Bagley, K. C., S. F. Abdelwahab, R. G. Tuskan, and G. K. Lewis. 2004. Calcium signaling through phospholipase C activates dendritic cells to mature and is necessary for the activation and maturation of dendritic cells induced by diverse agonists. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:77-82.
150. Goodridge, H. S., R. M. Simmons, and D. M. Underhill. 2007. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 178:3107-3115.
151. Granucci, F., and I. Zanoni. 2009. The dendritic cell life cycle. *Cell Cycle* 8:3816-3821.
152. Koski, G. K., G. N. Schwartz, D. E. Weng, R. E. Gress, F. H. Engels, M. Tsokos, B. J. Czerniecki, and P. A. Cohen. 1999. Calcium ionophore-treated myeloid cells acquire many dendritic cell characteristics independent of prior differentiation state, transformation status, or sensitivity to biologic agents. *Blood* 94:1359-1371.
153. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14.
154. Xu, S., J. Huo, K. G. Lee, T. Kurosaki, and K. P. Lam. 2009. Phospholipase Cgamma2 is critical for Dectin-1-mediated Ca²⁺ flux and cytokine production in dendritic cells. *J Biol Chem* 284:7038-7046.

155. Zanoni, I., R. Ostuni, G. Capuano, M. Collini, M. Caccia, A. E. Ronchi, M. Rocchetti, F. Mingozzi, M. Foti, G. Chirico, B. Costa, A. Zaza, P. Ricciardi-Castagnoli, and F. Granucci. 2009. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* 460:264-268.
156. Vukcevic, M., F. Zorzato, G. Spagnoli, and S. Treves. Frequent calcium oscillations lead to NFAT activation in human immature dendritic cells. *J Biol Chem* 285:16003-16011.
157. Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-747.
158. Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, S. Chuvpilo, E. Jankevics, S. Klein-Hessling, T. Twardzik, and A. Avots. 2000. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1498:1-18.
159. Shaw, J. P., P. J. Utz, D. B. Durand, J. J. Toole, E. A. Emmel, and G. R. Crabtree. 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241:202-205.
160. Hogan, P. G., L. Chen, J. Nardone, and A. Rao. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17:2205-2232.
161. Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, A. Avots, S. Chuvpilo, S. Klein-Hessling, M. K. Jha, E. Kondo, P. Pagel, J. Schulze-Luehrmann, and A. Palmetshofer. 2004. NFAT and NF-kappaB factors-the distant relatives. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1166-1170.
162. Crabtree, G. R., and E. N. Olson. 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl:S67-79.
163. Crabtree, G. R., and S. L. Schreiber. 2009. SnapShot: Ca²⁺-calcineurin-NFAT signaling. *Cell* 138:210, 210 e211.
164. Dave, V., T. Childs, Y. Xu, M. Ikegami, V. Besnard, Y. Maeda, S. E. Wert, J. R. Neilson, G. R. Crabtree, and J. A. Whitsett. 2006. Calcineurin/Nfat signaling is required for perinatal lung maturation and function. *J Clin Invest* 116:2597-2609.
165. Heit, J. J., A. A. Apelqvist, X. Gu, M. M. Winslow, J. R. Neilson, G. R. Crabtree, and S. K. Kim. 2006. Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* 443:345-349.
166. Kao, S. C., H. Wu, J. Xie, C. P. Chang, J. A. Ranish, I. A. Graef, and G. R. Crabtree. 2009. Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science* 323:651-654.
167. Winslow, M. M., M. Pan, M. Starbuck, E. M. Gallo, L. Deng, G. Karsenty, and G. R. Crabtree. 2006. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell* 10:771-782.
168. Wu, H., A. Peisley, I. A. Graef, and G. R. Crabtree. 2007. NFAT signaling and the invention of vertebrates. *Trends Cell Biol* 17:251-260.
169. Rao, A. 2009. Signaling to gene expression: calcium, calcineurin and NFAT. *Nat Immunol* 10:3-5.
170. Chen, L., J. N. Glover, P. G. Hogan, A. Rao, and S. C. Harrison. 1998. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 392:42-48.
171. Wolfe, S. A., P. Zhou, V. Dotsch, L. Chen, A. You, S. N. Ho, G. R. Crabtree, G. Wagner, and G. L. Verdine. 1997. Unusual Rel-like architecture in the DNA-binding domain of the transcription factor NFATc. *Nature* 385:172-176.
172. Graef, I. A., J. M. Gastier, U. Francke, and G. R. Crabtree. 2001. Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5740-5745.
173. Macian, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5:472-484.

174. Chuvpilo, S., E. Jankevics, D. Tyrstin, A. Akimzhanov, D. Moroz, M. K. Jha, J. Schulze-Luehrmann, B. Santner-Nanan, E. Feoktistova, T. Konig, A. Avots, E. Schmitt, F. Berberich-Siebelt, A. Schimpl, and E. Serfling. 2002. Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* 16:881-895.
175. Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, L. Jin, A. S. Rakeman, M. Michino, and A. Rao. 2001. Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 15:47-58.
176. Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, and A. Avots. 2007. NFAT in lymphocytes: a factor for all events? *Sci STKE* 2007:pe42.
177. Chuvpilo, S., A. Avots, F. Berberich-Siebelt, J. Glockner, C. Fischer, A. Kerstan, C. Escher, I. Inashkina, F. Hlubek, E. Jankevics, T. Brabletz, and E. Serfling. 1999. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* 162:7294-7301.
178. Chuvpilo, S., M. Zimmer, A. Kerstan, J. Glockner, A. Avots, C. Escher, C. Fischer, I. Inashkina, E. Jankevics, F. Berberich-Siebelt, E. Schmitt, and E. Serfling. 1999. Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* 10:261-269.
