
Einfluss des Treg-Aktivierungsmarkers GARP auf die Differenzierung und Funktion von T-Zellen

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Susanne Annette Hahn
Geboren am 10. August 1983 in Mainz**

Mainz, Juni 2014

Dekan:

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2014

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mitsamt den Ergebnissen selbstständig verfasst und erarbeitet habe und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen verwendet habe.

Mainz, den

(Susanne A. Hahn)

Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Soluble GARP has potent antiinflammatory and immunomodulatory impact on human CD4⁺ T cells. *Blood* 2013;122:1182-1191.

Susanne A. Hahn, Heiko f. Stahl, Christian Becker, Anita Correll, Franz-Joseph Schneider, Andrea Tuettenberg, Helmut Jonuleit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	9
2. Material und Methode	10
2.1 Methoden der Zellkultur	10
2.1.1 Isolierung humaner Blutzellen	10
2.1.2 Ermittlung der Lebendzellzahl	11
2.1.3 Magnetische Isolierung verschiedener T-Zellpopulationen	11
2.1.4 Isolation CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen	11
2.1.5 Isolation von CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T-Zellen	12
2.1.6 Stimulation der humanen Zellen	12
2.1.7 Ansatz des Suppressionsassays	13
2.1.8 Proliferationstest mittels ³ H-TdR	13
2.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen	14
2.2.1 Färbung von Oberflächenmolekülen	15
2.2.2 Färbung des TGF- β -Rezeptors	15
2.2.3 Proliferationstest mittels CFSE	15
2.2.4 Intrazelluläre Färbung von FoxP3	16
2.2.5 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen und Granzym B	16
2.2.6 Nachweis von Smad2/3-Phosphorylierung	16
2.3 Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR	17
2.3.1 Isolation und Quantifizierung von RNA	17
2.3.2 cDNA-Synthese mittels RT-PCR	17
2.3.3 qRT-PCR	17
2.4 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	18
2.4.1 Acetonfällung	18
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
2.4.3 Western Blot Analyse	18
2.5 ELISA	19
2.6 Tierversuche	19
2.6.1 Tierhaltung und Mausstamm	19
2.6.2 Transfer von humanen PBMC in Rag2 ^{-/-} γ c ^{-/-} -Mäuse	19
2.6.3 Gewinnung von humanen Zellen aus muriner Milz	19

2.6.4	Erythrozytenlyse	20
2.6.5	Bestimmung des GPT-Gehalts	20
2.7	Statistik	20
3.	Ergebnisse	21
3.1	GARP ist ein Aktivierungsmarker auf regulatorischen T-Zellen	21
3.2	Etablierung eines Testsystems zur funktionellen Analyse von sGARP	23
3.2.1	Durchflusszytometrische Analyse der FoxP3-Induktion in CD4 ⁺ Th-Zellen durch TGF- β	23
3.2.2	FoxP3-Expression und Proliferation in Abhängigkeit der Stimulationsbedingungen.....	25
3.3	Vergleich verschiedener sGARP-Proteine auf die Induktion von FoxP3 in CD4 ⁺ Th-Zellen	26
3.4	Kinetik der FoxP3-Expression nach sGARP-Stimulation	27
3.5	Die Wirkung von sGARP abhängig vom Differenzierungsstadium von CD4 ⁺ Th-Zellen.....	28
3.5.1	Charakterisierung der Differenzierungsstadien von CD4 ⁺ Th- Zellen	29
3.5.2	Der Effekt von sGARP ist abhängig vom Differenzierungsgrad der CD4 ⁺ Th-Zellen	30
3.5.3	sGARP führt zur Reduktion der Zytokinproduktion	32
3.5.4	Unterschiede in der Expression des TGF- β -Rezeptors bei naiven und differenzierten CD4 ⁺ Th-Zellen.....	33
3.6	sGARP induziert die TGF- β -Produktion in naiven CD4 ⁺ Th-Zellen	34
3.7	Untersuchungen zum GARP-Signalweg	35
3.7.1	sGARP-induzierte Smad-Phosphorylierung.....	35
3.7.2	Blockade des TGF- β -Rezeptor neutralisiert die Wirkung von sGARP	36
3.8	Der Einfluss von sGARP auf die Differenzierung von naiven CD4 ⁺ Th- Zellen	38
3.8.1	sGARP-Stimulation induziert suppressorische T-Zellen	38
3.8.2	sGARP fördert in Gegenwart von IL-6 und IL-23 die Differenzierung zu Th17-Zellen.....	39

3.9	Untersuchungen zur Wirkung von sGARP auf CD8 ⁺ T-Zellen	40
3.9.1	sGARP inhibiert die Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen	41
3.9.2	sGARP reduziert die Granzym B-Expression in CD8 ⁺ T-Zellen..	41
3.10	Die Wirkung von sGARP im humanisierten Mausmodel der GvHD ...	42
3.10.1	Regulatorische T-Zellen verhindern dosisabhängig eine GvHD .	43
3.10.2	Die Applikation von sGARP verstärkt die protektive Wirkung regulatorischer T-Zellen	44
3.10.3	In Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen kann die einmalige Gabe von sGARP eine GvHD nicht verhindern.....	45
3.10.4	Unterdrückte Ausbildung einer GvHD nach repetitiver sGARP-Injektion	45
3.10.5	Untersuchung der Th-Zellen nach sGARP-Injektion	47
3.11	GARP wird aus der Membran von CD25 ⁺ T-Zellen herausgelöst	49
4.	Diskussion.....	51
5.	Zusammenfassung	57
6.	Literaturverzeichnis.....	59
7.	Anhang	69
7.1	Abkürzungsverzeichnis	69
7.2	Puffer und Medien.....	70
7.3	Lebenslauf	73
7.4	Publikation	74

1. Einleitung

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus zellulären und molekularen Komponenten zum Schutz des Organismus vor schädlichen Pathogenen. Das angeborene Immunsystem besteht zum einen aus physikalischen Barrieren wie der Haut, zum anderen aus hoch spezialisierten Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen und Makrophagen, die ubiquitäre Strukturen von Pathogenen erkennen.¹ Diese angeborenen Schutzmechanismen sind effizient, können aber von vielen Krankheitserregern überwunden werden. Erst die zusätzliche Bildung von Erreger-spezifischen Gedächtniszellen sichert einen dauerhaften Schutz. Dieser kann nur von B- und T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems gewährleistet werden.

Im Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunität werden Antigene von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) durch Phagozytose und Pinozytose aufgenommen, prozessiert und, gebunden an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), auf der Oberfläche präsentiert. Antigen-spezifische T-Zellen erkennen mit dem T-Zellrezeptor (TZR) das spezifische Antigen in Form des Peptid-MHC-Komplexes. Für die maximale Aktivierung benötigt die T-Zelle jedoch weitere Signale. Diese liefern zum einen sogenannte kostimulatorische Moleküle, die auf den APC exprimiert werden und zum anderen ist das die Zellen umgebende Zytokinmilieu von entscheidender Bedeutung. Erst das Zusammenspiel von allen drei Signalen löst eine vollständige und effiziente Aktivierung der T-Zelle aus.²

Der TZR durchläuft bei seiner Entwicklung die sogenannte somatische Rekombination. Durch die Umlagerung verschiedener Genabschnitte, welche für die Proteinketten des Rezeptors codieren, kommt es zu einem äußerst umfangreichen Repertoire an Rezeptorspezifitäten.^{3;4} Dieser Vorgang birgt jedoch auch die Gefahr, dass einige Rezeptoren körpereigene Antigene erkennen. Daher werden weitere Regulationsmechanismen benötigt. Um die schützende Immunität gegen Pathogene bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen aufrecht zu erhalten, sind im gesunden Organismus verschiedene Mechanismen aktiv, die ein Gleichgewicht herstellen zwischen Immunität und Toleranz.⁵

Bei den beteiligten Toleranzmechanismen wird zwischen zentraler und peripherer Toleranz unterschieden. T-Zellen durchlaufen bereits während ihrer Entstehung im Thymus erste Selektionsprozesse. Die Positivselektion überleben nur solche T-Zellen, die eine ausreichende Affinität für körpereigene MHC-Moleküle besitzen. Ist der TZR nicht in der Lage MHC-Moleküle zu erkennen, bekommt die Zelle kein Überlebenssignal und wird apoptotisch. T-Zellen mit einer zu hohen Affinität gegenüber dem MHC-Peptid-Komplex werden, um die Entwicklung selbstreaktiver T-Zellen zu verhindern, negativ selektioniert und überleben ebenfalls nicht.⁶

Trotz dieses effizienten Selektionsprozesses gelangen potentiell autoaggressive T-Zellen in die Peripherie und bergen das permanente Risiko zur Entwicklung von Autoimmunität.^{7;8} Um dies zu verhindern, entwickelten sich ergänzende Mechanismen der peripheren Toleranz wie z.B. spezifische T-Zellpopulationen mit suppressiven Eigenschaften. Sogenannte natürliche, im Thymus entstehende, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (tTreg) weisen eine konstitutive Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (Interleukin-2-Rezeptor) und des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Forkhead box protein 3) auf.^{9;10} Diese Zellen wurden 1995 von Sakaguchi et al. (1995) erstmals charakterisiert und ließen so das Forschungsfeld um die Suppressor-T-Zellen wieder aufleben. Die Autoren konnten anhand eines adoptives Transfermodells bei atypischen „nude“-Mäusen (Nacktmäuse ohne Thymusanlage) die regulatorische Funktion eindeutig einer CD4⁺CD25⁺ T-Zellsubpopulation zuordnen.¹¹ Eine induzierte letale lymphoproliferative Autoimmunerkrankung, ausgelöst durch den adoptiven Transfer von isolierten CD25⁻ T-Zellen in T-Zell-defiziente Mäuse, konnte durch einen Ko-Transfer von isolierten CD4⁺CD25⁺ tTreg verhindert werden. Zusätzlich führte die Depletion von CD4⁺CD25⁺ tTreg in gesunden Mäusen mit normaler Thymusentwicklung zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Diese und folgende Arbeiten identifizierten den Thymus als essentielles Organ, welches für die Entstehung und Differenzierung natürlich vorkommender CD4⁺CD25⁺ tTreg essentiell ist.¹¹⁻

13

tTreg machen in gesunden Individuen ca. 5-10 % der peripheren CD4⁺ T-Zellen aus. Zusätzlich zu den natürlichen tTreg, existieren induzierte Treg in der

Peripherie (pTreg). Sie bilden eine heterogene Population, die je nach Art ihrer Entstehung und Ausübung ihrer suppressiven Aktivität unterteilt werden. Zu ihnen gehören Typ-1 regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen) und Th3-Zellen. Th3-Zellen entstehen durch eine suboptimale Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von tolerogenen Zytokinen, wie IL-10 (Interleukin-10) oder TGF- β (Transforming Growth Factor beta) und inhibieren die Aktivierung von T-Effektorzellen (Teff) anhand der Sekretion von TGF- β .^{14;15}

Eine andere Gruppe induzierter pTreg stellen die Tr1-Zellen dar. Sie definieren sich durch die primäre Sekretion von IL-10, welches durch seine inhibitorische Wirkung auf APC einen indirekten Einfluss auf die T-Effektorzellfunktionen nimmt.¹⁶ APC entwickeln unter dem Einfluss von IL-10 einen tolerogenen Phänotyp, der durch die Herunterregulation von MHC-Molekülen und die verminderte Expression von kostimulatorischen Molekülen gekennzeichnet ist.^{17;18}

Im Gegensatz zu induzierten pTreg wirken natürlich vorkommende tTreg nicht primär über eine Zytokinausschüttung, sondern supprimieren zellkontaktabhängig. So zeigten z. B. Arbeiten von Bopp et al. (2007), dass tTreg nach ihrer Aktivierung zytosolisches cAMP (cyclic adenosine monophosphate) produzieren, welches durch den direkten Kontakt via Gap Junctions in die Zielzelle transportiert wird. Dort führt cAMP zur Inhibition der IL-2-Produktion und somit zu einer verringerten T-Zellaktivierung.¹⁹

Dennoch ist bis dato der genaue Wirkmechanismus der tTreg-vermittelten Suppression nicht vollständig verstanden. Obwohl durch Analysen *in vitro* eine durch lösliche Faktoren vermittelte Suppression ausgeschlossen werden kann, scheinen TGF- β und IL-10 *in vivo* bei der Immunregulation durch natürliche tTreg durchaus eine wichtige Rolle zu spielen. Die Hypothese der „infektiösen Toleranz“ beschreibt,²⁰⁻²² dass *in vivo* möglicherweise natürliche tTreg und induzierte pTreg zusammen wirken, um eine autoaggressive T-Zellantwort systemisch zu unterdrücken. Hierbei supprimieren natürliche tTreg nicht nur die Aktivierung von T-Helferzellen (Th-Zellen), sondern induzieren in diesen Zellen ebenfalls eine suppressive Kapazität. Diese induzierten sekundären T-Helfer-Suppressorzellen vermitteln im Anschluss ihre suppressive Funktion durch die Produktion von IL-10 und TGF- β .^{23;24}

TGF- β liegt in Säugetieren in drei Isoformen vor (TGF- β I, II, und III). Sie besitzen eine ähnliche, aber nicht gleiche Wirkung²⁵ und binden mit unterschiedlicher Affinität an die TGF- β -Rezeptoren. So ist die Affinität des TGF- β -Rezeptor II hundertfach stärker für TGF- β I und TGF- β III als für TGF- β II.²⁶ TGF- β wirkt je nach Gewebe, Zelltyp und umgebendem Milieu u.a. auf Zelldifferenzierung, Zellwachstum, Adhäsion und Migration. In der Zelle entsteht es zunächst als Homodimer zweier pro-TGF- β -Moleküle, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Nach Spaltung des Propeptids bildet sich das so genannte Latency Associated Protein (LAP), welches mit der aktiven Form von TGF- β nicht-kovalent gebunden ist.²⁷

Die meisten Zellen sezernieren TGF- β als diese latente, nicht aktive Form. Die Aktivierung erfolgt extrazellulär über verschiedene Mechanismen, wie z.B. enzymatische Spaltung durch Proteinasen. Durch die Abspaltung von LAP entsteht die aktive Form von TGF- β , welche an den TGF- β -Rezeptor binden kann. Die TGF- β -Typ I- und II-Rezeptoren sind transmembrane Glykoproteine.²⁶ Die Bindung eines Liganden an TGF- β -Rezeptor II führt zur Rekrutierung des Typ I-Rezeptors und zur Phosphorylierung an Serin und Threonin. Es folgt eine Konformationsänderung der Tertiärstruktur und die Freigabe der Kinase des TGF- β -Rezeptor I. Die Rezeptor-Kinase des TGF- β -Rezeptor I führt zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, den sogenannten Smad-Proteinen. Von den 10 bekannten Smad-Proteinen werden durch TGF- β -Rezeptor I Smad2 und 3 aktiviert. An die phosphorylierten Transkriptionsfaktoren bindet Co-Smad4. Dieser Komplex transloziert in den Nukleus und interagiert dort mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren zur Regulation der Transkription.²⁸⁻³⁰

Die Aktivierung des TGF- β -Signalwegs resultiert u.a. in der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und ist somit an der Induktion und Stabilisierung von pTreg beteiligt.^{31;32} Funktionelle Untersuchungen zeigen, dass FoxP3 als transkriptioneller Repressor fungiert und die Expression von Zytokinen wie z.B. IL-2 unterdrückt.³³ Zusätzlich hat FoxP3 ebenso aktivierende Effekte auf Gene wie CTL4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), GITR (Glucocorticoid-induced TNFR-related protein) und CD25, welche zu den Treg-assoziierten Oberflächenmarkern zählen.³⁴

Ein zentrales Problem bei der Untersuchung von CD4⁺CD25⁺ tTreg im humanen System ist das Fehlen von spezifischen Oberflächenmarkern. Arbeiten zur phänotypischen Charakterisierung zeigen, dass neben CD25 auch Moleküle wie GITR oder OX-40 (TNFR superfamily member) konstitutiv exprimiert werden.³⁵ Allerdings werden diese Treg-assoziierten Marker, ähnlich wie CD25, nach Aktivierung auch von CD4⁺ Teff exprimiert.³⁶

GARP (Glycoprotein A repetitions predominant oder LRRC32) wurde bereits 1994 von Ollendorf et. al als Gen beschrieben, welches für ein transmembranes Protein codiert, dessen extrazellulärer Teil aus 21 Leucinreichen Domänen besteht und auf Thrombozyten exprimiert wird.^{37;38} Die Ektodomäne von GARP weist eine große strukturelle Homologie zum humanen Toll-like Rezeptor 3 (TLR-3) auf. Strukturanalysen zeigten, dass die funktionelle Region von GARP die extrazelluläre Domäne ist.³⁹

Erst vor wenigen Jahren wurde GARP als Oberflächenmolekül auf tTreg identifiziert. Es ist bisher nur wenig über die Funktion von GARP bekannt. Auf humanen tTreg wie auch auf Thrombozyten wird GARP für die Bildung und Oberflächenexpression bzw. Bindung von latentem TGF- β benötigt.⁴⁰⁻⁴² Untersuchungen zeigen, dass rekombinantes TGF- β an GARP sowohl kovalent als auch nicht kovalent bindet. Zusätzlich ist für die Bindung von latentem (nicht aktivem) TGF- β an die Zelloberfläche GARP von entscheidender Bedeutung.⁴³ Allerdings ist der Beitrag des Komplexes von GARP und latentem TGF- β für die Suppressorfunktion von tTreg nicht eindeutig geklärt.

Neueste Untersuchungen an Mäusen von Edwards et. al zeigen, dass die Induktion von GARP auch zur Expression von latentem TGF- β führt. Die GARP-Expression in TGF- β -defizienten tTreg ist jedoch nicht beeinträchtigt.⁴⁴ Demnach scheinen GARP und (latentes) TGF- β in einem komplexen Verhältnis zu einander zu stehen, welches weiterhin untersucht werden muss.

Neben der Expressionsregulation von GARP steht auch seine Effektorfunktion im Vordergrund der Analysen. Die Herabregulation von GARP mittels siRNA in tTreg führt zu einer verminderten Suppressionsfähigkeit und einer geringeren FoxP3-Expression in diesen Zellen.⁴⁵

Auch zu der Wirkung von GARP auf die Differenzierung von Th-Zellen liegen erste Hinweise vor. So konnte bei aktivierten murinen Treg gezeigt werden,

dass sie in der Lage sind, die Th17-Differentiation zu induzieren, wenn sie den Komplex von GARP und latentem TGF- β 1 auf der Oberfläche tragen.⁴⁴

Die Differenzierung von naiven Th-Zellen wird von unterschiedlichen Faktoren gelenkt. Den entscheidenden Einfluss haben jedoch die spezifischen Zytokine zum Zeitpunkt der TZR-Stimulation.⁴⁶ Naive Th-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, exprimieren das Oberflächenmolekül CD45RA. Nach Antigenkontakt, Proliferation und Differenzierung werden sie CD45RO positiv. Teilweise entwickeln sich diese Teff zu T-Gedächtniszellen weiter, die bei erneuter Infektion mit demselben Antigen eine schnellere und effektivere Immunreaktion auslösen. Nach einer gewissen Zeit ohne Antigenkontakt verändert sich die Expression von CD45RO wieder zu CD45RA. Daher kann die Expression von CD45RA nicht als Alleinstellungsmerkmal von naiven Th-Zellen dienen.⁴⁷⁻⁵⁰

Naive Th-Zellen sind lediglich in der Lage IL-2 zu bilden. Dies ist ein wichtiger Faktor für die Homeostase der Zellen. Je nach Aktivierung und umgebendem Zytokinmilieu kann die naive Th-Zelle in verschiedene Subpopulationen von Th-Zellen differenzieren⁴⁶. Die Anwesenheit von IL-2 und IFN- γ (Interferon gamma) fördert die Entstehung von Th1-Zellen.^{51;52} Diese vermitteln lokal an der Entzündungsstelle u.a. die Aktivierung von Makrophagen. Ihr spezifischer Transkriptionsfaktor ist T-bet, welcher die Expression von IFN- γ als Effektorzytokin induziert. In Anwesenheit von IL-4 kommt es zur Differenzierung von Th2-Zellen, welchen der Transkriptionsfaktor GATA-3 zugeschrieben wird.⁵³ IL-4 sezernierende Th2-Zellen werden für die meisten Antikörperantworten benötigt.⁵⁴⁻⁵⁶

Die Differenzierung von naiven Th-Zellen in Th17-Zellen ist abhängig von TGF- β , IL-6 und IL-23. Th17-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR γ t (orphan nuclear receptor) und sezernieren nach Aktivierung das namensgebende Zytokin IL-17.⁵⁷⁻⁵⁹

Werden die ausdifferenzierten Th-Zellen aktiviert und üben über die Produktion von Zytokinen ihre Effektorfunktion aus, werden sie als Teff bezeichnet.⁶⁰

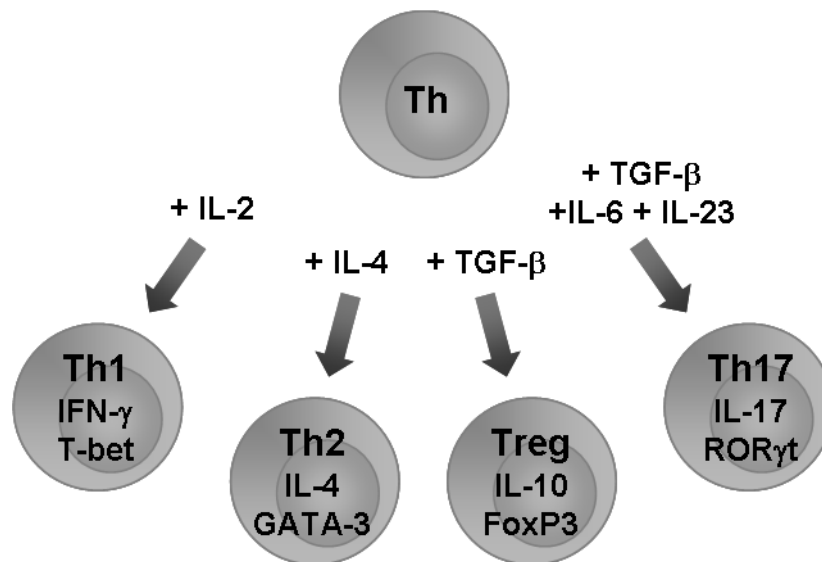


Abb. 1 Differenzierung von Th-Zellen

In Anwesenheit von bestimmten Zytokinen wird die Differenzierung unterschiedlicher Th-Zellen begünstigt. IL-2 fördert die Induktion von Th1-Zellen mit dem Transkriptionsfaktor T-bet und dem Effektorzytokin IFN- γ . IL-4 induziert die Differenzierung zu Th2-Zellen, welche GATA-3 exprimieren und IL-4 ausschütten. TGF- β fördert die Expression von FoxP3, die Differenzierung zu pTreg und die Produktion von IL-10. TGF- β zusammen mit IL-6 und IL-23 induziert ROR γ t, die Differenzierung zu Th17 und die Expression von IL-17.

