AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchung der Plastizität humaner CD4+CD25+-T-Zell-Subpopulationen anhand ihres Zytokinmusters und spezieller Transkriptionsfaktoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Teresa Steger

2014

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchung der Plastizität humaner CD4+CD25+-T-Zell-Subpopulationen anhand ihres Zytokinmusters und spezieller Transkriptionsfaktoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Teresa Steger

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Matthias Edinger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Florian Obermeier
Tag der mündlichen Prüfung:	18.07.2014

gewidmet
Frau Anna Maria Baldauf

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem 9

1.1.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem 10

1.1.2 Aktivierung des erworbenen Immunsystems 10

1.2 T-Lymphozyten 11

1.3 $CD4^+$-T-Zellen und ihre phänotypischen und funktionellen Eigenschaften 12

1.3.1 Th1-Zellen 13

1.3.2 Th2-Zellen 14

1.3.3 Th17-Zellen 15

1.3.4 Regulatorische T-Zellen 16

1.3.4.1 Entwicklung der regulatorischen T-Zellen 16

1.3.4.2 Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen 16

1.3.4.3 Unterscheidung zwischen natürlichen Treg und induzierten Treg 18

1.3.4.4 *In vitro* Expansion regulatorischer T-Zellen 18

1.3.4.5 Bedeutung der Treg bei GvHD nach allogener Stammzelltransplantation 19

1.3.5 Interaktion der einzelnen T-Zell-Subpopulationen 20

2 Zielsetzung 21

3 Material und Methoden

3.1 Material 22

3.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien 22

3.1.2 Geräte 22

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien 24

3.1.3.1 Gekaufte Chemikalien 24

3.1.3.2 Selbst angesetzte Puffer 25

3.1.4 Enzyme, Inhibitoren, molekularbiologische Kits 25

3.1.5 Farbstoffe und Stimulanzien 26

3.1.6 Anti-Human-Antikörper für die FACS-Färbung 26

3.1.7 Magnet-Beads zur Zellisolierung 27

3.1.8 Oligonukleotide 27

3.1.9 Software und Internetdienste 28

3.2 Methoden 29
3.2.1 Zellbiologische Methoden 29
3.2.1.1 Ermittlung der Zellzahl 29
3.2.1.2 Auftauen von Zellen 29
3.2.1.3 Kultivierung und Expansion humaner Treg und Tconv Zellen 29
3.2.1.4 Ruhigstellung von in vitro expandierten Zellen 30
3.2.1.5 PMA/Ionomycin-Stimulation für Zytokinanalysen 30
3.2.1.6 Durchflusszytometrie 31
3.2.1.7 Zellfärbung für durchflusszytometrische Analysen 32
3.2.1.7.1 Färbung von Oberflächenantigenen 32
3.2.1.7.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen 32
3.2.1.7.3 Intranukleäre Färbung des Transkriptionsfaktors FOXP3 32
3.2.1.7.4 Gleichzeitige Färbung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren 33
3.2.1.8 Isolierung humaner Treg- und Tconv-Zellen aus dem peripheren Blut 34
3.2.1.8.1 Magnetische Zellseparation (MACS) 35
3.2.1.8.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung 35
3.2.2 Molekularbiologische Methoden 36
3.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA 36
3.2.2.2 Nano-Drop-Messung zur Bestimmung der Gesamt-RNA 36
3.2.2.3 RNA-Gelelektrophorese 37
3.2.2.4 Reverse Transkription 37
3.2.2.5 Real-time Polymerase-Kettenreaktion 38
3.2.3 Statistik 39

4 Ergebnisse
4.1 Gewinnung intakter RNA aus fixierten Treg – die Grundproblematik 40
4.1.1 RNA aus unfixierten in vitro expandierten Treg 41
4.1.2 Färbung auf FOXP3 mit anschließender RNA-Isolierung und Analyse auf intakte RNA 43
4.1.3 Kombinierte Färbung auf FOXP3 und Zytokine 45
4.1.4 Optimierung der kombinierten FOXP3- und Zytokinfärbung unter dem Aspekt der Isolierung intakter RNA 46
4.2 Analyse der Genexpression mittels quantitativer rt-PCR 54
4.3 Genexpression in fixierten und nach FOXP3 und IL-4 gesorteten Zellen 60

5 Diskussion

5.1 Güte und Anwendbarkeit der kombinierten FOXP3- und IL4-Färbung für die Zellsortierung 67

5.2 RNA-Extraktion mit PFA und Ethanol – Qualität und Integrität 68

5.3 Genanalyse mittels real-time PCR 69

5.3.1 Kontrollgene zur Qualitätssicherung der Zellsortierung 69

5.3.2 Upregulation von Th2-Genen in der FOXP3-negativen Treg-Subpopulation 70

5.3.3 RORc – Entwicklung zur Th17-Zelle? 70

5.3.4 LAG3 und LIF – zwei Treg-Gene? 71

5.4 Zusammenfassung und Ausblick 72

6 Literaturverzeichnis 73

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis 78

7.2 Publikationen 79

7.3 Eidesstattliche Erklärung 80

7.4 Danksagung 81

7.5 Lebenslauf 82

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den menschlichen Körper vor Einwirkungen aus der Umwelt, wie zum Beispiel vor Krankheitserregern und ihren Toxinen. Es erkennt diese als Fremdstoffe und bekämpft sie mithilfe einer angeborenen und einer individuell erworbenen Komponente des Immunsystems. Auch körpereigene Zellen können Ziel der Immunabwehr werden. Zum einen werden mutierte Zellen erkannt und zerstört, um so eine mögliche Tumorentstehung zu verhindern, zum anderen kann es durch Angreifen gesunder körpereigener Zellen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen kommen (1).

Alle an diesen Immunreaktionen beteiligten Zellen entstammen den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks (Abb. 1-1).

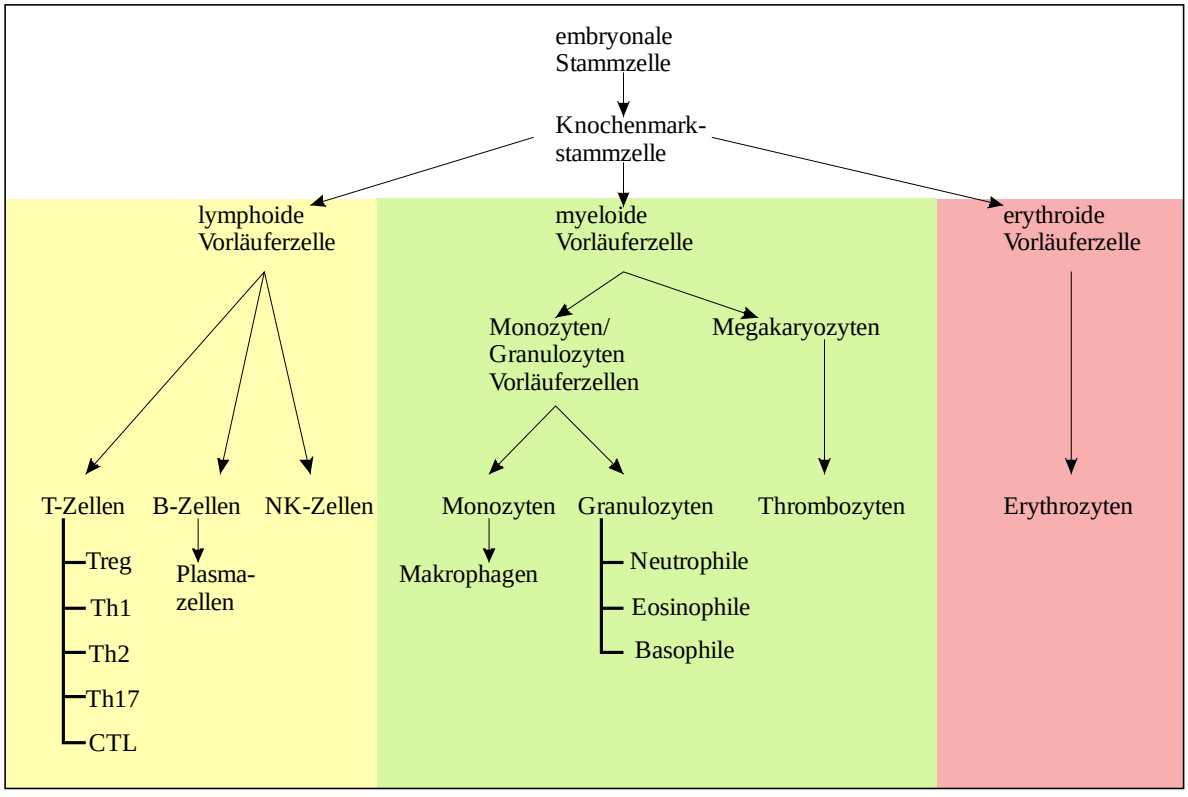


Abb. 1-1: Hämatopoese
Die pluripotenten Stammzellen entwickeln sich über Vorläuferzellen hin zu den ausgereiften Blutzellen. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und ihre Subpopulationen. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich zum einen die Makrophagen- und Granulozyten-Vorläuferzellen, zum anderen die Megakaryozyten, aus denen wiederum die Thrombozyten hervorgehen. Die Erythrozyten entstehen aus eigenen erythroiden Vorläuferzellen. [verändert nach (2)]

1.1.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem

Man unterscheidet das angeborene und das erworbene Immunsystem. Das angeborene Immunsystem gliedert sich in zwei Komponenten und die dadurch vermittelte Immunantwort steht dem Körper innerhalb kürzester Zeit zur Abwehr zur Verfügung. Eine Komponente ist die zellvermittelte Abwehr, welche mithilfe von Phagozytose und Aktivierung des Komplementsystems sowie allgemeiner Entzündungsreaktion zur Abwehr körperschädigender Substanzen und deren Abbau führt. Zu ihm zählen Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen (3). Eine weitere Komponente bilden die natürlichen physiologischen und anatomischen Barrieren des Körpers, wie die Hornschicht der Haut oder die Magensäure, welche die zelluläre angeborene Immunantwort in ihrer Abwehrfunktion unterstützt. Das erworbene Immunsystem bildet die spezifische Abwehr des Körpers, die sich individuell von Organismus zu Organismus auch innerhalb einer Spezies unterscheidet. Diese Immunantwort beinhaltet die Bildung spezifischer Antikörper durch Plasmazellen (humorale Antwort) genauso wie die Interaktion verschiedener T-Zellpopulationen mit antigenpräsentierenden Zellen und Zytokinen (zelluläre Antwort). Die Spezifität des erworbenen Immunsystems beruht darauf, dass die Antwort nur gegen das Antigen gerichtet ist, das die Reaktion hervorgerufen hat. Dies wiederum kommt dadurch zustande, dass T- und B-Lymphozyten Antigenrezeptoren auf der Oberfläche tragen, die jeweils nur ein bestimmtes Antigen binden können. Jeder Lymphozyt trägt auf seiner Oberfläche bestimmte Oberflächenmerkmale, sog. Differenzierungsantigene (CD = cluster of differentiation). Durch diese werden sowohl Zelltyp als auch Entwicklungs- und Differenzierungsgrad und sogar ein Teil der funktionellen Eigenschaften charakterisiert (4).

1.1.2 Aktivierung des erworbenen Immunsystems

Das erworbene Immunsystem reagiert am effektivsten unter Zuhilfenahme des angeborenen Immunsystems. Da T-Zellen nicht in der Lage sind, Antigene ohne weitere zelluläre Hilfe zu erkennen, müssen diese auf der Oberfläche von Zellen über MHC-Moleküle (MHC = major histocompatibility complex) präsentiert werden. Es gibt zwei verschiedene Arten von MHC-Molekülen. MHC Klasse I präsentieren Antigene, die sich im Zytoplasma der präsentierenden Zelle befinden und von CD8+-Lymphozyten erkannt werden. MHC I -Moleküle werden von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Phagozytierte Antigene werden nur von speziellen antigen-präsentierenden Zellen (APCs), wie Makrophagen und dendritischen Zellen, auf MHC-Molekülen der Klasse II den CD4+-Lymphozyten präsentiert. Dieser CD4+-Lymphozyt wird bei Kontakt mit dem präsentierten Antigen über seinen T-Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert und bringt dadurch die adaptive Immunantwort in Gang (4).

1.2 T-Lymphozyten

Vorläuferzellen der T-Lymphozyten wandern nach ihrer Entstehung im Knochenmark über die Blutbahn in den Thymus, um dort auszureifen. Hier werden sie über verschiedene Signale zunächst selektiert. T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor an körpereigene MHC-Moleküle binden kann, überleben (positive Selektion); T-Zellen, die auf körpereigene Antigene jedoch zu stark reagieren, erhalten ein Signal, das zum Zelltod führt (negative Selektion). Im Thymus findet zudem die Festlegung auf eine der beiden Hauptpopulationen der T-Zellen statt; die Zellen, die an körpereigene MHC-Moleküle der Klasse II binden und das Oberflächenantigen CD4 exprimieren, werden zu $CD4^+$ T-Zellen; diejenigen, die an MHC-Moleküle der Klasse I binden, werden zu $CD8^+$ T-Zellen. Die die Selektion überlebenden ausgereiften T-Zellen verlassen den Thymus und zirkulieren nun im Blut und in den peripheren lymphatischen Organen (5).

Solange eine T-Zelle noch keinen Antigenkontakt hatte, wird sie als naive T-Zelle bezeichnet. Um an einer Immunantwort teilnehmen zu können, muss diese naive T-Zelle auf das für sie spezifische Antigen treffen, welches ihr von einer antigenpräsentierenden Zelle auf einem MHC-Molekül präsentiert werden muss. Erst durch diesen Kontakt zum Antigen ist es der T-Zelle möglich, sich zu differenzieren und zu proliferieren. $CD8^+$ T-Zellen werden durch MHC-Moleküle der Klasse I aktiviert und differenzieren sich hauptsächlich zu zytotoxischen T-Zellen. Sie sind vor allem dafür verantwortlich, dass körpereigene Zellen getötet werden, die Krankheitserreger in ihrem Zytoplasma tragen oder selbst durch Mutation entartet sind. $CD4^+$ T-Zellen werden durch MHC-Moleküle der Klasse II aktiviert und differenzieren sich in peripheren lymphatischen Geweben in folgende Untergruppen: Th1-Zellen, Th2-Zellen und Th17-Zellen. Die natürlichen regulatorischen T-Zellen (Treg) entstehen im Thymus direkt und nicht aus der zuvor genannten CD4+ T-Zell-Population. Diese vier Untergruppen unterscheiden sich anhand ihrer Oberflächenmerkmale, ihres Zytokinmusters, ihrer Genexpression sowie in ihrer speziellen Aufgabe während des Ablaufs einer Immunreaktion (6). Im Folgenden werden die einzelnen CD4+-T-Zell-Subpopulationen nun näher beschrieben.

1.3 CD4$^+$-T-Zellen und ihre phänotypischen und funktionellen Eigenschaften

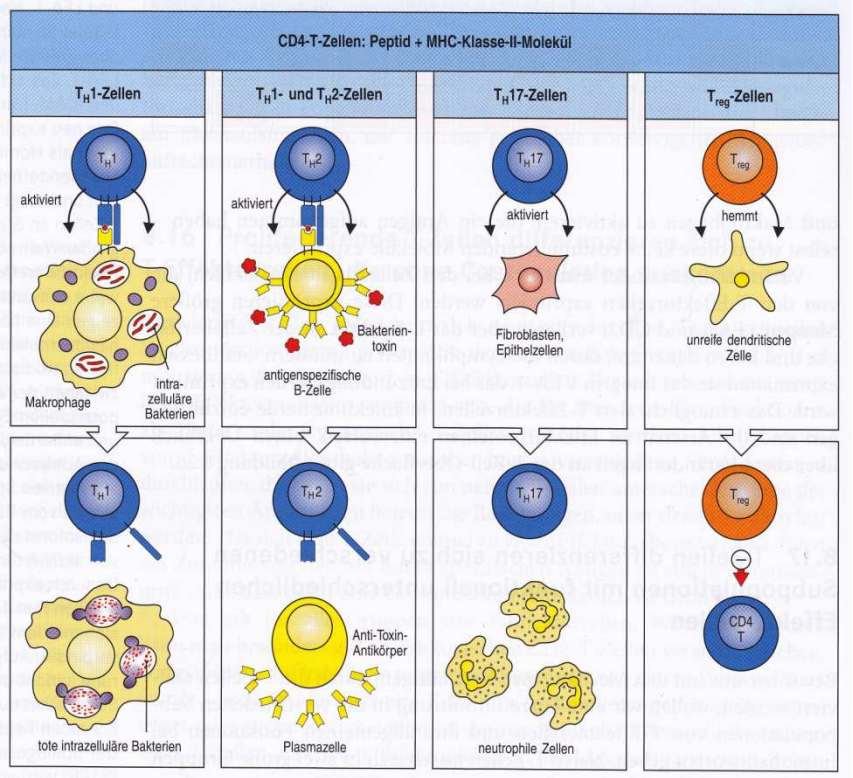


Abb. 1-2: Übersicht über die Funktionen CD4-positiver T-Zellen [modifiziert nach (6)]

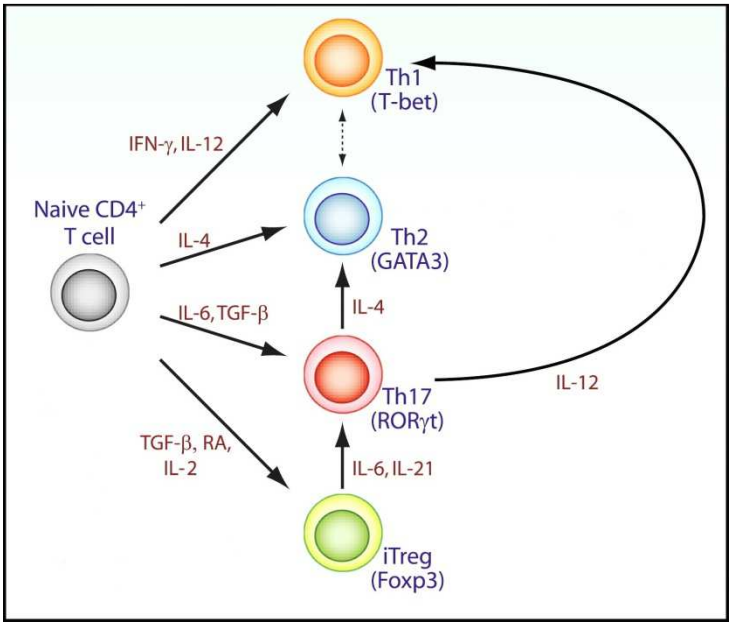


Abb. 1-3: Die Differenzierung der verschiedenen CD4+ T-Zell-Linien
Das Zytokinmilieu determiniert die Differenzierung der naiven CD4+ T-Zellen. Diese können sich differenzieren zu Th1, Th2, Th17 und induzierten Treg. Diese Differenzierungsprogramme werden unter anderem kontrolliert durch die Zytokine IL-12 und IFNγ für die Th1-Differenzierung, zudem IL-4 für die Th2-Differenzierung und TGF-β und IL-6 für die Th17-Differenzierung. Induzierte Treg entstehen durch TGF-β, IL-2 und retinoic acid (RA). Spezifische Transkriptionsfaktoren für die einzelnen CD4+ T-Zell-Populationen sind T-bet für Th1-Zellen, GATA3 für Th2-Zellen, RORc für Th17-Zellen und FOXP3 für Tregs. [modifiziert nach (7)]

1.3.1 Th1-Zellen

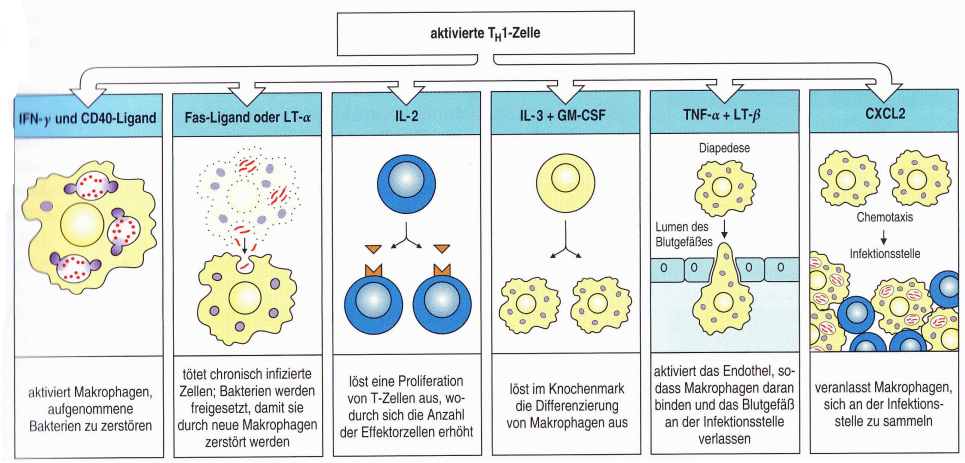


Abb. 1-4: Koordination der Immunreaktion von aktivierten Th1-Zellen
Zu Beginn der Th1- Immunantwort führt eine Aktivierung durch infizierte Makrophagen zu einer Synthese von INFγ. Dieses aktiviert zusammen mit dem CD40-Liganden Makrophagen die intrazellulären Pathogene zu zerstören. Chronisch infizierte Makrophagen benötigen hierfür den Fas-Liganden, den wiederum die Th1-Zellen bilden können. Über IL-2- Produktion kommt es zur T-Zell-Proliferation und damit zur Erhöhung der Effektorzellen während der Immunantwort. Über IL-2 und GM-CSF kann die Th1-Zelle die Makrophagendifferenzierung im Knochenmark beeinflussen. Auch auf die Wanderung der Makrophagen wirkt die Th1-Zelle ein, indem sie mithilfe von TNF-α diese zur Diapedese und durch CXCL2 zur Migration zum Infektionsort anregt (6).