179. Nayak, A., J. Glockner-Pagel, M. Vaeth, J. E. Schumann, M. Buttmann, T. Bopp, E. Schmitt, E. Serfling, and F. Berberich-Siebelt. 2009. Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *J Biol Chem* 284:10935-10946.
180. Bhattacharyya, S., J. Deb, A. K. Patra, D. A. Thuy Pham, W. Chen, M. Vaeth, F. Berberich-Siebelt, S. Klein-Hessling, E. D. Lamperti, K. Reifenberg, J. Jellusova, A. Schweizer, L. Nitschke, E. Leich, A. Rosenwald, C. Brunner, S. Engelmann, U. Bommhardt, A. Avots, M. R. Muller, E. Kondo, and E. Serfling. NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin-NFAT signaling network. *J Exp Med* 208:823-839.
181. Serfling, E., S. Chuvpilo, J. Liu, T. Hofer, and A. Palmetshofer. 2006. NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends Immunol* 27:461-469.
182. Hogan, P. G., R. S. Lewis, and A. Rao. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28:491-533.
183. Gwack, Y., S. Feske, S. Srikanth, P. G. Hogan, and A. Rao. 2007. Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 42:145-156.
184. Klein, M., S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, C. Tertilt, T. Bopp, V. Heib, M. Becker, C. Taube, H. Schild, E. Schmitt, and M. Stassen. 2006. Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *J Immunol* 177:6667-6674.
185. Baine, I., B. T. Abe, and F. Macian. 2009. Regulation of T-cell tolerance by calcium/NFAT signaling. *Immunol Rev* 231:225-240.
186. Penna, A., A. Demuro, A. V. Yeromin, S. L. Zhang, O. Safrina, I. Parker, and M. D. Cahalan. 2008. The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* 456:116-120.
187. Bueno, O. F., E. B. Brandt, M. E. Rothenberg, and J. D. Molkentin. 2002. Defective T cell development and function in calcineurin A beta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9398-9403.
188. Zhuo, M., W. Zhang, H. Son, I. Mansuy, R. A. Sobel, J. Seidman, and E. R. Kandel. 1999. A selective role of calcineurin alpha in synaptic depotentiation in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4650-4655.

189. Chan, V. S., C. Wong, and P. S. Ohashi. 2002. Calcineurin Aalpha plays an exclusive role in TCR signaling in mature but not in immature T cells. *Eur J Immunol* 32:1223-1229.
190. Li, H., A. Rao, and P. G. Hogan. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* 21:91-103.
191. Shibasaki, F., U. Hallin, and H. Uchino. 2002. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem* 131:1-15.
192. Sieber, M., and R. Baumgrass. 2009. Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506? *Cell Commun Signal* 7:25.
193. Yu, H., T. J. van Berkel, and E. A. Biessen. 2007. Therapeutic potential of VIVIT, a selective peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells, in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Drug Rev* 25:175-187.
194. Li, H., A. Rao, and P. G. Hogan. 2004. Structural delineation of the calcineurin-NFAT interaction and its parallels to PP1 targeting interactions. *J Mol Biol* 342:1659-1674.
195. Beals, C. R., C. M. Sheridan, C. W. Turck, P. Gardner, and G. R. Crabtree. 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275:1930-1934.
196. Okamura, H., C. Garcia-Rodriguez, H. Martinson, J. Qin, D. M. Virshup, and A. Rao. 2004. A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol* 24:4184-4195.
197. Arron, J. R., M. M. Winslow, A. Polleri, C. P. Chang, H. Wu, X. Gao, J. R. Neilson, L. Chen, J. J. Heit, S. K. Kim, N. Yamasaki, T. Miyakawa, U. Francke, I. A. Graef, and G. R. Crabtree. 2006. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441:595-600.
198. Gwack, Y., S. Sharma, J. Nardone, B. Tanasa, A. Iuga, S. Srikanth, H. Okamura, D. Bolton, S. Feske, P. G. Hogan, and A. Rao. 2006. A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441:646-650.
199. Sherman, M. A., D. R. Powell, D. L. Weiss, and M. A. Brown. 1999. NF-ATc isoforms are differentially expressed and regulated in murine T and mast cells. *J Immunol* 162:2820-2828.
200. Avots, A., M. Buttman, S. Chuvpilo, C. Escher, U. Smola, A. J. Bannister, U. R. Rapp, T. Kouzarides, and E. Serfling. 1999. CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* 10:515-524.
201. Vaeth, M., T. Gogishvili, T. Bopp, M. Klein, F. Berberich-Siebelt, S. Gattenloehner, A. Avots, T. Sparwasser, N. Grebe, E. Schmitt, T. Hunig, E. Serfling, and J. Bodo. Regulatory T cells facilitate the nuclear accumulation of inducible cAMP early repressor (ICER) and suppress nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:2480-2485.
202. Sharma, S., G. M. Findlay, H. S. Bandukwala, S. Oberdoerffer, B. Baust, Z. Li, V. Schmidt, P. G. Hogan, D. B. Sacks, and A. Rao. Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:11381-11386.
203. Soto-Nieves, N., I. Puga, B. T. Abe, S. Bandyopadhyay, I. Baine, A. Rao, and F. Macian. 2009. Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance. *J Exp Med* 206:867-876.
204. Jin, L., P. Sliz, L. Chen, F. Macian, A. Rao, P. G. Hogan, and S. C. Harrison. 2003. An asymmetric NFAT1 dimer on a pseudo-palindromic kappa B-like DNA site. *Nat Struct Biol* 10:807-811.