Neben den MHC-Klasse II restringierten Th-Zellen bildet das Immunsystem MHC-Klasse I restringierte CD8⁺ T-Zellen aus, auch zytotoxische T-Zellen genannt.⁶¹ Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen besitzen das Potential virusinfizierte Zellen und entartete Zellen durch die Freisetzung zytotoxischer Granula, welche u.a. Perforine und Granzyme enthalten, abzutöten.^{62;63}

Da das Immunsystem ein vielschichtiges Netzwerk aus zahlreichen zellulären und molekularen Komponenten darstellt, können komplexe Fragestellungen häufig nicht allein durch Experimente *in vitro* geklärt werden. Erst Analysen *in vivo*, in geeigneten Mausmodellen, erlauben in diesen Fällen die Untersuchung komplexer Wechselwirkungen. Allerdings führen signifikante Unterschiede des Immunsystems zwischen Mensch und Maus dazu, dass sich im herkömmlichen Mausmodell gewonnene Ergebnisse nur eingeschränkt auf den Menschen transferieren lassen. Zusätzlich zeigen biologische Arzneimittel in der Regel eine Spezies-spezifische Wirkweise und können daher nur bedingt in konventionellen Mausmodellen untersucht werden.^{64;65} Ein Weg um die Übertragbarkeit zu verbessern, ist die Entwicklung von neuen Mausmodellen, die kein eigenes Immunsystem besitzen und es somit erlauben, menschliches Gewebe und Zellen auf Mäuse zu transferieren. Diese sogenannten

humanisierten Mausmodelle können als Bindeglied zwischen Tierversuchsmodellen und der klinischen Testung eines neuen Wirkstoffs an Probanden betrachtet werden.⁶⁶ Ermöglicht werden sie durch manipulierte Mausstämme, deren eingeschränkte Immunität mittels präziser Verpaarung immer ausgeprägter wurde.

Der Beginn der Humanisierung von Mäusen war die Entdeckung der immundefizienten *Scid*-Mutation (severe combined immunodeficiency) in CB17-Mäusen im Jahr 1983.⁶⁷ Tiere mit homozygoter Mutation sind nicht in der Lage eine somatische Rekombination durchzuführen und besitzen daher keine reifen B- und T-Zellen.^{68;69} Diese Tiere können keine adaptiven Immunantworten gegen humane Zellen und Gewebe ausbilden. Damit wurde erstmals eine Übertragung humaner Immunzellen auf die Maus möglich. Die Kreuzung der *Scid*-Mäuse mit immundefizienten NOD-Mäusen verbesserte zusätzlich das Anwachsen humaner Zellen in den Tieren (wie non-obese diabetic, NOD).^{70;71} Das Mausmodell wurde durch das Einkreuzen eines IL-2-Rezeptor- γ -Ketten Knockouts in NOD/*Scid* bzw. Rag2^{-/-} Mäusen weiter verbessert.⁷²⁻⁷⁴ Die γ -Kette des IL-2-Rezeptors ist ein wesentlicher Bestandteil der Zytokinrezeptoren von IL-2, -4, -7, -9, -15 und -21. Das Fehlen der γ -Kette beeinträchtigt die T- und B-Zellentwicklung und führt zu einem vollständigen Verlust von NK-Zellen.^{75;76}

Der Begriff humanisierte Mäuse umfasst verschiedenste Transfermodelle. Hier soll im Folgenden nur detailliert der Transfer reifer humaner Immunzellen erläutert werden. Durch den Transfer von humanen mononukleären peripheren Blutzellen (PBMC) in immundefiziente Mäuse kommt es zu einer partiellen immunologischen Rekonstitution. Der Verlauf der Humanisierung wird beeinflusst durch die Art und Anzahl der transferierten Zellen, den Mausstamm und das Alter der Tiere.⁷⁷⁻⁸⁰ Hohe Zahlen an PBMC führen zur Induktion einer xenogenen Graft-versus-Host Disease (GvHD), die letztlich zum Tod der Tiere führt. Neugeborene Tiere reagieren wesentlich sensibler auf den Transfer als adulte Tiere. Dadurch kann auch durch den Transfer geringer PBMC-Mengen eine letale GvHD induziert werden.⁷⁷ Die übertragenen xenoreaktiven humanen T-Zellen werden durch Gewebsantigene der Maus aktiviert und leiten eine Entzündungsreaktion ein, die einhergeht mit Gewichtsverlust, Hepatitis und der Entzündungen der Haut.^{77;81} Die massive Immunreaktion basiert auf einer

aggressiven humanen T-Zellenreaktion gegen murines Gewebe, da es bei dem Transfer von T-Zell-depletierten PBMC zu keiner GvHD kommt.⁸² Untersuchungen von Becker et al. (2009) zeigen, dass ein zusätzlicher Transfer von tTreg zu den injizierten PBMC die GvHD dosisabhängig unterdrückt. Eine weitere tTreg-abhängige Protektion vor einer GvHD zeigte die Injektion von gp120. Die einmalige Verabreichung des tTreg-Aktivator gp120 führt ebenfalls zur Verhinderung einer GvHD, vorausgesetzt, die transferierten PBMC enthalten tTreg.⁷⁷ Das Mausmodell ermöglicht die komplexe Regulation von humanen T-Zellantworten *in vivo* über mehrere Wochen untersuchen zu können.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Charakterisierung des tTreg-Aktivierungsmarkers GARP im Hinblick auf die Funktion und Differenzierung humaner T-Helferzellen. Um den Einfluss von GARP auf die Differenzierung von T-Helferzellen, unabhängig von den bekannten suppressiven Eigenschaften der tTreg untersuchen zu können, wurde ein lösliches GARP-Fusionsprotein eingesetzt. Nach erfolgreicher Identifizierung der immunmodulatorischen Eigenschaften von GARP *in vitro*, folgte die Analyse von GARP als Modulator der T-Zellaktivierung in einem humanisierten Mausmodell *in vivo*.

2. Material und Methode

2.1 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten der Zellkultur wurden an sterilen Werkbänken mit sterilen Reagenzien durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂-Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Der pH-Wert der CO₂/Bikarbonat-gepufferten Medien bleibt bei diesen Bedingungen konstant. Die humanen Immunzellen wurden in X-VIVO-15 (Lonza) kultiviert. Alle in der Zellkultur eingesetzten Antikörper und Proteine waren Azid-frei und steril.

2.1.1 Isolierung humaner Blutzellen

Die peripheren humanen Immunzellen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, stammen aus Buffy Coats gesunder Blutspender der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz. Naive Th-Zellen wurden aus Nabelschnurblut gewonnen, das aus Überschussmaterial der Frauenklinik der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung stand. Bei der Isolierung von PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) wurde eine Dichtengradienten-Zentrifugation angewendet. Hierbei ermöglicht das Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll, PAA, Pasching) die Auftrennung der einzelnen Blutzellpopulationen anhand ihrer Dichte. Ficoll ist eine isotonische Lösung mit einer mittleren Dichte von 1,077 g/ml bei 20 °C. Mononukleäre Zellen besitzen eine geringere Dichte als das Separationsmedium im Gegensatz zu Erythrozyten und Granulozyten. Die Ficolllösung (15 ml) wurde mit 30 ml Blut überschichtet und bei Raumtemperatur (30 min, 350xg, ohne Bremse) zentrifugiert. Durch die gleichbleibende Zentrifugalkraft und die konstante Viskosität des Separationsmediums wurden die Zellen ihrer Dichte nach aufgetrennt. Nach Zentrifugation lagen folgende vier Phasen vor:

1. oberste Phase = Blutplasma
2. Phasengrenze = mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten)
3. Phase = Ficoll
4. Bodenschicht = Erythrozyten, Granulozyten

Die zweite Phase aus Lymphozyten und Monozyten wurde vollständig in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit 50 ml kaltem 1xPBS/EDTA gewaschen. Durch mehrere Waschschrte (Zentrifugation bei 300xg, 4 °C, 6 min) wurden die Zellen von restlichen Plasma- und Ficollresten sowie Thrombozyten befreit.

2.1.2 Ermittlung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Teil der Zellen in einer Trypanblau-Lösung aufgenommen. Tote und geschädigte Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind an ihrer Blaufärbung zu erkennen. Anhand der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. Nach Auszählung von einem Großquadrat (16 Einzelfelder) berechnete man die Zellzahl anhand folgender Formel:

$$\text{Zellzahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen} \times 10^4 \\ (\text{Kammerkonstante}) = \text{Zellzahl}$$

2.1.3 Magnetische Isolierung verschiedener T-Zellpopulationen

Die verwendeten T-Zellpopulationen wurden mittels Microbeads (Milteny Biotec) aus den PBMC oder aufgearbeitetem Nabelschnurblut isoliert. Microbeads sind ca. 50 nm große, uniforme, superparamagnetische Polystyrolkugeln mit gebundenen Antikörpern. Die Antikörper erkennen spezifisch die entsprechenden Antigene auf der Oberfläche der Zielzellen. In dieser Arbeit wurden CD4-, CD8-, CD25- und CD45RA-Microbeads (1-2 Beads pro Zelle) verwendet. Nach 15 min Inkubation der Microbeads mit der Zellsuspension (bei 4 °C auf dem Schüttler) wurde das Gemisch nach einem Waschschrte über eine mit Eisenpartikeln gefüllte MACS-Zell-Separationssäule gegeben. Durch ein starkes Magnetfeld werden die Zellen, die mit Microbeads markiert sind, in der Säule zurückgehalten. Die unmarkierten Zellen können die Separationssäule ungehindert passieren. Durch das Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld konnten die spezifisch gebundenen Zellen mit Medium herausgespült werden. Als CD45RO⁺ Population wurden Zellen, die sich bei der CD45RA-Aufreinigung im Durchlauf befanden, verwendet.

2.1.4 Isolation CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden wie in 2.1.3 beschrieben mit CD25 Microbeads (Milteny Biotec) isoliert. Zur Entfernung von Verunreinigungen durch CD8⁺ T-

Zellen, CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ B-Zellen wurden die angereicherten CD25⁺ Zellen mit Dynabeads (Invitrogen) behandelt. Hierfür wurden die Zellen mit anti-CD8- (2 Beads/Zelle), anti-CD14- (1 Bead/Zelle) und anti-CD19- Dynabeads (2 Beads/Zelle) für 30 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Depletion der Kontaminatoren erfolgte im Anschluss mittels eines Depletionsmagneten (Invitrogen, Deutschland) nach Herstellerprotokoll.

2.1.5 Isolation von CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen

Für die Isolation von CD4⁺CD45RA⁺ und CD4⁺CD45RO⁺ T-Zellen wurde vor dem Schritt in 2.1.3 CD4⁺ T-Zellen mittels Multisort Beads (Milteny Biotec) isoliert. Hierfür wurde wie oben beschrieben zunächst die Zellen mit CD4- Beads inkubiert und mittels MACS-Zell-Separationssäule separiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer MultiSort Release-Lösung inkubiert und die Reaktion mit MultiSort Stop-Lösung beendet, um die gebundenen CD4- Microbeads zu entfernen. Im Anschluss konnte eine zweite magnetische Isolation wie unter 2.1.3 beschrieben durchgeführt werden.

2.1.6 Stimulation der humanen Zellen

Nach der Aufreinigung der gewünschten Zellpopulation wurde diese in Kulturplatten (mit 48 Löchern) mit 10⁶ Zellen/Loch kultiviert. Die Stimulation erfolgte mit anti-CD3 mAk (Klon OKT3) und anti-CD28 mAk (Klon 28.2, eBioscience) sowie zusätzlich, je nach Angaben, mit 1 ng/ml TGF-β1 (R&D Systems, innerhalb dieser Arbeit als TGF-β bezeichnet), 10 µg/ml anti-TGF-β-Rezeptor II (R&D Systems), 200 IU/ml IL-6 (CellGenix), 100 ng/ml IL-23 (R&D Systems).

Das lösliche GARP-Fusionsprotein (sGARP) wurde von Fa. Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & CoKG hergestellt durch die Bindung der extrazelluläre Domäne von GARP an die Fc-Domäne eines IgG1 (Herkunft Kaninchen) und in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt (Abb. 2). Als Kontrolle diente die Fc-Domäne ohne gebundenes GARP (1 µg/ml eingesetzt).⁸³ Zusätzlich wurde kommerziell erhältliches rekombinantes GARP-Protein von R&D (10 µg/ml; mit C-terminaler 6 His tag) und Enzo (10 µg/ml; gebunden an die Fc-Domäne eines humanen IgG1) verwendet.

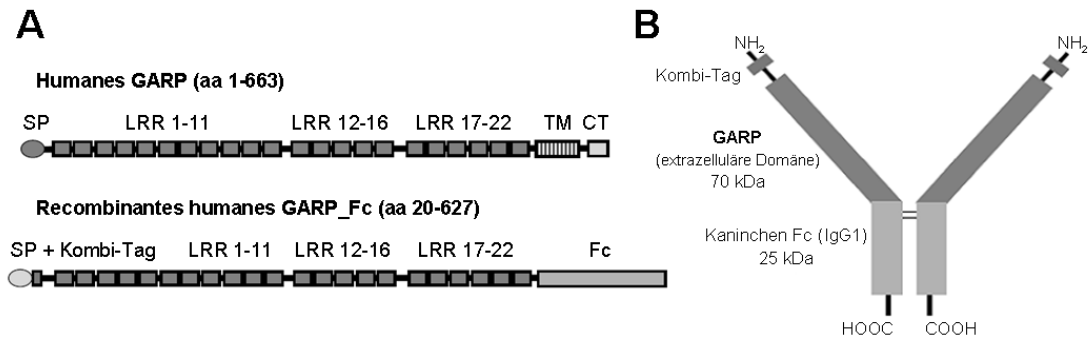


Abb. 2 GARP-Fusionsprotein

A Vergleich zwischen GARP-Fusionsprotein mit und ohne FC-Domäne IgG1 (Herkunft Kaninchen; links). **B** Struktur und Molekulargewicht von sGARP (rechts). SP= Signalpeptid, LRR= Leucin rich repeat, TM= transmembrane Domäne, CT= Carboxyterminus.

2.1.7 Ansatz des Suppressionsassays

Naive CD4⁺ T-Zellen aus Nabelschnurblut (Spender 1) wurden mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk, 1 µg/ml anti-CD28 mAk in An/Abwesenheit von 1 µg/ml sGARP stimuliert (induzierte Suppressor-T-Zellen). CD4⁺ T-Zellen aus PBMC (Spender 2) wurden unter den gleichen Bedingungen ohne sGARP stimuliert (Responder-T-Zellen). Am Tag 7 wurden beide Populationen geerntet und in Einzel- bzw. Kokultur (Titration der naiven CD4⁺ Suppressor-T-Zellen von Spender 1) mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk stimuliert. Als Kostimulus dienten 3x10⁵ T-Zell-depletierte PBMC (Spender 3), welche bestrahlt wurden, um ihre Eigenproliferation zu unterbinden. Die Proliferation wurde nach 4 Tagen mittels ³H-TdR analysiert.

2.1.8 Proliferationstest mittels ³H-TdR

Für die Analyse der T-Zellproliferation wurde der Einbau von radioaktivem ³H-Thymidin (³H-Tdr, MP Biomedicals Europe, Eschwege) in die proliferierende Zelle gemessen. Hierbei wird das im Überschuss vorhandene ³H-TdR im Medium bei der DNA-Neusynthese expandierender Zellen eingebaut. Nach drei Tagen wurde der Kultur 10 µl ³H-TdR-Lösung (entspricht 37 kBq/Well) hinzugegeben und die Stimulationskulturen für weitere 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zellerntegerät abgesaugt und auf einen Glasfaserfilter übertragen. Durch Spülen des Filters wird nicht eingebautes ³H-TdR entfernt. Das Trocknen des Filters erfolgte bei 100 °C. Mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit verschlossen in einer Plastikhülle wurde im β-Szintillationszähler die Messung vorgenommen. Diese Verfahren

nennt man Flüssigkeitsszintillations-Methode oder LSC-Methode (Liquid Scintillation Counting). ^3H -TdR ist ein β -Strahler mit geringer radioaktiver Strahlung, die mit gewöhnlichen Zählrohren nicht detektierbar ist. Das Szintillationsgemisch besteht aus organischen Lösungsmitteln und einer flüssigen, fluoreszierenden, organischen Verbindung, die in der Lage ist, die Zerfallsenergie über die Szintillatormoleküle aufzunehmen. Durch die Aufnahme der Energie werden die Moleküle in einen energiereicheren instabilen Zustand versetzt. Wenn die angeregten Elektronen in ihren Grundzustand zurückkehren, wird die Energie in Form von Photonen frei. Diese wird von Photozellen detektiert. Der Zähler ist in der Lage, die Lichtblitze pro Minute zu messen und gibt so eine indirekte Aussage über die Radioaktivität als radioaktive Zerfälle pro Minute (cpm).

2.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zum Zählen und Analysieren von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Das Prinzip beruht auf Zellen, die in einer Lösung durch Kapillaren gedrückt werden und einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbei fließen. Der Laserstrahl wird, nachdem er auf eine Zelle getroffen ist, in verschiedene Richtungen abgelenkt und reflektiert. Dies kann durch Photodetektoren nachgewiesen werden. Die Menge des gestreuten Lichts steht im Zusammenhang mit der Größe und Granularität der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) bezieht sich auf die Größe der Zellen und ist ein Maß für die Beugung des Lichts. Das Seitwärtsstreulicht SSC (Sideward Scatter) stellt die Komplexität bzw. Granularität der Zelle dar. Für die Analyse von Zellen werden diese mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff wird im Durchflusszytometer durch einen Laserstrahl entsprechend seiner Wellenlänge angeregt. Durch die Lichtabsorption gelangen die Elektronen der Fluorochrome auf ein energetisch höheres Niveau. Durch die Rückkehr der Elektronen vom angeregten instabilen Energieniveau in ihren Ausgangszustand entsteht die Fluoreszenz. Der Photometer detektiert dabei die emittierte Energie in Form von Photonen. Anhand der spezifischen Emissionswellenlängen können verschiedene Fluorochrome gleichzeitig gemessen werden.

2.2.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Für die Färbung von Oberflächenmolekülen wurden Antikörper verwendet, die direkt an ein Fluorochrom gekoppelt sind. Die Zellsuspension wurde zunächst in eine 96-Well Platte mit ca. 10^5 Zellen pro Well gegeben, zentrifugiert (300xg, 4 °C, 6min) und einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Durch das im FACS-Puffer enthaltene Sandoglobulin (polyklonale humane Antikörperlösung) werden die Fc-Antikörperbindungsstellen abgedeckt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Die Zellen wurden mit den Antikörpern (Endkonzentration 5 µg/ml) für 15 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift, um die Probe von überschüssigem, ungebundenem Antikörper zu befreien. Folgende Antikörper wurden verwendet: anti-CD4 (RPATA4), anti-CD25 (M-A25), anti-CD27 (L128), anti-CD45 (HI100), alle von BD Biosciences; anti-CD62L (DREG-56) von BD Pharmingen und anti-CCR7 (150503) von R&D Systems. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden die Proben in 150 µl kaltem FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Datenaufnahme wurde am BD FACS Calibur bzw. am BD FACS LSRII durchgeführt.

2.2.2 Färbung des TGF-β-Rezeptors

Die Expression von Zytokinrezeptoren auf der Zelloberfläche ist aufgrund der geringen Dichte dieser Rezeptoren mit Antikörpern oft nur schwierig zu detektieren. Deshalb wurde für den Nachweis des TGF-β-Rezeptors biotinyliertes TGF-β verwendet. Durch die Verwendung dieser indirekten Färbemethode mit FITC-markiertem (Fluoresceinisothiocyanat) Streptavidin als Sekundärantikörper wird das Signal verstärkt. Die Analyse der TGF-β-Rezeptorexpression erfolgte nach Herstellerprotokoll (Fluorokine, R&D Systems).

2.2.3 Proliferationstest mittels CFSE

5,6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) ist ein Vital-Fluoreszenzfarbstoff, der lebende Zellen anfärbt. In seiner ursprünglichen Form ist CFDA-SE nicht fluoreszierend. Durch seine Acetatgruppe ist er in der Lage die Plasmamembran lebender Zellen zu überwinden. Im Zytoplasma wird die Acetatgruppe des CFDA-SE durch intrazelluläre Esterasen abgebaut. Durch diesen Abbau wird der Ester in den fluoreszierenden Farbstoff CFSE

umgewandelt. CFSE ist in der Lage mit freien Aminogruppen Bindungen einzugehen, die über mehrere Wochen stabil sind. Bei der Zellteilung wird CFSE gleichmäßig auf das Zytoplasma der beiden Tochterzellen verteilt. Hierdurch kommt es zur logarithmischen Abnahme der Fluoreszenzintensität, die Rückschlüsse auf die Proliferation der Zelle gibt. Alle verwendeten Reagenzien wurden auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden zunächst mit warmem 1xPBS gewaschen und anschließend mit 2 ml einer 1 µM CFSE/1xPBS-Lösung für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension mit X-VIVO-15 + 10 % HSA (Human Serum Albumin) aufgefüllt, zentrifugiert und für die folgenden Versuche in X-VIVO-15 aufgenommen. Die Proliferation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im Durchflusszytometer (BD FACS Calibur) analysiert.

2.2.4 Intrazelluläre Färbung von FoxP3

Die Färbung von intrazellulärem FoxP3 wurde im Anschluss an die Oberflächenfärbung durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach Herstellerangaben fixiert, permeabilisiert (Fix/Permeabilization Kit; eBioscience) und anschließend mit einem mAk gegen FoxP3 (259D/C7 oder PCH101, BD Biosciences) gefärbt.

2.2.5 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen und Granzym B

Zur Bestimmung des Zytokinprofils von T-Zellen wurden die Zellen mit 1 µg/ml Ionomycin und 1 ng/ml PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) für 5 Stunden maximal stimuliert. Nach 30 min erfolgte zusätzlich die Zugabe von Monensin (1,3 µg/ml), welches den Austritt der gebildeten Zytokine aus der Zelle verhindert, so dass diese für die intrazelluläre Detektion zur Verfügung stehen. Für die Detektion von Granzym B wurden die T-Zellen direkt aus der Kultur verwendet. Nach der Stimulation wurden die Zellen gewaschen und permeabilisiert (Perm/Fix Solution, BD Pharmingen). Die Färbung erfolgte mit den angegebenen Antikörpern (anti-IL-2, anti-IFN γ , anti-Granzym B, BD Biosciences).

2.2.6 Nachweis von Smad2/3-Phosphorylierung

Für den Nachweis der Smad2/3-Phosphorylierung von Zellen wurde zunächst eine Oberflächenfärbung durchgeführt und anschließend nach

Herstellerangaben (BD Phosflow) die Zellen mit anti-phospho-Smad2/3 (BD Phosflow) gefärbt.

2.3 Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR

2.3.1 Isolation und Quantifizierung von RNA

Die geernteten T-Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden sie in Lysepuffer des RNeasy Mini Kits (Qiagen) resuspendiert und nach Herstellerangaben die RNA-Isolation durchgeführt. Die anschließende Bestimmung der RNA-Konzentration wurde an einem Spektralphotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) durchgeführt.