Th1-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf intrazelluläre Bakterien und bei der Abwehr von Virusinfektionen. Wird ihre Funktion fehlreguliert, so kann es zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen kommen (8). Zur Differenzierung in Richtung der Th1-Zelllinie aus naiven CD4+ T-Zellen kommt es vor allem durch die Zytokine IFNγ und IL-12 (7). Außerdem leistet der Signalweg über STAT4 einen wichtigen Beitrag dazu, dass sich die naive T-Zelle in Richtung Th1-Zelle entwickeln kann (9). Zudem produzieren Th1-Zellen selbst IFNγ und IL-2 neben den proinflammatorischen Zytokinen TNF-α und TNF-β, die das angeborene Immunsystem, wie z.B. Makrophagen, dazu aktivieren, Pathogene abzuwehren, und die zudem die T-Zell-Antwort aktivieren (10). Die Aktivität der Th1-Zellen wird über das antiinflammatorische Zytokin IL-10 moduliert, das die IFN-γ Produktion herunterreguliert, sobald das Pathogen abgewehrt wurde, um zu verhindern, dass die Immunreaktion auf körpereigene gesunde Zellen übergreift (11). Der Transskriptionsfaktor *T-bet* ist für die Funktion und die Entwicklung der Th1-Zellen von entscheidender Bedeutung und induziert die IFNγ-Produktion. Er gehört zur T-box Familie und ist das einzige T-box-Gen, das speziell nur in der lymphoiden Zellreihe exprimiert wird. Ohne ihn wird die T-Zell-Entwicklung in Richtung Th2-Zelle getrieben (12). Für eine optimale *T-bet*-Expression in den sich differenzierenden Th1-Zellen ist die Aktivierung von STAT1 durch IFNγ und von STAT4 durch IL-4 notwendig. Nur durch das Zusammenspiel dieser beiden STAT-Systeme und anderer wichtiger Faktoren wie den Zytokinen IL-12 und IL-27 kann eine Differenzie-

rung in Richtung Th1-Zelle überhaupt stattfinden (10, 12). Die Th1-Immunantwort wird vor allen durch Treg mit hoher *FOXP3*-Expression moduliert oder sogar unterdrückt (8). Zu niedrige Level an TGF-β und IL-10 im Blut rufen eine starke allgemeine Th1-Immunantwort hervor, die vor allem durch Induktion in IFNγ entsteht und Auswirkungen auf den Gastrointestinaltrakt hat; eine starke Th1-Antwort wird als einer der Hauptfaktoren für die Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen gesehen (13). Eigentliche Hauptaufgabe der Th1-Zell-Population ist es, den Organismus vor obligat intrazellulären Erregern zu schützen. Diese zellvermittelte Immunität erreicht die Th1-Zelle durch eine zytolytische Aktivität, die zur Apoptose der befallenen Zelle führt. Übermäßige proinflammatorische Th1-Zell-Aktivität trägt zu Gewebeschäden und zu reaktiven Entzündungen bei, wie z.B. zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und zu Autoimmunreaktionen, z.B. bei Diabetes mellitus oder rheumatoider Arthritis (10).

1.3.2 Th2-Zellen

Für die Abwehr von Parasiten und Wurmerkrankungen ist vor allem die Immunreaktion der Th2-Zellen verantwortlich (8). Sie produzieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 und regen dadurch B-Zellen an, sich zu differenzieren und Immunglobuline zu produzieren bzw. rufen einen Immunglobulin-Switch der B-Zellen hervor, sodass vor allem die zur Parasitenabwehr wichtigen IgE produziert werden (6). Außerdem spielen Th2-Zellen durch die indirekt hervorgerufene hohe IgE-Produktion eine wichtige Rolle in der Erregerabwehr der Lunge (10). IL-4 und das absolut essentielle Zyotkin IL-2 spielen eine tragende Rolle in der Differenzierung der naiven T-Zelle in eine Th2-Zelle. IL-2 stabilisiert die Zugänglichkeit des IL-4 Gens; wird IL-2 neutralisiert, kommt es zu einer verminderten IL-4 Produktion in den Th2-Zellen. Damit die sich differenzierende Th2-Zelle die Th2-spezifischen Zytokine produzieren kann, muss sie den Transskriptionsfaktor *GATA-3* exprimieren. Die Amplifikation des Genabschnitts von *GATA-3* wird daher während der Differenzierung heraufreguliert. Das entstandene Produkt interferiert mit den Genorten für IL-4, IL-5 und IL-13, den Th2 spezifischen Genen (14, 15, 16). GATA-3 ist sozusagen der Schirmherr der Th2-Differenzierung. Zum einen ist er – wie oben bereits erwähnt – entscheidender Faktor für die IL-4 Produktion und zum zweiten hemmt GATA-3 die Th1-Differenzierung und die Th1-Immunantwort durch Hemmung der Expression von T-bet. Bei Fehlen von GATA-3 kann eine Th1-Immunantwort sogar in Abwesenheit von Faktoren auftreten, die normalerweise notwendig sind, um eine Th1-Antwort zu induzieren (17). STAT6 ist via IL-4 wiederum der Hauptstimulator der *GATA-3*-Expression und somit der Th2-Differenzierung (10). Treg mit hohen FOXP3-Leveln unter-

drücken die Th2-Differenzierung, somit kommt es bei verminderter oder fehlender *FOXP3*-Expression zu einer Überproduktion an Th2-Zellen. Diese Dysregulation kann zur Entstehung von Asthma und Allergien führen. Regulatorische T-Zellen können allerdings nicht die Zytokinproduktion von ausgereiften Th2-Zellen unterdrücken und somit nur in die Differenzierung modulierend eingreifen (8).

1.3.3 Th17-Zellen

Bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzinfektionen spielt die proinflammatorische Funktion der Th17-Zellen eine wichtige Rolle. Sie rufen eine Chemokin-Produktion in lokal vorhandenen Epithel- und Stromazellen hervor. Dadurch verstärken die Th17-Zellen die akute Entzündungsreaktion während einer Immunantwort. Daher wird davon ausgegangen, dass eine Unterdrückung der Th17-spezifischen Zytokine, wie IL-17 und IL-22, zu einer Remission bei Autoimmunerkrankungen führen könnte (18, 19). Namensgeber für diese relativ neue T-Zell-Subpopulation ist das für diese Zellen spezifische Zytokin IL-17. Neben diesen produzieren Th17-Zellen weitere proinflammatorischen Zytokine wie IL-6, IL-1 und IL-23, ebenso wie IL-21 und IL-22 und sie exprimieren den IL-23-Rezeptor. Damit die Differenzierung in Th17-Zellen abläuft, müssen IL-2, IL-6 und TGF-β als polarisierende Zytokine vorhanden sein. Nur wenn kein IL-4, IFNγ oder IL-12 vorhanden ist, erfolgt die Differenzierung allein in die Th17-Richtung und nicht in Th1- oder Th2-Richtung. Charakteristisch für Th17-Zellen ist des Weiteren die Expression von STAT3 und dem Transskriptionsfaktor *RORc* (retinoic acid receptor- related orphan receptor c) (6, 8, 20). Das Zytokin IL-27 vermindert die *RORc*-Expression und reguliert die Produktion von IL-17A und IL-17F in naiven T-Zellen herunter. Durch Unterdrückung der RORc-abhängigen Th17-Differenzierung wirkt IL-27 Autoimmunerkrankungen entgegen und unterstützt die Entwicklung der anderen T-Zell-Subpopulationen, die IL-10 produzieren (21). STAT3 ist relevant in der IL-6-vermittelten Th17-Zell-Regulation. Bei Fehlen von STAT3 wurde nicht nur eine verminderte Produktion von IL-17 festgestellt, sondern auch eine Veränderung in der Expression von IL-17F, IL-22 und dem IL-23-Rezeptor. Für die IL-21-vermittelte Th17-Differenzierung und für die IL-21-Expression ist STAT3 essentiell (22).

Hohe FOXP3-Level unterdrücken die Th17-Antwort während einer Infektion (8). IFNγ dagegen fördert die Th17-Antwort und auch die Ausbildung von Th17-Gedächtniszellen (20).

1.3.4 Regulatorische T-Zellen

Erstbeschreiber der CD4+CD25+regulatorischen T-Zellen, kurz Treg, war Sakaguchi in seinem bis heute vielzitierten Paper von 1995. Die Treg sind eine heterogene Gruppe von Zellen, die in der Lage sind, die Immunantwort zu modulieren und die Aktivität der konventionellen T-Zellen, sog. Tconv, zu unterdrücken. Sie sind unerlässlich für Selbsttoleranz und verhindern dadurch die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Sakaguchi zeigte weiterhin, dass CD4+CD25+ Treg anerg sind und nur unter Zugabe von IL-2 proliferieren können. Zudem zeigte er, dass sie immunsupprimierend auf die restlichen T-Zellen, genannt Tconv, wirken und selbst keine proinflammatorische Funktionen übernehmen (23, 24, 25). Jedoch können bei Verlust von FOXP3 Treg neben den für sie charakteristischen Zytokinen – IL-10, IL-35 und TGF-β – zusätzlich beachtliche Mengen an IL-2, TNF-α, IFN-γ und IL-17 produzieren (8). Mit Verlust von FOXP3 verlieren die Treg auch ihre hohe Expression von CD25, GITR und CTLA-4; sie sind nicht mehr in der Lage, die Proliferation der Tconv zu unterdrücken (26).

1.3.4.1 Entwicklung der regulatorischen T-Zellen

Treg entstehen im Thymus und sind abhängig von einer hohen und kontinuierlichen Expression des Transkriptionsfaktors *FOXP3*, der ausschlaggebend für ihre Entwicklung und ihre Suppressorfunktion ist (24, 27, 28). *FOXP3* ist ein linienspezifischer Transskriptionsfaktor und wird nur von CD4+ Zellen exprimiert (24, 29). Der Funktionsverlust von *FOXP3* ruft eine tödliche Autoimmunität sowohl bei Maus als auch beim Menschen hervor (24, 30, 31). Die genaue Differenzierungsweise im Thymus konnte bis jetzt noch nicht vollständig geklärt werden.

1.3.4.2 Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen

Die Zytokine, die normalerweise von regulatorischen T-Zellen produziert werden, sind TGF-β, IL-10 und IL-35. Sie haben eine antiinflammatorische Wirkung, was wiederum die wichtige Funktion der regulatorischen T-Zellen, nämlich die Modulation der Immunantwort, unterstreicht und zeigt, dass sie eine Schlüsselrolle in genau dieser Funktion einnehmen. Vor allem IL-10 spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen. Die Aufgaben von TGF-β sind zum einen die Steuerung der Entwicklung von induzierten regulatorischen T-Zellen, zum anderen die Aufrechterhaltung des Phänotyps der regulatorischen T-Zellen. Auch die Unterdrückung der Entwicklung der anderen drei T-Zell-Subpopulationen wird unter anderem TGF-β zugeschrieben (32).

Ebenso ist IL-35 ein inhibitorisches Zytokin, das hauptsächlich von Treg produziert und für ihre starke Suppressionsaktivität verantwortlich gemacht wird. IL-35 wird vor allem im Rahmen einer Immunantwort in aktiven Treg signifikant hochreguliert (33). Regulatorische T-Zellen wirken zum einen direkt über Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10, TGF-β und IL-35 der entzündlichen Komponente der Immunantwort entgegen, zum anderen auch indirekt durch Induktion der Zytolyse. Obwohl diese Funktion der zellulären Abwehr hauptsächlich den NK-Zellen zugeschrieben wird, zeigen auch viele der CD4+ T-Zellen zytolytische Aktivität. Aktivierte regulatorische T-Zellen exprimieren vor allem Granzym A, das zur Apoptose der Zielzellen führt. Vor Kurzem wurde ein weiterer Mechanismus entdeckt, der mit dem Begriff „metabolic disruption“ bezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um einen Mechanismus, bei dem die regulatorischen T-Zellen durch hohe Expression von CD25 dazu befähigt werden, am Ort der Abwehr die IL-2-Konzentration durch Aufnahme in die Treg-Zellen zu verringern und dadurch den Effektor-T-Zellen das Substrat, das sie zum Überleben benötigen, zu entziehen. Zusätzlich nimmt man an, dass die regulatorischen T-Zellen die Entwicklung und Differenzierung von dendritischen Zellen, welche wiederum für die Effektor-T-Zell-Aktivierung notwendig sind, beeinflussen können (32).

Treg mit einer hohen Expression von *FOXP3* unterdrücken vor allem die Antwort der Th1- und Th17-Zellen und die Differenzierung in die Th2-Subpopulation. Auch auf NK-Zellen und dendritische Zellen wirken die regulatorischen T-Zellen ein und modulieren so die Immunantwort (8).

Erwähnenswert sind zwei weitere Gene, deren Bedeutung für die Treg bislang noch nicht abschließend geklärt werden konnten. Hierbei handelt es sich zum einen um *LAG 3* (= lymphocyte activation gene 3). *LAG-3* ist ein mit CD-4 assoziiertes Gen und bindet an MHC-Moleküle der Klasse II. Natürliche $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen exprimieren LAG-3 vor allem, wenn sie aktiviert werden. Besonders in FOXP3+ Zellpopulationen wird LAG3 vermehrt exprimiert im Vergleich zu FOXP3- Zellpopulationen (16). Unspezifische Expression von *LAG-3* in anderen $CD4^+$ T-Zellen reduziert deren Proliferationskapazitäten signifikant (16, 34). Zum anderen ist *LIF* (= leukemia inhibitory factor) ein weiteres interessantes Gen. Es ist ein pleiotropes Zytokin der IL-6-Familie, welches in verschiedensten Zelltypen exprimiert wird und Effekte auf verschiedene Zelltypen, u.a. Neurone, Megakaryozyten und verschiedene Tumorzelllinien, hat. Es kann unter anderem in die Differenzierung von Th17 Zellen hemmend eingreifen und dadurch die Hemmung der Th17 Zellen auf die Treg-Zellen aufheben und die Autoimmunantwort somit unterdrücken. Erstmals beschrieben und identifiziert wurde *LIF* 1986 von Metcalf und seinen Kollegen (35).

1.3.4.3 Unterscheidung zwischen natürlichen Treg und induzierten Treg

Man unterscheidet natürliche von peripher induzierten regulatorischen T-Zellen. Die natürlichen regulatorischen T-Zellen unterscheiden sich von konventionellen T-Zellen dadurch, dass sie keine T-Zell-Rezeptor-gekoppelten Signale benötigen, um CD25 kontinuierlich zu exprimieren (16). Humane natürliche Treg zeichnen sich zudem durch eine Coexpression von CD4, CD25 und FOXP3 aus und exprimieren kein oder nur wenig CD127. Wohingegen aktivierte CD25+ Tconv auch CD127 auf ihrer Oberfläche exprimieren (24, 36, 37). Bei *in vitro* Stimulation können Tconv zumindest vorübergehend FOXP3 hochregulieren und werden dann als induzierte Treg, kurz iTreg, bezeichnet. Im Gegensatz zu natürlichen Treg im peripheren Blut exprimieren iTreg kein HELIOS. HELIOS scheint ein Marker für Thymus-gereifte Treg zu sein (24, 38).

Natürliche Treg unterscheiden sich des Weiteren von Tconv und iTreg durch ihr DNA-Methylierungsmuster und andere epigenetische Modifikationen (39). Eine wichtige Genregion ist TSDR (Treg-specific demethylation region), die in Treg demethyliert und in Tconv und iTreg methyliert vorliegt. TSDR stabilisiert die *FOXP3*-Expression in Treg (24, 40, 41, 42). Auch an anderen Genregionen finden sich DNA-Methylierungsunterschiede zwischen Treg auf der einen und Tconv und iTreg auf der anderen Seite (24, 42, 43, 44, 45, 46).

1.3.4.4 *In vitro* Expansion regulatorischer T-Zellen

Um natürliche Treg *in vitro* stimulieren und expandieren zu können, muss zunächst mittels Zellsortierung genau diese Population von den restlichen T-Zellen, insbesondere auch von den induzierten Treg, selektiert werden. Hierfür können Epigenetik und Methylierungs-Status nicht herangezogen werden, da noch keine Methode etabliert wurde, um vitale Zellen hiernach zu sortieren. Die Zellsortierung erfolgt demnach zunächst über Oberflächenantigene wie CD4 und CD25 (24, 47). Bei Zellsortierungen nur nach CD4+ und CD25high wurde allerdings festgestellt, dass die so gesorteten Zellen, auch wenn sie anfänglich in Kultur zu > 95% FOXP3 exprimieren, mit Kultivierungsdauer über 3 Wochen im Gehalt an FOXP3+-Treg erheblich variieren. Mit dem Abfall der *FOXP3*-Expression findet ein gleichzeitiger Anstieg der TSDR-Methylierung statt (24, 48). Je länger also die *in-vitro*-Expansion ist, desto weniger *FOXP3*+ Treg finden sich. Daraus folgt ein Zweifel an der Stabilität der Treg, v.a. weil bei den kultivierten und dadurch umstrukturierten Treg zunehmend proinflammatorische Zytokine wie IFNγ und IL-17 produziert werden (24, 49, 50, 51).

Um jedoch die Chance auf eine Gewinnung reiner FOXP3+ Treg bei der Zellsortierung zu erhöhen, bedient man sich u.a. eines weiteren Oberflächenantigens, nämlich CD45RA. Treg,

die CD45RA+ sind, bezeichnet man als naive Treg, die bisher noch keinen Antigenkontakt hatten. Diese Treg sind in Bezug auf ihr *FOXP3*-Expression und Funktionsbeibehaltung über die gesamte Expansionsdauer stabiler als Treg, die bereits Antigenkontakt hatten und somit CD45RA- sind (24, 48, 51). Weitere Analysen zeigten, dass nur die CD45RA+ gesorteten Zellen der CD4+CD25high T-Zell-Population einheitlich CD62L, CCR7, CTLA-4 (= cytotoxic T lymphozyte-associated antigen-4) und *FOXP3* exprimieren und über die Dauer der Kultivierung beibehalten. Zudem produzieren sie keine proinflammatorischen Zytokine und behalten ihre suppressive Aktivität auch nach der *in vitro* Expansion bei. Im Gegensatz dazu verlieren die CD45RA- Treg die Expression der Lymphknoten-Homing-Rezeptoren CCR7 und CD62L. Und vor allem auch die Expression von FOXP3 bleibt in dieser Zelllinie nicht erhalten.

1.3.4.5 Bedeutung der Treg bei GvHD nach allogener Stammzelltransplantation

Aufgrund von tierexperimentellen Studien geht man davon aus, dass auch nach HLA-identischer Stammzelltransplantation die Zellen des Spenders mit weiteren Strukturen des Empfängers, z.B. den minor histocompatibility antigens (mHA), interagieren und somit eine Graft-versus-Host-Disease (GvHD) auslösen können, bei der die Spender-T-Zellen die Empfängerzellen v.a. der Haut, der Leber und des Gastrointestinaltraktes angreifen und zerstören können. Die GvHD ist mit einer hohen Mortalität assoziiert. In unserer Arbeitsgruppe konnte aufbauend auf unseren tierexperimentellen Ergebnissen im Rahmen von wenigen klinischen Heilversuchen bei Patienten mit schwerer GvHD gezeigt werden, dass sich auf histologischer Ebene die Auswirkungen der GvHD auf die betroffenen Organsysteme nahezu vollständig rückgängig machen lassen, indem die Treg-Zellen des Spenders die Immunreaktion der restlichen Spender-T-Zellen auf die Empfängergewebe modulieren und unterdrücken (24). Um eine möglichst konstant *FOXP3*-exprimierende Treg-Population und damit die bestmögliche immunsupprimierende Antwort zu erhalten, wurde für die klinischen Therapieversuche die CD45RA+-Population der CD4+CD25high Treg verwendet. (51) Bislang konnte jedoch durch diese Heilversuche noch keine Verlängerung des Überlebens der von der GvHD betroffenen Individuen erreicht werden (24). Dennoch zeigen diese Versuche die Bedeutung der Treg-Zellen im Rahmen von immunologischen Erkrankungen auf und könnten eine potentiell kurative Behandlungsmöglichkeit bei Auftreten einer GvHD sowie verschiedener angeborener und erworbener hämatologischer Erkrankungen darstellen.

1.3.5 Interaktion der einzelnen T-Zell-Subpopulationen

Die oben beschriebenen T-Zell-Subpopulationen befinden sich nicht in einem statischen System, sondern interagieren miteinander. So entstehen zum Beispiel die Th17- und die Treg-Immunantwort parallel. Einige *FOXP3* exprimierende Zellen exprimieren auch *RORc*. Diese Interaktion zwischen FOXP3 und RORc kann wiederum die Th17 Antwort unterdrücken. Zudem ist IL-2 sowohl für Th17-Zellen als auch für Treg ein wichtiges Differenzierungssignal (8). IL-6 dagegen unterdrückt die Differenzierung in Treg und unterstützt die Th17-Differenzierung (10). Des Weiteren unterscheiden sich diese beiden Subpopulationen dahingehend, dass Th17 proinflammatorische Funktionen hat und die entzündliche Komponente der Immunantwort antreibt, wohingegen Treg die Hauptrolle in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und in der Modulation der Immunantwort spielen und die Aktivität der Th1-, Th2- und der Th17-Zellen regulieren. Somit ist eine Balance zwischen Th17- und Treg-Zellen unabdinglich für die Kontrolle und die Vermeidung der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen (52). Auch ist es wahrscheinlich, dass Th1- und Th17-Zellen aus gemeinsamen Vorläuferzellen entstehen. IL-12 und IL-23 sind beide mit der Differenzierung sowohl der Th1-Linie als auch der Th17-Linie assoziiert und besitzen eine identische Untergruppe in ihren Genen, die in beiden Zelllinien in gleichem Maß exprimiert zu sein scheint. Auch die Coexpression von IFNγ und IL-17 in T-Zellen lässt diesen Zusammenhang vermuten. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass eine frühe Th17-Antwort während einer Immunreaktion die Rekrutierung der Th1-Zellen zum Infektionsherd fördert und die Bildung von Th1-Gedächtniszellen unterstützt. Des Weiteren gibt es einige Bereiche, in denen die Entwicklung der Th17-Zelle durch die Th2-Zelle unterbunden wird, zum Beispiel wird durch eine hohe *GATA3*-Expression die Produktion von IL-17 gehemmt. Dasselbe trifft auch auf die Herabregulation von Th17-spezifischen Transskriptionsfaktoren wie *RORc* und *STAT3* zu (20). Wie zuvor schon erwähnt, unterdrücken *FOXP3*-positive Treg neben der Immunantwort der Th1- und Th17-Zellen auch die Differenzierung in die Th2-Subpopulation. Zudem wirken die regulatorischen T-Zellen auf NK-Zellen und dendritische Zellen ein und modulieren so die Immunantwort (8).