205. Asagiri, M., K. Sato, T. Usami, S. Ochi, H. Nishina, H. Yoshida, I. Morita, E. F. Wagner, T. W. Mak, E. Serfling, and H. Takayanagi. 2005. Autoamplification of

- NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* 202:1261-1269.
206. Torgerson, T. R., A. Genin, C. Chen, M. Zhang, B. Zhou, S. Anover-Sombke, M. B. Frank, I. Dozmorov, E. Ocheltree, P. Kulmala, M. Centola, H. D. Ochs, A. D. Wells, and R. Q. Cron. 2009. FOXP3 inhibits activation-induced NFAT2 expression in T cells thereby limiting effector cytokine expression. *J Immunol* 183:907-915.
207. Lehmann, O. J., J. C. Sowden, P. Carlsson, T. Jordan, and S. S. Bhattacharya. 2003. Fox's in development and disease. *Trends Genet* 19:339-344.
208. Weigel, D., and H. Jackle. 1990. The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell* 63:455-456.
209. Weigel, D., G. Jurgens, F. Kuttner, E. Seifert, and H. Jackle. 1989. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* 57:645-658.
210. Kaestner, K. H., W. Knochel, and D. E. Martinez. 2000. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14:142-146.
211. Stroud, J. C., Y. Wu, D. L. Bates, A. Han, K. Nowick, S. Paabo, H. Tong, and L. Chen. 2006. Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure* 14:159-166.
212. Liu, P. P., Y. C. Chen, C. Li, Y. H. Hsieh, S. W. Chen, S. H. Chen, W. Y. Jeng, and W. J. Chuang. 2002. Solution structure of the DNA-binding domain of interleukin enhancer binding factor 1 (FOXP1a). *Proteins* 49:543-553.
213. Li, B., and M. I. Greene. 2007. FOXP3 actively represses transcription by recruiting the HAT/HDAC complex. *Cell Cycle* 6:1432-1436.
214. Xiao, Y., B. Li, Z. Zhou, W. W. Hancock, H. Zhang, and M. I. Greene. Histone acetyltransferase mediated regulation of FOXP3 acetylation and Treg function. *Curr Opin Immunol* 22:583-591.
215. Mailer, R. K., K. Falk, and O. Rotzschke. 2009. Absence of leucine zipper in the natural FOXP3Delta2Delta7 isoform does not affect dimerization but abrogates suppressive capacity. *PLoS One* 4:e6104.
216. Banerjee-Basu, S., and A. D. Baxevanis. 2004. Structural analysis of disease-causing mutations in the P-subfamily of forkhead transcription factors. *Proteins* 54:639-647.
217. Mantel, P. Y., N. Ouaked, B. Ruckert, C. Karagiannidis, R. Welz, K. Blaser, and C. B. Schmidt-Weber. 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176:3593-3602.
218. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A. D. Lapan, J. C. Stroud, D. L. Bates, L. Guo, A. Han, S. F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
219. Bandukwala, H. S., Y. Wu, M. Feuerer, Y. Chen, B. Barboza, S. Ghosh, J. C. Stroud, C. Benoist, D. Mathis, A. Rao, and L. Chen. Structure of a Domain-Swapped FOXP3 Dimer on DNA and Its Function in Regulatory T Cells. *Immunity* 34:479-491.
220. Ochs, H. D., E. Gambineri, and T. R. Torgerson. 2007. IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity. *Immunol Res* 38:112-121.
221. Ochs, H. D., and T. R. Torgerson. 2007. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked inheritance: model for autoaggression. *Adv Exp Med Biol* 601:27-36.
222. Zheng, Y., S. Z. Josefowicz, A. Kas, T. T. Chu, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445:936-940.
223. Zheng, Y., and A. Y. Rudensky. 2007. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 8:457-462.

224. Marson, A., K. Kretschmer, G. M. Frampton, E. S. Jacobsen, J. K. Polansky, K. D. MacIsaac, S. S. Levine, E. Fraenkel, H. von Boehmer, and R. A. Young. 2007. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445:931-935.
225. Li, B., A. Samanta, X. Song, K. T. Iacono, K. Bembas, R. Tao, S. Basu, J. L. Riley, W. W. Hancock, Y. Shen, S. J. Saouaf, and M. I. Greene. 2007. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4571-4576.
226. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5138-5143.
227. Loizou, L., K. G. Andersen, and A. G. Betz. Foxp3 Interacts with c-Rel to Mediate NF-kappaB Repression. *PLoS One* 6:e18670.
228. Ono, M., H. Yaguchi, N. Ohkura, I. Kitabayashi, Y. Nagamura, T. Nomura, Y. Miyachi, T. Tsukada, and S. Sakaguchi. 2007. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446:685-689.
229. Huehn, J., J. K. Polansky, and A. Hamann. 2009. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* 9:83-89.
230. Tone, M., and M. I. Greene. Cooperative regulatory events and Foxp3 expression. *Nat Immunol* 12:14-16.
231. Rudensky, A. Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 241:260-268.
232. Zheng, Y., S. Josefowicz, A. Chaudhry, X. P. Peng, K. Forbush, and A. Y. Rudensky. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463:808-812.
233. Visekruna, A., M. Huber, A. Hellhund, E. Bothur, K. Reinhard, N. Bollig, N. Schmidt, T. Joeris, M. Lohoff, and U. Steinhoff. c-Rel is crucial for the induction of Foxp3(+) regulatory CD4(+) T cells but not T(H)17 cells. *Eur J Immunol* 40:671-676.