2.3.2 cDNA-Synthese mittels RT-PCR

Aus der isolierten RNA wurde mittels reverser Transkription die cDNA hergestellt. Hierfür wurden 300 ng RNA der jeweiligen Probe eingesetzt. Für die Transkription wurde das Sensiscript RT Kit (Qiagen) verwendet und nach den Herstellerangaben verfahren.

2.3.3 qRT-PCR

Für die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) wurde das QuantiFast PCR Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Von jeder Probe wurden Dupletten in einer 96-Well-PCR Mikroplatte angesetzt. Die Messung erfolgte mit dem Real-Time-PCR System 7300 (Applied Biosystems) nach dem von Qiagen empfohlenen Programm. Folgende Primer wurden verwendet: TGF- β (QuantiTect Primer, Qiagen), ROR γ t (forward: 5'-agagccaaggcatgag, reverse: 5'-caggtgataagtggat-3') und IL-17A (forward: 5'-tgccttcaagactgaacaa-3', reverse: 5'-tctctgaggggccttaac-3'). Alle Expressionen wurden auf das Haushaltsgen EF1 α (Elongationsfaktor 1- α ; forward: 5'-gattacagggacatctcaggctg-3', reverse: 5'-tatctcttctggctgtagggtgg-3') normalisiert. Die relative mRNA-Expression wurde bezogen auf unbehandelte Zellen mit der delta-delta CT-Methode kalkuliert.

2.4 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

2.4.1 Acetonfällung

Für die Bestimmung von löslichem GARP im Kulturüberstand mussten die Proteine zunächst aufkonzentriert werden. Hierfür wurde der Überstand mit dem vierfachen Volumen Aceton (100 %) versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 1 Stunde bei 4 °C, 950xg. Nach einem Waschschriff mit 90 %-igem Aceton und erneuter Zentrifugation (30 min, 4 °C, 950xg) wurde das Pellet in Aqua dest. aufgenommen.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für das SDS-Gel wurden die Zellen oder der gefällte Überstand in 4x NuPAGE LDS Sample Buffer und 10x NuPAGE Reducing Agent aufgenommen und mit Aqua dest. aufgefüllt. Das Gemisch wurde für die vollständige Denaturierung 7 min im Ultraschallbad inkubiert und anschließend 10 min auf 97 °C erhitzt. Für die SDS-PAGE wurde das System von Invitrogen verwendet. Die Proben wurden auf ein Nu PAGE 4-12% Bis-Tris Gel aufgetragen und die Laufkammer mit Nu PAGE 20x MOPS SDS Running Buffer befüllt. Die Laufbedingungen wurden konstant für 50 min bei 200 V gehalten.

2.4.3 Western Blot Analyse

Für den Nachweis von Proteinen mittels Western Blot Analyse wurden die Blottingschwämme sowie die Filterpapiere in folgendem Puffer vorbereitet: 20 x NuPAGE Transfer Buffer, NuPAGE Antioxidant (0,1 %), Methanol (10%) und Aqua dest.. Die PVDF-Membran wurde für 30 Sekunden in Methanol (100 %) vorinkubiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel zusammen mit der PVDF-Membran sowie den Filterpapieren in die Blotkammer gegeben und die Proteine bei 30 V für 1 Stunde auf die Membran transferiert. Um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren wurde die Membran nach dem Blotten für 1 Stunde mit Blockierlösung (1 x TBST + 5 % Milchpulver) behandelt. Anschließend wurde die Membran mit 15 ml der Blockierlösung inklusive des Primärantikörpers (anti-GARP mAk, Enzo) über Nacht inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 20 min. mit 1x TBST gewaschen und anschließend mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper (anti-Maus, Rockland) für 1 Stunde inkubiert. Nach erneuten Waschschriffen konnten die,

auf der Membran gebundenen Proteine mit Hilfe von Lumigen (ECL Plus, GE Healthcare) laut Herstelleranleitung detektiert werden. Die dabei entstandene Chemilumineszenz wurde auf einen Röntgenfilm projiziert und fotodokumentiert.

2.5 ELISA

Die Produktion von latentem TGF- β von naiven T-Zellen wurde mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Hierzu wurde nach dem Herstellerprotokoll (DRG Instruments, Marburg, Germany) vorgegangen.

2.6 Tierversuche

2.6.1 Tierhaltung und Mausstamm

Die Haltung der Rag2^{-/-} γ c^{-/-}-Mäuse sowie die Durchführung aller Tierversuche wurde in Pathogen-freien Räumen der zentralen Tierhaltung der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Alle tierexperimentellen Versuche wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsantrages durchgeführt. Die Tiere auf H2^d-Hintergrund wurden mit autoklaviertem Wasser, supplementiert mit dem Antibiotikum Borgal und sterilisierten Trockenpellets nach den Richtlinien der Tierversuchsordnung versorgt.

2.6.2 Transfer von humanen PBMC in Rag2^{-/-} γ c^{-/-}-Mäuse

Neugeborenen Rag2^{-/-} γ c^{-/-}-Mäusen wurden 2-4 Tage nach der Geburt 5x10⁶ PBMC interperitoneal appliziert. Je nach Versuchsansatz wurden zusätzlich zu den PBMC unterschiedliche Mengen von tTreg oder löslichem GARP (sGARP) bzw. dem Kontrollprotein (je 5 μ g/Maus) verabreicht. Die Tiere wurden in regelmäßigen Abständen gewogen und der Gesundheitszustand beurteilt.

2.6.3 Gewinnung von humanen Zellen aus muriner Milz

Für die Organentnahme wurden die Mäuse durch CO₂-Begasung abgetötet und anschließend auf dem Rücken fixiert. Die Haut an der Bauchseite wurde durch einen medianen Schnitt vom Unterkiefer bis zum Becken aufgeschnitten und die Milz entfernt. Die Milz wurde in X-VIVO-15 aufgenommen und mit Hilfe eines Nylonsiebes (Porengröße 70 μ m, BD Bioscience) und eines Stempels mechanisch zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet.

2.6.4 Erythrozytenlyse

Für die Weiterverarbeitung der Einzelzellsuspension aus der Milz musste die Zellsuspension zunächst von den Erythrozyten befreit werden. Hierfür wurden sie mit 2 ml hypotonischem Puffer (ACK-Lysepuffer) versetzt und für max. 2 min bei Raumtemperatur resuspendiert. Nach einer Zentrifugation (300xg, 4 °C, 6 min) wurde die Probe optisch auf verbleibende Erythrozyten untersucht und gegebenenfalls der Lyseschritt wiederholt. Für weitere Analysen wurden die Zellen in X-VIVO-15 aufgenommen. ACK-Puffer ist stark hypotonisch und sorgt für ein osmotisches Gefälle bei dem Wasser in die Zelle eindringt. Erythrozyten sind im Vergleich zu anderen Zellen besonders empfindlich und platzen bei steigendem Innendruck schneller. Somit können sie aus der Probe entfernt werden, ohne die restlichen Zellen zu zerstören.

2.6.5 Bestimmung des GPT-Gehalts

Die Glutamat-Pyruvat-Transaminase- (GPT) Konzentration wurde im Blutserum der Mäuse bestimmt und diente zur Beurteilung einer Leberentzündung. Hierfür wurde das Reflovet Plus System von Roche nach Herstellerangaben verwendet.

2.7 Statistik

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's t-Test ermittelt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angegeben.

3. Ergebnisse

Durch die Identifizierung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen als natürliche regulatorische Zellen (tTreg) bei der Unterdrückung von Autoimmunreaktionen durch Sakaguchi et al. in den 1990er Jahren wurde das Forschungsfeld der suppressiven T-Zellen wiederbelebt.¹¹ tTreg sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der peripheren Selbsttoleranz und kontrollieren die Proliferation von aktivierten T-Helferzellen (Th-Zellen) bei Entzündungsprozessen.⁸⁴ Charakterisiert werden tTreg anhand einer hohen Expression des nukleären Transkriptionsfaktors FoxP3.^{85;86} Aufgrund der Tatsache, dass aktivierte humane CD4⁺ Th-Zellen ebenfalls CD25 und FoxP3 exprimieren, können tTreg mittels dieser Marker nicht eindeutig von CD4⁺ Th-Zellen abgegrenzt werden.³⁶ Als spezifischer Oberflächenmarker auf aktivierten tTreg wurde GARP (Glycoprotein A repetitions predominant) erstmals von Wang et al. (2008) beschrieben.³⁹ Zu seinen Funktionen als Membranprotein auf tTreg gehört die Bindung von latentem (nicht aktivem) TGF-β (Transforming growth factor-β).⁴³ Der Beitrag des Komplexes bzw. von GARP allein für die Suppressorfunktion von tTreg ist noch nicht eindeutig geklärt. Um GARP unabhängig von den funktionellen Eigenschaften der tTreg untersuchen zu können, wurde daher ein lösliches GARP-Protein (sGARP) verwendet.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung von sGARP und seiner modulatorische Wirkung auf T-Zellen *in vitro*. Des Weiteren konnte mittels eines xenogenen Mausmodells der Einfluss von sGARP auf humane T-Zellantworten *in vivo* analysiert werden.

3.1 GARP ist ein Aktivierungsmarker auf regulatorischen T-Zellen

Die Analyse von Wang et al. (2008) führte zur Identifikation von GARP als spezifischen Aktivierungsmarker auf tTreg gegenüber aktivierten und ruhenden Th-Zellen.³⁹ Die Abbildung 3.1 zeigt CD4⁺CD25⁺ tTreg und CD4⁺CD25⁻ Th-Zellen, die immunomagnetisch aus peripheren mononukleären Zellen der Blutes (PBMC) angereichert wurden. Für die Analyse an Tag 0 blieben die

Zellen unbehandelt. Die Aktivierung für die Messung der späteren Zeitpunkte erfolgte durch die Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk.

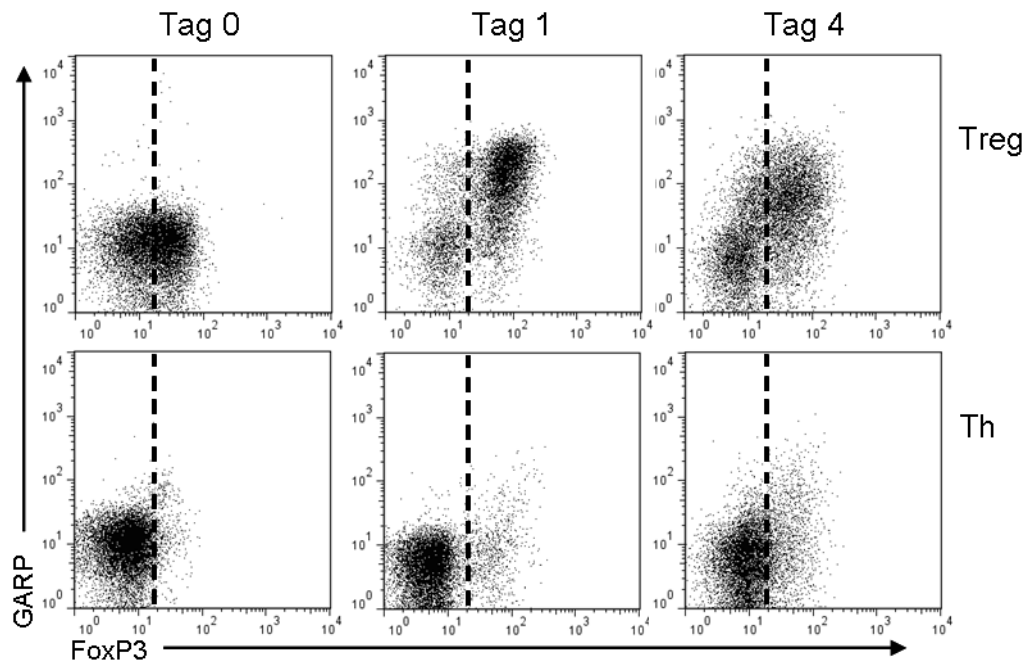


Abb. 3.1 GARP-Expression auf aktivierten tTreg

CD4⁺CD25⁺ tTreg und CD4⁺CD25⁻ Th-Zellen wurden unstimuliert (Tag 0) gelassen oder mit anti-CD3 (0,5 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) mAk stimuliert. Die GARP- und FoxP3-Expression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Im Folgenden konnte anhand einer Kinetik dargestellt werden, dass es erst nach Aktivierung der tTreg zu einer Expression von GARP kommt (Abb. 3.1). tTreg zeigten bereits unstimuliert an Tag 0 eine deutliche FoxP3-Expression, wiesen jedoch noch keine GARP-Expression auf. Erst 24 Stunden nach Stimulation (Tag 1) wurde GARP hoch reguliert und mit FoxP3 koexprimiert. Die GARP-Expression auf tTreg war über mehrere Tage stabil. Auf Th-Zellen konnte zu keinem Zeitpunkt eine GARP-Expression detektiert werden.

Um den möglichen Einfluss von GARP auf die T-Zell-Differenzierung unabhängig von tTreg analysieren zu können, wurde in Kooperation mit der Fa. Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & CoKG ein lösliches GARP-Protein (sGARP) hergestellt.^{82;83} Dieses sGARP wurde in den folgenden Experimenten zu den Stimulationskulturen von T-Zellen zugesetzt.

3.2 Etablierung eines Testsystems zur funktionellen Analyse von sGARP

Aus der Literatur ergaben sich Hinweise, dass GARP an latentes TGF- β und LAP (latency-associated protein) binden kann.^{40;41} TGF- β gehört zu den Zytokinen, die von Treg selbst gebildet werden können und fördert u.a. die Expression von FoxP3 in Th-Zellen.³¹

3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der FoxP3-Induktion in CD4⁺ Th-Zellen durch TGF- β

Wie bereits beschrieben, führt die Stimulation von CD4⁺ Th-Zellen in Anwesenheit von TGF- β zur Induktion des Transkriptionsfaktors FoxP3. Naive Th-Zellen können in Anwesenheit von TGF- β zu induzierten pTreg differenziert werden. Allerdings ist die pTreg-Induktion strikt von den Stimulationsbedingungen abhängig.⁸⁷ Nach optimaler TZR-Stimulation exprimieren auch Th-Zellen ohne suppressive Aktivität FoxP3 als transienten Aktivierungsmarker.^{36;88} Um das immunmodulatorische Potential von sGARP analysieren zu können, musste das Kultursystem der pTreg-Induktion zunächst optimiert werden. Aus diesem Grund wurden isolierte CD4⁺ Th-Zellen mit CFSE gefärbt und für drei Tage in An- oder Abwesenheit von TGF- β polyklonal mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert. Zellen, die nur mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert wurden, werden innerhalb dieser Arbeit in den Abbildungen mit w/o gekennzeichnet. Bei der Zellteilung wird CFSE gleichmäßig auf das Zytoplasma der beiden Tochterzellen verteilt, was zu einer logarithmischen Abnahme der Fluoreszenzintensität führt und somit Rückschlüsse auf die Proliferation der Zellen zulässt. Zur Analyse der FoxP3-Expression wurden zunächst die anti-FoxP3 mAk PCH101 und 259D im Vergleich ausgetestet. Ziel dieser Untersuchungen war es, ein Testsystem zu etablieren, das gleichzeitig Analysen zum Einfluss von sGARP auf FoxP3-Expression, Proliferation und Zytokinbildung in Th-Zellen erlaubt.

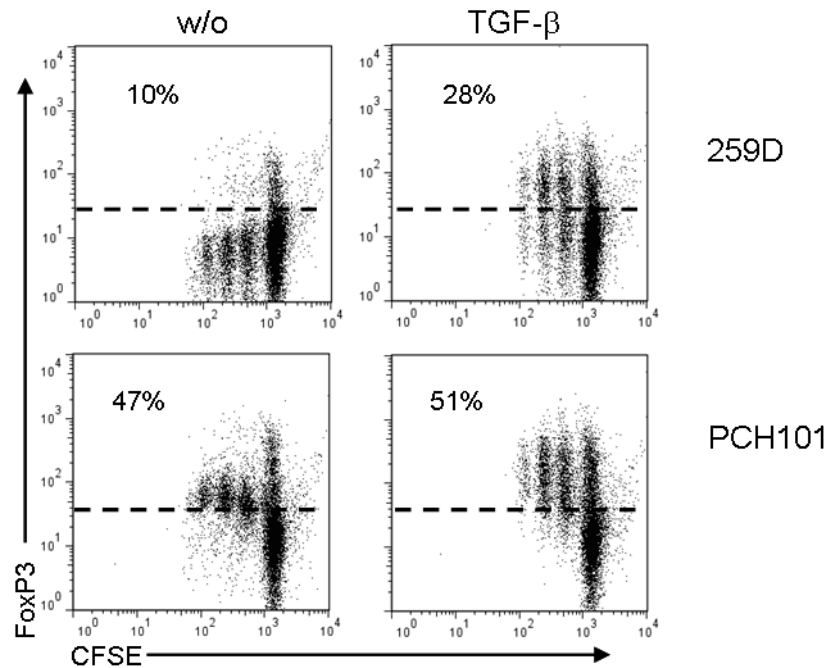


Abb. 3.2 Vergleich von 259D und PCH101

CFSE-markierte CD4⁺ Th-Zellen wurden mit anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) mAk (w/o, links) ± TGF-β (1 ng/ml, rechts) stimuliert. Die FoxP3-Expression und die T-Zellproliferation wurden an Tag 3 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die relative Expression von FoxP3, nachgewiesen mit den beiden mAk 259D und PCH101, ist angegeben in Prozent. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, dass die FoxP3-Färbung mit dem mAk 259D geeigneter war, um die Wirkung der TGF-β-Stimulation zu untersuchen, da bei einer Färbung mit dem mAk PCH101 bereits die unstimulierten Zellen ein deutliches Signal für FoxP3 aufwiesen (47 %), welches sich durch die Anwesenheit von TGF-β nur geringfügig steigern ließ. Deshalb wurde für die folgenden Experimente der mAk 259D eingesetzt.

Unter den gewählten Stimulationsbedingungen konnte die Expression von FoxP3 von 10% auf 28 % in den aktivierten Th-Zellen nach Stimulation mit TGF-β gesteigert werden. (Abb. 3.2). Die TGF-β-Zugabe konnte die Expression von FoxP3 zwar induzieren, eine Suppression der Proliferation oder eine inhibierte Synthese von Zytokinen (nicht gezeigt), wie sie bei der Induktion von pTreg beobachtet wurde,^{87;89} konnte jedoch nicht festgestellt werden. Somit waren die gewählten Stimulationsbedingungen nicht geeignet, um einen immunmodulatorischen Einfluss von sGARP zu untersuchen. Deshalb wurden die Stimulationsbedingungen in den folgenden Experimenten zunächst optimiert.

3.2.2 FoxP3-Expression und Proliferation in Abhängigkeit der Stimulationsbedingungen

Neben der Induktion von FoxP3 inhibiert TGF- β unter suboptimalen Stimulationsbedingungen die T-Zellproliferation.⁹⁰ Unter den zunächst gewählten Kulturbedingungen konnte diese jedoch nicht detektiert werden (siehe Kap. 3.2.1). Ein Grund hierfür könnte die hohe Konzentration der stimulierenden Antikörper sein. Daher sollten die idealen Stimulationsbedingungen für eine FoxP3-Induktion bei gleichzeitiger Proliferationsinhibition ermittelt werden. Hierfür wurden verschiedene Titrationsreihen durchgeführt, bei denen die Konzentration des Kostimulus (anti-CD28 mAk) und des TZR-Stimulus (anti-CD3 mAk) variiert wurden. Diese Ansätze erfolgten in An- und Abwesenheit von TGF- β . Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde lediglich ein Teil der Titrationsreihe in Abbildung 3.3 aufgeführt.

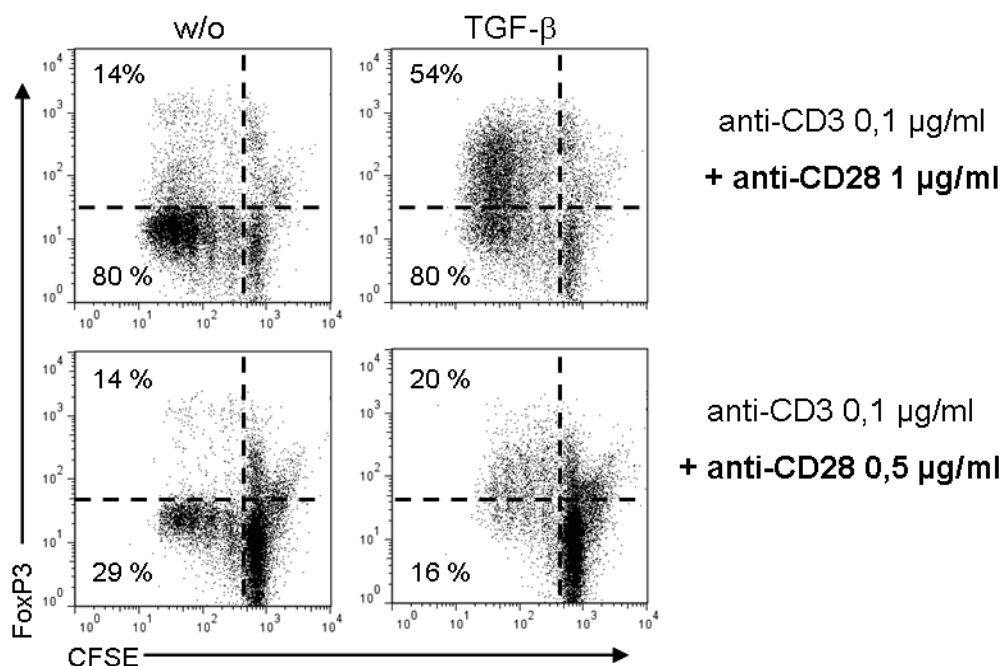


Abb. 3.3 Einfluss des Kostimulus auf die FoxP3-Induktion und Proliferationsinhibition
CFSE-markierte CD4⁺ Th-Zellen wurden mit anti-CD3 (0,1 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml oder 0,5 µg/ml) mAk $\pm$ TGF- β (1 ng/ml) stimuliert. Die FoxP3-Expression und Proliferation wurde an Tag 3 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die relative FoxP3-Expression in % ist oberhalb der horizontalen Linie angegeben, die relative Proliferation unten links. Die Daten zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, dass zur optimalen TGF- β -vermittelten Induktion von FoxP3 und zur maximalen Suppression der T-Zellproliferation nicht die gleichen Stimulationsbedingungen gewählt werden konnten. Der größte Einfluss von

TGF- β auf die FoxP3-Expression der stimulierten Th-Zellen (von 14 % auf 54 %) war bei einer schwachen TZR-Stimulation (0,1 μ g/ml anti-CD3 mAk) und optimaler Kostimulation (1 μ g/ml anti-CD28 mAk) messbar. Allerdings konnte unter diesen Bedingungen kein Effekt von TGF- β auf die Proliferation (konstant bei 80 %) der Th-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.3). Erst wenn der Kostimulus zusätzlich auf 0,5 μ g/ml reduziert wurde, war eine Suppression der Proliferation unter dem Einfluss von TGF- β detektierbar (von 29 % auf 16 %). Allerdings war hier die FoxP3-Induktion nur noch gering nachzuweisen (von 14 % auf 20 %). Demnach überkommt eine starke Stimulation der Th-Zellen den inhibitorischen Effekt von TGF- β auf die Proliferation, wohingegen die Induktion von FoxP3 gefördert wird. Deshalb wurden zur Analyse der FoxP3-Induktion und Proliferationsinhibition im Folgenden getrennte Assays mit den jeweils optimalen Stimulationsbedingungen durchgeführt.