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen näher zu charakterisieren. Diese wichtigen Immunzellen spielen eine herausragende Rolle bei der Modulation des Immunsystems und der Aufrechterhaltung der körpereigenen Selbsttoleranz. Die Grundlage hierfür bilden ihre phänotypischen und funktionellen Eigenschaften ebenso wie ihre Wandlungsfähigkeit. Wie in der Einleitung beschrieben, kommt es bei der in vitro Expansion zu einer Veränderung des Expressionsmusters linienspezifischer Merkmale, wie z.B. Hoch- oder Herabregulation von *FOXP3*. Um diese Veränderung auf molekularer Ebene nachvollziehen und damit auch die Wandelbarkeit der Treg darstellen zu können, wurde in dieser Arbeit eine Methode etabliert, mit der es möglich ist, die in vitro expandierten Treg nach FOXP3 und IL-4 in verschiedene Subpopulationen zu sortieren. Nach der Sortierung sollte jeweils intakte RNA extrahiert werden, was nach der kombinierten FOXP3- und IL-4-Färbung bisher noch nicht möglich war. Im Anschluss an der RNA-Extraktion erfolgte mittels quantitativer real-time PCR die Analyse in Bezug auf Unterschiede in der Expression verschiedener linienspezifischer Gene. Hierbei wurden neben *CD4* als Erfolgskontrolle die linienspezifische Gene *RORc* für Th17-Zellen (6, 8, 20), *GATA 3* für Th2-Zellen (14, 15), *FOXP3* für Treg (24, 27, 28) sowie *LAG3* und *LIF* als potentielle Marker einer der Treg-Subpopulation (16, 35) verwendet.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
5ml FACS-Röhrchen steril	BD Falcon
5ml FACS-Röhrchen unsteril	BD Falcon
Einmalhandschuhe, latexfrei	Hartmann
Reagiergefäße (0,5 und 1,5 ml)	Eppendorf
Filterspitzen	Ratiolab
Glaskolben 500ml	VWR
Kanülen (0,4 und 0,9 mm)	BD Microlance
Heatsealing film	Eppendorf
Kryoröhrchen	Corning
MACS-Separation Columns (LS, LD)	Miltenyi
MACS PreSeparation Filter	Miltenyi
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Polypropylenröhrchen (15, 50 ml)	BD Falcon
Twin.tec PCR Plate 96, semiskirted	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm^2)	Corning
6-well, 24-well und 96-well-Flachboden Platten	BD Falcon
96-well Rundbodenplatten	Corning
Zellsiebe (70µm)	BD Falcon

3.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe	Roth
Varioclav 75 S	H + P Labortechnik AG
ARIA Hochgeschwindigkeitszellsorter	BD
Brutschrank, CO2, Heracell240	Kendro Heraeus
Digestorium	Prutscher

Elektrophoresekammer Blue Marine	Serva Elextrophoresis (Heidelberg)
FACSCalibur	BD
Gefrierschrank Premium no-frost	Liebherr
Heizblock	HLC (Heap Labor Consult)
Kühlblocks für twin.tec PCR Plate 96	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank Premium frost-free	Liebherr
Laminar Flow Einheit Clean Air	Biohazard
Laminar Flow Einheit	Heraeus HeraSafe
Mikroliterzentrifuge Mikro 200R	Hettich
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikrowelle Modell 8020	Privileg
Mikrozentrifuge Capsulefuge PMC-060	TOMY
ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop)	PEQLab
Netzgerät Blue Power Plus	Blue Power
Phosphorimmager, Typhoon 920	GE HealthCare Bio-Science
PTC-200 Thermo Cycler	MJ Research
RealPlex^4 Mastercycler, ep gradient S	Eppendorf, Hamburg
Permanentmagnet Midi-MACS	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
RotorMixer	Miltenyi
Rührer, magnetisch, beheizt, RCT basic	IKA Labortechnik
Schüttelgerät Vortemp 56 EVC	neoLab
Schweißgerät	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermostatic WaterBath-WBS	Fried Electric
Vortex REAX 2000	Heidolph
Waage	Sartorius
Zentrifuge 6K15	Sigma Laboratory Centrifuges
Zentrifuge Sigma 2-6 mit Ausschwingrotor	Sigma

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

3.1.3.1 Gekaufte Chemikalien

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller/Herstellung
2-Propanol	Merck
AB-Serum, human	Transfusionsmedizin Tübingen
Chloroform	Merck
Cytofix/Cytoperm	BD
DAPI	Sigma
DEPC	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO, 99,7%)	Sigma
EDTA-Dinatriumsalz (0,1mM)	Sigma
Ethanol	J.T. Baker
FACS-Clean	BD Heidelberg
FACS-Flow	BD Heidelberg
FACS-Rinse	BD Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
FOXP3 Färbekit(Pufferset)	eBioscience
Lymphozytenseparationslösung Biocoll	Biochrom AG
Methanol	Merck
NaCl (100mM)	Roth
Paraformaldeyhd	Fluka
DPBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline)	PAA Laboratories
RNAse freies Wasser	GIBCO invitrogen
SDS	Sigma
TRIzol ®	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol(für RNA)	Roth
2-Mercaptoethanol(für Zellkultur)	Gibco

3.1.3.2 Selbst angesetzte Puffer

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller/Herstellung
Komplettes RPMI Medium (cRMPI)	Medium RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 50 µM 2-Mercaptoethanol (Roth) 1 mM Natrium-Pyruvat 1 % MEM non-essential amino acids 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,4mL/100mL MEM Vitamins 10% FCS 10 mM HEPES-Puffer
MACS-Puffer	PBS + 2mmol EDTA, 1%FCS
MOPS 20x	300 ml DEPC-H_2O 42 g MOPS 4,1 g NaAcetat (H_2O-frei) 3,7 g EDTA pH 7,0 mit NaOH ad 500 ml DEPC-H_2O
Lysepuffer	0,2922 g NaCl (100 mM) (Roth) 0,06057 g Tris (10 mM) (Sigma) 0,9306 g EDTA (50 mM) (Sigma) 0,25 g SDS (0,5 %) (Sigma) ad 50ml USB (DEPC) Wasser
TRIzol ®	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.4 Enzyme, Inhibitoren, molekularbiologische Kits

	Hersteller
High Pure FFPE RNA Micro Kit	Roche
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen
Reverse Transkriptase (M-MLV RT)	Promega
RNAsin	Promega
SUPERase IN	Ambion

3.1.5 Farbstoffe und Stimulanzien

	Hersteller
Ethidiumbromid	Invitrogen
Ionomycin	Alexxis
PMA	Calbiochem(Merck)
Propidumiodid	Sigma
Trypanblau (0,4%)	Sigma
Türks-Lösung	Merck
Anti-CD28 purified, NA/LE	BD
OKT3 (anti-CD3)	Janssen-CILAG GmbH
Proleukin S (IL-2)	Novartis
TCE	Dynal

3.1.6 Anti-Human-Antikörper für die FACS-Färbung

Spezifität	Klon	Konjugation	Hersteller
anti-CD3	SK7	APC	BD
anti-CD4	SK3	APC	BD
anti-CD4	SK3	FITC	BD
anti-CD4	SK3	PE	BD
anti-CD14	MΦP9	PE	BD
anti-CD25	2A3	APC	BD
anti-CD25	2A3	PE	BD
anti-FOXP3	PCH101	APC	eBioscience
anti-FOXP3	PCH101	PE	eBioscience
anti-FOXP3	PCH101	eFluor450	eBioscience
anti-GATA3	TWAJ	PE	eBioscience
anti-IL-2	MQ1-17H12	APC	BD
anti-IL-2	MQ1-17H12	PE	BD
anti-IL-4	8D4-8	APC	eBioscience
anti-IL-4	8D4-8	AlexaFluor 488	eBioscience
anti-IL-17a	64DEC17	AlexaFluor 647	eBioscience

anti-IL-17a	64DEC17	AlexaFluor 488	eBioscience
anti-INFg	B27	APC	BD
anti-INFg	B27	FITC	BD
anti-INFg	B27	PE	BD
anti-RORc	AFKJS-9	PE	eBioscience
anti-Tbet	eBio4B10	AlexaFluor 647	eBioscience

3.1.7 Magnet-Beads zur Zellisolierung

Spezifität	Hersteller
anti-Human-CD4-MicroBeads	Miltenyi
anti-Human-CD25-MicroBeads	Miltenyi
anti-PE-MicroBeads	Miltenyi

3.1.8 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5‘ → 3‘)
CD4 Sense	ATG TGG CAG TGT CTG CTG AG
CD4 Antisense	GAT GCC TAG CCC AAT GAA AA
β2M Sense	GTG CTC GCG CTA CTC TCT CT
β2M Antisense	TCT CTG CTG GAT GAC GTG AG
FOXP3 Sense	GAA ACA GCA CAT TCC CAG AGT TC
FOXP3 Antisense	ATG GCC CAG CGG ATG AG
β-Aktin Sense	CGT CTT CCC CTC CAT CG
β-Aktin Antisense	CTC GTT AAT GTC ACG CAC
IL-4 Sense	CAC AGC AGT TCC ACA GGC TTC AC
IL-4 Antisense	CGT ACT CTG GTT GGC TTC CTT CAC
GAPDH Sense	CCA CAT CGC TCA GAC ACC AT
GAPDH Antisense	GGC AAC AAT ATC CAC TTT ACC AGA GT
GATA3 Sense	GAC CCT GTC TGC AAT GCC TG
GATA3 Antisense	TCT GGA TGC CTT CCT TCT TCA TAG TC
RORc Sense	GCAGCG CTC CAA CAT CTT CTC

RORc Antisense	GCA CAC CGT TCC CAC ATC TC
LIF Sense	GTG CCA ATG CCC TCT TTA TTC TC
LIF Antisense	CCA AGG TAC ACG ACT ATG CGG
LAG3 Sense	CGT CTC CAT CAT GTA TAA CCT CAC
LAG3 Antisense	CCT GGC TCA CAT CCT CTA GTC
TBET Sense	TGA ACG ACG GAG AGC CAG AG
TBET Antisense	TGG TTG GGT AGG AGA GGA GAG
INFγ Sense	TTT GGG TTC TCT TGG CTG TTA CTG
INFγ Antisense	CAT TAT CCG CTA CAT CTG AAT GAC CTG

3.1.9 Software und Internetdienste

Im Folgenden finden sich alle Software und Internetdienste, die während der Erstellung der Arbeit Anwendung gefunden haben.

Software	Hersteller/Adresse
Adobe Acrobat Reader	Adobe, Germany
BioGPS	http://biogps.gnf.org/#goto=welcome
CELLQuest Pro	BD
Corel Draw	Corel Corporation
FlowJo	Treestar, San Carlos
Mastercycler RealPlex	Eppendorf, Hamburg
Microsoft Office	Microsoft, Redmont
NanoDrop	PEQ Lab
Pubmed Medline	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Ermittlung der Zellzahl

Um die Zellzahl einer Population zu bestimmen, wurden die Zellen mit einer 0,16-prozentigen Trypanblau-Lösung in 0,9% NaCl und in PBS verdünnt, in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und mithilfe eines Mikroskops ausgezählt. Da tote Zellen sich wegen ihrer fehlenden Membranintegrität im Gegensatz zu den lebenden blau färben, ist dadurch eine Lebend-Tot-Diskriminierung möglich. Die Zellzahl wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{Anzahl\ der\ lebenden\ Zellen}{Anzahl\ der\ ausgezählten\ Quadranten} \times \text{Volumen} \times Verdünnungsfaktor\ \times 10\,000$$

Bei Zellsuspensionen mit potentiell enthaltenen Erythrozyten wurde zur Bestimmung der Zellzahl die Türkslösung verwendet. Die in dieser Lösung enthaltene Essigsäure hämolysiert die Erythrozyten, das enthaltene Gentianviolett diskriminiert, wie oben erläutert, weiterhin die Leukozyten.

3.2.1.2 Auftauen von Zellen

Das Auftauen kryokonservierter Zellen, vor allem PBMCs, erfolgte nach dem in der Arbeitsgruppe üblichen Protokoll.

Beim Auftauen wurden die Kryoröhrchen schnell in ein 37°C warmes Wasserbad überführt, nach dem Auftauen rasch in warmem RPMI-Medium (10%FCS) verdünnt und abzentrifugiert (311 G/10 min/4 °C). Danach erfolgte je nach Zellzahl eine Aussaat in 25 bzw. 75 cm^2 Zellkulturflaschen, die über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO_2, ≥ 90% Luftfeuchtigkeit) inkubiert wurden, oder es erfolgte die sofortige Weiterverarbeitung im Hinblick auf Färbung oder RNA-Gewinnung.

3.2.1.3 Kultivierung und Expansion humaner Treg und Tconv Zellen

In vitro expandierte Treg-Zellen wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jasmin Stahl und Rüdiger Eder. Zur Zellsortierung wurden dafür zunächst aus Leukapheresaten über Dichtezentrifugation die humanen PBMCs gewonnen. Diese wurden mit PE-anti-Human-CD25 Antikörpern gefärbt und mit anti-PE-beads (Milteny Biotec, Berg-

isch-Gladbach) über LS-Säulen und das Midi-MACS-System gemäß des Herstellerprotokolls in eine Positiv- und eine Negativ-Fraktion aufgetrennt. Dann wurden beide Fraktionen mit FITC-anti-Human-CD4 und APC-anti-Human-CD45RA Antikörpern gefärbt und über ein 30 µm Zellsieb filtriert, um Zellkonglomerate herauszufiltern. Um während der Sortierung tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurden jeweils 10% Propidiumiodid zu den beiden Zellfraktionen gegeben. Im Anschluss daran erfolgte die Zellsortierung im Durchflusszytometer FACSAria. Hierbei wurden die Proben in $CD4^+CD25^{high}CD45RA^+$ (Treg-Subpopulation, naiver Zellen), $CD4^+CD25^{high}CD45RA^-$ (Treg-Subpopulation, mit schon erfolgtem Antigenkontakt) und $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellsubpopulationen sortiert. Die sortierten T-Zellpopulationen wurden im Anschluss durchflusszytometrisch reanalysiert und hatten, falls nicht anders vermerkt, eine Reinheit von > 98%. Expandiert wurden die so gewonnen Zellen zum einen auf sog. L-Zellen unter Zugabe von anti-Human-CD3- und anti-Human-CD28-Antikörper, zum anderen erfolgte die Expansion mit T-Zell-Expander-beads (TCE) mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper auf ihrer Oberfläche. Dem Kulturmedium wurden außerdem 300 U/ml humanes IL-2 zugesetzt, um die Anergie der humanen Treg-Zellen zu überwinden.

3.2.1.4 Ruhigstellung von in vitro expandierten Zellen

Für qualitative und funktionelle Analysen der in vitro expandierten Treg-Subpopulationen wurden die Zellen an Tag 11 (L-Zell-Kultur) oder an Tag 14 (TCE-Kultur) geerntet und ohne weitere Stimulation in einer Konzentration von $1x\ 10^6$/ml für weitere 4 Tage in cRPMI mit 300 U/ml IL-2 kultiviert (= „ruhig gestellt“ oder „rested“).

3.2.1.5 PMA/Ionomycin-Stimulation für Zytokinanalysen

Um die Zytokin-Expression der Zellen durchflusszytometrisch analysieren zu können, mussten die ruhig gestellten Zellen zunächst wieder mit PMA/Ionomycin stimuliert werden, um die Zytokinproduktion zu aktivieren. Hierfür wurden die Zellen in cRPMI mit 20 ng/ml PMA und 1 µM Ionomycin unter Zugabe von 3 µM des Sekretionshemmers Monensin (Golgi Stop) für 4 bis 5 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO_2, ≥ 90% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit FACS-Puffer erfolgte zunächst die Oberflächenfärbung und nach Permeabilisierung der Zellen die intrazelluläre Färbung der akkumulierten Zytokine.

3.2.1.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das der Erfassung physikalischer und chemischer Eigenschaften verschiedener Zellen oder Zellpopulationen dient (FACS = fluorescence activated cell sorting). Mittels FACS kann man neben der Größe und Granularität der Zellen auch zellspezifische Antigenmuster durch fluorochrom-markierte Antikörper analysieren. Hierfür fließen die markierten Zellen, die sich in einer Lösung befinden und durch eine Kapillare angesaugt werden, einzeln in hohem Tempo an einem Laserstrahl vorbei. Im verwendeten Gerät (FACSCalibur, BD, Heidelberg) handelt es sich um einen blauen Argonlaser (488nm) und eine rote Laserdiode (633nm). Das Licht wird in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Zelle gestreut und durch verschiedene Filter, mit deren Hilfe die Auftrennung der Fluoreszenzsignale erfolgt, auf unterschiedliche Detektoren übertragen. Das Durchflusszytometer kann unterscheiden zwischen dem Vorwärtsstreulicht (FSC=Forward Scatter), das ein Maß für die Beugung des Licht im flachen Winkel ist und vom Volumen der Zelle, also ihrer Größe, abhängt, und dem Seitwärtsstreulicht (SSC=Sideward Scatter), das ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel ist und von der Granularität der Zelle, der Größe und der Struktur des Zellkerns abhängt (53).

Die Messung der Fluoreszenz beruht auf dem Prinzip, dass bei Anregung von Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laser deren Energieniveau angehoben und beim Zurückfallen auf das Ausgangsniveau Energie in Form von Licht einer bestimmten, für jeden Fluoreszenzfarbstoff spezifischen Wellenlänge abgegeben wird (Emission). Die Intensität ist proportional zu der Menge an gebundenen fluorochrom-markierten Antikörpern pro Zelle. Verwendet wurden als Fluorochrome AF488 (Alexa Fluor 488), APC (Allophycocyanin), FITC (Fluorothioisocyanat), PE (Phycoerythrin), und der DNA-Farbstoff Propidiumiodid, um tote Zellen zu diskriminieren.

Die Emission der Farbstoffe wurde in vier Kanälen gemessen:

Fluoreszenzkanal 1 (Fl1) FITC- und AF488

Fluoreszenzkanal 2 (Fl2) PE

Fluoreszenzkanal 3 (Fl3) PI

Fluoreszenzkanal 4 (Fl4) APC

Die Auswertung der Daten wurde mithilfe des Analyseprogramms FlowJo® (Treestar, San Carlos) vorgenommen.

3.2.1.7 Zellfärbung für durchflusszytometrische Analysen

3.2.1.7.1 Färbung von Oberflächenantigenen

Pro Färbe-Ansatz wurden 1 x 10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen gefüllt, mit FACS-Puffer aufgefüllt, bei 365 G und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.
Das Pellet wurde in 100µl FACS-Puffer resuspendiert, die entsprechende Menge an fluorochrom-markierten Antikörpern dazugegeben und auf dem Vortex kurz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 4°C wurde das FACS-Röhrchen erneut mit FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, um überschüssige nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Nach der Resuspension der Zellen in 300µl FACS-Puffer und der Zugabe von 30µl Propidiumiodid (10% Anteil am Endvolumen im FACS-Röhrchen) zur Anfärbung toter Zellen konnten die Proben durchflusszytometrisch analysiert werden.

3.2.1.7.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Pro Färbe-Ansatz wurden 1 x 10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen gefüllt, mit FACS-Puffer aufgefüllt, bei 365 G und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.
Dann folgte zunächst, wie oben beschrieben, die Antikörperfärbung der Oberflächenantigene.
Nachdem die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert worden waren und der Überstand abgesaugt worden war, wurden die Zellen in 250µl Cytofix/Cytoperm-Lösung (BD, Heidelberg) 20min bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit BD Perm/Wash-Buffer (BD, Heidelberg) gewaschen und danach in 50µl BD Perm/Wash-Buffer aufgenommen, um weiterhin die Permeabilität der Zellmembran zu gewährleisten. Dann wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge an fluorochrom-markierten Antikörpern für die Intrazellulärfärbung 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen zunächst mit BD Perm/Wash-Buffer und dann mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 300µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.1.7.3 Intranukleäre Färbung des Transkriptionsfaktors FOXP3

Die FOXP3-Färbung der Zellen erfolgte nach dem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll.
Pro Färbe-Ansatz wurden 1 x 10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen gefüllt, mit FACS-Puffer aufgefüllt, bei 365 G und 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt. Dann folgte zunächst, wie oben beschrieben, die Antikörperfärbung der Oberflächenantigene.
Nachdem die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert worden waren und der Überstand abgesaugt worden war, wurden die Zellen auf dem Vortex in 1000µl Fixierungs-

/Permeabilisierungs-Lösung (eBioscience, San Diego) 30min bei 4°C fixiert und permeabilisiert.
Die fixierten Zellen wurden zweimal mit Permeabilisierungspuffer (PermBuffer, eBioscience, San Diego) gewaschen und danach in 100µl eBioscience PermBuffer aufgenommen und mit 2µl Rattenserum für 15 min bei 4°C blockiert, um eine unspezifische Bindung des Ratte-anti-human-FOXP3-Antikörpers zu verhindern. Ohne die Zellen zu waschen, wurden dann direkt die fluorochrom-markierten Antikörper für FOXP3 zugegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit zunächst zweimal eBioscience Perm/Wash-Buffer und dann einmalig mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 300µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.1.7.4 Gleichzeitige Färbung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren

Hierzu wurde das Färbeschema von eBioscience für die intranukleäre Färbung verwendet.
Um die Durchlässigkeit von Zell- und Zellkernmembran zu gewährleisten, wurden die Zellen für die gleichzeitige Färbung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren entsprechend des oben aufgeführten Protokolls für die intranukleäre Färbung fixiert und permeabilisiert. Da diese kommerziell erhältlichen Fixierungs-/Permeabilisierungs-Reagenzien mit einer anschließenden Isolierung von intakter mRNA aus den Zellen nicht kompatibel sind, wurde zusätzlich versucht, unter Verwendung verschiedener anderer Fixierungs- und Permeabilisierungslösungen eine qualitativ gleichwertige Färbung der Zellen zu erreichen.
Die Oberflächenfärbung erfolgte hierfür wie unter 3.2.1.7.1 beschrieben.

Zur Fixierung und Permeabilisierung wurden als Puffer reines PBS und folgende Substanzen in parallelen Einzelansätzen verwendet:

Nr.	Substanz	Konzentration	Eingesetzte Menge
1	Paraformaldehyd (PFA)	0.25%, 0.5%, 1%, 1.5% in PBS	250 µl, 500 µl, 1ml
2	Ethanol (EtOH)	70% in RNAse-freiem Wasser verdünnt	500 µl, 1 ml
3	Kombination aus Paraformaldehyd und Ethanol	PFA: 0.25%, 0.5%, 1%, 1.5%, in PBS EtOH: 70%	PFA: 250 µl EtOH: 500 µl

Des Weiteren sahen die Versuche wie folgt aus:

A) Protokoll für Ansatz Nr. 1:

Die Zellen wurden nach der Oberflächenfärbung mit PBS aufgefüllt und bei 365 G für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen auf dem Vortex mit X µl X % Paraformaldehyd resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 x 2 ml PBS gewaschen und in 100 µl PBS aufgenommen. Für die FOXP3-Färbung wurden die Zellen zunächst mit 2µl Rattenserum (entspricht einer Endkonzentration von 2%) für 15 min bei 4°C blockiert und zum Schutz der RNA vor RNAsen mit 5µl RNAsin versetzt. Dann wurden die gewünschten fluorochrom-markierten Antikörper gegen Zytokine und FOXP3 zugegeben und für weitere 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Probe oder die Weiterverarbeitung für die anschließende RNA-Extraktion.

B) Protokoll für Ansatz Nr. 2 (54):

Die Zellen wurden nach der Oberflächenfärbung mit PBS aufgefüllt und bei 365 G für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen auf dem Vortex mit X µl eiskaltem X % EtOH/PBS resuspendiert und 10 min bei -20 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 x 2 ml Puffer gewaschen und, wie in Ansatz Nr. 1 beschrieben, gefärbt und weiterverarbeitet.

C) Protokoll für Ansatz Nr. 3:

Die Zellen wurden nach der Oberflächenfärbung mit PBS aufgefüllt und bei 365 G für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit 250 µl X % Paraformaldehyd resuspendiert und entweder für 10 min bei RT fixiert oder sofort nach 10-15 sec Fixierung auf dem Vortex zweimal mit Puffer gewaschen und abgesaugt. Hiernach wurden 5µl RNAsin zugegeben, die Zellen mit 0,5 ml eiskaltem 70% Ethanol auf dem Vortex resuspendiert und 10 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Puffer gewaschen. Die weitere Färbung der Zellen erfolgte wie in Ansatz 1 beschrieben; ebenso die Weiterverarbeitung.