234. Hsieh, C. S. 2009. Kickstarting Foxp3 with c-Rel. *Immunity* 31:852-853.
235. Kim, H. P., and W. J. Leonard. 2007. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med* 204:1543-1551.
236. Polansky, J. K., K. Kretschmer, J. Freyer, S. Floess, A. Garbe, U. Baron, S. Olek, A. Hamann, H. von Boehmer, and J. Huehn. 2008. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 38:1654-1663.
237. Baron, U., S. Floess, G. Wieczorek, K. Baumann, A. Grutzkau, J. Dong, A. Thiel, T. J. Boeld, P. Hoffmann, M. Edinger, I. Turbachova, A. Hamann, S. Olek, and J. Huehn. 2007. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 37:2378-2389.
238. Mayack, S. R., and L. J. Berg. 2006. Cutting edge: an alternative pathway of CD4+ T cell differentiation is induced following activation in the absence of gamma-chain-dependent cytokine signals. *J Immunol* 176:2059-2063.
239. Yao, Z., Y. Kanno, M. Kerényi, G. Stephens, L. Durant, W. T. Watford, A. Laurence, G. W. Robinson, E. M. Shevach, R. Moriggl, L. Hennighausen, C. Wu, and J. J. O'Shea. 2007. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 109:4368-4375.
240. Xu, L., A. Kitani, C. Stuelten, G. McGrady, I. Fuss, and W. Strober. Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I. *Immunity* 33:313-325.
241. Martinez, G. J., Z. Zhang, Y. Chung, J. M. Reynolds, X. Lin, A. M. Jetten, X. H. Feng, and C. Dong. 2009. Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. *J Biol Chem* 284:35283-35286.

242. Long, M., S. G. Park, I. Strickland, M. S. Hayden, and S. Ghosh. 2009. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 31:921-931.
243. Venuprasad, K., H. Huang, Y. Harada, C. Elly, M. Subramaniam, T. Spelsberg, J. Su, and Y. C. Liu. 2008. The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nat Immunol* 9:245-253.
244. Maruyama, T., J. Li, J. P. Vaque, J. E. Konkel, W. Wang, B. Zhang, P. Zhang, B. F. Zamarron, D. Yu, Y. Wu, Y. Zhuang, J. S. Gutkind, and W. Chen. Control of the differentiation of regulatory T cells and T(H)17 cells by the DNA-binding inhibitor Id3. *Nat Immunol* 12:86-95.
245. Klunker, S., M. M. Chong, P. Y. Mantel, O. Palomares, C. Bassin, M. Ziegler, B. Ruckert, F. Meiler, M. Akdis, D. R. Littman, and C. A. Akdis. 2009. Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3+ inducible regulatory T cells. *J Exp Med* 206:2701-2715.
246. Mantel, P. Y., H. Kuipers, O. Boyman, C. Rhyner, N. Ouaked, B. Ruckert, C. Karagiannidis, B. N. Lambrecht, R. W. Hendriks, R. Cramer, C. A. Akdis, K. Blaser, and C. B. Schmidt-Weber. 2007. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e329.
247. Shen, Z., L. Chen, F. Hao, and J. Wu. 2009. Transcriptional regulation of Foxp3 gene: multiple signal pathways on the road. *Med Res Rev* 29:742-766.
248. Hai, T. W., F. Liu, E. A. Allegretto, M. Karin, and M. R. Green. 1988. A family of immunologically related transcription factors that includes multiple forms of ATF and AP-1. *Genes Dev* 2:1216-1226.
249. Hoeffler, J. P., T. E. Meyer, Y. Yun, J. L. Jameson, and J. F. Habener. 1988. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242:1430-1433.
250. Foulkes, N. S., B. M. Laoide, F. Schlotter, and P. Sassone-Corsi. 1991. Transcriptional antagonist cAMP-responsive element modulator (CREM) down-regulates c-fos cAMP-induced expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5448-5452.
251. Molina, C. A., N. S. Foulkes, E. Lalli, and P. Sassone-Corsi. 1993. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75:875-886.
252. Stehle, J. H., N. S. Foulkes, C. A. Molina, V. Simonneaux, P. Pevet, and P. Sassone-Corsi. 1993. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 365:314-320.
253. Foulkes, N. S., E. Borrelli, and P. Sassone-Corsi. 1991. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64:739-749.
254. Laoide, B. M., N. S. Foulkes, F. Schlotter, and P. Sassone-Corsi. 1993. The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *Embo J* 12:1179-1191.
255. Lamas, M., C. Molina, N. S. Foulkes, E. Jansen, and P. Sassone-Corsi. 1997. Ectopic ICER expression in pituitary corticotroph AtT20 cells: effects on morphology, cell cycle, and hormonal production. *Mol Endocrinol* 11:1425-1434.
256. Bodor, J., Z. Fehervari, B. Diamond, and S. Sakaguchi. 2007. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur J Immunol* 37:884-895.
257. Bodor, J., and J. F. Habener. 1998. Role of transcriptional repressor ICER in cyclic AMP-mediated attenuation of cytokine gene expression in human thymocytes. *J Biol Chem* 273:9544-9551.

258. Borsook, D., O. Smirnova, O. Behar, S. Lewis, and L. A. Kobierski. 1999. PhosphoCREB and CREM/ICER: positive and negative regulation of proenkephalin gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Mol Neurosci* 12:35-51.
259. Mayr, B. M., G. Canettieri, and M. R. Montminy. 2001. Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10936-10941.
260. Gonzalez, G. A., and M. R. Montminy. 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59:675-680.
261. Montminy, M. R., G. A. Gonzalez, and K. K. Yamamoto. 1990. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* 13:184-188.
262. Fassbender, M., B. Gerlitzki, N. Ullrich, C. Lupp, M. Klein, M. P. Radsak, E. Schmitt, T. Bopp, and H. Schild. Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol* 265:91-96.