3.3 Vergleich verschiedener sGARP-Proteine auf die Induktion von FoxP3 in CD4⁺ Th-Zellen

Die ersten Analysen zur Funktion von GARP zeigten, dass es durch die Herabregulation von GARP mittels siRNA in tTreg zu einer verminderten FoxP3-Expression in diesen Zellen kommt.⁴⁵ Die Expression von FoxP3 scheint somit mit der Anwesenheit von GARP in Verbindung zu stehen und könnte somit auch durch sGARP beeinflusst werden. Wie bereits erwähnt, wurde für die Analyse von GARP unabhängig von tTreg ein sGARP in Kooperation mit FA. Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & CoKG hergestellt. Hierfür wurde die extrazelluläre Domäne von GARP an die Fc-Domäne eines IgG1 (Herkunft Kaninchen) gebunden (Abb. 2).⁸³ Zur Validierung der erzeugten Daten wurden zusätzlich kommerziell erhältliches rekombinantes GARP von R&D (mit C-terminaler 6 His tag) und Enzo (gebunden an die Fc-Domäne eines humanen IgG1) verwendet. Hierbei sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auf die Fc-Domäne des Fusionsproteins zurück zu führen sind. Um die Effizienz der unterschiedlichen sGARP vergleichen zu können, wurde die Detektion der FoxP3-Induktion gewählt.

Um die Sensitivität des Testsystems zu steigern, wurden für die Analysen naive CD4⁺CD45RA⁺CC62L⁺CCR7⁺ Th-Zellen (siehe Kap. 3.5.1) aus

Nabelschnurblut isoliert, im weiteren Text als naive $CD4^+$ Th-Zellen bezeichnet. Die Stimulation erfolgte polyklonal mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk in An- und Abwesenheit der drei verschiedenen sGARP. Für die Stimulation der naiven $CD4^+$ Th-Zellen musste der TZR-Stimulus entgegen dem ausgetesteten System leicht erhöht werden (von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ auf 0,5 $\mu\text{g/ml}$).

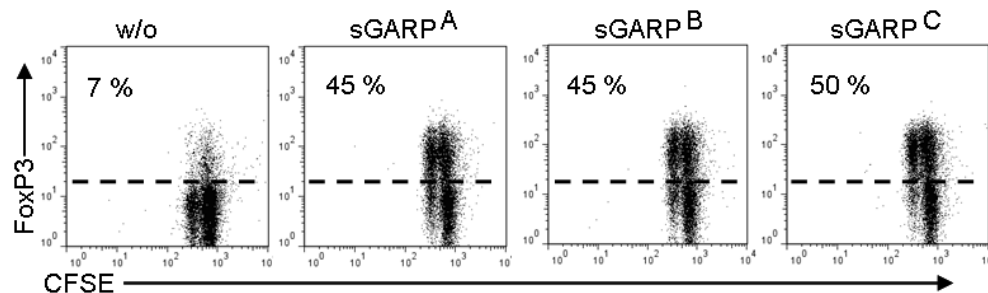


Abb. 3.4 Verschiedene sGARP Proteine induzieren die gleiche Expressionsstärke von FoxP3

CFSE-markierte naive $CD4^+$ Th-Zellen wurden mit anti-CD3 (0,5 $\mu\text{g/ml}$) und anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$) mAk $\pm$ sGARP: mit Kaninchen Fc-Domäne (sGARP^A), His tag (sGARP^B) oder humaner IgG1 Fc-Domäne (sGARP^C) stimuliert. Die FoxP3-Expression (angegeben in %) wurde an Tag 2 nach Stimulation gemessen. Ein repräsentatives Resultat von drei unabhängigen Versuchen ist dargestellt.

Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen, führte die Stimulation der naiven $CD4^+$ Th-Zellen in Anwesenheit von sGARP zu einer deutlichen FoxP3-Expression. Bereits nach 2 Tagen induzierte sGARP eine 6-fache Steigerung der FoxP3-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Zusätzlich führten die drei unterschiedlichen sGARP-Proteine zu einer vergleichbaren FoxP3-Induktion (45–50 %). Die beiden Fc-Domänen von sGARP^A und sGARP^C hatten demzufolge keinen Einfluss. sGARP ist demnach in der Lage, als lösliches Protein eine FoxP3-Expression in naiven $CD4^+$ Th-Zellen zu induzieren. Diese mit TGF- β vergleichbaren Eigenschaften sollen innerhalb dieser Arbeit genauer analysiert werden. In den weiteren Versuchen wurde bevorzugt sGARP von der Fa. Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & CoKG verwendet.

3.4 Kinetik der FoxP3-Expression nach sGARP-Stimulation

Die Induktion der FoxP3-Expression wird unter anderem durch die TGF- β -Signaltransduktion vermittelt.^{31;91} Da diese Induktion von einer komplexen Signalkaskade abhängig ist, wurde eine Kinetik durchgeführt, die den geeigneten Zeitpunkt für die FoxP3-Untersuchung festlegen sollte. Hierfür wurden naive $CD4^+$ Th-Zellen polyklonal in An- oder Abwesenheit von sGARP

stimuliert und an verschiedenen Tagen die FoxP3-Expression mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

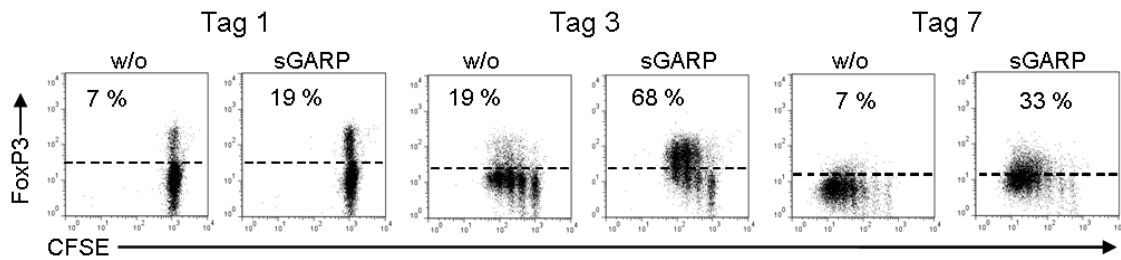


Abb. 3.5 Kinetik der FoxP3-Induktion nach Stimulation in Anwesenheit von sGARP

CFSE-markierte naive $CD4^+$ Th-Zellen wurden mit anti-CD3 (0,5 $\mu\text{g/ml}$) und anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$) mAk $\pm$ sGARP (1 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die FoxP3-Expression (angegeben in %) wurde an Tag eins, drei und sieben nach Stimulation gemessen. Die durchflusszytometrischen Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

An Tag eins zeigte sich bei Zugabe von sGARP eine geringe Expression von 19 % FoxP3-positiver Zellen. An Tag drei führte die Stimulation in Anwesenheit von sGARP zu dem höchsten Anstieg auf 68 %, an Tag sieben nahm die FoxP3-Expression wieder auf 33 % ab (Abb. 3.5). Folglich erschien Tag 3 als optimaler Zeitpunkt für den Nachweis der FoxP3-Expression. Demnach induzierte die Anwesenheit von sGARP eine deutliche, über mehrere Tage hinweg stabile FoxP3-Expression in naiven $CD4^+$ Th-Zellen, welche vergleichbar ist mit der Induktion von FoxP3, die durch die Stimulation mit TGF- β erzielt werden konnte (Kap. 3.2.2).

3.5 Die Wirkung von sGARP abhängig vom Differenzierungsstadium von $CD4^+$ Th-Zellen

Die Sensitivität von $CD4^+$ Th-Zellen für Aktivierungssignale verringert sich mit ihrer fortschreitenden Differenzierung.⁹² Periphere Th-Zellen können anhand der Expression von CD45RA und CD45RO einem definierten Differenzierungsgrad zugewiesen werden. Naive Th-Zellen exprimieren CD45RA auf ihrer Oberfläche, während aktivierte Th-Zellen und T-Gedächtniszellen CD45RO exprimieren. Nach einer gewissen Zeit ohne Antigenkontakt verändert sich die Expression von CD45RO wieder zu CD45RA. Daher kann die Expression von CD45RA nicht als Alleinstellungsmerkmal von naiven Th-Zellen dienen.⁴⁷⁻⁵⁰ Um die verschiedenen Populationen genauer voneinander abzugrenzen, werden weitere Marker wie CD62L und CCR7 benötigt.

Naive Th-Zellen sind $CD45RA^+CC62L^+CCR7^+$, während aktivierte Th-Zellen den Phänotyp $CD45RO^+CC62L^{+/-}CCR7^-$ aufweisen.⁹³⁻⁹⁵

3.5.1 Charakterisierung der Differenzierungsstadien von $CD4^+$ Th-Zellen

Im Folgenden sollte die Wirkung von sGARP in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender $CD4^+CD45RA^+$ und $CD4^+CD45RO^+$ Th-Zellen sowie naive $CD4^+CD45RA^+$ Th-Zellen aus Nabelschnurblut isoliert. Anschließend erfolgte deren detaillierte Charakterisierung hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades mittels der Marker CD62L und CCR7.

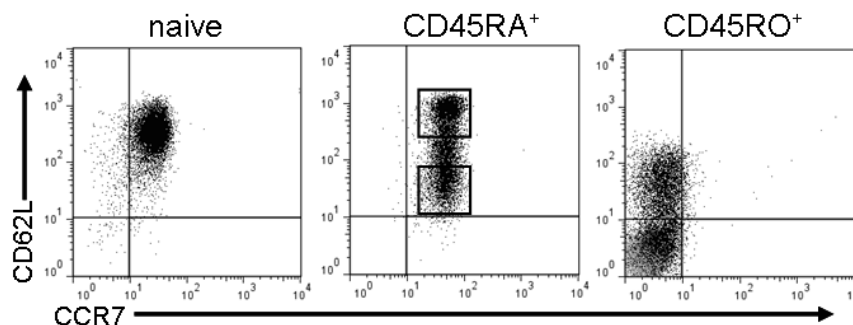


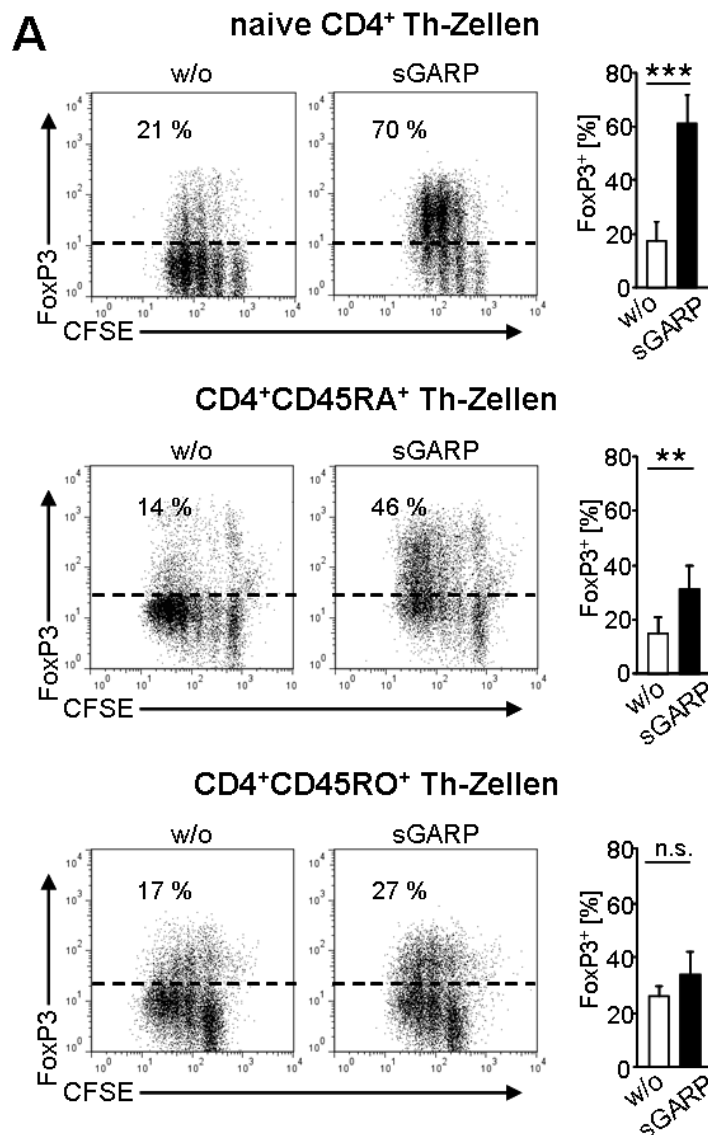
Abb. 3.6 Charakterisierung der T-Zellpopulationen

Naive $CD4^+$ Th-Zellen isoliert aus Nabelschnurblut, $CD4^+CD45RA^+$ und $CD4^+CD45RO^+$ Th-Zellen aus peripherem Blut wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer CD62L- und CCR7-Expression untersucht. Ein repräsentatives Ergebnis von acht unabhängigen Analysen ist abgebildet.

Naive $CD4^+$ Th-Zellen zeigten eine $CD62L^{++}CCR7^{++}$ Expression im Gegensatz zu den $CD45RO^+$ Th-Zellen, die $CD62L^{+/-}CCR7^-$ bzw. $CD62L^-CCR7^-$ waren (Abb. 3.6). Bei den $CD45RA^+$ Th-Zellen konnte ebenfalls eine heterogene Expression bezogen auf CD62L beobachtet werden, nämlich $CD62L^+$ und $CD62L^{++}$ Th-Zellen. Beide $CD45RA^+$ Populationen waren jedoch $CCR7^+$. Die aus Nabelschnurblut isolierten naiven $CD4^+$ Th-Zellen zeigten einen homogenen $CCR7^+CD62L^+$ Phänotyp. $CD45RA^+$ periphere Th-Zellen stellen anhand der hier gemessenen Marker eine Mischpopulation dar. Diese Resultate bestätigen die bereits veröffentlichten Daten.⁹³⁻⁹⁵ Im Folgenden sollten die drei charakterisierten Populationen hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit für die sGARP-Stimulation untersucht werden.

3.5.2 Der Effekt von sGARP ist abhängig vom Differenzierungsgrad der CD4⁺ Th-Zellen

Nach der Charakterisierung der Th-Zellpopulationen konnte nun die Wirkung von sGARP abhängig vom Differenzierungsgrad der Th-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden naive CD4⁺ Th-Zellen aus Nabelschnurblut sowie CD4⁺CD45RA⁺ und CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen aus PBMC isoliert, polyklonal stimuliert und der Einfluss von sGARP auf FoxP3-Expression und Proliferation untersucht.



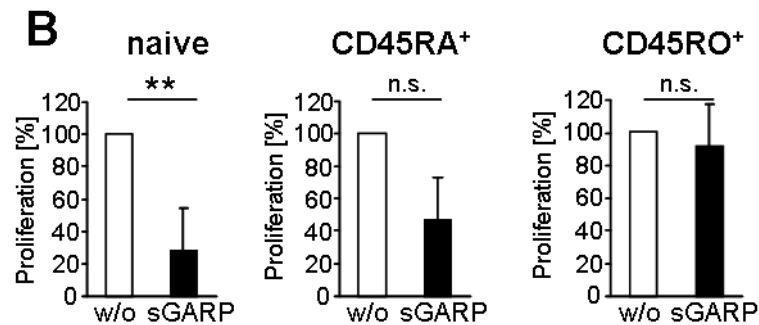


Abb. 3.7 Der Einfluss von sGARP auf die funktionellen Eigenschaften von CD4⁺ Th-Zellen ist abhängig von ihrem Differenzierungsgrad

A CFSE-markierte CD4⁺ Th-Zellen aus Nabelschnurblut (oben), CD4⁺CD45RA⁺ (Mitte) und CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen (unten) aus peripheren PBMC isoliert, wurden mit anti-CD3 (0,5 µg/ml) und antiCD28 (1 µg/ml) mAk ± sGARP (1 µg/ml) stimuliert. Die Expression von FoxP3 wurde an Tag drei mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (links). Die Zusammenfassung von sieben unabhängigen Experimenten erfolgte in den Balkendiagrammen. Dargestellt wurden die Mittelwerte ± SEM von n=7, **p<0,01; ***p<0,001 **B** CD4⁺ Th-Zellen isoliert aus Nabelschnurblut (links), CD4⁺CD45RA⁺ (Mitte) und CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen (rechts) von PBMC isoliert wurden mit anti-CD3 (0,5 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) mAk ± sGARP stimuliert (1 µg/ml). Die Proliferation wurde durch Einbau von ³H-TdR (Zugabe an Tag 8) bestimmt. Dargestellt wurden die arithmetischen Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten, **p<0,01; n.s.= nicht signifikant.

Durch die Zugabe von sGARP wurde in naiven CD4⁺ Th-Zellen und CD4⁺CD45RA⁺ Th-Zellen eine signifikante Steigerung der FoxP3-Expression erzielt (von 17 auf 60 % bzw. von 14 auf 30 %). Wohingegen sGARP auf CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen nur einen sehr geringen, nicht signifikanten Effekt zeigte (von 26 auf 34 %). Ähnlich verhielt es sich mit der Proliferation. Diese war in naiven CD4⁺ Th-Zellen signifikant reduziert. In Kulturen aus CD4⁺CD45RA⁺ Th-Zellen war sie nur leicht verringert, wohingegen in CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen keine Reduktion der Proliferation detektiert werden konnte (Abb. 3.7). sGARP hatte demnach nur auf naive CD4⁺ Th-Zellen hinsichtlich FoxP3-Induktion und Proliferation eine Wirkung. Im Gegensatz dazu wurden CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen durch die Anwesenheit von sGARP nicht signifikant beeinflusst. Der Effekt von sGARP scheint demzufolge abhängig vom Differenzierungsgrad der Th-Zelle zu sein und bewirkt in naiven Th-Zellen eine Inhibition der Proliferation sowie die Induktion von FoxP3.

Auf der Grundlage dieser Untersuchungen zum Einfluss von sGARP auf unterschiedliche T-Zelldifferenzierungsstadien (siehe Abb. 3.7) beschränkten sich die Analysen im Folgenden auf den Vergleich von naiven CD4⁺ Th-Zellen und differenzierten CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen. Neben der Wirkung von sGARP

auf die FoxP3-Expression und die Proliferation wurde im nächsten Schritt der Effekt auf die Produktion der Zytokine analysiert.

3.5.3 sGARP führt zur Reduktion der Zytokinproduktion

Die Differenzierung von Th-Zellen führt zu der Ausprägung eines charakteristischen Zytokinprofils dieser Zellen. Daher sind Veränderungen in der Zytokinproduktion für die funktionelle Analyse nach verschiedenen Stimulationsansätzen interessant. Um die Wirkung von sGARP auf die Zytokinproduktion (IL-2, IFN- γ) zu analysieren, wurden naive CD4⁺ Th-Zellen aus Nabelschnurblut und CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen aus PBMC für 10 Tage in An- und Abwesenheit von sGARP stimuliert. An Tag 10 folgte eine 5-stündige maximale Restimulation mit PMA und Ionomycin.

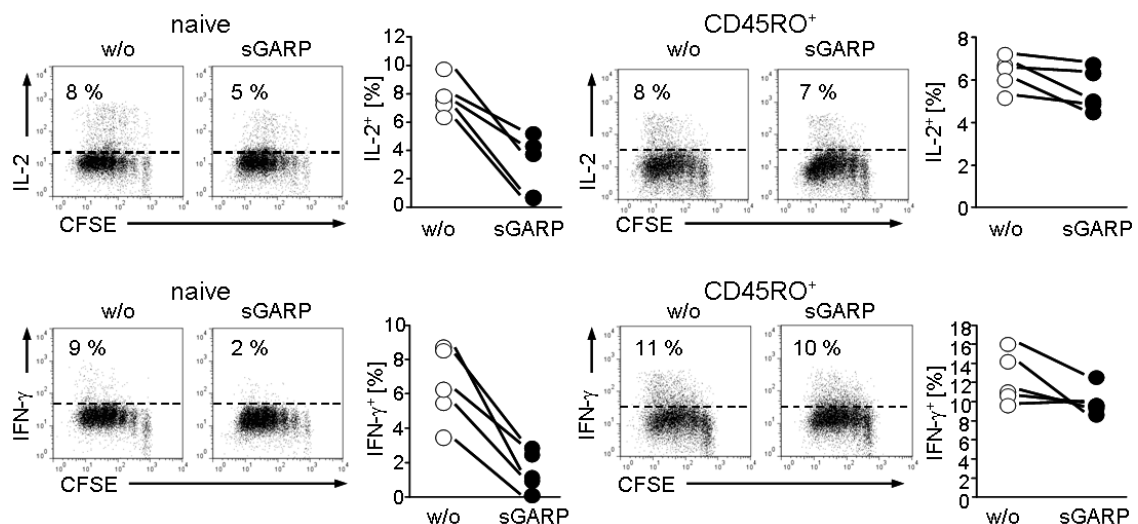


Abb. 3.8 sGARP inhibiert die Produktion von IL-2 und IFN- γ in naiven CD4⁺ Th-Zellen

CFSE-markierte naive CD4⁺ Th-Zellen (links) und CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen (rechts) wurden mit anti-CD3 (0,5 μ g/ml) und antiCD28 (1 μ g/ml) mAk $\pm$ sGARP (1 μ g/ml) stimuliert. Die Expression von IL-2 (oben) und IFN- γ (unten) wurde an Tag 10 nach Restimulation mittels Durchflusszytometrie analysiert und in % angegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis. Diagramme stellen zusammenfassend fünf unabhängige Experimente dar.

Wie in Abbildung 3.8 dargestellt, führte die Anwesenheit von sGARP zu einer deutlich verminderten IL-2- und IFN- γ -Produktion in naiven CD4⁺ Th-Zellen. Die Expression beider Zytokine wurde durchschnittlich um mindestens die Hälfte reduziert. Hingegen zeigte sich bei CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen keine Beeinflussung durch sGARP. Somit führt sGARP neben der Induktion von FoxP3 und der Reduktion der Proliferation zusätzlich zu einer reduzierten Produktion von IL-2 und IFN- γ in naiven CD4⁺ Th-Zellen. Diese Charakteristika

lassen auf ein suppressorisches Potential der Zellen schließen,^{87;89} welches innerhalb dieser Arbeit noch zur Untersuchung stehen wird.