3.2.1.8 Isolierung humaner Treg- und Tconv-Zellen aus dem peripheren Blut

Um aus humanen PBMCs die verschiedenen T-Zellpopulationen zu sortieren, wurden alle Isolationsschritte, wie schon unter 3.2.1.3 näher erläutert, durchgeführt.

3.2.1.8.1 Magnetische Zellseparation (MACS)

Die magnetische Zellseparation ist eine Methode, mit der man eine bestimmte Zellart von anderen Zellarten, die das passende Antigen nicht besitzen, trennen kann. Diese Trennung erreicht man dadurch, dass man mit Antikörpern beschichtete Eisenpartikel, sog. Microbeads, an diese Zellart bindet und diese durch Einbringen in ein Magnetfeld anreichert (positive Separation). Die Separation wurde gemäß dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll und mit Microbeads der Firma Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach) durchgeführt. Dafür verwendet wurden meistens aufgetaute PBMCs. Zunächst wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen, bei 311 G und 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt. Pro 10 x 10^6 Zellen wurden 80µl FACS-Puffer und 20µl Microbeads verwendet. Diese Zellsuspension wurde 15 min bei 4°C inkubiert und danach mit MACS-Puffer aufgefüllt, über ein Zellsieb filtriert, bei 311 G und 4°C für 10 min zentrifugiert, abgesaugt und erneut in MACS-Puffer aufgenommen. Für die Separation wurden LS-Säulen (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) verwendet und in einen Permanentmagneten (Midi-MACS, Miltenyi Biotech) eingespannt. Vor der Separation wurde die Säule einmal mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde luftblasenfrei auf die Säule gegeben, die positiv markierten Zellen wurden durch die Magneteinwirkung in der Säule zurückgehalten, die negativen Zellpopulationen eluiert. Nachdem die Säule dreimal mit MACS-Puffer luftblasenfrei gespült worden war, wurde sie aus dem Magneten genommen und über einem frischen Sammelröhrchen mit 5ml MACS-Puffer aufgefüllt. Die Zielzellen wurden mit Hilfe eines Druckstempels eluiert. Die danach durchgeführte durchflusszytometrische Kontrolle ergab eine Reinheit der über MACS-Separation gewonnenen Zellpopulationen von > 90%, soweit nicht anders angegeben.

3.2.1.8.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Eine besondere Anwendung der Durchflusszytometrie stellt die fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung dar, die mithilfe des FACSAria (BD, Heidelberg) nach dem in der Arbeitsgruppe üblichen Protokoll durchgeführt wurde. Durch spezielle automatisierte Reinigungs- und Spülprogramme wurde vor jeder Zellsortierung das Gerät sterilisiert und das Schlauchsystem luftblasenfrei befüllt.

Für die Zellsortierung erfolgte die Färbung der Zellen mit fluorochrom-markierten Antikörpern, wie unter 3.2.1.3 beschrieben. Vor der Sortierung wurden die Zellen über ein 30µm Zellsieb filtriert, um eventuell vorhandene Zellkonglomerate zu entfernen.

Nach der durchflusszytometrischen Messung wurde mit Hilfe sogenannter Sort-Gates festgelegt, nach welchen Zelleigenschaften, Antigen- und Zytokinmustern sowie Transkriptionsfak-

toren die Zellsortierung erfolgen soll. Die anschließend durchgeführte Zellsortierung erfolgte mit einer Durchflussfrequenz (= Flow Rate), die den spezifischen Eigenschaften der Zellen und Färbung angepasst wurde und in der Regel zwischen 5.000- 20.000 Zellen/s lag, und einer Sortierfrequenz (= Sort Rate), die 10.000 Zellen/s nicht überschritt, aber des Weiteren stark von der zu sortierenden Zellpopulation und deren prozentualem Anteil an der Probe abhängig war. Die Zellen wurden in verschiede Auffangröhrchen sortiert, in denen PBS vorgelegt wurde. Die durchflusszytometrische Re-Analyse ergab eine Reinheit von über 95%, wenn nicht anders angegeben.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Vermeidung von Kontaminationen oder Zerstörung der RNA wurden die Arbeitsflächen vor Arbeitsbeginn mit „RNase away“-Spray (MβP, Molecular Bio Products) gereinigt. Zudem erfolgte die Arbeit mit Einmal-Handschuhen unter Benutzung von Filterspitzen und RNAse-freien Einwegsmaterialien.

Um verschiedene RNA-Extraktionsmethoden miteinander zu vergleichen, wurde neben TRIzol (Invitrogen und Sigma) auch das High Pure FFPE RNA Micro Kit (Roche) verwendet (55). Alle Isolierungen erfolgten nach dem jeweiligen im Handbuch des Herstellers vorgeschlagenen Protokoll.

Zur Lagerung wurde die gewonnene RNA jeweils in 20µl RNAse-freiem Wasser gelöst und bis zu maximal einem Monat bei -20°C, danach bei -80°C eingefroren.

3.2.2.2 Nano-Drop-Messung zur Bestimmung der Gesamt-RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration der extrahierten RNA wurden die Proben photometrisch am ND-1000 Spectrophotometer (PEQLab) vermessen. Hierfür wurden nach Eichung mit RNAse-freiem Wasser je Probe 1,8 µl luftblasenfrei auf den Detektor gegeben und dieser geschlossen. Anschließend erfolgten die Detektion von A230, A260 und A280 sowie die Bildung der Quotienten 260/280 und 260/230. Laut Geräte-Handbuch gilt eine 260/280-Ratio von 2.0 als akzeptabler Wert, um die RNA als „rein“, das heißt ohne Verunreinigungen, zu betrachten. Für die 260/230-Ratio gilt ein Wert von 2.0-2.2 als Anhaltspunkt für eine verunreinigte RNA.

3.2.2.3 RNA-Gelelektrophorese

Um die Integrität der RNA zu ermitteln, nutzt man die Eigenschaft von Nukleinsäuren, wegen ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen zu sein. So ist es durch Anlegen einer Spannung und Einbringen in ein Formaldehyd-Agarose-Gel möglich, die zur Anode wandernden Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufzutrennen. Als Integritätskriterium werden die Banden der beiden ribosomalen RNAs 28S und 18S verwendet; sind diese gut sichtbar, geht man davon aus, dass auch die restliche RNA intakt ist (56).

Für die RNA-Gelelektrophorese wurden 1% Agarose Gele gegossen. Für ein 200ml Gel benötigt man: 2 g Agarose, 153 ml DEPC-H_2O, 10 ml 20x MOPS und 35 ml Formaldehyd (37%, säurefrei). In einem Erlenmeyer-Kolben wurden Agarose, 20x MOPS und DEPC-H_2O in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach vollständigem Auflösen der Agarose und anschließendem Abkühlen auf 60°C auf dem Magnetrührer wurde unter dem Abzug das Formaldehyd hinzugegeben. Nach weiterem Abkühlen unter kontinuierlichem Rühren auf ca. 50°C wurde die Lösung in die Gelkammer gegossen. Nach vollständigem Erkalten wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt.

Zur Probenvorbereitung wurden die ausgewählten RNA-Proben mit einer RNA-Menge von 5µg pro Probe 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend pro 1 µl RNA 4µl Ethidiumbromid zugegeben und für 20 min bei 65°C inkubiert. Nachdem die Elektophoresekammer mit 1x MOPS als Laufpuffer aufgefüllt worden war, wurden die Proben in die Kammern des Gels pipettiert und liefen bei 60 V für 2 Stunden in Richtung Anode.

Die Gele wurden auf dem Phosphorimmager Typhoon 920 (GE HealthCare Bio-Science) eingescannt, gespeichert und danach in den Sonderabfall entsorgt.

3.2.2.4 Reverse Transkription

Um die extrahierte RNA mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion analysieren zu können, muss sie in eine einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür dient die RNA der Reversen Transkriptase als Matrize. Um unter anderem auch nicht polyadenylierte RNA (u.a. auch RNA-Fragmente) revers zu transkribieren, wurden Random-Hexamer-Primer eingesetzt, die an verschiedenen Stellen an die RNA binden und somit die RNA als gesamtes in cDNA umschreiben, inklusive der 18S-RNA.

Zur Herstellung der cDNA wurden pro Probe folgende Substanzen benötigt:

- 1 µl Random Hexamere (Promega)
- 1 µl dNTP-Mix
- 4 µl MLV-Puffer (Promega)

- 0,5 µl RNasin
- 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase
- x µl RNA (100-2000 ng)

ad RNAse-freies H_2O x µl

Bei jeder Transkription wurde pro Probe die gleiche Menge RNA eingesetzt und mit RNase-freiem H_2O auf ein Volumen von 12,5 µl aufgefüllt. Die weitere Vorbereitung erfolgte wie im Herstellerprotokoll beschrieben. Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des Thermo Cyclers PTC-200 von MJ Research bei 42°C über 50 min. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte anschließend ein Denaturierungsschritt bei 70°C über 15 min. Die cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert oder sofort zur Amplifizierung eingesetzt.

3.2.2.5 Real-time Polymerase-Kettenreaktion

Um die Transkriptionsregulation bestimmter Gene zu untersuchen, eignet sich die real-time PCR. Hierbei können bestimmte vorher ausgewählte Nukleinsäuresequenzen mithilfe von Primern selektiv amplifiziert und angereichert werden. Durch die kontinuierliche Beobachtung dieser Anreicherung können folgende Parameter bestimmt werden: Zykluszahl bei Nachweisgrenze, Menge des PCR-Produkts im Bereich des exponentiellen Anstiegs, Schwelle und Sättigung. Die Amplifikation erfolgt mit Hilfe von thermo-stabilen DNA-Polymerasen, die ausgehend von dem kurzen doppelsträngigen Stück, das durch Anlagerung des Primers entsteht, den fehlenden komplementären Einzelstrang in 5‘-3‘-Richtung synthetisieren. Durch Trennung des Doppelstrangs, erneute Anlagerung von Primern und Synthese durch die DNA-Polymerasen erfolgt eine exponentielle, selektive Anreicherung des gewünschten Transkripts. Theoretisch entstehen so bei n Zyklen 2^{n-1} Amplifikate. Diese Ampflifizierung erfolgt in programmierbaren Thermoblöcken automatisch (57).

Da die cDNA ein sehr sensibles Molekül und die quantitative PCR sehr anfällig für Kontaminationen ist, wurden verschiedene Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamination und Degeneration der cDNA ergriffen: Alle Arbeiten erfolgten unter Kühlung auf Eis, die Arbeitsflächen und Pipetten wurden vor Beginn UV-bestrahlt und es wurden Pipettenspitzen mit Filter verwendet (58).

Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green, der mit der doppelsträngigen DNA interkaliert, wurde nach jedem PCR-Zyklus die Menge an neu entstandener doppelsträngiger DNA analysiert, sobald die DNA-Menge einen bestimmten Schwellenwert überschritten hatte (treshold cycle, C_t).

Das Material wurde, wie unter 3.2.2.1 und 3.2.2.4 beschrieben, aquiriert und alle Reaktionen wurden unter Verwendung vom QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) und RealPlex^4 Mastercycler, ep gradient S (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Amplifikationsreaktion wurde in einem Volumen von 10 µl ausgeführt:

SyborGreen: 5 µl/Probe

Sense (10pmol): 0,5 µl/Probe

Antisense (10pmol): 0,5 µl/Probe

H_2O 2 µl/Probe

2 µl cDNA (1 : 6 verdünnt mit H_2O)

Um die Effizienz der Reaktion zu überprüfen, wurden bei jedem Versuchsansatz eine geeignete Probe als Verdünnungsreihe (1:1, 1:10; 1:100, 1:1000, 1:10000) und eine Negativkontrolle (H_2O) mitgeführt.

Das Programm, nach dem die Amplifikation ablief, sah wie folgt aus:

- 95 °C für 5 min
- 95 °C für 8 sec und 60°C für 20 sec (Elongationsphase): Wiederholung in 45 Zyklen
- 95 °C für 15 sec
- 60 °C für 15 sec
- Langsames Aufheizen von 60 °C auf 95 °C innerhalb von 10 min
- 95 °C für 15 sec

Am Ende der Elongationsphase jedes Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung, am Ende des gesamten Programms die Analyse des Schmelzverhaltens der DNA.

3.2.3 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der student's t-test verwendet. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurden als statistisch

$p > 0,05$ nicht signifikant

$p < 0,05$ signifikant (*)

$p < 0,01$ hochsignifikant (**)

$p < 0,001$ extrem signifikant (***) erachtet.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen auf molekularer Ebene näher zu charakterisieren sowie die Wandlungsfähigkeit dieser Zellpopulation anhand ausgewählter Gene und ihres jeweiligen Expressionsmusters aufzuzeigen.
Hierfür wurde zunächst nach einer Färbemethode gesucht, bei der es nach Fixierung und Permeabilisierung der Treg möglich war, die Güte dieser Färbung mit den kommerziell erhältlichen Färbemethoden zu vergleichen, die Treg mittels Zellsortierung nach IL-4 und FOXP3 aufzutrennen und danach noch intakte RNA aus den sortierten Zellen zu gewinnen. Dies gelang, indem eine in der Arbeitsgruppe bekannte DNA-Extraktionsmethode modifiziert und zur RNA-Extraktion eingesetzt wurde. Nach Überprüfung der Integrität der so gewonnenen RNA erfolgte die Analyse der verschiedenen linienspezifischen und anderer ausgewählter Gene mittels quantitativer real-time PCR, um die Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Treg-Subpopulationen aufzuzeigen und miteinander zu vergleichen.

4.1 Gewinnung intakter RNA aus fixierten Treg – die Grundproblematik

Zur Fluoreszenzfärbung von intrazellulären Strukturen benötigt man bestimmte Fixierungs- bzw. Permeabilisierungslösungen, damit die fluoreszenzmarkierten Antikörper an ihr Antigen binden können. Im Falle von FOXP3, das im Zellkern lokalisiert ist, benötigt man eine Permeabilisierungslösung, die sowohl die Zellmembran als auch den Zellkern für die fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen FOXP3 durchlässig macht. Im Falle von Zytokinen ist es vor der Permeabilisierung der Zelle nötig, die von der Zelle produzierten und im Zellplasma lokalisierten Zytokine in der Zelle zu fixieren, damit sie in der Zelle gebunden bleiben und von fluoreszenzmarkierten Antikörpern erkannt werden. Würden die Zytokine ihre Zelle verlassen und sich *in vitro* im umgebenden Puffer befinden, wären sie zum einen ihrer Ursprungszelle nicht mehr zuzuordnen und würden zum anderen in den auf die Färbungen folgenden Waschschritten entfernt werden. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zelle erfolgt die Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, z.B. gegen FOXP3 oder verschiedene Zytokine. Betrachtet man die Fluoreszenzfärbungen für FOXP3 und Zytokine, so lässt sich feststellen, dass die Güte der Färbung zwischen den kommerziell erhältlichen Fixierungs- und Permeabilisierungslösungen vergleichbar ist. Eine Gewinnung intakter RNA ist jedoch mit keiner dieser Methoden möglich. Lediglich die FOXP3-Färbung der in unserer Arbeitsgruppe 2010 etablierten Methode mit 70% Ethanol als Permeabilisierungslösung erlaubt eine

Gewinnung intakter RNA, jedoch wiederum keine Färbung für Zytokine, da die Zytokine durch Ethanol nicht in der Zelle fixiert werden können (54).
Im Folgenden wird nun der Standard für die Messung der RNA-Integrität festgelegt und anschließend werden die einzelnen Färbemethoden näher beleuchtet und neue Methoden entwickelt.

4.1.1 RNA aus unfixierten in vitro expandierten Treg

Zur Festlegung eines Standards, mit dem die Integrität der extrahierten RNA-Proben aus fixierten Treg verglichen werden soll, wurde mittels Trizol aus unfixierten in vitro expandierten Treg RNA gewonnen. Die gewonnene RNA wurde zunächst photometrisch am NanoDrop-1000 Spectrophotometer (PEQLab) vermessen und danach auf ein RNA-Gel aufgetragen, um die Integrität der RNA zu überprüfen. Die Integrität der RNA stellt man anhand der ribosomalen RNA fest, deren Banden 18S und 28S sichtbar sein müssen; sind diese zwei Banden zu sehen, kann man davon ausgehen, dass auch die restliche RNA intakt ist. Da jedoch davon auszugehen ist, dass bei fixierten Zellen auch die RNA in der Zelle fixiert ist und dadurch wahrscheinlich nicht vollständig extrahiert werden kann, wurde zudem getestet, ob ein Lysepuffer mit 0.5% SDS, wie er normalerweise für die DNA-Extraktion verwendet wird, Einfluss auf die Integrität unfixierter RNA hat. Da sich hier keine Veränderung der RNA-Integrität zeigte, wurde der Lysepuffer (LP) bei der RNA-Extraktion aus fixierten Zellen in allen folgenden Versuchen eingesetzt.
Abbildung 4-1 zeigt die photometrischen Messergebnisse der RNA-Proben aus je 4 Millionen unfixierten RA- Treg, die zum einen nur mit Trizol, zum anderen mit Trizol und Lysepuffer extrahiert wurden. Betrachtet man die Wellenlänge λ=260nm, bei der die RNA ihr Absorptionsmaximum hat, so sieht man, dass dieses bei der RNA-Extraktion mit Trizol bei ca. 8.00 nm liegt, ein kleinerer Absorptionsanstieg auf ca. 6.70 nm findet sich bei einer Wellenlänge von ca. 225 nm. Bei der Extraktion mit Trizol und Lysepuffer liegt das RNA-Absorptionsmaximum nur bei ca. 5.00 nm und man sieht auch diesmal zusätzlich ein weiteres Absorptionsmaximum von ca. 6.60 nm bei einer Wellenlänge von ca. 225 nm. Aus dem Absorptionsunterschied bei einer Wellenlänge von 260 nm lässt sich schließen, dass nach der RNA-Extraktion mit Trizol und Lysepuffer weniger RNA zur Messung vorhanden ist als nach alleiniger Extraktion mit Trizol. Die Verunreinigungen, die zu einem Absorptionsanstieg bei einer Wellenlänge von 225 nm führen, sind jedoch nach beiden Extraktionsmethoden in gleichem Maß vorhanden.

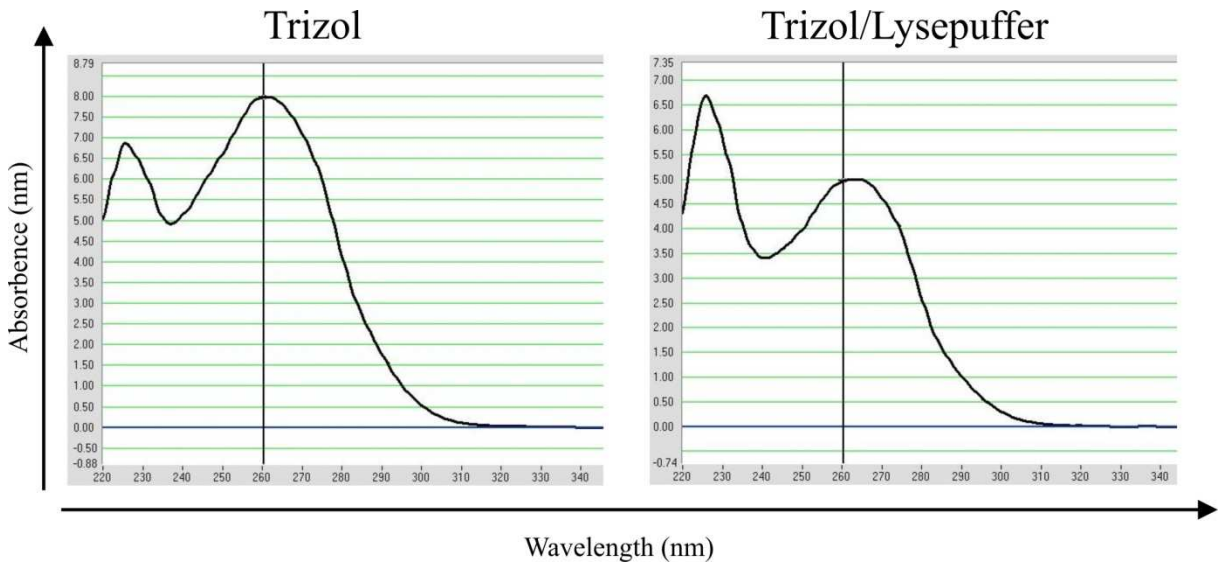


Abb. 4-1: Einfluss von Lysepuffer bei der RNA-Extraktion aus unfixierten Zellen mit Trizol auf die Absorption bei λ = 260nm

Unfixierte RA- Treg wurden für 11 Tage in vitro kultiviert und anschließend RNA aus ihnen extrahiert. Hierfür wurde zum einen die Extraktion mit Trizol nach Herstellerprotokoll verwendet, zum anderen wurden die Zellen vor Zugabe von Trizol mit Lysepuffer für 1 h bei 65°C inkubiert.

Daher wurde zusätzlich der RNA-Gehalt betrachtet. Während nach RNA-Extraktion mit Trizol 319.15 ng/µl messbar waren, waren es nach Extraktion mit Trizol und Lysepuffer nur 197.99 ng/µl. Es lässt sich also festhalten, dass sich der Einsatz des Lysepuffers negativ auf die Menge der extrahierten RNA auswirkt. Da er aber zur Extraktion der RNA aus fixierten Zellen unbedingt benötigt wird, soll in einem weiteren Versuch geklärt werden, ob er Einfluss auf die Integrität der RNA hat. Hierfür wurde ein RNA-Gel angefertigt und darauf wurden jeweils 5 µg der beiden oben genannten Proben aufgetragen.

Wie **Abbildung 4-2** zeigt, sind bei beiden Proben die zwei ribosomalen Banden S28 und S18 zu sehen, wobei die Banden nach Extraktion nur mit Trizol stärker sichtbar sind als nach Extraktion mit Trizol und Lysepuffer. Es kann jedoch in beiden Proben von einer Intaktheit der RNA ausgegangen werden, da die ribosomale RNA mittels des RNA-Gels intakt dargestellt werden kann.

Somit wird für die weiteren Versuche festgelegt, dass die mit Trizol extrahierte RNA aus unfixierten RA- Treg den Standard darstellt, mit dem alle weiteren getesteten Methoden verglichen werden. Zudem hat sich gezeigt, dass der verwendete Lysepuffer (mit 0.5% SDS) keinen negativen Einfluss auf die Integrität der RNA zeigt und somit für die RNA-Extraktion aus fixierten Zellen verwendet werden kann.

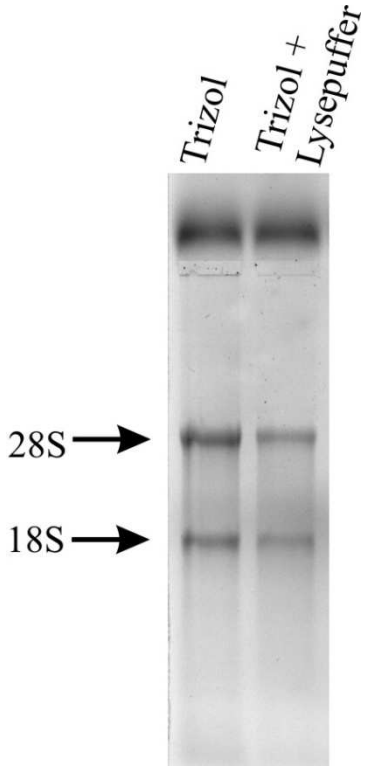


Abb. 4-2: Einfluss von Lysepuffer bei der RNA-Extraktion aus unfixierten Zellen mit Trizol auf in Integrität der RNA

Unfixierte RA- Treg wurden für 11 Tage in vitro kultiviert und anschließend RNA aus ihnen extrahiert. Hierfür wurde zum einen die Extraktion mit Trizol nach Herstellerprotokoll verwendet, zum anderen wurden die Zellen vor Zugabe von Trizol mit Lysepuffer für 1 h bei 65°C inkubiert.