263. Mao, D., E. A. Warner, S. A. Gurwitch, and D. R. Dowd. 1998. Differential regulation and transcriptional control of immediate early gene expression in forskolin-treated WEHI7.2 thymoma cells. *Mol Endocrinol* 12:492-503.
264. Monaco, L., M. Lamas, K. Tamai, E. Lalli, E. Zazopoulos, L. Penna, F. Nantel, N. S. Foulkes, C. Mazzucchelli, and P. Sassone-Corsi. 1997. Coupling transcription to signaling pathways: cAMP and nuclear factor cAMP-responsive element modulator. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31:63-74.
265. Xing, J., D. D. Ginty, and M. E. Greenberg. 1996. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273:959-963.
266. Thommesen, L., K. Norsett, A. K. Sandvik, E. Hofslis, and A. Laegreid. 2000. Regulation of inducible cAMP early repressor expression by gastrin and cholecystokinin in the pancreatic cell line AR42J. *J Biol Chem* 275:4244-4250.
267. Mead, J. R., T. R. Hughes, S. A. Irvine, N. N. Singh, and D. P. Ramji. 2003. Interferon-gamma stimulates the expression of the inducible cAMP early repressor in macrophages through the activation of casein kinase 2. A potentially novel pathway for interferon-gamma-mediated inhibition of gene transcription. *J Biol Chem* 278:17741-17751.
268. Krueger, D. A., E. A. Warner, and D. R. Dowd. 2000. Involvement of thyrotroph embryonic factor in calcium-mediated regulation of gene expression. *J Biol Chem* 275:14524-14531.
269. Folco, E. J., and G. Koren. 1997. Degradation of the inducible cAMP early repressor (ICER) by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem J* 328 (Pt 1):37-43.
270. Yehia, G., F. Schlotter, R. Razavi, A. Alessandrini, and C. A. Molina. 2001. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and targets inducible cAMP early repressor to ubiquitin-mediated destruction. *J Biol Chem* 276:35272-35279.
271. Kwok, R. P., J. R. Lundblad, J. C. Chrivia, J. P. Richards, H. P. Bachinger, R. G. Brennan, S. G. Roberts, M. R. Green, and R. H. Goodman. 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370:223-226.
272. Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard, and Y. Nakatani. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87:953-959.
273. Bodor, J., A. L. Spetz, J. L. Strominger, and J. F. Habener. 1996. cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3536-3541.

274. Barabitskaja, O., J. S. Foulke, Jr., S. Pati, J. Bodor, and M. S. Reitz, Jr. 2006. Suppression of MIP-1beta transcription in human T cells is regulated by inducible cAMP early repressor (ICER). *J Leukoc Biol* 79:378-387.
275. Bodor, J., J. Bodorova, C. Bare, D. L. Hodge, H. A. Young, and R. E. Gress. 2002. Differential inducibility of the transcriptional repressor ICER and its role in modulation of Fas ligand expression in T and NK lymphocytes. *Eur J Immunol* 32:203-212.
276. Kyttaris, V. C., Y. T. Juang, K. Tenbrock, A. Weinstein, and G. C. Tsokos. 2004. Cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator is responsible for the decreased expression of c-fos and activator protein-1 binding in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 173:3557-3563.
277. Garcia-Rodriguez, C., and A. Rao. 1998. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J Exp Med* 187:2031-2036.
278. Gerritsen, M. E., A. J. Williams, A. S. Neish, S. Moore, Y. Shi, and T. Collins. 1997. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2927-2932.
279. Bodor, J., L. Feigenbaum, J. Bodorova, C. Bare, M. S. Reitz, Jr., and R. E. Gress. 2001. Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *J Leukoc Biol* 69:1053-1059.
280. Fassi Fehri, L., M. Koch, E. Belogolova, H. Khalil, C. Bolz, B. Kalali, H. J. Mollenkopf, M. Beigier-Bompadre, A. Karlas, T. Schneider, Y. Churin, M. Gerhard, and T. F. Meyer. Helicobacter pylori induces miR-155 in T cells in a cAMP-Foxp3-dependent manner. *PLoS One* 5:e9500.
281. Huang, B., J. Zhao, Z. Lei, S. Shen, D. Li, G. X. Shen, G. M. Zhang, and Z. H. Feng. 2009. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep* 10:180-185.
282. Jain, N., H. Nguyen, R. H. Friedline, N. Malhotra, M. Brehm, M. Koyanagi, M. Bix, J. A. Cooper, C. A. Chambers, and J. Kang. 2009. Cutting edge: Dab2 is a FOXP3 target gene required for regulatory T cell function. *J Immunol* 183:4192-4196.
283. Bodor, J., Z. Fehervari, B. Diamond, and S. Sakaguchi. 2007. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol* 81:161-167.
284. Ngan, P., S. Saito, M. Saito, R. Lanese, J. Shanfeld, and Z. Davidovitch. 1990. The interactive effects of mechanical stress and interleukin-1 beta on prostaglandin E and cyclic AMP production in human periodontal ligament fibroblasts in vitro: comparison with cloned osteoblastic cells of mouse (MC3T3-E1). *Arch Oral Biol* 35:717-725.
285. del Pozo, M. A., P. Sanchez-Mateos, M. Nieto, and F. Sanchez-Madrid. 1995. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 131:495-508.
286. Thelen, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2:129-134.
287. Lutz, M. B., N. A. Kukutsch, M. Menges, S. Rossner, and G. Schuler. 2000. Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy in vitro. *Eur J Immunol* 30:1048-1052.