3.5.4 Unterschiede in der Expression des TGF- β -Rezeptors bei naiven und differenzierten CD4⁺ Th-Zellen

Die Bindung von TGF- β an GARP wurde vielfach in der Literatur beschrieben.⁴⁰⁻⁴³ Wie diese Arbeit bereits zeigte, besitzt GARP auch ähnliche Wirkungsweisen wie die Induktion von FoxP3 oder die Suppression der Proliferation. Dies resultierte in der Fragestellung, ob sGARP über den TGF- β -Signalweg wirkt und somit die Anwesenheit des TGF- β -Rezeptors essentiell sein könnte. Wie in Abschnitt 3.5.2 analysiert, war die Wirkung von sGARP abhängig vom Differenzierungsgrad der Zelle. Demzufolge wurde die Expression des TGF- β -Rezeptors auf naiven CD4⁺ Th-Zellen und CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen im ruhenden und aktivierten Zustand untersucht. Hierfür wurde biotinyliertes TGF- β verwendet. Die Zellen wurden entweder frisch nach der Aufreinigung (ruhend) gefärbt oder nach einer 16-stündigen, polyklonalen Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk (aktiviert).

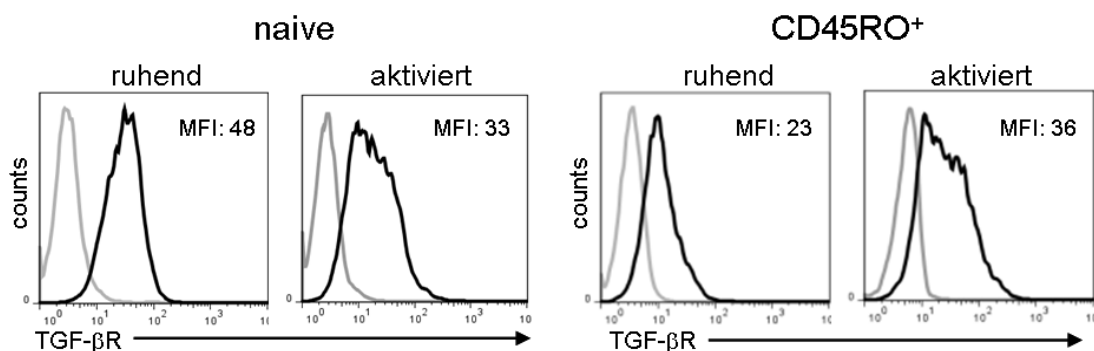


Abb. 3.9 TGF- β -Rezeptor-Expression auf naiven und CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen

Naive CD4⁺ Th-Zellen (links) und CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen (rechts) wurden unstimuliert belassen oder stimuliert mit anti-CD3 (0,5 μ g/ml) und anti-CD28 (1 μ g/ml) mAk für 16 Stunden. In den Histogrammen wurde die TGF- β -Rezeptor-Expression als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) eines repräsentativen Ergebnisses von vier dargestellt. MFI: naive ruhend 52 $\pm$ 20, aktiviert 35 $\pm$ 6; CD4⁺CD45RO⁺ ruhend 22 $\pm$ 5, aktiviert 28 $\pm$ 14.

Im Vergleich zu frisch isolierten CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen (MFI: 23) war die Expression des TGF- β -Rezeptors auf ruhenden naiven CD4⁺ Th-Zellen mehr als doppelt so hoch (MFI: 48). Nach Aktivierung wurde die Expression des TGF- β -Rezeptors in beiden Populationen vergleichbar herunterreguliert (MFI: 33 bzw. 36; Abb. 3.9). Diese Daten zeigen, dass der TGF- β -Rezeptor auf ruhenden naiven CD4⁺ Th-Zellen am höchsten exprimiert wird. Demnach

könnte die stärkere Wirkung von sGARP auf naive $CD4^+$ Th-Zellen auch eine Folge der höheren Expression des TGF- β -Rezeptors sein.

3.6 sGARP induziert die TGF- β -Produktion in naiven $CD4^+$ Th-Zellen

Bisher wurde innerhalb dieser Arbeit die Wirkung von sGARP auf die Eigenschaften von Th-Zellen in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad untersucht. Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass der Einfluss von sGARP mit der Differenzierung der Th-Zellen abnahm. In den folgenden Analysen wurden naive $CD4^+$ Th-Zellen im Detail betrachtet, da bei dieser Population der effektivste Einfluss von sGARP festgestellt werden konnte.

Aufgrund der Tatsache, dass GARP und TGF- β in komplexer Beziehung zueinander stehen, wurde im nächsten Schritt die TGF- β -Produktion von naiven $CD4^+$ Th-Zellen in Abhängigkeit von sGARP analysiert. Die Zellen wurden in Gegenwart von sGARP stimuliert. Nach 16 Stunden erfolgte die Analyse der TGF- β -Expression, sowohl im Kulturüberstand als auch auf mRNA-Ebene.

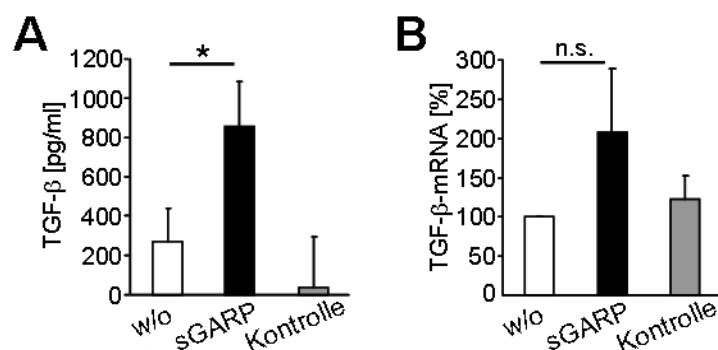


Abb. 3.10 Induktion von TGF- β in naiven Th-Zellen durch sGARP

Naive $CD4^+$ Th-Zellen wurden mit anti-CD3 (0,5 μ g/ml) und anti-CD28 (1 μ g/ml) mAk $\pm$ sGARP oder Kontrollprotein (je 1 μ g/ml) stimuliert. Nach 16 Stunden wurde **A** der Überstand abgenommen und mittels ELISA die TGF- β -Konzentration bestimmt und **B** die Zellen zur anschließenden Bestimmung der TGF- β -mRNA-Expression lysiert. Darstellung der TGF- β -mRNA in Prozent normalisiert auf das Haushaltsgen EF1 α und unbehandelte Zellen. Balkendiagramme zeigen die Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten (Mittelwert $\pm$ SEM, * $p < 0,05$; n.s., nicht signifikant).

Abbildung 3.10 A zeigt eine signifikante Induktion von TGF- β in Anwesenheit von sGARP im Vergleich zu unstimulierten Zellen oder zum Kontrollprotein. Da naive $CD4^+$ Th-Zellen nicht in der Lage sind aktives TGF- β zu produzieren, konnte hier lediglich die Bildung von latentem TGF- β durch die sGARP-

Stimulation dargestellt werden. Zudem konnte eine Bindung von TGF- β an sGARP im Kulturüberstand nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde die TGF- β -Induktion zusätzlich auf mRNA-Ebene analysiert. Auch hier war in Anwesenheit von sGARP eine effiziente Steigerung der TGF- β -mRNA festzustellen (Abb. 3.10 B).

3.7 Untersuchungen zum GARP-Signalweg

Um den Einfluss eines Proteins auf eine Zelle nachvollziehen zu können, ist es notwendig zu verstehen, über welche Mechanismen seine Effekte vermittelt werden. Demzufolge sollte der Signalweg, über den sGARP die Zellen beeinflusst, untersucht werden. Wie bereits gezeigt, bestehen enge Parallelen zwischen GARP und TGF- β . Daher sollte zunächst untersucht werden, ob sGARP über den TGF- β -Signalweg wirkt.

3.7.1 sGARP-induzierte Smad-Phosphorylierung

Die Bindung von TGF- β an den TGF- β -Rezeptor II führt zur Rekrutierung des Typ I-Rezeptors und nachfolgend zur Phosphorylierung von Smad2 und Smad3.²⁹ Ob sGARP an den TGF- β -Rezeptor binden kann, wurde anhand der Smad-Phosphorylierung untersucht. Für die Analysen wurden frisch isolierte Zellen ohne vorangegangene immunomagnetisch Anreicherung verwendet, da diese bereits zu einer Aktivierung der Zellen führen kann und das Ergebnis beeinflusst. Die mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut wurden für 30 Minuten mit anti-CD3 mAk in An- und Abwesenheit von sGARP stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von Smad2/3 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei wurden mittels Doppelfärbung nur die CD4⁺ T-Zellen analysiert.

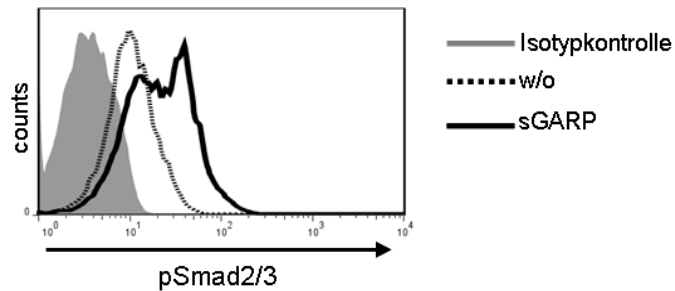


Abb. 3.11 Phosphorylierung von Smad2/3 durch sGARP

Mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut wurden mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk ± sGARP (1 µg/ml) stimuliert. Smad2/3-Phosphorylierung der CD4⁺ T-Zellen nach 30 min; w/o (anti-CD3 mAk) MFI: 12; sGARP MFI: 29. Das Ergebnis ist repräsentativ für 5 unabhängige Versuche.

Es zeigte sich, dass die Stimulation mit sGARP in den CD4⁺ Th-Zellen zu einer deutlichen Phosphorylierung (MFI: 29) von Smad2/3 im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte (MFI: 12; Abb. 3.11). sGARP induziert demnach die Phosphorylierung von Smad2/3. Somit liegt nahe, dass sGARP sowohl den TGF-β-Rezeptor als auch die nachgeschaltete Signaltransduktion aktiviert.

3.7.2 Blockade des TGF-β-Rezeptor neutralisiert die Wirkung von sGARP

Da die Phosphorylierung von Smad2/3 durch die Bindung an den TGF-β-Rezeptor II katalysiert wird, sollte ein blockierender Antikörper gegen den Rezeptor die Signaltransduktion inhibieren. Zur Untersuchung stand, ob in Anwesenheit eines blockierenden anti-TGF-β-Rezeptor II mAk die Phosphorylierung von Smad2/3 durch sGARP neutralisiert werden kann. Hierfür wurde der gleiche Versuchsansatz wie in 3.7.1 verwendet, jedoch wurde zusätzlich ein anti-TGF-β-Rezeptor II mAk hinzugegeben.

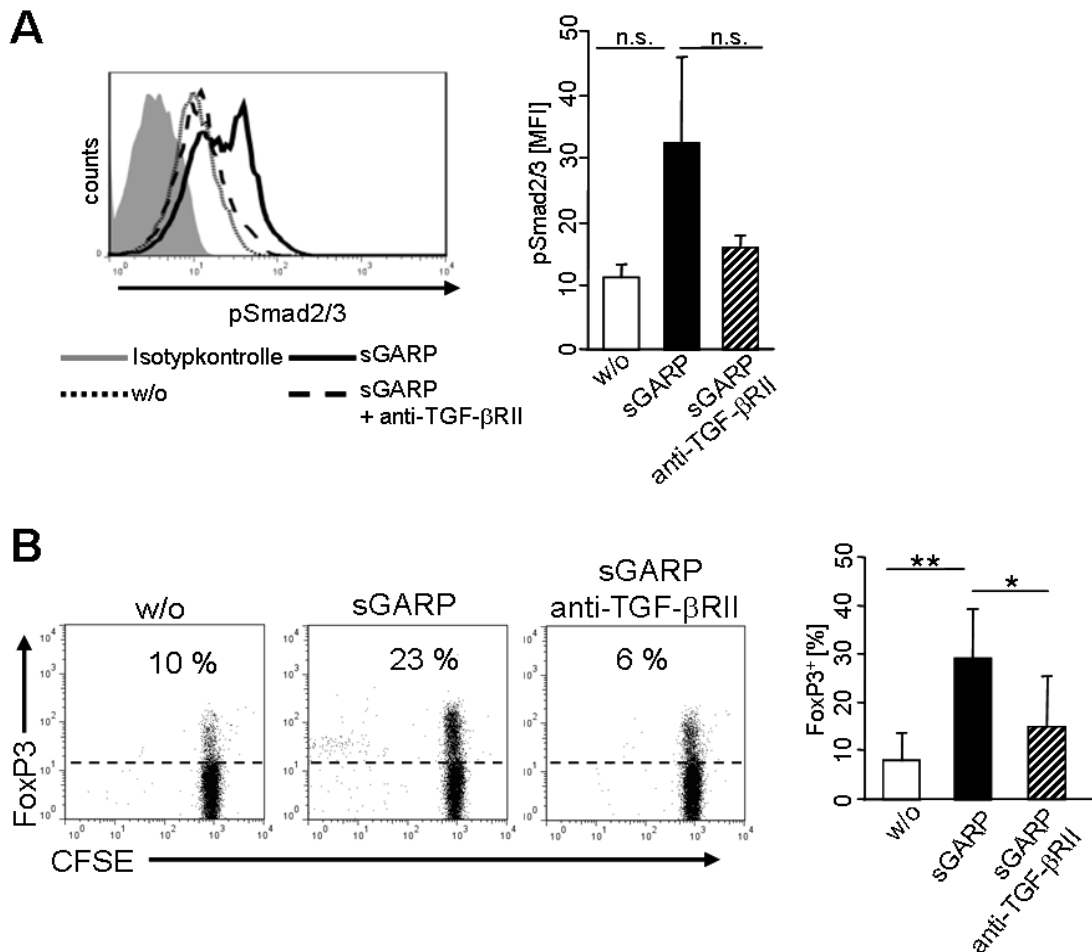


Abb. 3.12 Neutralisation der sGARP-Wirkung durch TGF-β-Rezeptor-Blockade

A Mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut wurden mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk ± sGARP in An- oder Abwesenheit von blockierenden anti-TGF-β-Rezeptor II (anti-TGF-βRII) mAk (10 µg/ml) stimuliert. Smad2/3-Phosphorylierung der CD4⁺ Th-Zellen (Auswahl mittels Doppelfärbung) nach 30 min. Das Histogramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten (links). Das Balkendiagramm (rechts) stellt den Mittelwert ± SEM dar (n.s., nicht signifikant). **B** CFSE-markierte naive CD4⁺ Th-Zellen wurden stimuliert mit anti-CD3 (0,5 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) mAk ± sGARP (1 µg/ml) in An- oder Abwesenheit eines blockierenden anti-TGF-βRII mAk (10 µg/ml). Die FoxP3-Expression (in %) wurde an Tag zwei nach Stimulation gemessen. Abgebildet ist ein repräsentatives Resultat von acht Experimenten (links). Das Balkendiagramm zeigt die Zusammenfassung von acht Experimenten (rechts). Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (*p<0,05; **p<0,01).

Abbildung 3.12. A zeigt, dass die Blockade des TGF-β-Rezeptors II die durch sGARP induzierte Smad2/3-Phosphorylierung vollständig neutralisierte. Die induzierte Phosphorylierung von Smad2/3 (von durchschnittlich 11 auf 32 MFI) konnte durch die Zugabe von anti-TGF-β-Rezeptors II mAk aufgehoben werden (MFI: 16).

Durch eine komplexe Signaltransduktionskaskade induziert durch den TGF-β-Signalweg kommt es u.a. zur Expression von FoxP3.^{31;32} Somit könnte die Blockade des TGF-β-Rezeptors auch die Induktion von FoxP3 durch sGARP

verhindern. Für die Untersuchung dieser Hypothese wurde in naiven CD4⁺ Th-Zellen die FoxP3-Expression in An- und Abwesenheit von anti-TGF- β -Rezeptor II mAk und sGARP analysiert. Wie in Abbildung 3.12. B dargestellt, konnte durch die Blockade des Rezeptors die FoxP3-Induktion durch sGARP vollständig aufgehoben werden. Der Anstieg der Frequenz der FoxP3⁺ Zellen von durchschnittlich 8 % auf 30 % wurde durch die Zugabe des blockierenden anti-TGF- β -Rezeptors II mAk wieder auf 15 % reduziert.

Die FoxP3-Induktion und die Smad2/3-Phosphorylierung durch sGARP sind demnach abhängig von der TGF- β -Signaltransduktion.

3.8 Der Einfluss von sGARP auf die Differenzierung von naiven CD4⁺ Th-Zellen

Durch die Aktivierung des TZR wird die Differenzierung von naiven Th-Zellen eingeleitet. Der Differenzierungsweg wird vom umgebenden Zytokinmilieu beeinflusst.⁴⁶ Die unterschiedlichen Th-Subtypen (Th1, Th2, Th17) werden anhand ihrer Zytokinprofile und der Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren definiert.^{55;56}

3.8.1 sGARP-Stimulation induziert suppressorische T-Zellen

FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor von tTreg und pTreg und wesentlich an ihrer Differenzierung, Stabilität und Funktion beteiligt.^{31;32;87} FoxP3⁺ Treg zeichnen sich durch einen anergen Phänotyp und ihre suppressiven Eigenschaften aus. Die erhöhte Expression von FoxP3 in naiven CD4⁺ Th-Zellen nach Stimulation mit sGARP und die verringerte Proliferation ließen vermuten, dass es hier zur Induktion von pTreg kommen könnte. Für die Analyse dieser Hypothese wurden naive CD4⁺ Th-Zellen in Anwesenheit von sGARP stimuliert, nach sieben Tagen Differenzierungskultur geerntet und in Kokultur mit CD4⁺ Th-Zellen eines 2. Spenders stimuliert. Hierin wurden sie als „Suppressorzellen“ in absteigenden Zellzahlen zu CD4⁺ Th-Zellen aus PBMC hinzu gegeben.

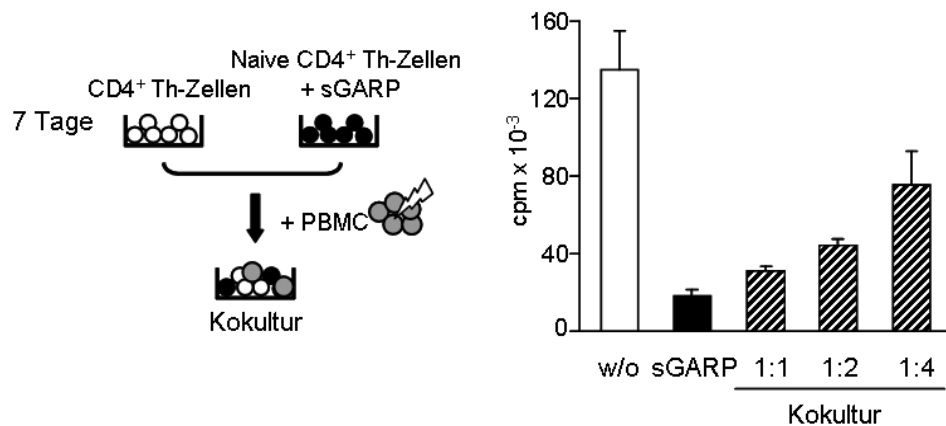


Abb. 3.13 sGARP induziert T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften

Naive CD4⁺ T-Zellen (Spender 1) wurden für sieben Tage in Anwesenheit von anti-CD3 (0,5 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) mAk und sGARP (1 µg/ml) differenziert, geerntet und in den Kokulturen eingesetzt. Als Responderzellen dienten allogene CD4⁺ Th-Zellen (Spender 2), die ebenfalls für sieben Tage mit anti-CD3 (0,5 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) mAk stimuliert wurden. 10⁵ Responderzellen wurden mit Suppressorzellen in absteigender Zellzahl kultiviert. Stimuliert wurden die Kokulturen mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk und 3x10⁵ bestrahlten T-Zell-depletierten PBMC. Die Proliferation wurde durch Einbau von ³H-TdR (Zugabe an Tag 4) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Die Restimulation von CD4⁺ Th-Zellen, die ohne sGARP kultiviert wurden, führte zur deutlichen Proliferation der T-Zellen. Hingegen zeigten naive CD4⁺ Th-Zellen, die in Anwesenheit von sGARP differenziert wurden, einen anergen Phänotyp. Wurden nun beide Populationen kokultiviert, erfolgte eine konzentrationsabhängige Suppression der Th-Zellproliferation durch die in Anwesenheit von sGARP stimulierten Zellen (Abb. 3.13). sGARP war demnach in der Lage, die Differenzierung naiver CD4⁺ Th-Zellen in induzierte pTreg einzuleiten.

3.8.2 sGARP fördert in Gegenwart von IL-6 und IL-23 die Differenzierung zu Th17-Zellen

TGF-β ist ein multifunktionales Zytokin, welches je nach extrazellulärem Milieu und Zelltyp verschiedene Effekte in den Zellen hervorruft. In Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-23 fördert TGF-β die Differenzierung in Th17-Zellen, charakterisiert durch die Expression von IL-17A und dem Transkriptionsfaktor RORγt.^{58;59} Da sGARP - ähnlich wie TGF-β - die Differenzierung von naiven CD4⁺ Th-Zellen beeinflusst (Kap. 3.8.1), wurde geprüft, welchen Effekt sGARP auf die Differenzierung von Th17-Zellen hat. Hierzu wurden naive CD4⁺ Th-Zellen polyklonal stimuliert und in An- und Abwesenheit von sGARP, IL-6 und IL-23 inkubiert.

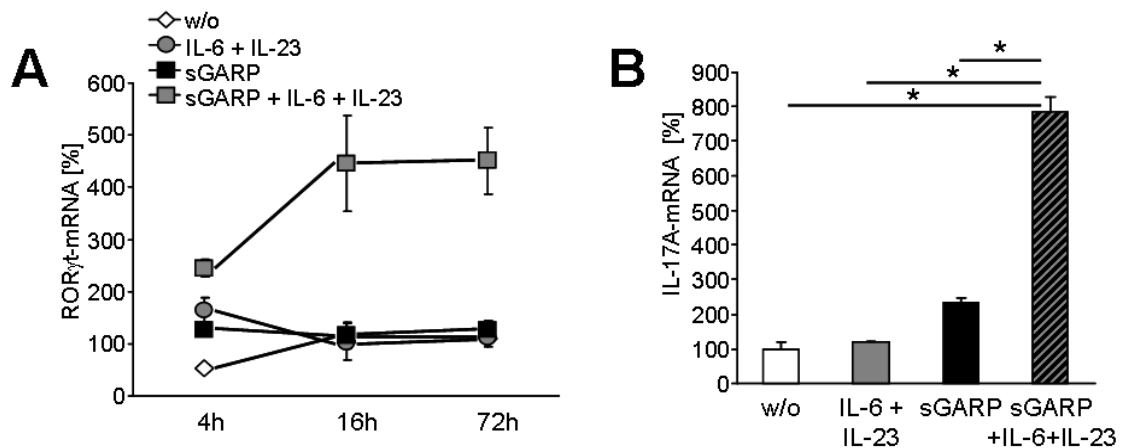


Abb. 3.14 In Gegenwart von IL-6 und IL-23 polarisiert sGARP naive Th-Zellen zu Th-17-Zellen

Naive CD4⁺ Th-Zellen wurden mit anti-CD3 (0,5 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) mAk ± sGARP (1 µg/ml) sowie einer Kombination von IL-6 (200 IU/ml) und IL-23 (100 ng/ml) stimuliert. **A** Die ROR γ t-mRNA-Expression wurde nach 4, 16 und 72 Stunden bestimmt. **B** Die IL-17A-mRNA-Expression wurde nach 72 Stunden gemessen. Die Werte wurden normalisiert auf das Haushaltsgen EF1 α und unbehandelte Zellen. Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche (Mittelwert $\pm$ SEM, *p<0,05).