4.1.2 Färbung auf FOXP3 mit anschließender RNA-Isolierung und Analyse auf intakte RNA

Da ohne Permeabilisierung und Fixierung der Zellen eine FOXP3-Färbung nicht möglich ist, soll im Folgenden untersucht werden, ob eine RNA-Isolierung mit anschließender Analyse möglich ist, wenn die Zellen zuvor mit der kommerziell erhältlichen FOXP3-Färbung von eBioscience gefärbt wurden. Hierfür wurden 3 Millionen Treg mit eBioscience auf FOXP3 gefärbt. Nach der Färbung erfolgte die Inkubation in Lysepuffer (LP) für 1 h bei 65°C und anschließend die RNA-Extraktion mit Trizol. Bei der anschließenden Messung des RNA-Gehalts der gewonnen Probe ergab sich ein Wert von 303.4 ng/µl. Aufgrund dessen, dass RNA in der Probe gemessen werden konnte, wurde diese Probe auf einem RNA-Gel auf Integrität untersucht. Der Versuch erfolgte in drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Abbildung 4-3 zeigt eine Gegenüberstellung einer FOXP3-Färbung von Treg mit dem Ergebnis der oben genannten RNA-Analyse der Treg mittels RNA-Gel.

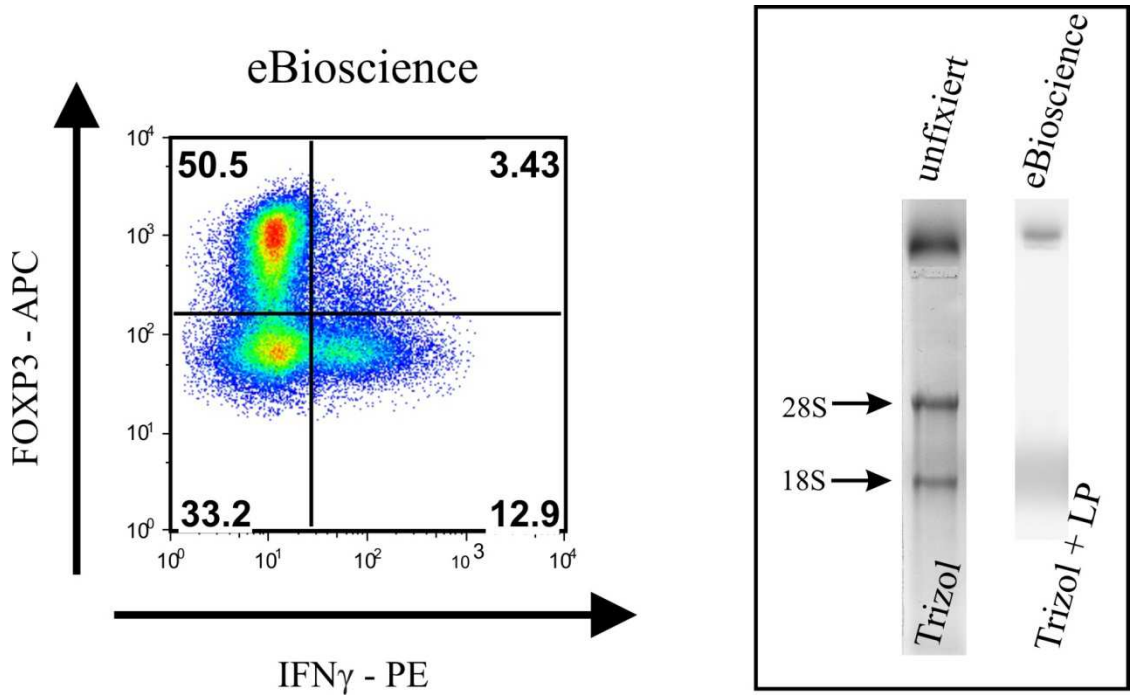


Abb. 4-3: Gegenüberstellung von FOXP3-Färbung und RNA-Gel nach Permeabilisierung und Fixierung mit eBioscience

Für die Färbung wurden RA- Treg für 11 Tage in vitro kultiviert und vor der Färbung auf FOXP3 und IFNγ mit eBioscience für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert. Nach der Färbung wurden die Zellen für die RNA-Extraktion vor Zugabe von Trizol mit Lysepuffer für 1 h bei 65°C inkubiert. Die Extraktion erfolgte nach Trizol-Herstellerprotokoll.

Man sieht in dem Färbeplot, dass es unter Verwendung von eBioscience zu einer deutlichen Auftrennung der Populationen in FOXP3-negativ und -positiv sowie in IFNγ-negativ und -positiv kommt. Die Güte der Färbung ist sehr gut. Betrachtet man das RNA-Gel und vergleicht es mit dem Standard, wie er unter 4.1.1 festgelegt wurde, so kann man nach der Färbung mit eBioscience und Extraktion mit Trizol und Lysepuffer keine ribosomalen Banden mehr erkennen. Folglich muss die extrahierte RNA komplett degradiert vorliegen, obwohl bei der photometrischen Messung RNA gemessen werden konnte. Somit steht sie nicht für weitere Analysen zur Verfügung. Da die Färbung jedoch zu einer guten Auftrennung der einzelnen Populationen führt, wird diese hiermit als Standard zur Beurteilung der Güte der anderen Färbemethoden festgelegt.

Da die FOXP3-Färbung nach Permeabilisierung mit 70% Ethanol und anschließender Extraktion von intakter RNA für weitere Analysen in unserer Arbeitsgruppe schon ausführlich getestet und beschrieben wurde, wurde auf eine erneute alleinige Testung der Fluoreszenzfärbung für FOXP3 verzichtet und die Methode nur in Kombination mit einer zusätzlichen Zytokinfärbung weiteruntersucht. Dies wird im Folgenden unter 4.1.3 näher beschrieben.

4.1.3 Kombinierte Färbung auf FOXP3 und Zytokine

Da in dieser Arbeit untersucht werden soll, ob nach einer kombinierten Färbung von Treg auf FOXP3 und Zytokine die Isolierung von intakter RNA möglich ist, erfolgt in diesem Kapitel die Gegenüberstellung von kommerziellen Färbemethoden mit eBioscience und mit BD Cytofix/Cytoperm und der laborintern entwickelten Färbemethode mit 70% Ethanol. Hierfür wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten pro Ansatz 5 Millionen kultivierte und anschließend stimulierte RA- Treg eingesetzt. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 erfolgten in drei parallelen Ansätzen die Färbungen auf FOXP3 und INFγ mit eBioscience, BD Cytofix/Cytoperm und 70% Ethanol. **Abbildung 4-4** zeigt die Gegenüberstellung der oben beschriebenen Ansätze. Man sieht bei der Färbung mit eBioscience – wie schon in Abb. 4-3 – eine klare Auftrennung der einzelnen Populationen. Bei der Färbung mit BD Cytofix/Cytoperm erkennt man zwar eine schöne Auftrennung in die IFNγ-positive und -negative Population, jedoch ist die Auftrennung der FOXP3-Populationen nicht optimal. Bei der Methode mit 70% Ethanol zur Permeabilisierung der Zellen sieht man eine klare Trennung der FOXP3-positiven und –negativen Population. Hier bleiben jedoch alle gefärbten Zellen IFNγ-negativ. Aus diesem Versuch kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass bezüglich der kombinierten FOXP3- und Zytokinfärbung eBioscience als der zuvor festgelegte Standard ein optimales Ergebnis liefert, wohingegen die Färbung mit BD Cytofix/Cytoperm trotz guter Zytokinfärbung ungeeignet für die FOXP3-Färbung erscheint. Entgegengesetzt verhält es sich mit der Färbung mit 70% Ethanol; bei guter FOXP3-Färbung lassen sich keine Zytokin-Populationen simultan anfärben. Bei letzterer Methode liegt es wahrscheinlich – wie schon in der Einleitung des Ergebnisteils beschrieben – daran, dass die Zelle mit Ethanol zwar permeabilisiert wird, die Zytokine aber nicht in der Zelle fixiert werden und daher auch nicht mehr angefärbt werden können. Deshalb sollte im weiteren Verlauf eine Methode gefunden werden, mit der man die Zelle permeabilisieren, die Zytokine in der Zelle fixieren und anschließend intakte RNA isolieren kann.

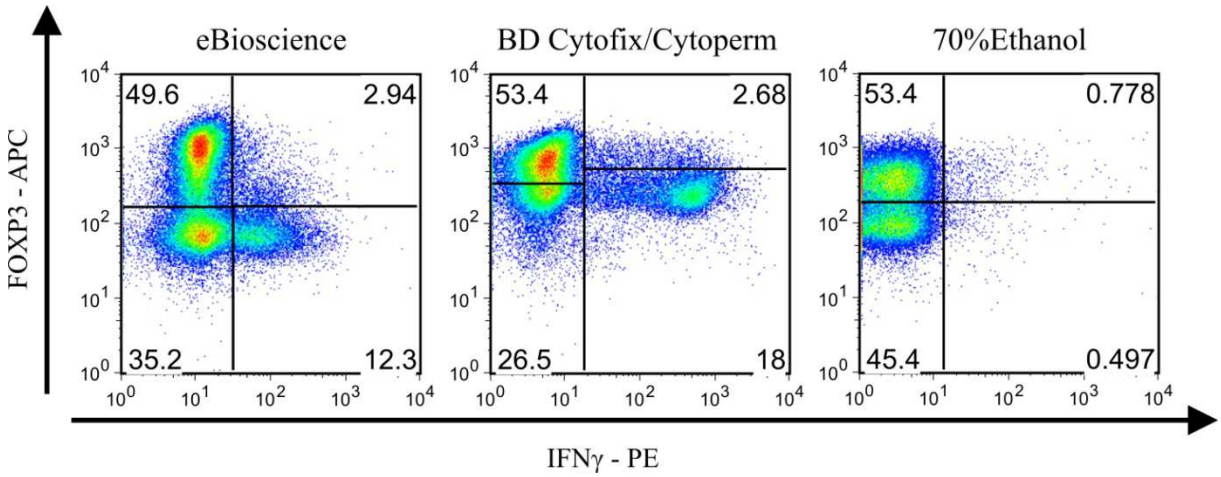


Abb. 4-4: Gegenüberstellung verschiedener Methoden zur kombinierten FOXP3- und IFNγ-Färbung

Für die Färbung wurden RA- Treg für 11 Tage in vitro kultiviert, für 6 Tage ruhiggestellt und vor der Färbung auf FOXP3 und IFNγ für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 wurden die Zellen entweder mit eBioscience, mit BD Cytofix/Cytoperm oder mit 70% Ethanol auf FOXP3 und IFNγ gefärbt.

4.1.4 Optimierung der kombinierten FOXP3- und Zytokinfärbung unter dem Aspekt der Isolierung intakter RNA

Da mit der Permeabilisierung mit 70% Ethanol eine Färbung der Zelle auf FOXP3 gut möglich ist, soll versucht werden, eine vergleichbare Färbung für Zytokine zu etablieren und diese beiden Färbemethoden für FOXP3 und Zytokine miteinander zu kombinieren.

In BD Cytofix/Cytoperm ist neben anderen vom Hersteller nicht preisgegebenen Zusätzen vor allem PFA enthalten. In welcher Konzentration dieses in BD Cytofix/Cytoperm vorliegt, wurde wie folgt getestet. Es wurden je Ansatz 1 Million in vitro expandierte Tconv verwendet, die zunächst in Kultur 19 Tage stimuliert und dann 1 Tag ruhig gestellt wurden. Vor Beginn der Färbung erfolgte eine Stimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin für 5 Stunden. Zur Fixierung der Zytokine wurde in drei parallelen Ansätzen Paraformaldehyd (PFA) 0.5%, 1.0% und 2.0% mit jeweils einer Inkubationszeit von 10min bei Raumtemperatur (RT) verwendet. Die Permeabilisierung erfolgte bei jedem Ansatz mit 70% Ethanol. Als Kontrolle wurde BD Cytofix/Cytoperm mitgeführt. Die Zytokinfärbung erfolgte beispielhaft für das Zytokin IL-2. Wie in **Abbildung 4-5** gezeigt, steigt der Anteil der Zytokin-positiven Zellen mit steigender PFA-Konzentration. Eine PFA-Konzentration von 1.0% entspricht der Güte der kommerziellen Färbung mit der Fixierungs- und Permeabilisierungslösung Cytofix/Cytoperm von BD, bei der ca. 90.5% der Zellen Zytokin-positiv sind. Bei der Färbung mit 1% PFA/70% Ethanol findet sich eine Zytokin-positive Zellpopulation von 90.8%, das heißt, es findet sich eine gleich große Populationen an Zytokin-positiven Zellen wie in der kommerziellen Methode,

was darauf schließen lässt, dass auch weitere Messungen mit der neuen Methode richtige Ergebnisse im Hinblick auf den Zytokingehalt der Zellen liefern werden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde beschlossen, bis auf weiteres die Zytokinfärbung mit der getesteten Methode mit 1%PFA/70%Ethanol weiterzuführen.

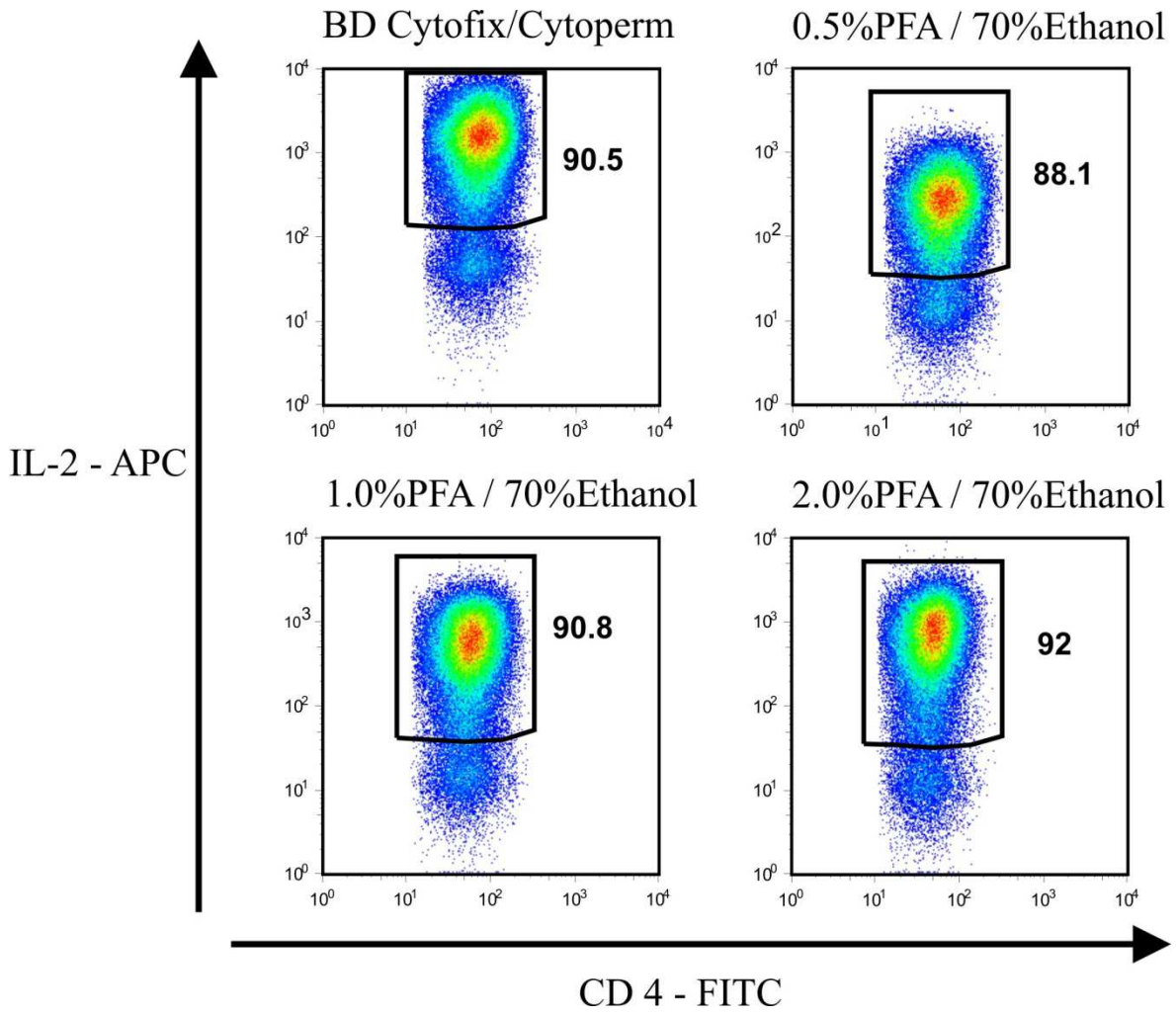


Abb. 4-5: Einfluss der PFA-Konzentration auf die Zytokin-positive Population
Für die Färbung wurden Tconv für 19 Tage in vitro kultiviert, für 1 Tag ruhiggestellt und vor der Färbung auf IL-2 für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 wurden die Zellen entweder mit BD Cytofix/Cytoperm oder mit 0.5%, 1.0% oder 2.0% PFA fixiert und anschließend mit 70% Ethanol permeabilisiert und auf IL-2 gefärbt.

Im Weiteren erfolgte die kombinierte Färbung der Zellen auf FOXP3 und Zytokine mit 1% PFA zur Fixierung und 70% Ethanol zur Permeabilisierung mit anschließender RNA-Extraktion mit Trizol und Lysepuffer zur Überprüfung der RNA-Integrität. Für die Färbung wurden 5 Millionen RA- Treg verwendet, die für 11 Tage *in vitro* kultiviert, für 6 Tage ruhiggestellt und anschließend für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert wurden. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 erfolgten nach Fixierung mit 1% PFA für 10 min bei RT und Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10 min bei -20°C die Färbungen auf

FOXP3 und INFγ. Für die RNA-Extraktion wurden nach Färbung die Treg in LP für 1 h bei 65°C mit Trizol inkubiert und anschließend die RNA extrahiert. Für das RNA-Gel wurden von der gewonnenen Probe und einem mitgeführten Standard aus unfixierten Zellen je 5µg RNA aufgetragen. Der Versuch erfolgte dreimal in voneinander unabhängigen Experimenten.

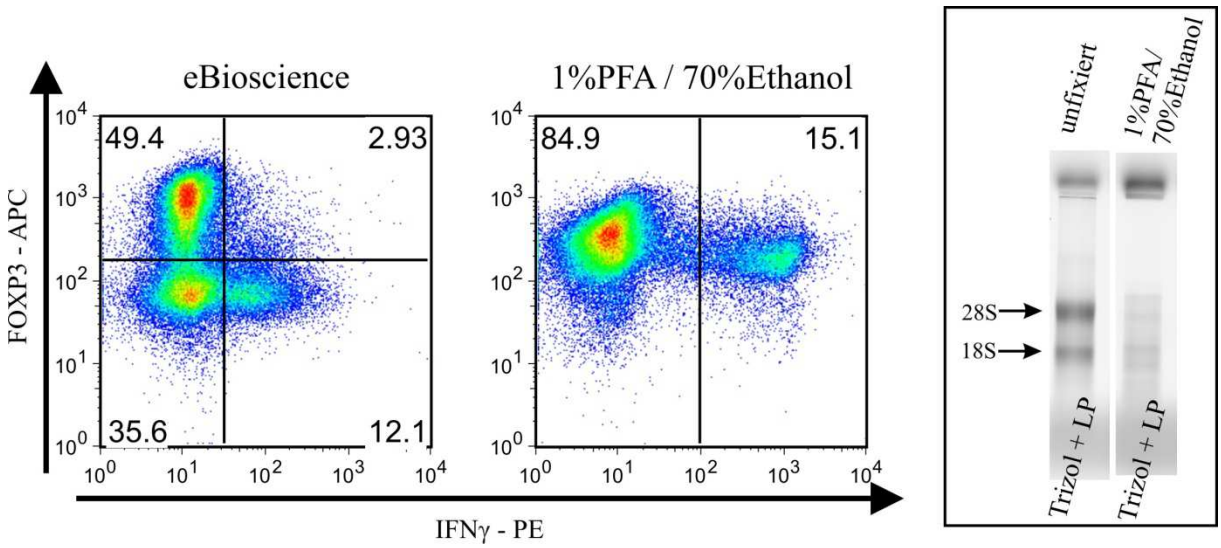


Abb. 4-6: Gegenüberstellung von FOXP3-Färbung und RNA-Gel nach Permeabilisierung und Fixierung mit 1%PFA und 70%Ethanol

Für die Färbung wurden RA- Treg für 11 Tage in vitro kultiviert, für 6 Tage ruhiggestellt und anschließend für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 erfolgten nach Fixierung mit 1% PFA für 10 min bei RT und Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10 min bei -20°C die Färbungen auf FOXP3 und INFγ. Nach der Färbung wurden die Zellen für die RNA-Extraktion vor Zugabe von Trizol mit Lysepuffer für 1 h bei 65°C inkubiert. Die Extraktion erfolgte nach Trizol-Herstellerprotokoll. Für das RNA-Gel wurden 5µg der RNA-Probe aufgetragen.

Abbildung 4-6 zeigt die Gegenüberstellung der beiden beschriebenen Versuche. Bei der Färbung zeigt sich eine schöne Auftrennung in eine IFNγ-positive und -negative Population, ähnlich wie auch schon in Abb. 4-5 gezeigt. Die FOXP3-Färbung hat sich unter dem Einfluss von PFA im Vergleich zur ebenso gezeigten Färbung mit eBioscience verschlechtert und man kann keine klare Auftrennung in die FOXP3-positive und -negative Population mehr erkennen. Auf dem RNA-Gel zeigt die Probe im Vergleich zur Kontrolle zwar nicht exakt die zwei zu erwartenden ribosomalen Banden 18S und 28S, jedoch kann man im Bereich dieser jeweils zwei schwächere Banden erkennen. Es liegt noch intakte RNA vor. Aufgrund der Annahme, dass es nach einer Fixierung mit PFA und einer Permeabilisierung mit 70% Ethanol möglich ist, noch weitestgehend intakte RNA zu isolieren, sollte versucht werden, die kombinierte FOXP3- und Zytokinfärbung zu optimieren.