288. Dorn, P., L. DaSilva, L. Martarano, and D. Derse. 1990. Equine infectious anemia virus tat: insights into the structure, function, and evolution of lentivirus trans-activator proteins. *J Virol* 64:1616-1624.
289. Karasuyama, H., and F. Melchers. 1988. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* 18:97-104.

290. Sussman, D. J., and G. Milman. 1984. Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA. *Mol Cell Biol* 4:1641-1643.
291. Gould, S. J., and S. Subramani. 1988. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem* 175:5-13.
292. Peitz, M., K. Pfannkuche, K. Rajewsky, and F. Edenhofer. 2002. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4489-4494.
293. Peitz, M., R. Jager, C. Patsch, A. Jager, A. Egert, H. Schorle, and F. Edenhofer. 2007. Enhanced purification of cell-permeant Cre and germline transmission after transduction into mouse embryonic stem cells. *Genesis* 45:508-517.
294. Tacke, M., G. Hanke, T. Hanke, and T. Hunig. 1997. CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol* 27:239-247.
295. Jang, E., W. S. Cho, M. L. Cho, H. J. Park, H. J. Oh, S. M. Kang, D. J. Paik, and J. Youn. Foxp3+ regulatory T cells control humoral autoimmunity by suppressing the development of long-lived plasma cells. *J Immunol* 186:1546-1553.
296. Adriani, M., K. A. Jones, T. Uchiyama, M. R. Kirby, C. Silvin, S. M. Anderson, and F. Candotti. Defective inhibition of B-cell proliferation by Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient regulatory T-cells. *Blood*.
297. Ranger, A. M., M. Oukka, J. Rengarajan, and L. H. Glimcher. 1998. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 9:627-635.
298. Lee, P. P., D. R. Fitzpatrick, C. Beard, H. K. Jessup, S. Lehar, K. W. Makar, M. Perez-Melgosa, M. T. Sweetser, M. S. Schlissel, S. Nguyen, S. R. Cherry, J. H. Tsai, S. M. Tucker, W. M. Weaver, A. Kelso, R. Jaenisch, and C. B. Wilson. 2001. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15:763-774.
299. Gogishvili, T., D. Langenhorst, F. Luhder, F. Elias, K. Elflein, K. M. Dennehy, R. Gold, and T. Hunig. 2009. Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28 superagonist treated mice. *PLoS One* 4:e4643.
300. Beyersdorf, N., X. Ding, T. Hunig, and T. Kerkau. 2009. Superagonistic CD28 stimulation of allogeneic T cells protects from acute graft-versus-host disease. *Blood* 114:4575-4582.
301. Verhagen, J., and D. C. Wraith. Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells". *J Immunol* 185:7129; author reply 7130.
302. Fujimoto, M., M. Nakano, F. Terabe, H. Kawahata, T. Ohkawara, Y. Han, B. Ripley, S. Serada, T. Nishikawa, A. Kimura, S. Nomura, T. Kishimoto, and T. Naka. The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 186:32-40.
303. Lahl, K., C. T. Mayer, T. Bopp, J. Huehn, C. Loddenkemper, G. Eberl, G. Wirnsberger, K. Dornmair, R. Geffers, E. Schmitt, J. Buer, and T. Sparwasser. 2009. Nonfunctional regulatory T cells and defective control of Th2 cytokine production in natural scurfy mutant mice. *J Immunol* 183:5662-5672.
304. Tasken, K. 2009. Waking up regulatory T cells. *Blood* 114:1136-1137.
305. Becker, C., C. Taube, T. Bopp, C. Becker, K. Michel, J. Kubach, S. Reuter, N. Dehzad, M. F. Neurath, K. Reifemberg, F. J. Schneider, E. Schmitt, and H. Jonuleit. 2009. Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood* 114:1263-1269.

306. Becker, C., J. Kubach, J. Wijdenes, J. Knop, and H. Jonuleit. 2007. CD4-mediated functional activation of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 37:1217-1223.
307. Kuczma, M., J. R. Lee, and P. Kraj. Connexin 43 Signaling Enhances the Generation of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J Immunol*.
308. Werthmann, R. C., K. von Hayn, V. O. Nikolaev, M. J. Lohse, and M. Bunemann. 2009. Real-time monitoring of cAMP levels in living endothelial cells: thrombin transiently inhibits adenylyl cyclase 6. *J Physiol* 587:4091-4104.
309. Nikolaev, V. O., A. Moshkov, A. R. Lyon, M. Miragoli, P. Novak, H. Paur, M. J. Lohse, Y. E. Korchev, S. E. Harding, and J. Gorelik. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* 327:1653-1657.
310. Borner, S., F. Schwede, A. Schlipp, F. Berisha, D. Calebiro, M. J. Lohse, and V. O. Nikolaev. FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells. *Nat Protoc* 6:427-438.
311. Chung, Y., S. Tanaka, F. Chu, R. I. Nurieva, G. J. Martinez, S. Rawal, Y. H. Wang, H. Lim, J. M. Reynolds, X. H. Zhou, H. M. Fan, Z. M. Liu, S. S. Neelapu, and C. Dong. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*.
312. Linterman, M. A., W. Pierson, S. K. Lee, A. Kallies, S. Kawamoto, T. F. Rayner, M. Srivastava, D. P. Divekar, L. Beaton, J. J. Hogan, S. Fagarasan, A. Liston, K. G. Smith, and C. G. Vinuesa. Foxp3(+) follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med*.
313. Hermann-Kleiter, N., and G. Baier. NFAT pulls the strings during CD4⁺ T helper cell effector functions. *Blood* 115:2989-2997.