Interessanterweise führte lediglich die Stimulation in Anwesenheit aller drei Komponenten zu einer stabilen ROR γ t-Expression. Hingegen zeigte sich dies nicht bei getrennter Stimulation der Zellen mit sGARP oder den Zytokinen IL-6 und IL-23 alleine (Abb. 3.14 A). Auch eine erhöhte IL-17A-Expression konnte nur durch in Anwesenheit aller drei Proteine induziert werden (Abb. 3.14 B). Dies spricht für einen additiven Effekt der einzelnen Faktoren auf die Differenzierung naiver Th-Zellen in Th17-Zellen.

Folglich hat sGARP, wie TGF- β , abhängig vom Zytokinmilieu, unterschiedliche Effekte und ist unter inflammatorischen Bedingungen in der Lage die Differenzierung naiver CD4⁺ Th-Zellen zu Th17-Zellen zu fördern.

3.9 Untersuchungen zur Wirkung von sGARP auf CD8⁺ T-Zellen

Neben CD4⁺ Th-Zellen spielen auch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern und malignen Tumoren. Sie patrouillieren durch Blut, Lymphknoten und Organe und interagieren mit körpereigenen Zellen, um diejenigen abzutöten, welche von Krankheitserregern befallen oder modifiziert worden sind. Werden CD8⁺ zytotoxische T-Zellen durch die Bindung an ein MHC-I-Protein aktiviert, schütten sie unter anderem

Perforine und Granzyme aus, welche die Zielzelle in den programmierten Zelltod treiben.^{62;63}

3.9.1 sGARP inhibiert die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen

TGF- β ist ein pleiotropes Zytokin, welches auf verschiedene Zellen unterschiedliche Einflüsse nehmen kann.^{96;97} Aufgrund der Parallelen zwischen TGF- β und sGARP wurde neben der Wirkung auf CD4⁺ Th-Zellen auch der Effekt von sGARP auf CD8⁺ zytotoxische T-Zellen analysiert. Hierzu wurden CD8⁺ T-Zellen aus PBMC isoliert, polyklonal aktiviert und in An- und Abwesenheit von sGARP stimuliert. Um zu untersuchen, ob sich Stimulation mit sGARP auf die Proliferation der Zellen auswirkt, wurden die Zellen mit CFSE markiert.

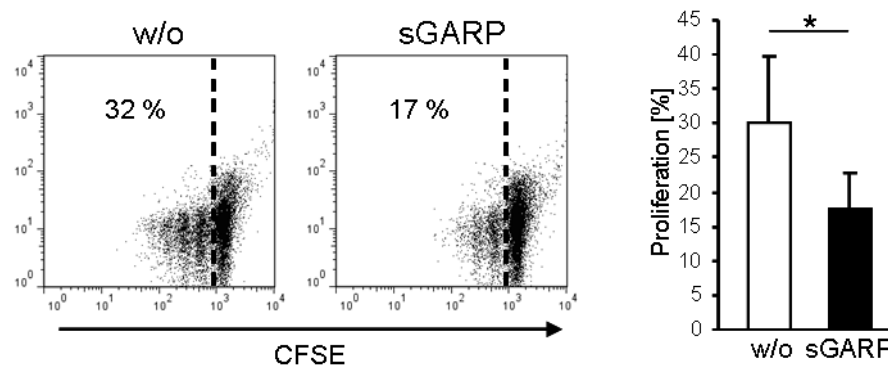


Abb. 3.15 sGARP führte zur reduzierten Proliferation von CD8⁺ T-Zellen

CFSE-markierte CD8⁺ T-Zellen wurden mit anti-CD3 (0,5 μ g/ml) und anti-CD28 (1 μ g/ml) mAk $\pm$ sGARP (1 μ g/ml) stimuliert. Die Proliferation wurde an Tag 4 mittels Durchflusszytometrie gemessen. Abgebildet ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments (links). Das Balkendiagramm zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM, *p<0,05.

Es zeigte sich, dass durch die Zugabe von sGARP die Proliferation von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen signifikant supprimiert wurde. Die Proliferation lag bei den unbehandelten Zellen bei durchschnittlich 30 % und wurde in Anwesenheit von sGARP auf 17 % reduziert (Abb. 3.15).

3.9.2 sGARP reduziert die Granzym B-Expression in CD8⁺ T-Zellen

Neben der Proliferation sollten wichtige Effektorfunktionen der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in Anwesenheit von sGARP analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Expression des Enzyms Granzym B bestimmt. Granzym B ist für die zytotoxische Funktion von CD8⁺ T-Zellen essentiell, da es

die Zielzelle in den programmierten Zelltod treibt. CD8⁺ T-Zellen wurden in Gegenwart von sGARP kultiviert und an Tag 4 durchflusszytometrisch analysiert.

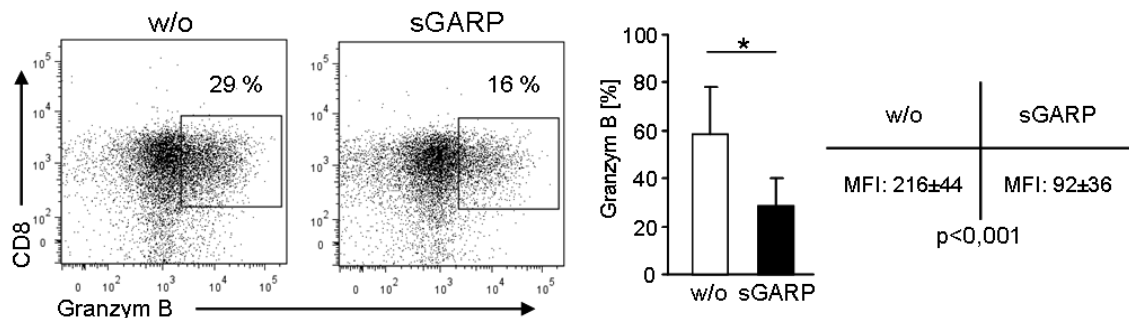


Abb. 3.16 sGARP führte zur Reduktion von Granzym B in CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺ T-Zellen wurden mit anti-CD3 (0,5 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) mAk ± sGARP (1 µg/ml) stimuliert. Die Analyse von Granzym B wurde an Tag 4 durchgeführt. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment (links). Das Balkendiagramm zeigt die Zusammenfassung der Prozentwerte von sechs unabhängigen Experimenten (Mitte). Die Tabelle zeigt die Zusammenfassung der MFI von sechs unabhängigen Experimenten (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, *p<0,05, ***p<0,001.

Die Addition von sGARP führte zur signifikanten Reduktion von Granzym B in CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. Abbildung 3.16. zeigt, dass die Anzahl Granzym B-positiver T-Zellen von 29 % auf 16 % abnahm. Die MFI-Werte zeigten zudem eine verringerte Expressionsstärke in Anwesenheit von sGARP.

3.10 Die Wirkung von sGARP im humanisierten Mausmodell der GvHD

Der beschriebene Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung sowie die Induktion von regulatorischen T-Zellen zeigt ein immunregulatorisches Potential von sGARP im Zusammenhang mit inflammatorischen T-Zellreaktionen *in vitro*. Um die Wirkung von sGARP auf die Immunregulation *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Mausmodell einer xenogenen Graft-versus-Host Disease (GvHD) verwendet. Das Modell beruht auf den adoptiven Transfer humaner PBMC in immundefiziente Mäuse. Die übertragenen humanen T-Zellen reagieren auf inkompatible MHC -Moleküle des murines Gewebes und lösen eine massive Immunreaktion gegen den Empfängerorganismus aus. Diese GvHD führt u.a. zu Gewichtsverlust, Hepatitis sowie zur Entzündung der Haut und letztendlich zum Tod der Tiere.⁷⁷ Dass die humanen T-Zellen der Auslöser der GvHD sind wird dadurch bestätigt, dass es bei T-Zell-depletierten PBMC zu keiner GvHD

kommt.⁸² Dieses Transfermodell bietet die Möglichkeit zur *in vivo*-Untersuchung von humanen T-Zellfunktionen und deren Modulation durch sGARP.

Für die vorliegende Arbeit wurden neugeborene Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse verwendet, die aufgrund von fehlenden T-, B- und NK-Zellen sich nicht gegen die transferierten Zellen immunologisch wehren können (keine Transplantatabstoßung) und bereits nach einem Transfer von 5x10⁶ humaner PBMC eine letale GvHD entwickeln.

3.10.1 Regulatorische T-Zellen verhindern dosisabhängig eine GvHD

Die GvHD basiert auf der aggressiven humanen T-Zellreaktion gegen das murine Gewebe. Da tTreg in der Lage sind die Reaktivität der T-Zellen zu supprimieren, können sie die schädliche Immunreaktion und folglich die GvHD verhindern.⁷⁷ Um die Effektivität von tTreg zur Unterdrückung der GvHD in dem gewählten Mausstamm zu analysieren, wurden neugeborene Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse interperitoneal 5x10⁶ humane PBMC injiziert und zusätzlich tTreg im Verhältnis von 20:1, 10:1 und 4:1 appliziert.

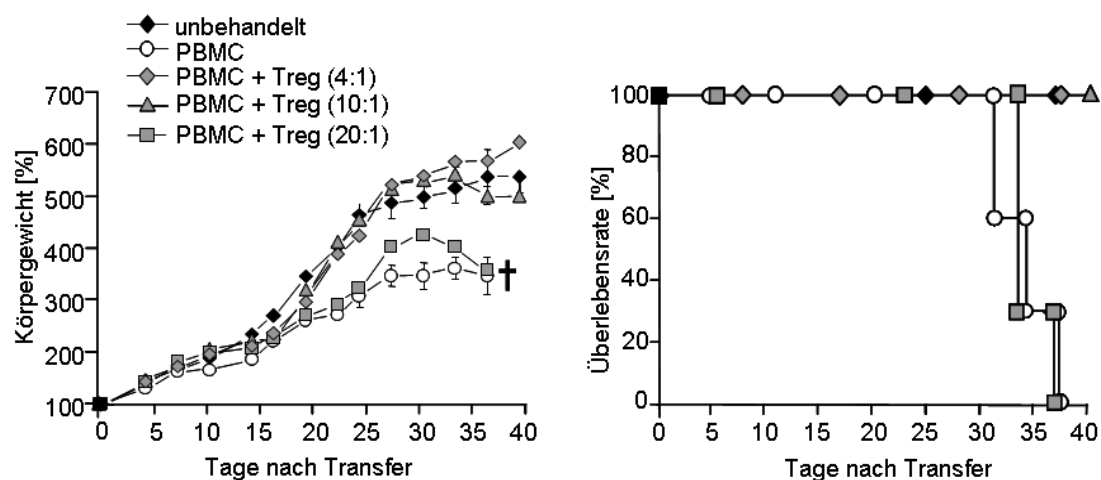


Abb. 3.17 Dosisabhängige Protektion einer GvHD durch tTreg

5x10⁶ humane PBMC mit oder ohne einer titrierten Anzahl von tTreg wurden neugeborenen Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen interperitoneal appliziert. Unbehandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Dargestellt wurde die prozentuale Gewichtszunahme (links) und das Überleben der Tiere (rechts) über einen Zeitraum von 40 Tagen. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe wurde dargestellt.

Wie in Abbildung 3.17 dargestellt, führte der Zusatz von tTreg dosisabhängig zu einer Inhibition der GvHD. In diesem wie in den nachfolgenden Versuchen diente die normale Gewichtszunahme unbehandelter Mäuse als Kontrolle. Der Transfer von humanen PBMC in die Rezipienten führte zu einer ausgeprägten

GvHD. Die Tiere wiesen eine geringe Gewichtszunahme und eine hohe Sterberate auf. Wurden den Tieren die Kombination von PBMC und tTreg im Verhältnis von 4:1 bzw. 10:1 (PBMC:Treg) injiziert, konnte die GvHD nahezu vollständig unterdrückt werden, die Tiere zeigten ein normales Wachstum und hatten eine normale Lebenserwartung. Die Applikation von PBMC und tTreg im Verhältnis von 20:1 konnte dagegen die Entstehung der GvHD nicht verhindern. Es kam zu einem deutlichen Gewichtsverlust und dem Versterben der Mäuse nach spätestens 38 Tagen. tTreg können somit die GvHD dosisabhängig unterdrücken.

3.10.2 Die Applikation von sGARP verstärkt die protektive Wirkung regulatorischer T-Zellen

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob sGARP eine immunsuppressive Wirkung *in vivo* hat und die regulatorische Funktion der tTreg unterstützen kann. Hierzu wurden Tiere, die PBMC und tTreg in einem nicht protektiven Verhältnis von 20:1 erhielten, zusätzlich mit einer Dosis von 5 µg sGARP behandelt.

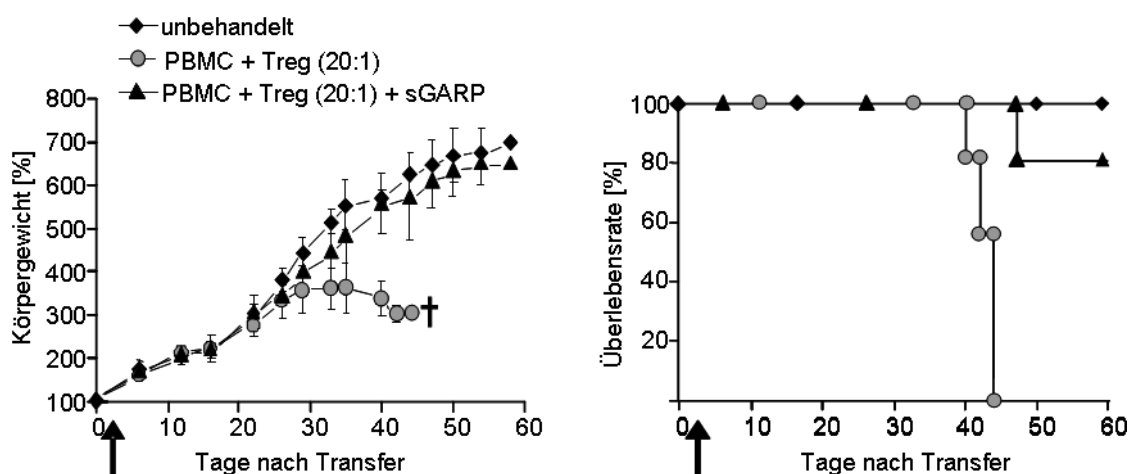


Abb. 3.18 Lösliches GARP verstärkt die immunsuppressive Funktion von tTreg *in vivo*
 5×10^6 humane PBMC und tTreg im Verhältnis von 20:1 wurden allein oder zusammen mit sGARP (5 µg/Maus) interperitoneal in neugeborene Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse transferiert. Unbehandelte Mäuse dienen als Kontrolle. Dargestellt ist die prozentuale Gewichtszunahme (links) und das Überleben der Tiere (rechts) über einen Zeitraum von 60 Tagen. Ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Mäusen pro Gruppe ist dargestellt. Pfeil = Injektionszeitpunkt von sGARP.

Es zeigte sich, dass bereits die einmalige Gabe von sGARP die suppressive Wirkung der tTreg soweit verstärkte, dass die Mäuse eine normale Zunahme des Körpergewichts zeigten und 80 % der Tiere den PBMC-Transfer überlebten (Abb. 3.18). Daraus konnte geschlossen werden, dass ein synergistischer

Effekt von sGARP und tTreg besteht, welcher wirkungsvoll die entzündliche T-Zellantwort bei der GvHD unterdrückt.

3.10.3 In Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen kann die einmalige Gabe von sGARP eine GvHD nicht verhindern

Als nächstes wurde analysiert, ob sGARP auch allein, in Abwesenheit von tTreg, die Entstehung der GvHD verhindern kann. Für diese Analyse wurden den Tieren nur humane PBMC plus/minus sGARP einmalig injiziert.

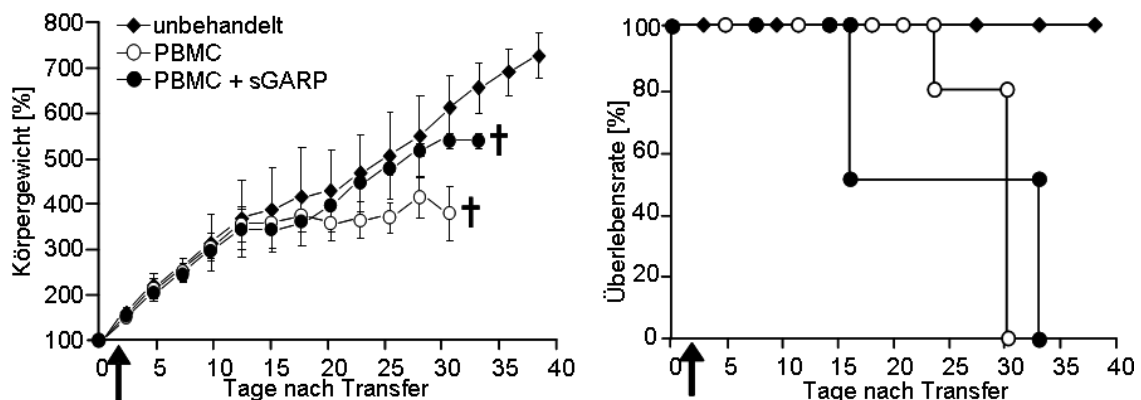


Abb. 3.19 sGARP allein kann eine GvHD nicht unterdrücken

5×10^6 humane PBMC in An- oder Abwesenheit von sGARP ($5 \mu\text{g}/\text{Maus}$) wurden in neugeborene $\text{Rag}2^{-/-}\gamma\text{c}^{-/-}$ -Mäuse interperitoneal transferiert. Unbehandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Dargestellt ist die prozentuale Gewichtszunahme (links) und das Überleben der Tiere (rechts) über einen Zeitraum von 40 Tagen. Ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils fünf Mäusen pro Gruppe wurde dargestellt. Pfeil = Injektionszeitpunkt von sGARP.

Abbildung 3.19 demonstriert, dass es durch die einmalige Administration von sGARP ohne zusätzlichen tTreg-Transfer nicht zu einem Schutz der Tiere vor der GvHD kam. Es konnte lediglich ein verzögerter Gewichtsverlust nach Injektion von sGARP beobachtet werden. Letztlich konnte sGARP aber die GvHD und den Tod der Tiere nicht verhindern.

3.10.4 Unterdrückte Ausbildung einer GvHD nach repetitiver sGARP-Injektion

Da die einmalige Gabe von sGARP allein nicht zu einem Schutz vor einer GvHD führte, wurde im Folgenden sGARP repetitiv (drei Mal hintereinander in Abstand von 48 Stunden) verabreicht. Zusätzlich erfolgte zur Kontrolle der eventuellen Wirkung der Fc-Domäne von sGARP die Applikation eines Kontrollproteins.

Wie die Resultate zeigten (Abb. 3.20 A), führte die mehrmalige Gabe von sGARP auch ohne zusätzlichen tTreg-Transfer zur Protektion der Tiere vor der

Entwicklung einer GvHD. 90 Prozent der Tiere überlebten bis zum Ende des Versuchs, die Gewichtsentwicklung nach wiederholter Applikation von sGARP verlief annähernd parallel zu den gesunden, unbehandelten Tieren. Das Kontrollprotein hatte keinen Einfluss auf den GvHD-Verlauf, die Mäuse verstarben vergleichbar schnell wie die PBMC behandelten Tiere. In der Abbildung 3.20 B wurde exemplarisch das Erscheinungsbild der drei verbleibenden Versuchsgruppen, Gruppe mit Kontrollprotein war bereits verstorben, an Tag 27 dargestellt. Im Gegensatz zu den nur mit PBMC behandelten Mäusen war deutlich erkennbar, dass sGARP die Gewichtszunahme der Tiere normalisierte.

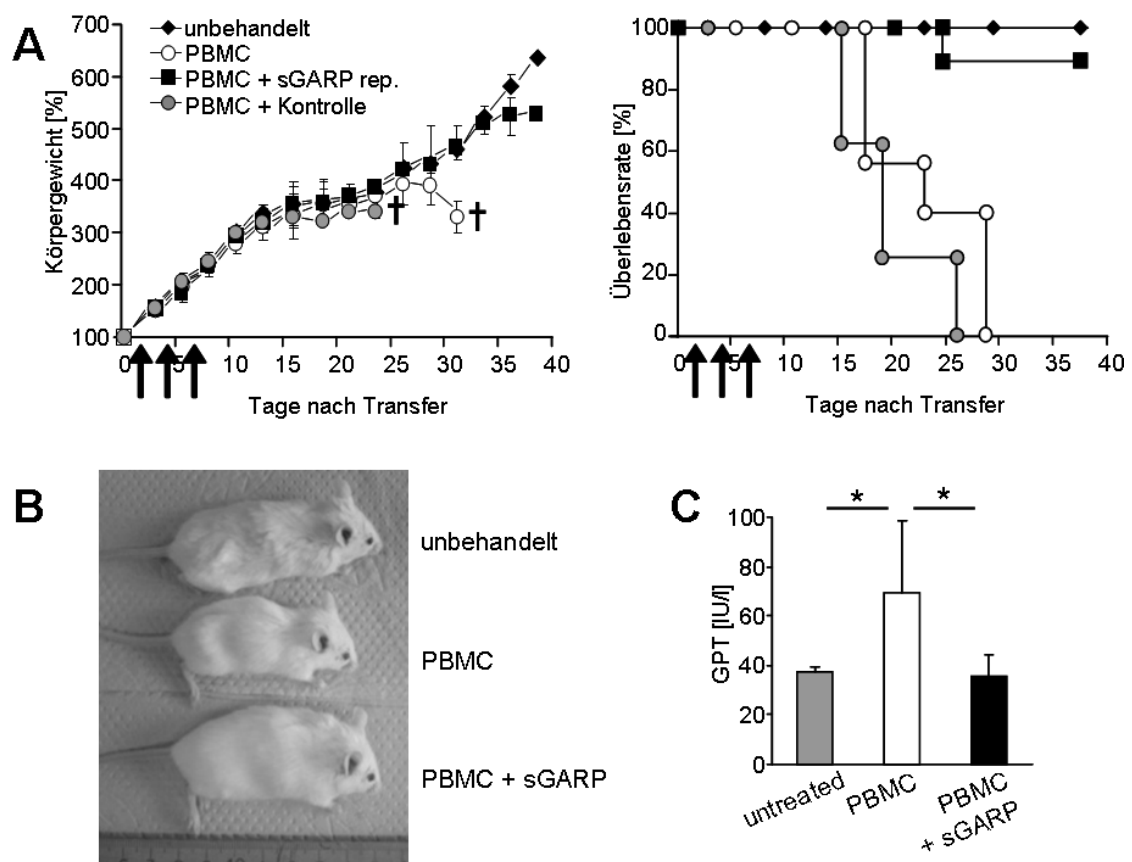


Abb. 3.20 Die repetitive Gabe von sGARP führt zur Unterdrückung einer GvHD

A 5×10^6 humane PBMC in An- oder Abwesenheit von sGARP (5 $\mu\text{g}/\text{Maus}$) oder dem Kontrollprotein wurden in neugeborene $\text{Rag}2^{-/-}\gamma\text{C}^{-/-}$ -Mäuse interperitoneal transferiert. sGARP wurde insgesamt drei Mal hintereinander im Abstand von zwei Tagen injiziert (sGARP rep.). Unbehandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Dargestellt ist die prozentuale Gewichtszunahme (links) und das Überleben der Tiere (rechts) über einen Zeitraum von 40 Tagen. Ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils sechs Mäusen pro Gruppe wurde dargestellt. Pfeile = Injektionszeitpunkte von sGARP. **B** Mäuse an Tag 27 nach Transfer der PBMC mit und ohne repetitiver Gabe von sGARP. **C** GPT-Werte im Serum der Mäuse an Tag 20 nach Transfer der PBMC, mit und ohne repetitiver Gabe von sGARP. Acht Mäuse pro Gruppe. Dargestellt wurden die Mittelwerte $\pm$ SEM, * $p < 0,05$.