Hierfür wurde zunächst die Inkubationszeit des PFA verändert, die Konzentration jedoch bei 1% belassen. Es wurden je Ansatz 1 Million RA- Treg verwendet, die für 10 Tage in vitro

kultiviert und anschließend für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert wurden. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 erfolgten nach Fixierung mit 1% PFA für 5 min, 10 min oder 15 min bei RT und Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10 min bei -20°C die Färbungen auf FOXP3 und IL-4. Der Versuch erfolgte dreimal in voneinander unabhängigen Experimenten. Wie in **Abbildung 4-7** gezeigt, nimmt die Anfärbbarkeit der Zytokin- und FOXP3-positiven Populationen mit zunehmender Fixierungsdauer ab und die Auftrennung der FOXP3-Populationen wird schlechter. Findet sich bei 5 min Fixierungsdauer ein FOXP3-positiver Zellanteil von 28.7 % und ein Zytokin-positiver Anteil von 30.7 %, so reduzieren sich diese Anteile kontinuierlich, bis bei einer Fixierungsdauer von 15 min nur 21.4 % FOXP3-positive und 23.8% Zytokin-positive Zellen vorhanden sind. Betrachtet man die Auftrennung der FOXP3-positiven und -negativen Population unter den IL-4-negativen Zellen, so sieht man in allen drei Abbildungen eine schlechte Auftrennung dieser beiden Populationen.

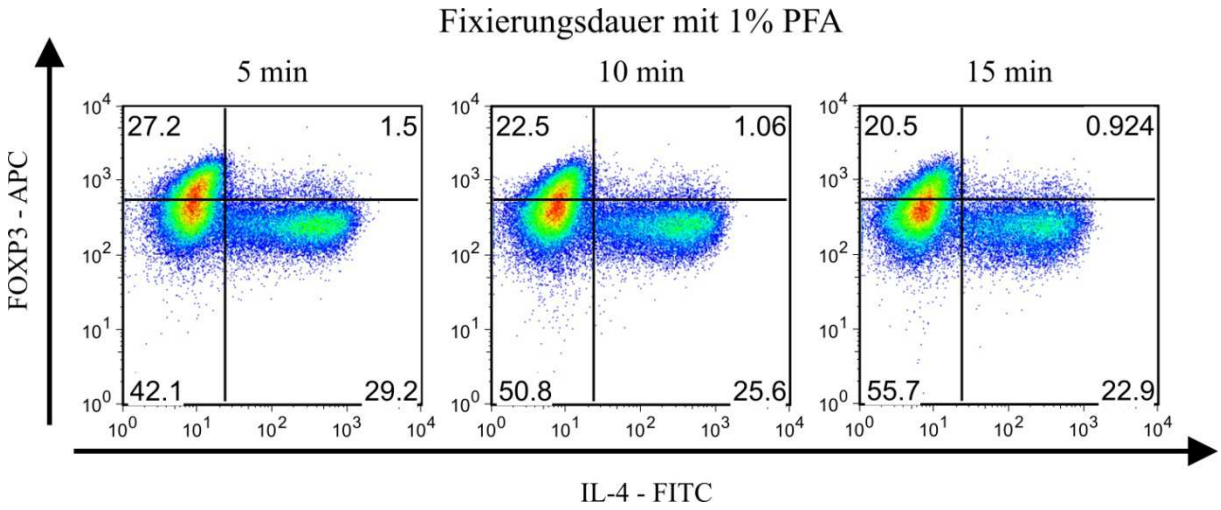


Abb. 4-7: Einfluss der Fixierungsdauer mit 1%PFA auf die Anfärbbarkeit fixierter Zellen für FOXP3 und IL-4

Für die Färbung wurden RA- Treg für 10 Tage in vitro kultiviert und vor der Färbung für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 wurden die Zellen mit 1.0% PFA für 5min, 10 min oder 15 min bei RT fixiert und anschließend mit 70% Ethanol permeabilisiert und auf FOXP3 und IL-4 gefärbt.

Aufgrund der Annahme, dass eine möglichst kurze Fixierungsdauer die Zellen am wenigsten schädigt, wurde zunächst die PFA-Konzentration bei einer Fixierungsdauer von 5 min von 1.0% auf 0.5% reduziert. Hierfür wurden je Ansatz 1 Million RA- Treg verwendet, die für 10 Tage in vitro kultiviert und anschließend für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert wurden. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 erfolgten nach Fixierung mit 0.5% PFA bzw. 1.0% PFA für 5 min bei RT und Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10 min bei -20°C die Färbungen auf FOXP3 und IL-4. Es zeigte sich hierbei eine Verbesserung

der Auftrennung der einzelnen Populationen durch eine Erniedrigung der PFA-Konzentration auf 0.5% PFA (Daten nicht gezeigt). Dies führte zu der Annahme, dass auch eine weitere Reduktion der PFA-Konzentration sowie auch der Inkubationszeit zu Verbesserung der Zellauftrennung beitragen könnte. Deshalb wurden in einem weiteren Versuch PFA-Konzentration und Fixierungsdauer weiter reduziert, um so eine optimale Färbung zu erreichen. Hierfür wurden je Ansatz 1 Million RA- Treg für 11 Tage in vitro kultiviert, für 5 Tage ruhig gestellt und vor der Färbung für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 erfolgten nach Fixierung mit 0.25% PFA bzw. 0.5% PFA für 5 min, 1 min und 10-15 sec bei RT und Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10 min bei -20°C die Färbungen auf FOXP3 und IL-4. **Abbildung 4-8** zeigt den Einfluss der Fixierungsdauer und der PFA-Konzentration auf die Anfärbbarkeit der fixierten Zellen. Man erkennt eine Verbesserung der Auftrennung der einzelnen Populationen vor allem bei weiterer Verkürzung der Fixierungsdauer. Bei einer Fixierungsdauer von nur 10-15 sec lassen sich die FOXP3-positive und -negative Population unter den IL-4-negativen Zellen sehr exakt voneinander abgrenzen, während bei einer Fixierungsdauer von 5 min diese Populationen noch fließend ineinander übergehen. Die Auftrennung in die IL-4-positive und -negative Population bleibt von der PFA-Fixierungsdauer weitgehend unbeeinflusst und gut voneinander abgrenzbar. Betrachtet man nun den Einfluss der PFA-Konzentration auf die Auftrennung der einzelnen gefärbten Populationen, so lässt sich feststellen, dass sich kein wesentlicher Unterschied zwischen einer PFA-Konzentration von 0.25% und einer von 0.5% zeigt. Sowohl die Auftrennung der FOXP3- als auch der IL-4-Populationen ist bei beiden Konzentrationen bei einer Fixierungsdauer von nur 10-15 sec am besten. Unter der Annahme, dass eine möglichst geringe PFA-Konzentration für die Zellen bzw. die darin enthaltene RNA am wenigsten toxisch ist und dass sich in der Färbung keine gravierenden Unterschiede zwischen beiden getesteten Konzentrationen zeigen, kann man festhalten, dass die optimale kombinierte Färbung der Zellen auf FOXP3 und Zytokine durch eine Fixierung der Zellen mit 0.25% PFA für 10-15 sec und eine anschließende Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10 min bei -20°C erreicht werden kann.

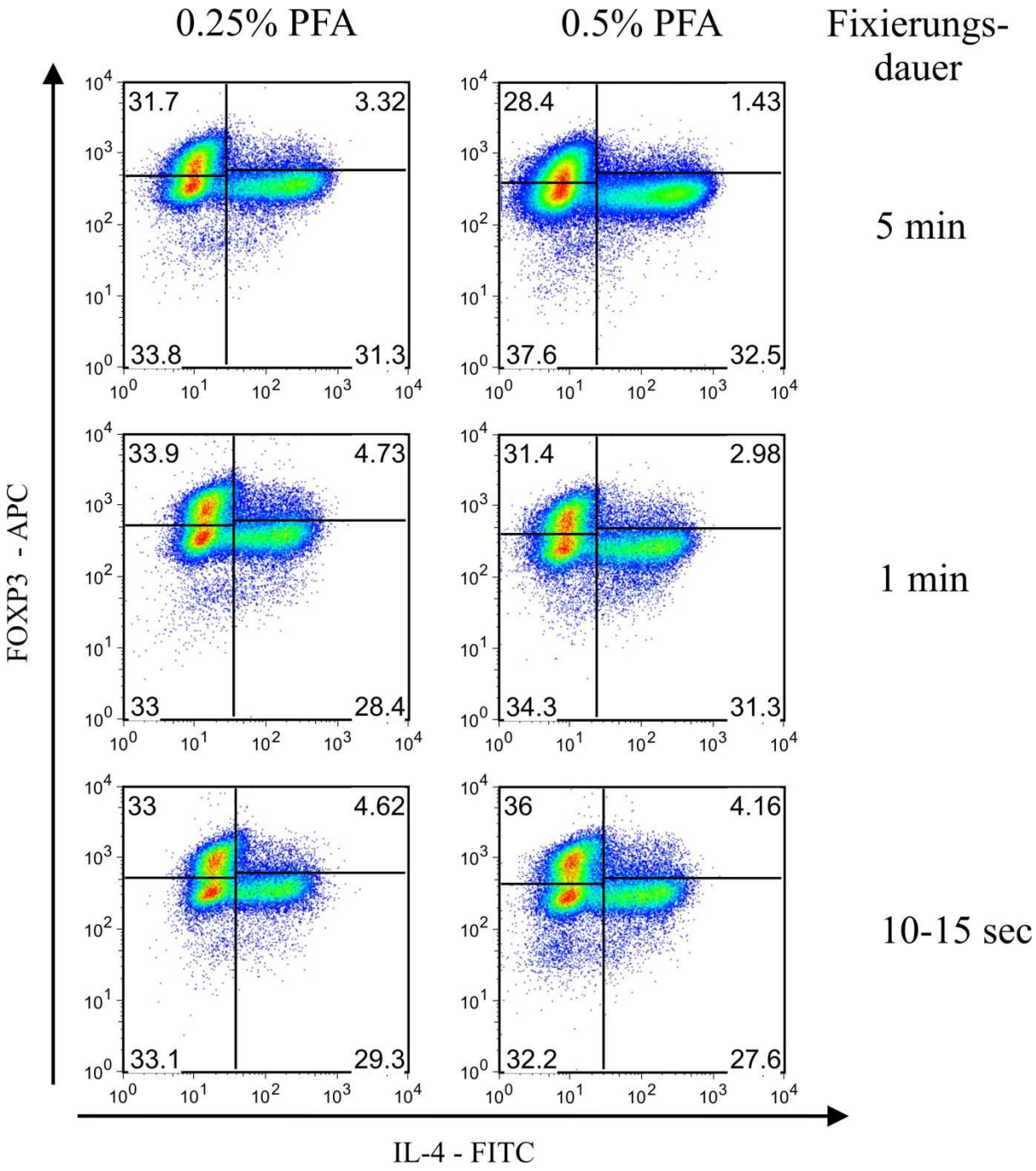


Abb. 4-8: Einfluss der Fixierungsdauer und der PFA-Konzentration auf die Anfärbbarkeit fixierter Zellen für FOXP3 und IL-4

Für die Färbung wurden RA- Treg für 11 Tage in vitro kultiviert, für 5 Tage ruhiggestellt und vor der Färbung für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 wurden die Zellen mit 0.25% PFA bzw. 0.5% PFA für 5min, 1 min und 10-15sec bei RT fixiert und anschließend mit 70% Ethanol permeabilisiert und auf FOXP3 und IL-4 gefärbt.

Im Folgenden wird nun getestet, ob nach oben gezeigter Färbung die Isolierung intakter RNA möglich ist. Der Versuch erfolgte dreimal in voneinander unabhängigen Experimenten. Hierfür wurden RA- Treg für 11 Tage in vitro kultiviert, für 5 Tage ruhiggestellt und anschließend behandelt, als würden sie auf FOXP3 und Zytokine gefärbt werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 0.25% PFA bzw. 0.5% PFA für 10-15 sec fixiert und anschließend mit 70%

Ethanol permeabilisiert. Nach der Färbung wurden die Zellen für die RNA-Extraktion vor Zugabe von Trizol mit Lysepuffer für 1 h bei 65°C inkubiert. Mitgeführt wurde eine RNA-Kontrolle aus unfixierten Zellen. Die Extraktion erfolgte nach Trizol-Herstellerprotokoll. Bei der Messung des RNA-Gehalts am NanoDrop ergaben sich für die unfixierte Kontrolle ein Wert von 306.4 ng/µl, für die fixierte Probe mit 0.25% PFA ein Wert von 126.6 ng/µl und für die fixierte Probe mit 0.5% PFA ein Wert von 59.2 ng/µl. Auch diese verschiedenen Werte bei der RNA-Ausbeute können zur Bestätigung der oben aufgestellten These herangezogen werden, dass die RNA umso mehr geschädigt wird, je höher die PFA-Konzentration zur Fixierung der Zelle gewählt wird.

In **Abbildung 4-9** sieht man, dass auf dem RNA-Gel in allen drei aufgetragenen Proben die zwei ribosomalen Banden 28S und 18S zu erkennen sind. Am deutlichsten sind diese in der unfixierten Kontrolle zu sehen, jedoch sind sowohl bei der Färbung nach Fixierung mit 0.5% PFA als auch nach Fixierung mit 0.25% PFA ribosomale Banden zu erkennen. Neben den, im Vergleich zur unfixierten Kontrolle schwächer ausgebildeten Banden 28S und 18S sind jeweils unterhalb der beiden Banden zwei sehr schwache Banden zusätzlich zu sehen. Dies entspricht demselben Bild, das sich auch schon in Abbildung 4-6 zeigt, wobei in der Abbildung 4-9 nun die Banden stärker ausgebildet sind als noch bei einer PFA-Konzentration von 1% und einer Fixierungsdauer von 10 min. Dementsprechend lässt sich folgern, dass die RNA wahrscheinlich zum Teil fragmentiert vorliegt, aber nicht komplett degradiert ist und folglich für weitere Analysen verwendet werden kann. Somit zeigt sich, je geringer der PFA-Gehalt zur Fixierung der Zellen ist, desto stärker sind die Banden der aufgetragenen Proben auf dem RNA-Gel zu sehen.

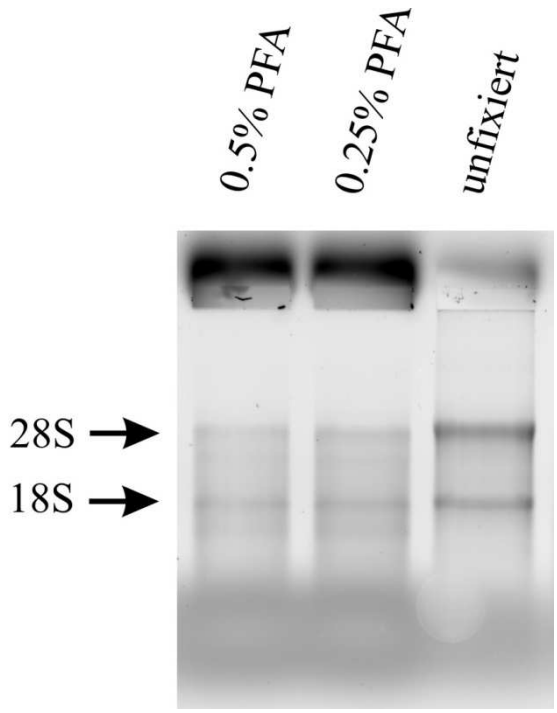


Abb. 4-9: RNA-Integritätsprüfung mittels RNA-Gel nach verschiedenen Färbemethoden
RA- Treg wurden für 11 Tage in vitro kultiviert, für 5 Tage ruhiggestellt und anschließend behandelt, als würden sie auf FOXP3 und Zytokine gefärbt werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 0.25% PFA bzw. 0.5% PFA für 10-15 sec fixiert und anschließend mit 70% Ethanol permeabilisiert. Nach der Färbung wurden die Zellen für die RNA-Extraktion vor Zugabe von Trizol mit LP für 1 h bei 65°C inkubiert. Mitgeführt wurde eine Kontrolle, die aus den unfixierten Zellen gewonnen wurde. Die Extraktion erfolgte nach Trizol-Herstellerprotokoll. Für das RNA-Gel wurden 5µg der RNA-Probe aufgetragen.

Zusammenfassend kann nun bezüglich der kombinierten Färbung von FOXP3 und Zytokinen unter dem Aspekt der anschließenden Isolierung intakter RNA festgehalten werden, dass nach der neu etablieren Färbemethode, das heißt Fixierung der Zellen mit 0.25% PFA für 10-15 sec bei RT und anschließender Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10 min bei -20°C, RNA mit der Trizol/LP-Methode isoliert werden kann, die weitestgehend intakt ist und somit zur weiteren Analyse zur Verfügung steht. Diese These soll in weiteren Versuchen bestätigt werden.

4.2 Analyse der Genexpression mittels quantitativer rt-PCR

Um die Intaktheit der RNA nach der neu etablierten Färbemethode zu überprüfen, wurden bestimmte Gene mittels quantitativer rt-PCR repliziert und mit einer unfixierten Kontrolle anhand eines Standards verglichen. Hierfür erfolgte zunächst die Herstellung von cDNA mittels reverser Transkription und anschließend die quantitative rt-PCR. Es wurden für die cDNA-Herstellung pro Probe 300 ng RNA, pro Standard 2000 ng RNA eingesetzt. Um zu überprüfen, ob die Reverse Transskription trotz nicht mehr komplett integrer RNA erfolgreich war, wurde die hergestellte cDNA im Vergleich zur eingesetzten RNA-Menge vergleichend am NanoDrop vermessen. Wie in **Tabelle 4-1** beispielhaft gezeigt, ergab sich in drei parallelen Versuchsansätzen sowohl in den unfixierten als auch in den mit 0.25% PFA fixierten und mit 70% Ethanol permeabilisierten Zellen ein cDNA-Gehalt von ca. 300 ng/µl bei jeweils 15ng/µl eingesetzter RNA. Dies entspricht der zu erwartenden cDNA-Ausbeute bei der zuvor eingesetzten RNA-Menge und zeigt, dass die reverse Transkription auch bei fixierten Zellen und eventuell fragmentierter RNA ohne große Verluste möglich ist.

Fixierung	eingesetzter RNA-Gehalt	cDNA-Gehalt
unfixiert	15 ng/µl	294.23 ng/µl
0.25%PFA/70%Ethanol	15 ng/µl	284.29 ng/µl

Tbl. 4-1: Vergleich des cDNA-Gehalts nach reverser Transkription pro 15 ng/µl eingesetzter RNA bei unfixierten und fixierten RA- Treg

RA- Treg wurden für 25 Tage in vitro kultiviert, für 7 Tage ruhiggestellt und anschließend behandelt, als würden sie auf *FOXP3* und Zytokine gefärbt werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 0.25% PFA für 10-15 sec fixiert und anschließend mit 70% Ethanol permeabilisiert. Nach der Färbung wurden die Zellen für die RNA-Extraktion vor Zugabe von Trizol mit LP für 1 h bei 65°C inkubiert. Mitgeführt wurde eine Kontrolle, die aus den unfixierten Zellen gewonnen wurde. Die Extraktion erfolgte nach Trizol-Herstellerprotokoll. Die cDNA-Herstellung erfolgte laut Herstellerprotokoll.

Nach der cDNA-Herstellung wurde des Weiteren untersucht, inwieweit die verschiedenen Färbemethoden vergleichbar mit einer unfixierten Kontrolle sind und zwar in Bezug auf die Intaktheit unterschiedlicher Gene. Hierzu wurde der Beginn der Zyklen der Fluoreszenzmessung (CT Mean) während des Realplex-Laufes gemessen, da er für den Vergleich des cDNA-Gehalts und der darin enthaltenen intakten Gene herangezogen werden kann. Es wurden für diesen Versuch drei verschiedene Kulturen von RA- Treg verwendet, die in vitro kultiviert und anschließend ruhiggestellt wurden. Vor der Färbung erfolgte die Stimulation für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 wurden die Zellen entweder mit eBioscience oder mit der oben neu etablierten Methode mit 0.25% PFA bzw. 0.5% PFA für 10-15sec bei RT fixiert und mit 70% Ethanol permeabilisiert und auf FOXP3 und IL-4 gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen für die RNA-

Extraktion vor Zugabe von Trizol mit Lysepuffer für 1 h bei 65°C inkubiert. Mitgeführt wurde eine Kontrolle, die aus den unfixierten Tconv gewonnen wurde, die für 11 Tage in vitro stimuliert worden waren. Die Extraktion erfolgte nach Trizol-Herstellerprotokoll. Die cDNA-Herstellung und die Aufarbeitung der cDNA zur quantitativen rt-PCR erfolgten nach Herstellerprotokoll.

In **Abbildung 4-10** ist eine quantitative rt-PCR dargestellt, die fixierte Zellen mit einer unfixierten Kontrolle in Hinblick auf verschiedene Gene inklusive der drei Housekeeper-Gene (*Beta-2-Mikroglobulin (B2M), Glycerinaldehy-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und beta-Aktin (B-Aktin)*) vergleicht. Die Grafik zeigt, nach wie vielen Replikations-Zyklen der Fluoreszenzanstieg der untersuchten cDNA-Proben messbar war. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der unfixierten Kontrolle und den fixierten Zellen. Bei der unfixierten Kontrolle ist jeweils circa 3 Zyklen früher ein Fluoreszenzanstieg messbar als bei den fixierten Proben. Nach Fixierung und Färbung mit eBioscience ist der Beginn der Fluoreszenzmessung am spätesten, im Schnitt ca. 5-8 Zyklen nach der unfixierten Kontrolle, zu beobachten. Die Anfänge der Fluoreszenzmessungen nach den Fixierungen mit 0.25% PFA bzw. mit 0.5% PFA und anschließender Permeabilisieurng mit 70% Ethanol sind miteinander vergleichbar, kommen jedoch – wie bereits oben erwähnt – 3 Zyklen später als die unfixierte Kontrolle, was definitionsgemäß bedeutet, dass der cDNA-Gehalt dieser fixierten Proben um das Zehnfache niedriger ist als der der unfixierten Kontrolle. Da aber dennoch ein Anstieg der Fluoreszenz bei der Vermessung der Zellproben für verschiedene Gene bei allen Zellproben, die mit PFA fixiert und mit Ethanol permeabilisiert wurden, beobachtet werden kann, muss nun im Folgenden untersucht werden, ob der cDNA-Verlust gleichmäßig über das ganze Genom verteilt oder nur zufällig in einzelnen Genabschnitten lokalisiert ist. Sollte der Verlust gleichmäßig verteilt sein, so würde er sich aufheben, wenn man den Quotienten aus zwei in diesen Zellen sicher exprimierten Genen bildet. Das heißt, der Quotient aus diesen zwei Genen müsste einen gleichen oder ähnlichen Wert zwischen den unfixierten und den fixierten Zellen liefern, da der cDNA-Verlust in beiden Genen gleich groß wäre und sich somit das Verhältnis der cDNA der zwei Gene nicht verändern würde.