314. Karim, M., C. I. Kingsley, A. R. Bushell, B. S. Sawitzki, and K. J. Wood. 2004. Alloantigen-induced CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells can develop in vivo from CD25⁺CD4⁺ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol* 172:923-928.
315. Xu, J., Y. Yang, G. Qiu, G. Lal, N. Yin, Z. Wu, J. S. Bromberg, and Y. Ding. Stat4 Is Critical for the Balance between Th17 Cells and Regulatory T Cells in Colitis. *J Immunol* 186:6597-6606.
316. Huber, S., N. Gagliani, E. Esplugues, W. O'Connor, Jr., F. J. Huber, A. Chaudhry, M. Kamanaka, Y. Kobayashi, C. J. Booth, A. Y. Rudensky, M. G. Roncarolo, M. Battaglia, and R. A. Flavell. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3 and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* 34:554-565.
317. Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H. D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e38.
318. Li, J., K. Semple, W. K. Suh, C. Liu, F. Chen, B. R. Blazar, and X. Z. Yu. Roles of CD28, CTLA4, and inducible costimulator in acute graft-versus-host disease in mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 17:962-969.
319. Semple, K., A. Nguyen, Y. Yu, H. Wang, C. Anasetti, and X. Z. Yu. Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. *Blood* 117:3096-3103.
320. Adachi, S., Y. Amasaki, S. Miyatake, N. Arai, and M. Iwata. 2000. Successive expression and activation of NFAT family members during thymocyte differentiation. *J Biol Chem* 275:14708-14716.
321. Amasaki, Y., S. Adachi, Y. Ishida, M. Iwata, N. Arai, K. Arai, and S. Miyatake. 2002. A constitutively nuclear form of NFATx shows efficient transactivation activity and induces differentiation of CD4⁽⁺⁾CD8⁽⁺⁾ T cells. *J Biol Chem* 277:25640-25648.

322. Amasaki, Y., S. Miyatake, N. Arai, and K. Arai. 2000. Regulation of nuclear factor of activated T-cell family transcription factors during T-cell development in the thymus. *J Allergy Clin Immunol* 106:S1-9.
323. Ghosh, S., S. B. Koralov, I. Stevanovic, M. S. Sundrud, Y. Sasaki, K. Rajewsky, A. Rao, and M. R. Muller. Hyperactivation of nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1) in T cells attenuates severity of murine autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15169-15174.
324. Frischbutter, S., C. Gabriel, H. Bendfeldt, A. Radbruch, and R. Baumgrass. Dephosphorylation of Bcl-10 by calcineurin is essential for canonical NF-kappaB activation in Th cells. *Eur J Immunol*.
325. Thome, M., and R. Weil. 2007. Post-translational modifications regulate distinct functions of CARMA1 and BCL10. *Trends Immunol* 28:281-288.
326. Sumpter, T. L., K. K. Payne, and D. S. Wilkes. 2008. Regulation of the NFAT pathway discriminates CD4+CD25+ regulatory T cells from CD4+CD25- helper T cells. *J Leukoc Biol* 83:708-717.
327. Fisher, W. G., P. C. Yang, R. K. Medikonduri, and M. S. Jafri. 2006. NFAT and NFkappaB activation in T lymphocytes: a model of differential activation of gene expression. *Ann Biomed Eng* 34:1712-1728.
328. Li, Y., C. E. Sedwick, J. Hu, and A. Altman. 2005. Role for protein kinase Ctheta (PKCtheta) in TCR/CD28-mediated signaling through the canonical but not the non-canonical pathway for NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 280:1217-1223.
329. So, T., P. Soroosh, S. Y. Eun, A. Altman, and M. Croft. Antigen-independent signalosome of CARMA1, PKCtheta, and TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) determines NF-kappaB signaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:2903-2908.
330. Coudronniere, N., M. Villalba, N. Englund, and A. Altman. 2000. NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3394-3399.
331. Szymczak-Workman, A. L., C. J. Workman, and D. A. Vignali. 2009. Cutting edge: regulatory T cells do not require stimulation through their TCR to suppress. *J Immunol* 182:5188-5192.
332. Au-Yeung, B. B., S. E. Levin, C. Zhang, L. Y. Hsu, D. A. Cheng, N. Killeen, K. M. Shokat, and A. Weiss. A genetically selective inhibitor demonstrates a function for the kinase Zap70 in regulatory T cells independent of its catalytic activity. *Nat Immunol* 11:1085-1092.
333. Hsu, L. Y., Y. X. Tan, Z. Xiao, M. Malissen, and A. Weiss. 2009. A hypomorphic allele of ZAP-70 reveals a distinct thymic threshold for autoimmune disease versus autoimmune reactivity. *J Exp Med* 206:2527-2541.
334. Siggs, O. M., L. A. Miosge, A. L. Yates, E. M. Kucharska, D. Sheahan, T. Brdicka, A. Weiss, A. Liston, and C. C. Goodnow. 2007. Opposing functions of the T cell receptor kinase ZAP-70 in immunity and tolerance differentially titrate in response to nucleotide substitutions. *Immunity* 27:912-926.
335. Tsang, J. Y., N. O. Camara, E. Eren, H. Schneider, C. Rudd, G. Lombardi, and R. Lechler. 2006. Altered proximal T cell receptor (TCR) signaling in human CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 80:145-151.
336. Hickman, S. P., J. Yang, R. M. Thomas, A. D. Wells, and L. A. Turka. 2006. Defective activation of protein kinase C and Ras-ERK pathways limits IL-2 production and proliferation by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 177:2186-2194.
337. Brandt, C., V. Pavlovic, A. Radbruch, M. Worm, and R. Baumgrass. 2009. Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis. *Allergy* 64:1588-1596.