Ein wichtiger klinischer Parameter für die Entwicklung einer GvHD ist die durch eine Leberentzündung bedingte Erhöhung der GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) -Werte.⁹⁸ Um diese untersuchen zu können, wurde den Tieren an Tag 20 Blut abgenommen. Mit PBMC behandelte Mäuse zeigten einen signifikanten Anstieg des GPT-Levels. Im Kontrast dazu hatte die repetitive Gabe von sGARP keine Veränderung der GPT-Werte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zur Folge (Abb. 3.20 C).

Die wiederholte Injektion von sGARP führte zu einem Schutz vor einer GvHD und einer GvHD-vermittelten Leberentzündung. Diese Ergebnisse verdeutlichten das Potential von sGARP eine systemische, inflammatorische T-Zellimmunantwort *in vivo* zu unterbinden.

3.10.5 Untersuchung der Th-Zellen nach sGARP-Injektion

Um die modulatorischen Effekte von sGARP auf humane T-Zellen in dem *in vivo* Modell der xenogenen GvHD detailliert analysieren zu können, wurden die transferierten Zellen reisoliert und *ex vivo* durchflusszytometrisch analysiert. Hierfür wurden die Tiere nach repetitiver Behandlung mit sGARP sowie den Kontrollen wie in Kap. 3.10.4 beschrieben an Tag sieben getötet, die Milzen entfernt und die Milzzellen gewonnen. Nach der Erythrozytenlyse wurde der Phänotyp der humanen Zellen direkt analysiert. Für die Messung der intrazellulären Zytokinproduktion wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin für vier Stunden stimuliert. Bei der Durchflusszytometrie wurde durch Mehrfachfärbung eine Selektion auf lebende humane CD4⁺ Th-Zellen durchgeführt.

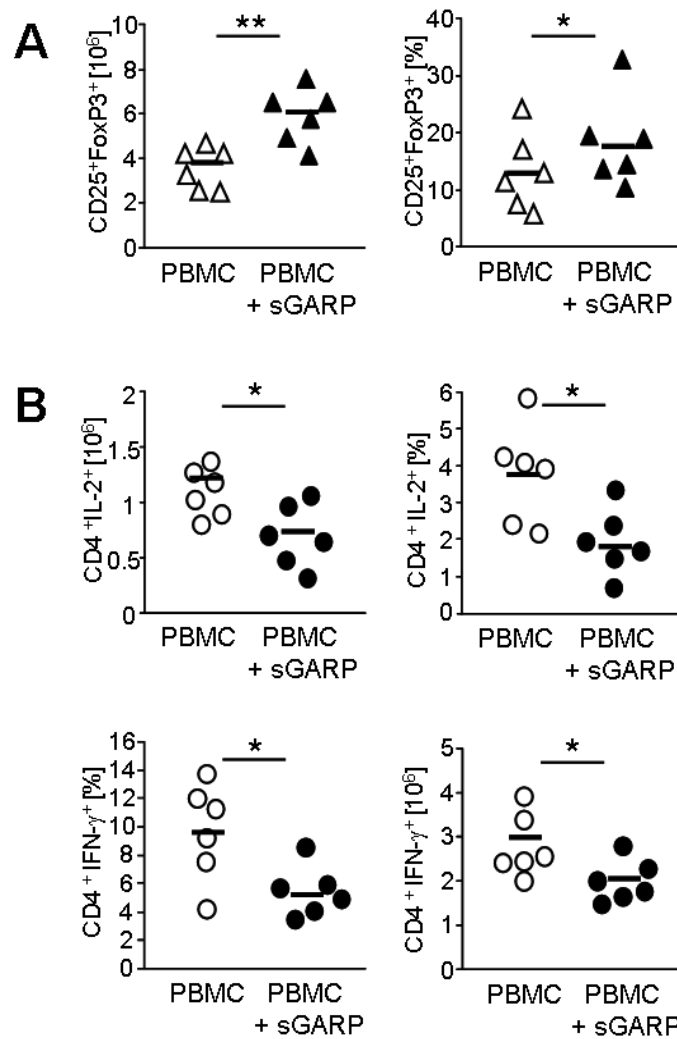


Abb. 3.21 Die Applikation von sGARP induziert CD25⁺FoxP3⁺ Zellen und reduziert die Zytokinproduktion von Th-Zellen *in vivo*

5x10⁶ humane PBMC wurden in An- oder Abwesenheit von sGARP (5 µg/Maus) oder dem Kontrollprotein in neugeborene Rag2^{yc-/-}-Mäuse interperitoneal transferiert. sGARP wurde drei Mal hintereinander alle zwei Tag injiziert. Am Tag sieben wurden die humanen Zellen aus der Milz reisoliert. Analyse mittels Durchflusszytometrie. **A** Dargestellt ist der relative Anteil an CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen bezogen auf den Anteil von humanen CD4⁺ Th-Zellen **B** intrazelluläre Färbung von IL-2 (oben) und IFN-γ (unten) in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Th-Zellen. Relative und absolute Zellzahlen, horizontale Balken repräsentieren den Mittelwert von n=6; *p<0,05; **p<0,01.

Die repetitive Applikation von sGARP führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen sowohl in absoluten Werten (Abb. 3.21 A, links) als auch im relativen Prozentsatz von CD4⁺ Th-Zellen (rechts). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine Induktion von pTreg oder einer Expansion von intrinsischen tTreg durch sGARP *in vivo*. Zusätzlich konnte durch die Anwesenheit von sGARP eine signifikant verringerte Produktion der Zytokine

IL-2 und IFN- γ von CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻ Th-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.21.B).

Dies bestätigte die erhobenen *in vitro* Daten, die zeigten, dass sGARP die Expression von IL-2 und IFN- γ in naiven CD4⁺ Th-Zellen signifikant reduzieren kann (Kap. 3.5.3). Zusammengefasst lassen diese *in vivo* Ergebnisse auf ein anti-inflammatorisches und immunsuppressives Potential von sGARP durch eine Induktion bzw. Expansion von T-Zellen mit regulatorischem Phänotyp schließen.

3.11 GARP wird aus der Membran von CD25⁺ T-Zellen herausgelöst

Für die Analyse der tTreg unabhängigen Wirkung von GARP wurde ein rekombinantes sGARP Protein verwendet, das die extrazelluläre Domäne des membrangebundenen GARP enthält (siehe Kap. 3.3). Unklar war, ob lösliches GARP auch von den tTreg selbst gebildet werden kann. Durch verschiedene Mechanismen kann es zu einer Ablösung von membranständigen Proteinen kommen, zum Beispiel durch die enzymatische Aktivität von Disintegrin-Metalloproteasen.⁹⁹ Daher war es interessant zu untersuchen, ob es auch bei GARP zu einem Herauslösen aus der Membran kommen kann und GARP somit unter physiologischen Bedingungen als lösliches Protein wirksam sein könnte. Um dies zu analysieren, wurden tTreg und als Kontrolle CD4⁺CD25⁻ Th-Zellen aus PBMC isoliert und stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Kulturüberstände abgenommen bzw. die Zellen lysiert. Nach Aufkonzentration der Kulturüberstände mittels Acetonfällung wurden sowohl die Überstände als auch die Zelllysate auf das Vorhandensein von löslichem GARP untersucht. Als Positivkontrolle diente rekombinantes, lösliches GARP.

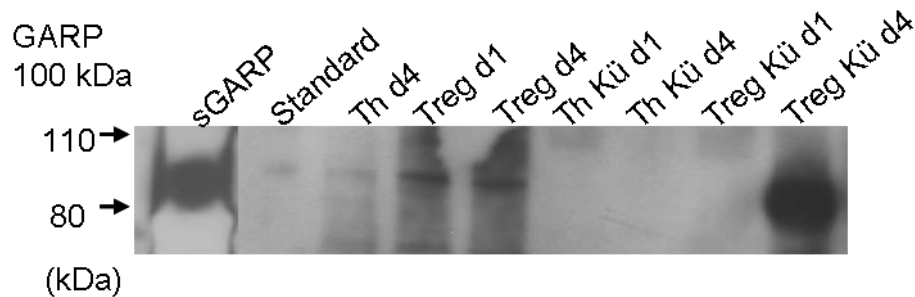


Abb. 3.22 Lösliches GARP im Kulturüberstand von aktivierten tTreg

tTreg und CD4⁺CD25⁻ Th-Zellen (Th) wurden mit anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) mAk stimuliert. An Tag eins und vier wurden Kulturüberstände (Kü) abgenommen und untersucht. Die Zellen wurden lysiert und zusammen mit den Kulturüberständen mittels Western Blot analysiert. Rekombinantes sGARP wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt ist ein repräsentativer Plot von zweien. Proteinstandard diente zur Detektion der Banden bei 80 und 110 kDa.

Abbildung 3.22 zeigt den Nachweis von löslichem GARP im Kulturüberstand von aktivierten tTreg. Die Positivkontrolle zeigt eine spezifische Bande (ganz links) nach Färbung mit einem anti-GARP mAk. Ein schwacher Nachweis von GARP konnte im Zelllysate der tTreg an Tag 1 und 4 detektiert werden. Deutlich mehr lösliches GARP war im Kulturüberstand aktivierter tTreg an Tag 4 nachweisbar (ganz rechts). Bei den Th-Zellen konnte dagegen zu keinem Zeitpunkt im Kulturüberstand lösliches GARP nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass lösliches GARP von aktivierten tTreg freigesetzt werden kann.

4. Diskussion

Sich im Thymus entwickelnde CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (tTreg) verhindern die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und allergischen Reaktionen.^{100;101} tTreg selbst sind *in vitro* anerg und supprimieren Zellkontakt-abhängig die Proliferation und Zytokinbildung von T-Helferzellen (Th-Zellen). tTreg exprimieren konstitutiv den Transkriptionsfaktor FoxP3, welcher eng mit ihrer Entwicklung und Funktion in Zusammenhang steht.^{9;102;103} Die eindeutige Charakterisierung der tTreg wird jedoch erschwert durch das Fehlen eines spezifischen Oberflächenmarkers, da auch aktivierte Th-Zellen die tTreg-assoziierten Marker CD25 und FoxP3 exprimieren können.³⁶ Die Arbeiten von Wang et. al identifizierten GARP (Glycoprotein A repetitions predominant) als spezifischen Oberflächenmarker auf aktivierten tTreg.³⁹ Dies konnte durch differentielle Proteomanalysen von tTreg und Th-Zellen in der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt werden.¹⁰⁴ Bei vergleichenden Analysen von stimulierten und unstimulierten tTreg und Th-Zellen wurde GARP nur nach Aktivierung auf tTreg mit FoxP3 koexprimiert.

Strukturfunktionsanalysen von membrangebundenem GARP auf tTreg zeigten, dass die funktionelle Region die extrazelluläre Domäne ist, zu deren Aufgaben die Bindung von latentem TGF- β (Transforming Growth Factor beta) gehört.³⁹ Durch verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel die enzymatische Aktivität von Disintegrin-Metalloproteasen, kann es zur Abspaltung von extrazellulären Domänen der Membranproteine kommen. Insbesondere ADAM (A disintegrin and metalloproteinases) sind in der Lage, Transmembranproteine direkt an der Zelloberfläche zu spalten.⁹⁹ Neueste Publikationen postulieren zudem, dass es nach der Transfektion von GARP in humane und murine Zellen zu einer Abspaltung des GARP-TGF- β -Komplexes von der Zelloberfläche kommen kann.¹⁰⁵ Da GARP als Transmembranprotein auf aktivierten tTreg exprimiert wird, wurden die Kulturüberstände von stimulierten tTreg auf das Vorhandensein von GARP untersucht. Präliminäre Analysen zeigten, dass GARP in den Überständen von aktivierten tTreg, nicht aber in Kulturüberständen von Th-Zellen, nachgewiesen werden konnte.

Im Focus dieser Arbeit stand die tTreg-unabhängige Analyse von löslichem GARP (sGARP) als funktioneller Modulator von T-Zellfunktionen.

Untersuchungen von GARP als Aktivierungsmarker von tTreg zeigten, dass GARP TGF- β und LAP (Latency Associated Protein) bindet.⁴¹ TGF- β ist ein pleiotropes Zytokin, welches auf die Zellproliferation, -differenzierung und -funktion von T-Zellen Einfluss nehmen kann. Seine Anwesenheit fördert in naiven CD4⁺ Th-Zellen die Differenzierung zu peripheren regulatorischen T-Zellen (pTreg) und induziert die Expression von FoxP3.^{30;97;106} Ein Beziehung zwischen FoxP3 von GARP wurden bereits 2008 aufgezeigt. Die Analysen demonstrierten, dass es durch die Herabregulation von GARP mittels siRNA in tTreg zu einer verminderten FoxP3-Expression in diesen Zellen kam.⁴⁵

Ein Zusammenhang zwischen FoxP3 und sGARP konnten auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Durch die Anwesenheit von sGARP kam es in naiven CD4⁺ Th-Zellen zu einer Induktion von FoxP3, einer reduzierten Proliferation und einer verminderten Zytokinproduktion von IL-2 und IFN- γ . Diese mit sGARP generierten Resultate widerlegen die Annahme, dass für die Modulation der T-Zellfunktion GARP in der Membran verankert sein muss⁴³ und zeigen erste Parallelen in der Wirkweise von GARP und TGF- β auf.

Der Nachweis der FoxP3-Expression mittels Durchflusszytometrie wurde in der Literatur mehrfach diskutiert.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Hierbei waren die unterschiedlich starken, positiven Signale der verschiedenen anti-FoxP3 mAk Gegenstand der Debatte. Zusätzlich wird die Detektion von FoxP3 dadurch erschwert, dass der Transkriptionsfaktor nicht nur von Treg sondern auch von aktivierten Th-Zellen exprimiert wird.^{36;88} Tran et al. (2007) konnte zeigen, dass die starke Expression von FoxP3, detektiert mit mAk PCH101, nicht auf PCR-Ebene bestätigt werden konnte.^{107;108} Dies konnte anhand von Analysen an CD4⁺ Th-Zellen in dieser Arbeit bestätigt werden. Zellen, die ohne TGF- β kultiviert wurden, zeigten bei der Verwendung des FoxP3 mAk PCH101 bereits ein viel höheres Signal als mit mAk 259D. Für den spezifischen Nachweis von FoxP3 mittels Durchflusszytometrie war mAk 259D der geeignetere Antikörper.

Von besonderer Bedeutung für die Aktivierung von T-Zellen ist neben der TZR-Aktivierung die Präsenz von kostimulatorischen Signalen.¹¹⁰ In Abwesenheit eines geeigneten Kostimulus kommt es zur unvollständigen Aktivierung, die

Anergie oder Apoptose auslösen kann.¹¹¹ Aus der Literatur ist bekannt, dass der Einfluss von TGF- β auf die T-Zellproliferation abhängig ist von der Stärke des TZR-Signals und der Kostimulation. Bei schwacher T-Zellstimulation ist ein größerer anti-proliferativer Effekt durch TGF- β festzustellen als bei einer stärkeren Stimulation.¹¹² Entscheidender Faktor für die suppressiven Effekte von TGF- β in dieser Arbeit war die Kostimulation mit anti-CD28 mAk. Bei einem starken Kostimulus führte die Stimulation mit TGF- β zur Induktion mit FoxP3, bei einem niedrigen Kostimulus zur Reduktion der T-Zellproliferation.

Als einer der möglichen Wirkungsbereiche von membrangebundenem GARP wird die Funktion als Rezeptor für den Komplex aus TGF- β und LAP postuliert.⁴³ Durch die Bindung von TGF- β an GARP sind tTreg in der Lage, TGF- β an den Ort der Entzündung zu transportieren. Eine der ersten Publikationen hierzu beschreibt GARP als Membranprotein auf Thrombozyten,⁴¹ welche hohe Mengen von TGF- β direkt zu Beginn einer Inflammation freisetzen können.¹¹³ Somit könnte GARP auch auf Thrombozyten für den Transport von TGF- β dienen. Zusätzlich zu dieser passiven Rolle von GARP als TGF- β -Transporter, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sGARP die Produktion von TGF- β in naiven CD4⁺ Th-Zellen anregt und somit zum Mechanismus der infektiösen Toleranz beiträgt.²¹ Die infektiöse Toleranz beschreibt das Phänomen, dass tTreg und pTreg zusammen autoaggressive T-Zellantworten unterdrücken und hierbei sekundäre T-Helfer-Suppressorzellen induzieren, die dann wiederum selbst immunmodulierende Zytokine wie TGF- β produzieren.²² Die Induktion der TGF- β -Produktion in naiven CD4⁺ Th-Zellen durch sGARP könnte zudem ein Grund für die vergleichbare Wirkweise der beiden Proteine sein.

Wie bereits erwähnt, bindet membrangebundenes GARP auf tTreg latentes TGF- β und LAP.^{40;41} Stockie et al. (2009) konnte dies auch für lösliches GARP nachweisen. Nach unserer Annahme, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen, bildet sGARP zusammen mit LAP und TGF- β einen Komplex, welcher an den TGF- β -Rezeptor binden kann und so die TGF- β -Signaltransduktion induziert. Die Bindung eines Liganden an den TGF- β -Rezeptor führt zur Phosphorylierung der Smad-Proteine.²⁹ Die vorliegende

Arbeit konnte zeigen, dass sGARP mit der TGF- β -Signaltransduktion assoziiert ist und es durch sGARP zur Phosphorylierung von Smad2/3 kam. Weiterhin wurde demonstriert, dass die Blockade des TGF- β -Rezeptors die Wirkung von sGARP hinsichtlich der Phosphorylierung von Smad2/3 und der Induktion von FoxP3 blockiert. sGARP ist demnach in der Lage, durch die Bindung an den TGF- β -Rezeptor die Signaltransduktion von TGF- β zu aktivieren. Ob hierfür die Gegenwart von TGF- β essentiell ist, sollte Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

Die erhöhte Expression von FoxP3, die reduzierte Produktion von Zytokinen wie IL-2 und IFN- γ sowie die verringerte Proliferation sind Charakteristika von tTreg und pTreg.^{87;89;114} Die Stimulation mit sGARP induzierte diesen Phänotyp in naiven CD4⁺ Th-Zellen. Die Analysen zeigten, dass sGARP eine Differenzierung zu suppressiven pTreg induzieren kann

Unter inflammatorischen Bedingungen, in Anwesenheit von IL-6 und IL-23, kann TGF- β die Induktion von Th17-Zellen begünstigen, inflammatorische Th-Zellen, die IL-17 synthetisieren und aktiv Entzündungsprozesse einleiten.^{115;116} In Gegenwart von IL-6 und IL-23 konnte auch sGARP – analog zu TGF- β - die Differenzierung von Th17-Zellen induzieren, charakterisiert durch die Expression von ROR γ t und die Produktion von IL-17A. Dieses Resultat stimmt mit der Literatur überein, welche belegt, dass der membrangebundene GARP/TGF- β -Komplex auf murinen Treg unter inflammatorischen Bedingungen bei der Entstehung von Th17-Zellen involviert ist.⁴⁴

Der Einsatz von TGF- β *in vivo* als immunsuppressives Therapeutikum ist aufgrund der pleiotropen Wirkweise und der ubiquitären Expression des TGF- β -Rezeptors stark limitiert. Die Regulation der TGF- β -Aktivität ist der kritische Faktor, um die lokale Wirkung als Arznei zu kontrollieren. Daher könnte die Gabe von sGARP ein potentieller Weg sein, die Wirkung von TGF- β zu kontrollieren und im Hinblick auf therapeutischen Nutzen zu ersetzen. Wie diese Studien belegen, war die Wirkung von sGARP auf den frühen Aktivierungsprozess von naiven CD4⁺ Th-Zellen beschränkt. Differenzierte CD4⁺CD45RO⁺ Th-Zellen wurden durch die Stimulation mit sGARP nicht beeinflusst. Zudem scheint die Intensität der sGARP-Wirkung mit der TGF- β -

Rezeptor-Expression zu korrelieren. Zusätzlich konnte *in vivo* ein synergistischer Effekt von sGARP mit tTreg festgestellt werden.

Der Effekt von sGARP ist abhängig von der Existenz des TGF- β -Rezeptor. In der Literatur ist mehrfach dokumentiert, dass TGF- β eine Vielzahl von Immunzellen beeinflussen kann, wie z.B. B-Zellen^{96;117} und NK-Zellen¹¹⁸ (natürliche Killerzellen). Der TGF- β -Rezeptor wird folglich auch von diesen Zellen exprimiert.^{97;119} Demnach hätte möglicherweise sGARP das Potential auch auf diese Immunzellen Einfluss zu nehmen. Die Expression von GARP wurde darüber hinaus im Gewebe von Mausembryos und verschiedenen humanen Tumoren festgestellt.^{37;120-122} Eine weitere wichtige Population für die Immunregulation sind CD8⁺ T-Zellen. Thomas et al. (2005) beschrieben, dass TGF- β die Expression von zytolytischen Genprodukten in CD8⁺ T-Zellen unterdrückt.¹²³ sGARP konnte in dieser Arbeit die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen reduzieren und die Produktion des zytolytischen Proteins Granzym B inhibieren. sGARP ist damit potentiell in der Lage eine durch CD8⁺ T-Zellen vermittelte Immunabwehr zu modulieren.