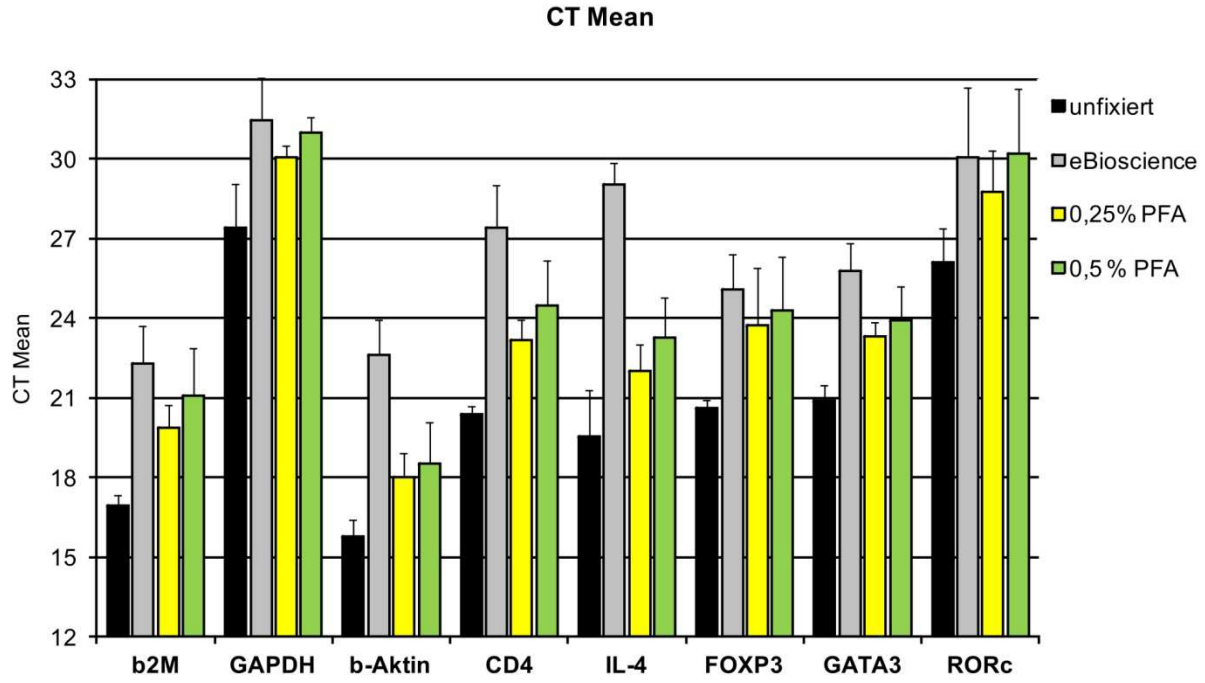


Abb. 4-10: Einfluss der Fixierung der Zellen auf den Fluoreszenzanstieg während der Replikation verschiedener Genomabschnitte

Drei verschiedene Kulturen von RA- Treg wurden in vitro kultiviert und anschließend ruhiggestellt. Vor der Färbung erfolgte die Stimulation für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 wurden die Zellen entweder mit eBioscience oder mit der oben neu etablierten Methode mit 0.25% PFA bzw. 0.5% PFA für 10-15sec bei RT fixiert und mit 70% Ethanol permeabilisiert und auf FOXP3 und IL-4 gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen für die RNA-Extraktion vor Zugabe von Trizol mit LP für 1 h bei 65°C inkubiert. Mitgeführt wurde eine Kontrolle, die aus den unfixierten Tconv gewonnen wurde, die für 11 Tage in vitro stimuliert worden waren. Die Extraktion erfolgte nach Trizol-Herstellerprotokoll. Die cDNA-Herstellung und die Aufarbeitung der cDNA zur quantitativen rt-PCR erfolgten nach Herstellerprotokoll.

Für die Klärung dieser These wurden in einem neuen Versuch drei verschiedene Kulturen von RA- Treg verwendet, die in vitro kultiviert und anschließend ruhiggestellt wurden. Vor der Färbung erfolgte die Stimulation für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 wurden die Zellen entweder mit eBioscience oder mit BD Cytofix/Cytoperm oder mit der oben neu etablierten Methode mit 0.25% PFA bzw. 0.5% PFA für 10-15sec bei RT fixiert und mit 70% Ethanol permeabilisiert und auf FOXP3 und IL-4 gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen für die RNA-Extraktion vor Zugabe von Trizol mit LP für 1 h bei 65°C inkubiert. Mitgeführt wurde eine Kontrolle, die aus den unfixierten Tconv gewonnen wurde, die für 11 Tage in vitro stimuliert worden waren. Die Extraktion erfolgte nach Trizol-Herstellerprotokoll. Die cDNA-Herstellung und die Aufarbeitung der cDNA zur quantitativen rt-PCR erfolgten nach Herstellerprotokoll.

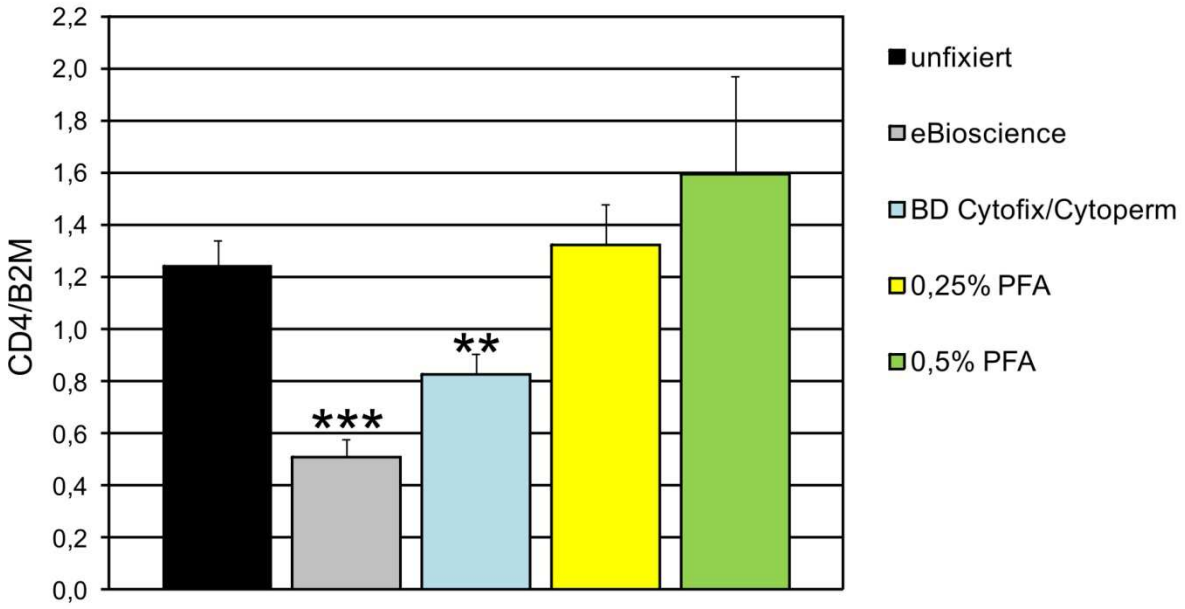


Abb. 4-11: Einfluss verschiedener Fixierungen/Permeabilisierungen auf die Verteilung des Genomverlusts der jeweiligen Zellen für *CD4* und *B2M*

Drei verschiedene Kulturen von RA- Treg wurden in vitro kultiviert und anschließend ruhiggestellt. Vor der Färbung erfolgte die Stimulation für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 wurden die Zellen entweder mit eBioscience oder mit BD Cytofix/Cytoperm oder mit der oben neu etablierten Methode mit 0.25% PFA bzw. 0.5% PFA für 10-15sec bei RT fixiert und mit 70% Ethanol permeabilisiert und auf FOXP3 und IL-4 gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen für die RNA-Extraktion vor Zugabe von Trizol mit LP für 1 h bei 65°C inkubiert. Mitgeführt wurde eine Kontrolle, die aus den unfixierten Tconv gewonnen wurde, die für 11 Tage in vitro stimuliert worden waren. Die Extraktion erfolgte nach Trizol-Herstellerprotokoll. Die cDNA-Herstellung und die Aufarbeitung der cDNA zur quantitativen rt-PCR erfolgten nach Herstellerprotokoll. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem unpaired student's t-test.

In **Abbildung 4-11** sieht man die graphische Darstellung der Mittelwerte des Quotienten aus *CD4* und *B2M* bei den verschiedenen Färbemethoden nach Analyse der cDNA mittels quantitativer rt-PCR nach reverser Transkription der zuvor isolierten RNA. Betrachtet man zunächst den Quotienten *CD4/B2M* der unfixierten Kontrolle, so ergibt sich ein Mittelwert der drei untersuchten RA- Treg Kulturen von 1.243. Hierbei handelt es sich um den Wert, den man möglichst auch bei fixierten Zellen erreichen möchte, falls der cDNA-Verlust in beiden Genen durch die Fixierung gleich groß wäre. Betrachtet man zunächst den Wert bei der eBioscience-Färbung, so sieht man, dass dieser Quotient nur 0.511 beträgt und somit am weitesten von dem gewünschten abweicht. Bei der Färbung mit BD Cytofix/Cytoperm beträgt der Quotient 0.826. Beide genannten Werte weichen signifikant von dem erwünschten Ergebnis ab, so beträgt für eBioscience $p = 0.0005$ und für BD Cytofix/Cytoperm $p = 0.0045$. Daraus lässt sich für diese beiden Färbung folgern, dass sie ungeeignet für die nachfolgende Isolierung intakter RNA sind. Betrachtet man nun die neu etablierte Färbemethode mit 0.25% PFA bzw. 0.5% PFA und 70% Ethanol, so erhält man für die Fixierung mit 0.25% PFA als Mittel-

wert des *CD4/B2M*-Quotienten einen Wert von 1.324 und für die Fixierung mit 0.5% PFA einen Wert von 1.593. Beide Werte zeigen mit einem p von 0.49 für 0.25% PFA bzw. einem p von 0.20 für 0.5% PFA keinen signifikanten Unterschied zu der unfixierten Kontrolle. In der Grafik erkennt man, dass der Mittelwert bei Fixierung mit 0.25% PFA dem der unfixierten Kontrolle am nächsten kommt. Daraus lässt sich schließen, dass der Genverlust bei dieser neu etablierten Färbemethode geringer ist als bei jeder anderen zusätzlich getesteten Methode, sie der unfixierten Kontrolle am ähnlichsten ist und sie somit festgelegt wird als die Methode, nach der in dieser Promotionsarbeit alle weiteren Färbungen, RNA-Extraktionen und Analysen der Genexpression erfolgen werden. Zusammenfassend kann man festhalten, dass für alle weiteren Versuche die in diesem Kapitel etablierte Färbung und RNA-Extraktion verwendet werden, das heißt die Färbung nach Fixierung mit 0.25% PFA bei einer Fixierungsdauer von 10-15 sec bei RT und nach Permeabilisierung mit 70% Ethanol bei einer Inkubationszeit von 10 min bei -20°C sowie die RNA-Extraktion nach Inkubation mit LP für 1 h bei 65°C mit Trizol.

Parallel zur oben beschriebenen Titration der Färbe- und Fixierungsmethode mit PFA und Ethanol wurde eine Versuchsreihe mit einem 2010 neu publizierten Paper mit ähnlicher Thematik durchgeführt, bei der diese Methode mit der Färbung mit 1%PFA für 10min bei RT und 70% Ethanol für 10 min bei -20°C verglichen wurde. Die Vergleichs-Methode wurde von Boniface et al. (2010) (59) verwendet, um nach Färbung auf IL-17 mit BD Cytofix/Cytoperm und Zellsortierung aus den gesorteten Zellen RNA mit dem High Pure FFPE RNA Micro Kit von Roche (Roche-Kit) für weitere Analysen zu isolieren. Diese Methode wurde im Hinblick auf RNA-Integrität und RNA-Analyse untersucht. Für den folgenden Versuch wurden zwei verschiedene Kulturen von RA- Treg verwendet, die in vitro kultiviert und anschließend ruhiggestellt wurden. Vor der Färbung erfolgte die Stimulation für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 wurden die Zellen entweder mit eBioscience, mit BD Cytofix/Cytoperm oder mit 1% PFA für 10 min bei RT fixiert und 70% Ethanol für 10min bei -20°C permeabilisiert und auf FOXP3 und IL-4 gefärbt. Nach der Färbung wurde die RNA mit dem Roche-Kit oder mit Trizol/LP extrahiert. Mitgeführt wurde je Kultur eine Kontrolle, die unfixiert belassen wurde. Die cDNA-Herstellung und die Aufarbeitung der cDNA zur quantitativen rt-PCR erfolgten nach Herstellerprotokoll. Wie in **Abbildung 4-12** gezeigt, wurden cDNA-Proben miteinander verglichen, die nach Färbung mit verschiedenen Färbemethoden bzw. unfixiert aus gewonnener RNA hergestellt wurden, die entweder mittels Roche-Kit oder mittels Trizol/LP extrahiert worden war. Verglichen

wurde wiederum der *CD4/B2M*-Quotient, um festzustellen, ob der vorhandene cDNA-Verlust gleichmäßig über das ganze Genom verteilt ist bzw. nach welchen Färbe- und Extraktionsmethoden dies der Fall ist. Vergleicht man zunächst die Mittelwerte des Quotienten der unfixierten Zellen zwischen den beiden Extraktionsmethoden, so sind die mit 0.825 beim Roche-Kit und 0.807 bei Extraktion mit Trizol/LP in einer ähnlichen Größenordnung. Auch beim Vergleich des Quotienten bei der Färbung mit eBioscience sind beide Methoden mit Mittelwerten von 0.200 (Roche-Kit) und 0.124 (Trizol/LP) ähnlich; hier fällt auf, dass der Quotient nach Färbung mit eBioscience in beiden Fällen am weitesten von allen getesteten Methode von der unfixierten Kontrolle abweicht. Betrachtet man als Nächstes den Quotienten nach Färbung mit 1%PFA und 70%Ethanol, so liegt dieser Mittelwert nach Extraktion mit dem Roche-Kit bei 0.827 und nach Extraktion mit Trizol/LP bei 0.726. Auch bei dieser Färbung besteht kein signifikanter Unterschied des Quotienten zwischen beiden Extraktionsmethoden. Allein nach der Färbung mit BD Cytofix/Cytoperm unterscheiden sich die Mittelwerte des Quotienten zwischen den beiden Extraktionsmethoden. Liegt der Quotient CD4/B2M nach Extraktion mit dem Roche-Kit bei 0.703, so ist er nach Extraktion mit Trizol/LP mit einem Mittelwert von 0.316 weniger als halb so groß.

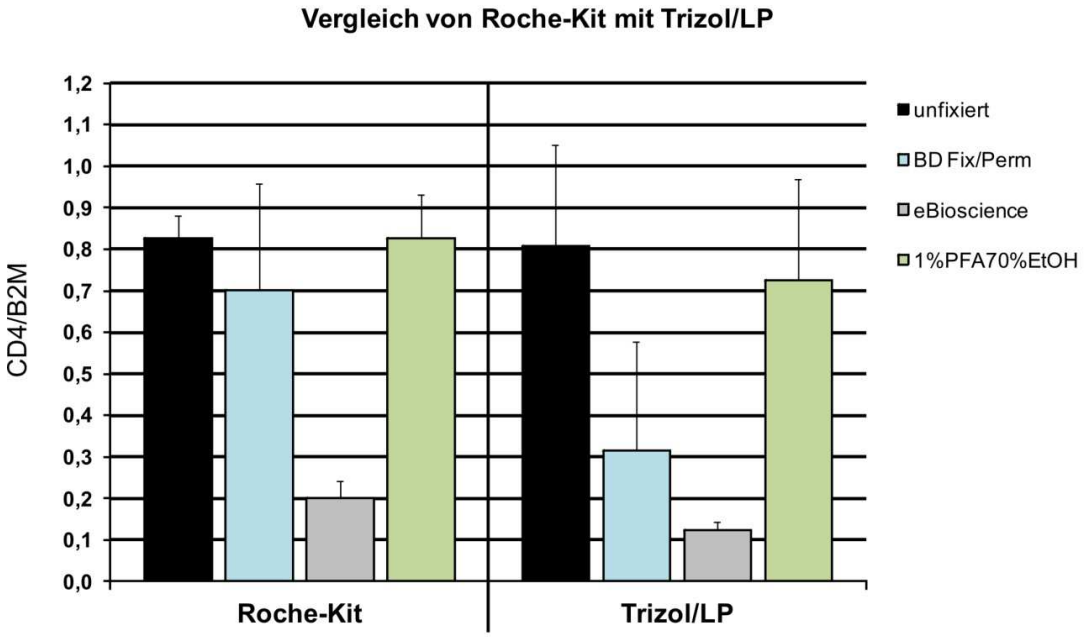


Abb. 4-12: Vergleich des CD4/B2M-Quotienten zwischen Roche-Kit und Trizol/LP
Zwei verschiedene Kulturen von RA- Treg wurden in vitro kultiviert und anschließend ruhiggestellt. Vor der Färbung erfolgte die Stimulation für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 wurden die Zellen entweder mit eBioscience, mit BD Cytofix/Cytoperm oder mit 1% PFA für 10 min bei RT fixiert und 70% Ethanol für 10mnin bei -20°C permeabilisiert und auf FOXP3 und IL-4 gefärbt. Nach der Färbung wurde die RNA mit dem Roche-Kit oder mit Trizol/LP extrahiert. Mitgeführt wurde je Kultur eine Kontrolle, die unfixiert belassen wurde. Die cDNA-Herstellung und die Aufarbeitung der cDNA zur quantitativen rt-PCR erfolgten nach Herstellerprotokoll.

Daraus lässt sich folgern, dass das Roche-Kit zur RNA-Extraktion nach Färbung mit BD Cytofix/Cytoperm besser geeignet ist als die Extraktion mit Trizol/LP. Da aber die Färbung, die in dieser Promotionsarbeit benötigt wird, nämlich die kombinierte Färbung mit FOXP3 und Zytokinen, mit BD Cytofix/Cytoperm nicht mit zufriedenstellendem Ergebnis möglich ist, bringt die RNA-Extraktion mit dem Roche-Kit keinen Vorteil gegenüber der Methode mit Trizol/LP und wird daher nicht weiterverfolgt.

4.3 Genexpression in fixierten und nach FOXP3 und IL-4 gesorteten Zellen

Da im Kapitel 4.2 nun eine Methode etabliert wurde, die nach kombinierter FOXP3- und Zytokin-Färbung die Extraktion intakter RNA für weitere Analysen möglich machte, wurde diese Methode im Folgenden dazu eingesetzt, in vitro kultivierte RA- Treg nach FOXP3 und IL-4 zu sorten, danach RNA zu extrahieren und nach reverser Transkription in cDNA mittels quantitativer rt-PCR im Hinblick auf die unterschiedliche Expression bestimmter Gene zu analysieren.

Hierfür wurden aus zwei verschiedene Kulturen jeweils 50 bis 60 Millionen RA- Treg für 12 Tage kultiviert, für 4 Tage ruhiggestellt und vor der Färbung für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 erfolgten nach Fixierung mit 0.25% PFA 10-15 sec bei RT und Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10 min bei -20°C die Färbungen auf FOXP3 und IL-4. Zur Überprüfung der Güte der Färbung wurde je 1 Million der Zellen als Kontrolle mit eBioscience auf FOXP3 und IL-4 gefärbt. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Zellsortierung mittel FACSAria (BD) in die drei Subpopulationen FOXP3+/IL4-, FOXP3-/IL4-, FOXP3-/IL4+. **Abbildung 4-13** zeigt das Vorgehen bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung. Es handelt sich um 2 voneinander unabhängige Experimente mit jeweils einem simultanen Sort, bei dem nach Gaten in eine FOXP3-positive und -negative Population die Gates in der FOXP3-positiven Population für die IL4-negative und in der FOXP3-negativen sowohl für die IL4-negative als auch für die IL4-positive Population gesetzt wurden und anschließend der Sort als Vier-Wege-Sortierung erfolgte. Hierdurch ergaben sich die drei Subpopulationen der RA- Treg, deren Genexpression im weiteren Verlauf mittels quantitativer rt-PCR weiteruntersucht werden sollte; diese Populationen werden im Folgenden bezeichnet als FOXP3+/IL4-, FOXP3-/IL4- und FOXP3-/IL4+. Die beispielhaft gezeigte eBioscience-Kontrolle des ersten Experimentes bestätigt, dass die Färbung nach der neuen Methode der Güte der kommerziellen Färbung entspricht.