338. Baumgrass, R., C. Brandt, F. Wegner, M. Abdollahnia, and M. Worm. Low-dose, but not high-dose, cyclosporin A promotes regulatory T-cell induction, expansion, or both. *J Allergy Clin Immunol* 126:183-184; author reply 184.
339. Meloni, F., M. Morosini, N. Solari, F. Bini, P. Vitulo, E. Arbustini, C. Pellegrini, and A. M. Fietta. 2006. Peripheral CD4⁺ CD25⁺ Treg cell expansion in lung transplant recipients is not affected by calcineurin inhibitors. *Int Immunopharmacol* 6:2002-2010.
340. Beyer, M., Y. Thabet, R. U. Muller, T. Sadlon, S. Classen, K. Lahl, S. Basu, X. Zhou, S. L. Bailey-Bucktrout, W. Krebs, E. A. Schonfeld, J. Bottcher, T. Golovina, C. T. Mayer, A. Hofmann, D. Sommer, S. Debey-Pascher, E. Endl, A. Limmer, K. L. Hippen, B. R. Blazar, R. Balderas, T. Quast, A. Waha, G. Mayer, M. Famulok, P. A. Knolle, C. Wickenhauser, W. Kolanus, B. Schermer, J. A. Bluestone, S. C. Barry, T. Sparwasser, J. L. Riley, and J. L. Schultze. Repression of the genome organizer SATB1 in regulatory T cells is required for suppressive function and inhibition of effector differentiation. *Nat Immunol* 12:898-907.
341. Rubtsov, Y. P., R. E. Niec, S. Josefowicz, L. Li, J. Darce, D. Mathis, C. Benoist, and A. Y. Rudensky. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* 329:1667-1671.
342. Lu, L. F., and A. Rudensky. 2009. Molecular orchestration of differentiation and function of regulatory T cells. *Genes Dev* 23:1270-1282.
343. Koh, K. P., M. S. Sundrud, and A. Rao. 2009. Domain requirements and sequence specificity of DNA binding for the forkhead transcription factor FOXP3. *PLoS One* 4:e8109.
344. Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223:77-92.
345. Nikolic, T., M. F. de Bruijn, M. B. Lutz, and P. J. Leenen. 2003. Developmental stages of myeloid dendritic cells in mouse bone marrow. *Int Immunol* 15:515-524.
346. Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
347. Kopp, E. B., and S. Ghosh. 1995. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 58:1-27.
348. Buchholz, M., and V. Ellenrieder. 2007. An emerging role for Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. *Cell Cycle* 6:16-19.
349. Buchholz, M., A. Schatz, M. Wagner, P. Michl, T. Linhart, G. Adler, T. M. Gress, and V. Ellenrieder. 2006. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *Embo J* 25:3714-3724.
350. Koenig, A., T. Linhart, K. Schlengemann, K. Reutlinger, J. Wegele, G. Adler, G. Singh, L. Hofmann, S. Kunsch, T. Buch, E. Schafer, T. M. Gress, M. E. Fernandez-Zapico, and V. Ellenrieder. NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 138:1189-1199 e1181-1182.
351. Robbs, B. K., A. L. Cruz, M. B. Werneck, G. P. Mognol, and J. P. Viola. 2008. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Mol Cell Biol* 28:7168-7181.
352. Kawai, T., and S. Akira. 2007. SnapShot: Pattern-recognition receptors. *Cell* 129:1024.
353. Kawai, T., and S. Akira. 2007. TLR signaling. *Semin Immunol* 19:24-32.

-
354. Kawai, T., and S. Akira. 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7:131-137.
355. Crocker, P. R., and P. Redelinghuys. 2008. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. *Biochem Soc Trans* 36:1467-1471.
356. Robinson, M. J., D. Sancho, E. C. Slack, S. LeibundGut-Landmann, and C. Reis e Sousa. 2006. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 7:1258-1265.
357. Brown, G. D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 6:33-43.
358. Brown, G. D., J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall, and S. Gordon. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 197:1119-1124.
359. Brown, G. D. 2006. Macrophage receptors and innate immunity: insights from dectin-1. *Novartis Found Symp* 279:114-123; discussion 123-116, 216-119.
360. Herre, J., J. A. Willment, S. Gordon, and G. D. Brown. 2004. The role of Dectin-1 in antifungal immunity. *Crit Rev Immunol* 24:193-203.
361. Minematsu, H., M. J. Shin, A. B. Celil Aydemir, K. O. Kim, S. A. Nizami, G. J. Chung, and F. Y. Lee. Nuclear presence of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c3 and c4 is required for Toll-like receptor-activated innate inflammatory response of monocytes/macrophages. *Cell Signal*.
362. Osorio, F., S. LeibundGut-Landmann, M. Lochner, K. Lahl, T. Sparwasser, G. Eberl, and C. Reis e Sousa. 2008. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur J Immunol* 38:3274-3281.
363. Tassi, I., M. Cella, I. Castro, S. Gilfillan, W. N. Khan, and M. Colonna. 2009. Requirement of phospholipase C-gamma2 (PLCgamma2) for Dectin-1-induced antigen presentation and induction of TH1/TH17 polarization. *Eur J Immunol* 39:1369-1378.
364. Mourao-Sa, D., M. J. Robinson, S. Zelenay, D. Sancho, P. Chakravarty, R. Larsen, M. Plantinga, N. Van Rooijen, M. P. Soares, B. Lambrecht, and C. R. Sousa. CLEC-2 signaling via Syk in myeloid cells can regulate inflammatory responses. *Eur J Immunol*.
365. LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Ruland, and C. Reis e Sousa. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8:630-638.