Neben der modulatorischen Wirkung von sGARP *in vitro*, konnte das immunsuppressive Potential von sGARP in einem GVHD-Modell in humanisierten Mäusen *in vivo* untersucht werden. Die GvHD ist eine T-Zell-abhängige Erkrankung, deren Auslöser und Verlauf mit der Höhe des von Spender-T-Zellen produziertem TGF- β in Zusammenhang gebracht wird.^{124;125} Der Transfer von humanen Immunzellen in neugeborene immundefiziente Mäuse stellt ein stabiles, reproduzierbares System zur Analyse humaner T-Zellantworten *in vivo* dar. In diesem Modell wurde bereits die Effektivität des Treg-Aktivator gp120, ein Glykoprotein auf der Oberfläche des HI-Virus, untersucht. Durch seine Bindung an den CD4-Rezeptor kommt es zur Aktivierung der humanen tTreg und so zur Unterdrückung der GvHD bereits bei einer einmaligen Injektion.⁷⁷ Im Gegensatz dazu konnte die einmalige Gabe von sGARP die GvHD nicht unterbinden, ein Hinweis, dass sGARP kein Aktivator von tTreg ist und deren Suppressivität nicht direkt beeinflusst. Allerdings zeigte sich, dass sGARP synergistisch die inhibitorische Kapazität von tTreg steigern kann, sodass in Anwesenheit von sGARP schon eine geringe Anzahl an tTreg ausreichend war die GvHD zu verhindern, während

diese wenigen tTreg für sich allein die Entstehung der Erkrankung nicht verhindern konnten.

Zusätzlich wurde eine repetitive Gabe von sGARP ohne die Anwesenheit von tTreg angewandt. Die Ergebnisse demonstrierten, dass durch die repetitive Gabe von sGARP die GvHD auch ohne zusätzlichen tTreg-Transfer verhindert werden konnte. Damit wurde die tTreg unabhängige Wirkung von sGARP, die bereits *in vitro* festgestellt wurde, auch *in vivo* demonstriert. In der Literatur ist die kurze Halbwertszeit von TGF- β beschrieben.¹²⁶ Wenn dies auch für sGARP zutreffen würde, könnte eine wiederholte Gabe von sGARP die kurze Halbwertszeit umgehen und ein stabiler sGARP-TGF- β -Komplex könnte zu einer robusten Induktion von pTreg führen und letztlich die Entstehung der GvHD verhindern.

Ein zentraler Ansatz um den Ausbruch einer GvHD zu verhindern ist die Verminderung der IFN- γ -produzierenden Th-Zellen.^{127;128} Die *ex-vivo* Analyse der humanen T-Zellen zeigte, dass sGARP zu einer reduzierten IFN- γ -Bildung in den Th-Zellen führte. Zudem inhibierte sGARP die IL-2-Produktion in den Th-Zellen und förderte die Induktion von CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen. Diese Ergebnisse stärken unsere Hypothese, dass sGARP die Induktion von pTreg begünstigt und die Entwicklung von T-Effektorzellen inhibiert. Die therapeutische Injektion von sGARP in anderen Krankheitsmodellen wie Allergie, Asthma und rheumatoide Arthritis wird Gegenstand von zukünftigen Untersuchungen sein. Martin et al. (2012) zeigte bereits, dass im humanisierten Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung die Aktivierung und Induktion von tTreg für eine Verhinderung des Asthmas von entscheidender Bedeutung ist.⁷⁹

5. Zusammenfassung

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) spielen eine essentielle Rolle bei der Unterdrückung von schädlichen Immunreaktionen. Da aktivierte CD4⁺ T-Helferzellen auch CD25 und FoxP3 exprimieren, können diese nicht als spezifische Marker zur Identifikation von Treg verwendet werden. Die Analyse der Membranproteinexpression beider Populationen führte zur Identifikation von GARP (glycoprotein A repetitions predominant) als spezifischen Marker auf aktivierten Treg. GARP bindet LAP und TGF- β , welches für die Unterdrückung von entzündlichen T-Zellantworten von Bedeutung ist. Um die Funktion von GARP unabhängig von Treg zu untersuchen, wurde lösliches GARP-Protein (sGARP) synthetisiert und sein Effekt auf die Aktivierung und Differenzierung von humanen T-Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sGARP die Proliferation von naiven CD4⁺ T-Zellen supprimiert und zu einer Phosphorylierung von SMAD2/3 sowie zur Induktion von FoxP3 führt. Zusätzlich inhibiert sGARP die Produktion von Effektorzytokinen wie IL-2 und IFN- γ . Die Stimulation von naiven CD4⁺ T-Zellen mit sGARP fördert die Differenzierung der T-Zellen zu Treg, welche in Kokultur die Aktivierung von T-Effektorzellen supprimieren. Die Wirkung war vergleichbar in naiven CD4⁺ und ruhenden CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen, konnte aber in differenzierten CD4⁺CD45RO⁺ T-Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Induktion von FoxP3 und die Phosphorylierung von SMAD2/3 konnte durch eine Blockade des TGF- β -Signalweges inhibiert werden. Zusätzlich zu seiner passiven Rolle als TGF- β -Transporter, induzierte sGARP die TGF- β -Produktion in naiven T-Zellen und trägt so zum Mechanismus der infektiösen Toleranz bei. Des Weiteren fördert die Stimulation von sGARP in Anwesenheit von IL-6 und IL-23 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th17-Zellen.

Neben dem Einfluss von sGARP auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen, supprimiert sGARP die Proliferation und Granzym B-Produktion in CD8⁺ T-Zellen.

Für die Analyse der immunmodulatorischen Funktion von sGARP *in vivo* wurde ein Modell der xenogenen GvHD (graft-versus-host disease) verwendet. Der Transfer von humanen PBMC in neugeborene, immundefiziente Rag2^{-/-} γ c^{-/-}

Mäuse führte zu einer letalen GvHD, welche durch die Applikation von humanen Treg dosisabhängig unterdrückt werden konnte. In diesem Modell konnte die repetitive Gabe von sGARP ebenfalls die GvHD unterdrücken. Zudem zeigte sGARP synergistische Wirkungen mit Treg bei der Suppression inflammatorischer T-Zellantworten in diesem Modell.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse auf eine entscheidende Rolle von GARP in der Modulation der peripheren Toleranz folgern und zeigen lösliches GARP als potentes Therapeutikum für die Behandlung von unerwünschten inflammatorischen Immunantworten.

6. Literaturverzeichnis

1. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol.Immunol.* 2004;40:845-859.
2. Clarkson MR, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 2005;80:555-563.
3. Kaye J, Kersh G, Engel I, Hedrick SM. Structure and specificity of the T cell antigen receptor. *Semin.Immunol.* 1991;3:269-281.
4. Kersh GJ, Miley MJ, Nelson CA et al. Structural and functional consequences of altering a peptide MHC anchor residue. *J.Immunol.* 2001;166:3345-3354.
5. Germain RN. Maintaining system homeostasis: the third law of Newtonian immunology. *Nat.Immunol.* 2012;13:902-906.
6. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 2003;21:139-176.
7. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity.* 2000;13:829-840.
8. Mason D. Some quantitative aspects of T-cell repertoire selection: the requirement for regulatory T cells. *Immunol.Rev.* 2001;182:80-88.
9. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity.* 2013;38:414-423.
10. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009;30:636-645.
11. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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.
12. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J.Immunol.* 1999;162:5317-5326.
13. Seddon B, Mason D. The third function of the thymus. *Immunol.Today* 2000;21:95-99.
14. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol.Rev.* 2001;182:207-214.

15. Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS* 2004;112:629-641.
16. Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742.
17. Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2001;22:394-400.
18. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 2002;99:2468-2476.
19. Bopp T, Becker C, Klein M et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J.Exp.Med.* 2007;204:1303-1310.
20. Becker C, Stoll S, Bopp T, Schmitt E, Jonuleit H. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med.Microbiol.Immunol.* 2006;195:113-124.
21. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H et al. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J.Exp.Med.* 2002;196:255-260.
22. Qin S, Cobbold SP, Pope H et al. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 1993;259:974-977.
23. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J.Exp.Med.* 2002;196:247-253.
24. Kubach J, Lutter P, Bopp T et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 2007;110:1550-1558.
25. Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M et al. Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J.Biol.Chem.* 1990;265:20533-20538.
26. Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992;68:775-785.
27. Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF, Marquardt H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol.Cell Biol.* 1988;8:4162-4168.

28. Lutz M, Knaus P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal*. 2002;14:977-988.
29. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*. 2000;19:1745-1754.
30. Chen W, Konkel JE. TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells. *J.Mol.Cell Biol*. 2010;2:30-36.
31. Fu S, Zhang N, Yopp AC et al. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + C. *Am.J.Transplant*. 2004;4:1614-1627.
32. Maruyama T, Konkel JE, Zamarron BF, Chen W. The molecular mechanisms of Foxp3 gene regulation. *Semin.Immunol*. 2011;23:418-423.
33. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. 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* 2005;102:5138-5143.
34. Zheng MH, Zhang YC, Chen YP. [CD4+CD25+Treg cell and its function in liver diseases: a review]. *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi*. 2007;15:238-240.
35. Valzasina B, Guiducci C, Dislich H et al. Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood* 2005;105:2845-2851.
36. Kmiecik M, Gowda M, Graham L et al. Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. *J.Transl.Med*. 2009;7:89.
37. Roubin R, Pizette S, Ollendorff V et al. Structure and developmental expression of mouse Garp, a gene encoding a new leucine-rich repeat-containing protein. *Int.J.Dev.Biol*. 1996;40:545-555.
38. Ollendorff V, Noguchi T, Delapeyriere O, Birnbaum D. The GARP gene encodes a new member of the family of leucine-rich repeat-containing proteins. *Cell Growth Differ*. 1994;5:213-219.
39. Wang R, Wan Q, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS.One*. 2008;3:e2705.
40. Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur.J.Immunol*. 2009;39:3315-3322.
41. Tran DQ, Andersson J, Wang R et al. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated

- FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009;106:13445-13450.
42. Wang R, Kozhaya L, Mercer F et al. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009;106:13439-13444.
 43. Wang R, Zhu J, Dong X et al. GARP regulates the bioavailability and activation of TGFbeta. *Mol.Biol.Cell* 2012;23:1129-1139.
 44. Edwards JP, Fujii H, Zhou AX et al. Regulation of the Expression of GARP/Latent TGF-beta1 Complexes on Mouse T Cells and Their Role in Regulatory T Cell and Th17 Differentiation. *J.Immunol.* 2013
 45. Probst-Keppler M, Geffers R, Kroger A et al. GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *J.Cell Mol.Med.* 2009;13:3343-3357.
 46. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-251.
 47. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu.Rev.Immunol.* 2004;22:745-763.
 48. Mattila PS, Tarkkanen J. Differentiation of T lymphocytes in the human adenoid as measured by the expression of CD45 isoforms. *Scand.J.Immunol.* 1998;48:59-64.
 49. Merritt WD, Taylor BJ, Der-Minassian V, Reaman GH. Coexpression of GD3 ganglioside with CD45RO in resting and activated human T lymphocytes. *Cell Immunol.* 1996;173:131-148.
 50. Yamada A, Kaneyuki T, Hara A, Rothstein DM, Yokoyama MM. CD45 isoform expression on human neonatal T cells: expression and turnover of CD45 isoforms on neonatal versus adult T cells after activation. *Cell Immunol.* 1992;142:114-124.
 51. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 1994;12:635-673.
 52. Bradley LM, Dalton DK, Croft M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J.Immunol.* 1996;157:1350-1358.
 53. Le GG, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J.Exp.Med.* 1990;172:921-929.
 54. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu.Rev.Immunol.* 2010;28:445-489.

-
55. Aune TM, Collins PL, Chang S. Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology* 2009;126:299-305.
 56. Miller SA, Weinmann AS. Common themes emerge in the transcriptional control of T helper and developmental cell fate decisions regulated by the T-box, GATA and ROR families. *Immunology* 2009;126:306-315.
 57. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J.Exp.Med.* 2007;204:1849-1861.
 58. Hwang ES. Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation. *Yonsei Med.J.* 2010;51:484-491.
 59. Morishima N, Mizoguchi I, Takeda K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. TGF-beta is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2009;386:105-110.
 60. Michalek RD, Rathmell JC. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol.Rev.* 2010;236:190-202.
 61. Laky K, Fleischacker C, Fowlkes BJ. TCR and Notch signaling in CD4 and CD8 T-cell development. *Immunol.Rev.* 2006;209:274-283.
 62. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr.Opin.Immunol.* 1998;10:581-587.
 63. Salti SM, Hammelev EM, Grewal JL et al. Granzyme B regulates antiviral CD8+ T cell responses. *J.Immunol.* 2011;187:6301-6309.
 64. Roep BO, Buckner J, Sawcer S, Toes R, Zipp F. The problems and promises of research into human immunology and autoimmune disease. *Nat.Med.* 2012;18:48-53.
 65. Wekerle H, Flugel A, Fugger L, Schett G, Serreze D. Autoimmunity's next top models. *Nat.Med.* 2012;18:66-70.
 66. Brehm MA, Shultz LD, Greiner DL. Humanized mouse models to study human diseases. *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* 2010;17:120-125.
 67. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301:527-530.
 68. Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW et al. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 1995;267:1178-1183.
 69. Miller RD, Hogg J, Ozaki JH et al. Gene for the catalytic subunit of mouse DNA-dependent protein kinase maps to the scid locus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:10792-10795.

70. Lowry PA, Shultz LD, Greiner DL et al. Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 1996;2:15-23.
71. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J.Immunol.* 1995;154:180-191.
72. DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:377-381.
73. Kirberg J, Berns A, von BH. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J.Exp.Med.* 1997;186:1269-1275.
74. Sugamura K, Asao H, Kondo M et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu.Rev.Immunol.* 1996;14:179-205.
75. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 2005;106:1565-1573.
76. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002;100:3175-3182.
77. Becker C, Taube C, Bopp T et al. Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood* 2009;114:1263-1269.
78. Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T et al. Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/gammanull mice model. *Blood* 2003;102:873-880.
79. Martin H, Reuter S, Dehzad N et al. CD4-mediated regulatory T-cell activation inhibits the development of disease in a humanized mouse model of allergic airway disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2012;129:521-8, 528.
80. Pino S, Brehm MA, Covassin-Barberis L et al. Development of novel major histocompatibility complex class I and class II-deficient NOD-SCID IL2R gamma chain knockout mice for modeling human xenogeneic graft-versus-host disease. *Methods Mol.Biol.* 2010;602:105-117.
81. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat.Rev.Immunol.* 2012;12:786-798.

82. Hahn SA, Stahl HF, Becker C et al. Soluble GARP has potent antiinflammatory and immunomodulatory impact on human CD4(+) T cells. *Blood* 2013;122:1182-1191.
83. Stahl HF. Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von miRNAs und Oberflächenrezeptoren spezifisch für regulatorische T-Zellen.; 2009.
84. Suvas S, Rouse BT. Treg control of antimicrobial T cell responses. *Curr.Opin.Immunol.* 2006;18:344-348.
85. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat.Genet.* 2001;27:20-21.
86. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat.Genet.* 2001;27:68-73.
87. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat.Rev.Immunol.* 2011;11:119-130.
88. Roncarolo MG, Gregori S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? *Eur.J.Immunol.* 2008;38:925-927.
89. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu.Rev.Immunol.* 2012;30:531-564.
90. Delisle JS, Giroux M, Boucher G et al. The TGF-beta-Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and proliferation of CD4 T cells. *Genes Immun.* 2013;14:115-126.
91. Li C, Ebert PJ, Li QJ. T cell receptor (TCR) and transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling converge on DNA (cytosine-5)-methyltransferase to control forkhead box protein 3 (foxp3) locus methylation and inducible regulatory T cell differentiation. *J.Biol.Chem.* 2013;288:19127-19139.
92. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J.Exp.Med.* 2001;194:1711-1719.
93. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008;73:975-983.
94. De Rosa SC, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat.Med.* 2001;7:245-248.

95. Prelog M, Keller M, Geiger R et al. Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4(+)CD45RA(+)CD62L(+) T cell compartment in later life. *Clin.Immunol.* 2009;130:123-132.
96. Lebman DA, Edmiston JS. The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes.Infect.* 1999;1:1297-1304.
97. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 2006;24:99-146.
98. Strasser SI, Shulman HM, Flowers ME et al. Chronic graft-versus-host disease of the liver: presentation as an acute hepatitis. *Hepatology* 2000;32:1265-1271.
99. Weber S, Saftig P. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* 2012;139:3693-3709.
100. Braga M, Quecchia C, Cavallucci E et al. T regulatory cells in allergy. *Int.J.Immunopathol.Pharmacol.* 2011;24:55S-64S.
101. Dunne PJ, Fletcher JM. Recent advances in regulatory T cell therapy of autoimmunity, graft rejection and cancer. *Recent Pat Inflamm.Allergy Drug Discov.* 2010;4:231-243.
102. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol.Med.* 2007;13:108-116.
103. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur.J.Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S116-S123.
104. Stahl HF, Fauti T, Ullrich N et al. miR-155 inhibition sensitizes CD4+ Th cells for TREG mediated suppression. *PLoS.One.* 2009;4:e7158.
105. Gauthy E, Cuende J, Stockis J et al. GARP is regulated by miRNAs and controls latent TGF-beta1 production by human regulatory T cells. *PLoS.One.* 2013;8:e76186.
106. Chen W, Wahl SM. TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:85-89.
107. Pillai V, Karandikar NJ. Attack on the clones? Human FOXP3 detection by PCH101, 236A/E7, 206D, and 259D reveals 259D as the outlier with lower sensitivity. *Blood* 2008;111:463-464.
108. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 2007;110:2983-2990.

-
109. Presicce P, Moreno-Fernandez ME, Lages CS, Orsborn KI, Chougnet CA. Association of two clones allows for optimal detection of human FOXP3. *Cytometry A* 2010;77:571-579.
 110. Gabrysova L, Christensen JR, Wu X et al. Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF-beta-dependent differentiation and maintenance of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur.J.Immunol.* 2011;41:1242-1248.
 111. Song J, Lei FT, Xiong X, Haque R. Intracellular signals of T cell costimulation. *Cell Mol.Immunol.* 2008;5:239-247.
 112. Gunnlaugsdottir B, Maggadottir SM, Ludviksson BR. Anti-CD28-induced co-stimulation and TCR avidity regulates the differential effect of TGF-beta1 on CD4+ and CD8+ naive human T-cells. *Int.Immunol.* 2005;17:35-44.
 113. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J.Clin.Invest* 2005;115:3378-3384.
 114. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M et al. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J.Exp.Med.* 2001;193:1285-1294.
 115. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu.Rev.Immunol.* 2009;27:485-517.
 116. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N.Engl.J.Med.* 2009;361:888-898.
 117. Stavnezer J. Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta. *J.Immunol.* 1995;155:1647-1651.
 118. Castriconi R, Cantoni C, Della CM et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100:4120-4125.
 119. Worthington JJ, Fenton TM, Czajkowska BI, Klementowicz JE, Travis MA. Regulation of TGFbeta in the immune system: an emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology* 2012;217:1259-1265.
 120. Bekri S, Adelaide J, Merscher S et al. Detailed map of a region commonly amplified at 11q13-->q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet.Cell Genet.* 1997;79:125-131.
 121. Edwards J, Krishna NS, Witton CJ, Bartlett JM. Gene amplifications associated with the development of hormone-resistant prostate cancer. *Clin.Cancer Res.* 2003;9:5271-5281.

122. Maire G, Forus A, Foa C et al. 11q13 alterations in two cases of hibernoma: large heterozygous deletions and rearrangement breakpoints near GARP in 11q13.5. *Genes Chromosomes.Cancer* 2003;37:389-395.
123. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 2005;8:369-380.
124. Banovic T, Macdonald KP, Morris ES et al. TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood* 2005;106:2206-2214.
125. Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB et al. Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp.Hematol.* 2003;31:1044-1050.
126. Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS et al. Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *J.Clin.Invest* 1990;86:1976-1984.
127. Mavin E, Ahmed SS, O'Boyle G et al. Regulatory T cells inhibit CD8(+) T-cell tissue invasion in human skin graft-versus-host reactions. *Transplantation* 2012;94:456-464.
128. Sun K, Hsiao HH, Li M et al. IFN-gamma receptor-deficient donor T cells mediate protection from graft-versus-host disease and preserve graft-versus-tumor responses after allogeneic bone marrow transplantation. *J.Immunol.* 2012;189:2033-2042.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierenden Zellen
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CFDA-SE	5,6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
cpm	Zähler pro Minute
CTL4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
d	Tag
EF1 α	Elongationsfaktor-1alpha
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead box protein 3
FSC	Forward Scatter
g	Erdbeschleunigung
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant oder LRRC32
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
GvHD	Graft-versus-Host Disease
^3H -Tdr	^3H -Thymidin
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
Kü	Kulturüberstand
LAP	Latency Associated Protein
mAk	monoklonaler Antikörper
MACS	magnetic activated cell sorter
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexe
min	Minute

mRNA	messenger RNA
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PBMC	mononukleären peripheren Blutzellen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
qTR-PCR	quantitativen Real-Time PCR
Rag2	Recombination Activating Gene 2
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
ROR γ t	Orphan nuclear receptor
Scid	Server combined immunodeficiency
sGARP	solubles GARP
siRNA	small interfering RNA
SSC	Sideward Scatter
Teff	T-Effektorzellen
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TGF- β R	TGF- β -Rezeptoren
Th	T-Helferzellen
TLR-3	Toll-like Rezeptor 3
Treg	regulatorische T-Zellen
Tr1-Zellen	Typ-1 regulatorischen T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor

7.2 Puffer und Medien

Alle Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt, sterilfiltriert (0,2 μ m) und bei 4 °C aufbewahrt.

MEM (Ansatz für 5 Liter Medium)

1 Packung	RPMI 1640 Trockenpulver (Gibco, Grand Island, USA)
4,77 g/l	HEPES (Biochrom AG, Berlin)
2,2 g/l	Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt)
3,6 ml/l	β -Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg)

pH 7,2

PBS 10x

80,4 g/l	NaCl (Roth)
15,6 g/l	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (Merck)
mit 10 M	NaOH auf pH- Wert 6,6 einstellen

PBS-EDTA

1 x	PBS
1 mM	EDTA (GEBRU Biotechnik, Gailsberg, Deutschland)

PBS-EDTA-Heparin

1 x	PBS
1 mM	EDTA (GEBRU Biotechnik)
0,2%	Heparin (Roche)

MACS-Puffer

1 x	PBS
0,5%	HSA (OCTAPHARMA)
3 mM	EDTA (GEBRU Biotechnik)

FACS-Puffer

1 x	PBS
0,5 %	HSA (OCTAPHARMA)
1 mM	EDTA (GEBRU Biotechnik)
10 µg/ml	Sandoglobin

ACK-Puffer

0,15 M	Ammoniumchlorid NH ₄ Cl (Merck, Darmstadt)
1 mM	Kaliumhydrogencarbonat KHCO ₃ (Merck, Darmstadt)
0,5 mM	EDTA (GEBRU Biotechnik)
(pH=7,2)	

TBST 10x

60,1 g	Tris-HCL (Invitrogen, Paisley)
87,66 g	NaCl (Braun, Melsungen)
5 g	Tween20 (AppliChem, Darmstadt)
(pH=7,2)	

7.3 Lebenslauf

7.4 Publikation