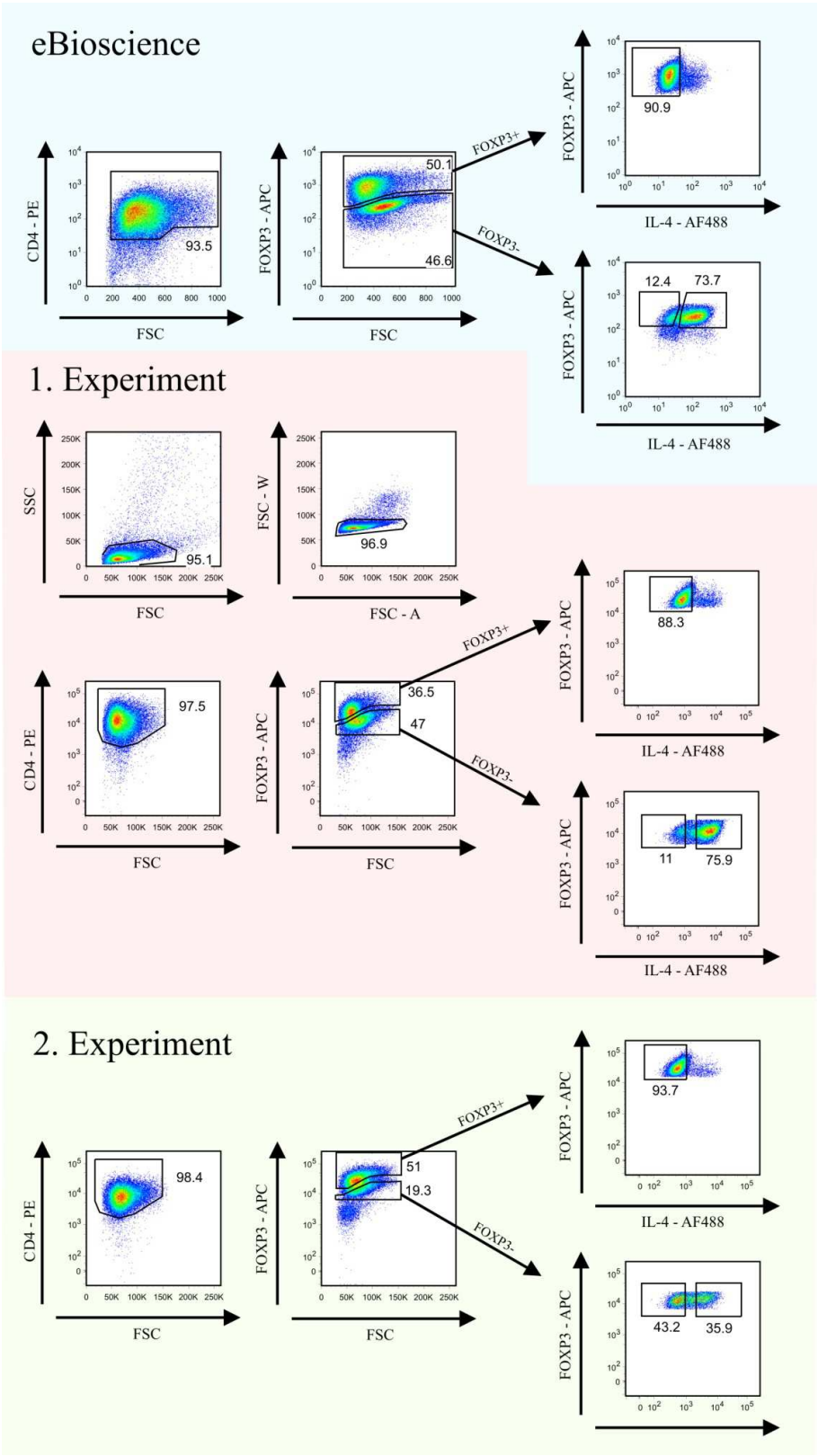
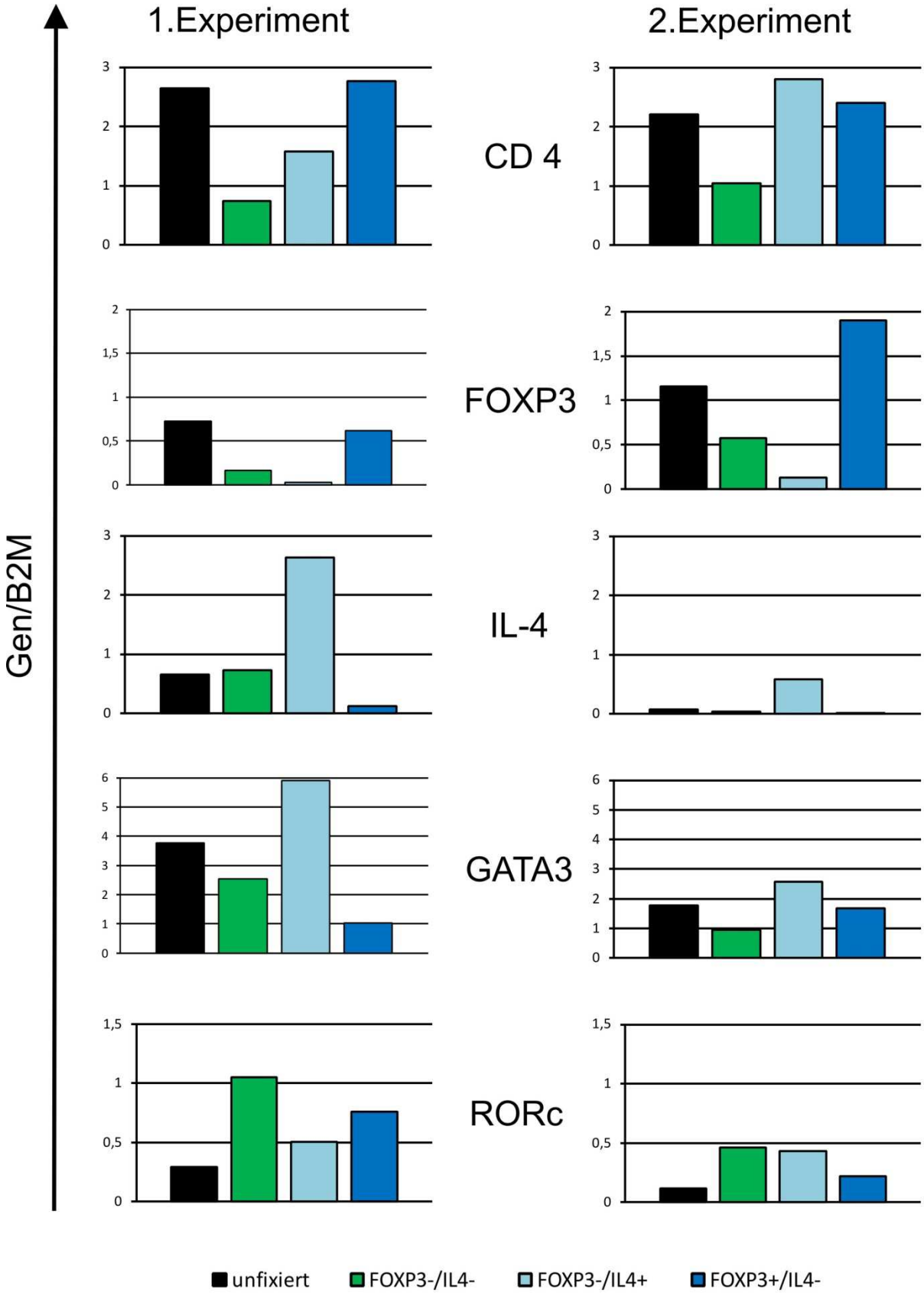


Abb. 4-13: Vorgehen bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung nach FOXP3 und IL4
Jeweils 50 bis 60 Millionen Zellen zweier verschiedener Kulturen RA- Treg wurden für 12 Tag kultiviert, für 4 Tage ruhiggestellt und vor der Färbung für 5 h mit PMA/ Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 erfolgten nach Fixierung mit 0.25% PFA für 10-15 sec bei RT und Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10 min bei -20°C die Färbungen auf FOXP3 und IL-4. Zusätzlich wurde je 1 Million der Zellen als Kontrolle mit eBio-science auf FOXP3 und IL-4 gefärbt.

Nach der Zellsortierung waren für die RNA-Extraktion in der FOX3+/IL4- Population ca. 1.3 Millionen Zellen, in der FOXP3-/IL4- Population ca. 250 000 Zellen und in der FOXP-/IL4+ Population ca. 800 000 Zellen vorhanden. Nach der Sortierung wurden die Proben der 3 Subpopulationen während des Transports leicht gekühlt (bei ca. 4°C) und lichtundurchlässig verpackt, um die RNA zu schützen. Anschließend erfolgten wegen der geringen Zellzahlen erst nach Zugabe von Glykogen zur Sichtbarmachung der RNA-Pellets die Inkubation mit Lysepuffer (LP) für 1 h bei 65°C, die RNA-Extraktion mittels Trizol und danach die cDNA-Herstellung nach üblichem Protokoll. Im Anschluss erfolgte die Analyse ausgewählter Gene mittels quantitativer rt-PCR.

Für Gene, deren Expression in den drei gesorteten Populationen näher untersucht werden sollte, wurden als Kontrollgene *CD4, IL4* und *FOXP3* gewählt, da zu erwarten war, dass CD4 in allen Populationen kultivierter RA- Treg im gleichen Maße vorhanden sein und die Höhe von FOXP3 und IL4 mit der jeweils gesorteten Subpopulation korrelieren sollte. Zusätzlich wurden die Transkriptionsfaktoren *GATA3* und *RORc* und andere Gene wie *LAG3* und *LIF* (vgl. Einleitung) bezüglich ihrer Expression in den drei Subpopulationen betrachtet. Da auch hier wieder nicht die absoluten Werte betrachtet werden können, wurde als Housekeeper *B2M* mitgeführt und für die Vergleichbarkeit der Genexpression der Quotient des jeweiligen Gens mit *B2M* (*Gen/B2M*) gebildet.


1.Experiment
2.Experiment
Gen/B2M
CD 4
FOXP3
IL-4
GATA3
RORc
unfixiert
FOXP3-/IL4-
FOXP3-/IL4+
FOXP3+/IL4-

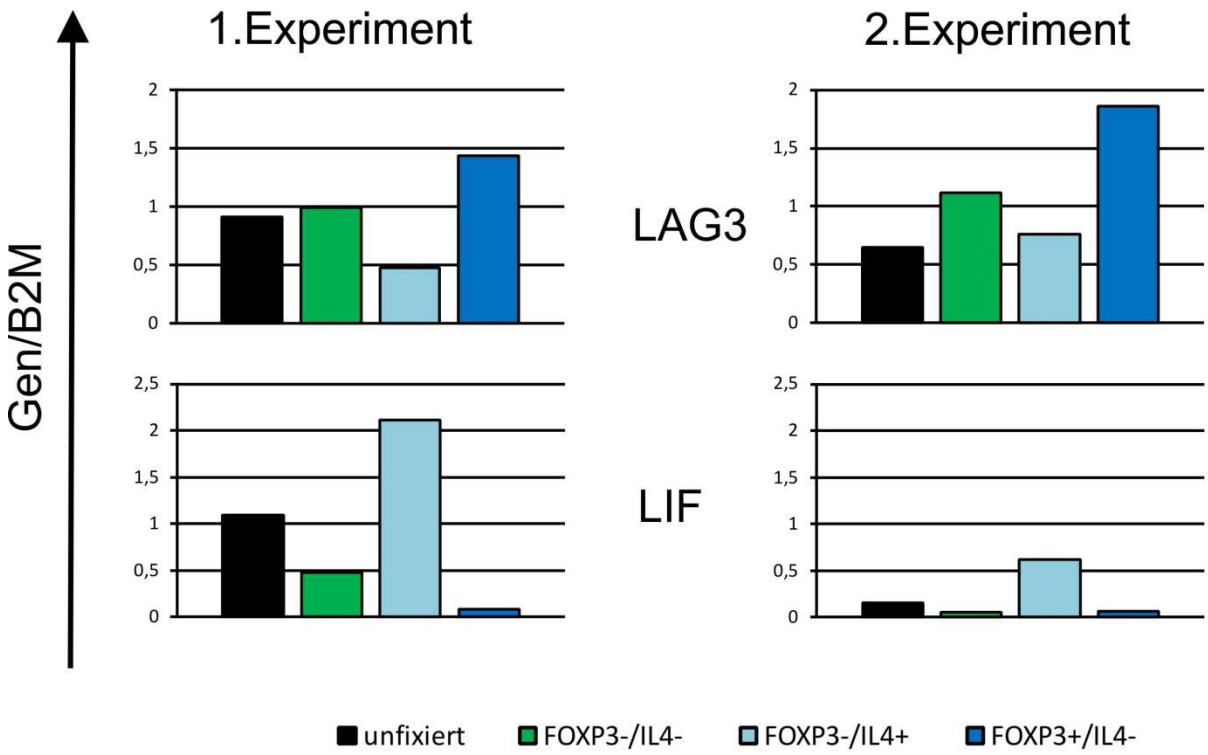


Abb. 4-14: Gegenüberstellung des Genexpressionsmusters zweier nach FOXP3 und IL-4 gesorteter Kulturen

Jeweils 50 bis 60 Millionen Zellen zweier verschiedener Kulturen RA- Treg wurden für 12 Tage kultiviert, für 4 Tage ruhiggestellt und vor der Färbung für 5 h mit PMA/Ionomycin in Gegenwart von Golgi Stop stimuliert. Nach der Oberflächenfärbung auf CD4 erfolgten nach Fixierung mit 0.25% PFA für 10-15 sec bei RT und Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10 min bei -20°C die Färbungen auf FOXP3 und IL-4. Nach der RNA-Extraktion mit Trizol/LP und der cDNA-Herstellung erfolgte die quantitative rt-PCR für die Gene CD4, *FOXP3*, IL4, *GATA3*, *RORc*, LAG3 und LIF.

Abbildung 4-14 zeigt die Gegenüberstellung der zwei gesorteten Kulturen im Hinblick auf ihr Genexpressionsmuster ausgewählter Gene. Betrachtet man zunächst die drei Kontrollgene, so fällt auf, dass sich für *CD4*, das ja in allen Treg Zellen und somit auch in allen Subpopulationen in gleichem Maße exprimiert werden sollte, kein einheitliches Expressionsmuster zeigt. Beiden Sorts ist gemeinsam, dass die doppelt-negativ gesortete FOXP3-/IL4- Population am wenigsten *CD4* exprimiert. Des Weiteren fällt auf, dass für *FOXP3* und *IL-4*, nach denen die jeweiligen Populationen ja gesortet wurden, das Muster der Genexpression in beiden Sorts der jeweilig gesorteten Population entspricht. So findet sich die höchste *FOXP3*-Expression in der FOXP3+/IL4- gesorteten, am wenigsten *FOXP3* in der FOXP3-/IL4+ gesorteten Population. Die doppelt negative Population FOXP3-/IL4- zeigt die zweitgeringste Expression. Auch bei der Expression von *IL-4* lässt sich das bereits oben beschriebene Muster wiederfinden; die höchste *IL-4*-Expression findet sich in der FOXP3-/IL4+, die niedrigste in der FOXP3+/IL4-Population. Die doppelt-negative Probe und die unfixierte Kontrolle zeigen ein ähnliches Ex-

pressionslevel. Durch diese Betrachtung, lässt sich zeigen, dass die gesorteten Populationen auch in ihrem Expressionsmuster dem zu Erwartenden entsprechen.

Auch für *GATA3* lässt sich eine Tendenz in beiden Sorts feststellen. Hier exprimieren die FOXP3-/IL4+ am meisten, so wie man es auch erwarten würde, da *GATA3* ein Th2-Zellen spezifisches Gen ist und diese Zellen auch IL4-Produzenten sind. Bei der Untersuchung des Th17-spezifischen Transkriptionsfaktors *RORc* unterscheiden sich die beiden Kulturen insofern, als dass die FOXP3-/IL4- Population zwar am meisten *RORc* exprimiert, der Unterschied zu den anderen Populationen allerdings sehr gering ist.

In Bezug auf ihre Expression unterscheiden sich die Gene *LAG3* und *LIF* in ihrem Expressionsverhalten dahingehend, dass *LAG3* in beiden untersuchten Kulturen uniform am meisten in der FOXP3+/IL4- Population vertreten ist, während *LIF* vor allem in der FOXP3-/IL4+ Populationen exprimiert wird. Wie in unserer Publikation 2011 beschrieben, können FOXP3+ Zellpopulationen Produzenten von *LAG3* sein (16). Diese Tendenz ist hier in beiden gesorteten Kulturen deutlich zu sehen.

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass es in dieser Arbeit gelungen ist, eine Methode zu entwickeln, mit der man nach Fixierung und Permeabilisierung von Treg diese mittels Zellsortierung in ihre Subpopulationen auftrennen und intakte RNA zu weiteren Analyse gewinnen kann. Folglich konnten die Treg-Subpopulationen mittels quantitativer real-time PCR weiter klassifiziert und definiert werden.

5. Diskussion

CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen (Treg) sind physiologischer Weise imstande, Immunantworten zu modulieren und die Aktivität konventioneller T-Zellen zu unterdrücken. Hierdurch werden überschießende Immunreaktionen mit potentiell gewebeschädigenden Folgen vermieden. Treg-Zellen werden durch eine Vielzahl von Eigenschaften, Genen, Oberflächenmarkern sowie durch die Produktion und Sekretion von bestimmten Botenstoffen charakterisiert (7).

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen eine Methode zu entwickeln, mit der man kultivierte Treg-Zellen nach Färbung, durchflusszytometrischer Zellsortierung und nach RNA-Extraktion mittels quantitativer realtime-PCR einer molekularen Analyse ausgewählter Gene zur näheren Charakterisierung unterziehen kann. Dies gelang mittels Fixierung durch 0.25% PFA für 10-15 sec bei RT und Permeabilisierung mit 70% Ethanol für 10min bei -20°C. Nach der durchflusszytometrischen Zellsortierung erfolgte die RNA-Extraktion aus den gesorteten Subpopulationen mit Trizol nach vorheriger Inkubation für 1 Stunde in Lysepuffer bei 65°C auf dem Thermoschüttler. Anschließend wurde aus den gesorteten Proben zunächst cDNA hergestellt und diese mittels quantitativer realtime-PCR näher analysiert.

5.1 Güte und Anwendbarkeit der kombinierten FOXP3- und IL4-Färbung für die Zellsortierung

Im Vergleich zu der kombinierten FOXP3- und IL4-Färbung mit dem konventionellen Färbekit von eBioscience unterscheidet sich die in dieser Arbeit etablierte Methode vor allem dahingehend, dass für die oben genannte Färbung Ethanol verwendet wurde und die Paraformaldehydkonzentration im Vergleich zu kommerziellen Kits (Biosciences-Kit) drastisch reduziert wurde. Wie in unserer Arbeitsgruppe 2010 gezeigt, benötigt man Ethanol bei der Färbung von FOXP3 zur Permeabilisierung der Zellen, damit der Antikörper im Zellkern an den Transkriptionsfaktor FOXP3 binden kann. Um zusätzlich auch Zytokine in der Zelle anfärben zu können, müssen diese zuvor in der Zelle fixiert werden, damit sie bei der Permeabilisierung nicht aus der Zelle entweichen. Für diese Fixierung wurde in der vorliegenden Arbeit PFA verwendet, wobei schon eine niedrige Konzentration (0.25%) und eine kurze Inkubationsdauer (10-15 Sekunden) ausreichten, um die Zytokine in der Zelle zu halten. Mittels einer Kombination aus PFA-Fixierung und Ethanol-Permeabilisierung ist es gelungen, Färbebedingungen zu finden, mit denen man Zytokine und FOXP3 gemeinsam färben kann,

ohne die RNA für nachfolgende molekulare Analysen vollständig zu zerstören. Auch wenn diese Färbung im Vergleich zu der Färbung mit kommerziellen Kits von eBioscience nicht dieselbe Trennungsqualität aufweist, so ermöglicht sie, wie unter 4.3 beschrieben, eine durchflusszytometrische Zellsortierung mit anschließender RNA- bzw. cDNA-Analyse.

5.2 RNA-Extraktion mit PFA und Ethanol – Qualität und Integrität

Es wurde für die Zellsortierung mit anschließender RealPlex-Analyse ein geringer Prozentsatz an PFA, nämlich nur 0.25% verwendet, um die Zelle bzw. die RNA - bei ähnlicher Färbequalität - nicht mehr als nötig schädlichen Detergenzien auszusetzen

Paraformaldehyd (PFA) wird dazu eingesetzt, Zytokine in der Zelle festzuhalten, und interferiert daher auch mit anderen intrazellulären Strukturen und fixiert diese in der Zelle. Dies gilt ebenso in Bezug auf die RNA. Es wird davon ausgegangen, dass die Fixation mit PFA zum einen zu einer teilweisen Degradierung der RNA führt, zum anderen, dass das PFA selbst mit der RNA reagiert und durch Spaltung der Methylenbrücken zwischen den Aminogruppen N-Methylol bildet. Für diese Spaltung ist vor allem der Poly-A-Schwanz der mRNA in fixierten Zellen besonders anfällig, weswegen die Herstellung der cDNA aus dieser RNA nur eingeschränkt möglich ist (60)**.** Deshalb wurde nun versucht, die Entstehung solcher Verbindungen zwischen PFA und RNA zu minimieren; dafür wurde überlegt, die in unserer Arbeitsgruppe für die DNA-Extraktion entwickelten und getesteten Puffer im Hinblick auf die Einsetzbarkeit in der RNA-Extraktion zu testen. Der Lysepuffer (LP) mit einem SDS-Gehalt von 0.5% erwies sich als geeignet für den weiteren Gebrauch. Da RNA sehr viel labiler ist als die DNA, unter anderem weil sie im Gegensatz zur doppelsträngigen DNA einsträngig vorliegt, wurde die Inkubationszeit des Lysepuffers auf 1 Stunde bei 65°C auf dem Thermoschüttler reduziert. Die Qualität der so erhaltenen RNA ließ sich indirekt testen; so zeigte sich bei der Herstellung von cDNA nur ein sehr geringer Mengenunterschied bei der Verwendung fixierter im Vergleich zu unfixierten Zellen bei gleicher eingesetzter RNA-Menge (siehe Kapitel 4.2). Die Integrität der gewonnenen RNA ließ sich mittels RNA-Gel beurteilen. Wie im Ergebnisteil in Abbildung 4-9 an den ribosomalen Banden erkennbar, ist nach der oben beschriebenen Färbe- und Extraktionsmethode intakte RNA vorhanden und steht zur weiteren Analyse zur Verfügung.

5.3 Genanalyse mittels real-time PCR

Zur weiteren Genanalyse musste aus der gewonnenen RNA die cDNA Herstellung erfolgen.
Wie unter 5.2 beschrieben, wird durch die Fixierung mit PFA der RNA-Gehalt, der für die Umschreibung in cDNA zur Verfügung steht, leicht reduziert. Dies führt dazu, dass – bei gleicher eingesetzter RNA-Menge – weniger intakte cDNA in den fixierten Zellen als in den unfixierten Kontrollzellen entstehen kann.
Wenn man Abbildung 4-10 betrachtet, sieht man, dass die Zyklen, ab denen Fluoreszenz in der quantitativen realtime-PCR gemessen werden kann, um bis zu + 6 Zyklen (CT Mean) nach Fixation der Zellen im Vergleich zur unfixierten Kontrolle abweichen können. Dies lässt sich auch durch den geringeren cDNA-Gehalt erklären. Bei der Fixation mit eBioscience erkennt man schon anhand des RNA-Gels, dass die RNA komplett degradiert vorliegt, da keinerlei Banden mehr zu sehen sind. Dies verifiziert sich bei Betrachtung des RealPlex. Man sieht also in Abb. 4-10, dass der cDNA-Gehalt zwischen den einzelnen Genen im CT Mean stark schwankt, die Tendenz bezüglich der unfixierten und fixierten Proben jedoch gleich bleibt. Daher wurde diejenige Methode weiterverwendet, deren Ergebnisse derjenigen der unfixierten Zellen am nächsten kommt, nämlich der Fixierung mit 0.25% PFA und der Permeabilisierung mit 70% Ethanol und der anschließenden Extraktion mit Trizol nach einstündiger Inkubation mit Lysepuffer bei 65°C auf dem Thermoschüttler.
Bei Betrachtung der Rohdaten des RealPlex nach Zellsortierung fällt auf, dass beim Vergleich der Doppelwerte der einzelnen Populationen einer Kultur zum Teil erhebliche Abweichungen voneinander messbar sind. Diese lassen sich, wie unter 5.2 beschrieben, durch die teilweise Degradierung der RNA und damit einer fehlerhaften bzw. unvollständigen reversen Transskription erklären. Der Unterschied der Doppelwerte zeigt, dass, selbst bei Verwendung desselben cDNA-Pools, unterschiedlich lange Teilstücke der cDNA vorliegen können, die zu unterschiedlichen Fluoreszenzmessungen und somit zu unterschiedlichem cDNA-Gehalt führen.

5.3.1 Kontrollgene zur Qualitätssicherung der Zellsortierung

Betrachtet man zunächst die sogenannten Kontrollgene der Zellsortierung, nämlich neben dem Housekeeper *Beta-2-Mikroglobulin* auch diejenigen Gene, nach denen die Zellensortierung erfolgte, *FOXP3* und *IL-4*, so fällt auf, dass sich vor allem bei *Beta-2-Mikroglobulin* die Werte der Rohdaten zwischen unfixierten und fixierten Zellen teilweise um das 30-Fache unterscheiden. Wäre dieser Unterschied nur zwischen fixierten und unfixierten Zellen zu sehen, könnte man vermuten, dass dies wiederum ein Ergebnis der Fixierung mit PFA ist. Jedoch

auch zwischen den fixierten und gesorteten Populationen fallen diese Unterschiede auf. Hierfür ließ sich bisher keine eindeutige Erklärung finden, wahrscheinlich sind für die Variabilität die PFA-Expositionsdauer und das Zeitintervall bis zur Extraktion verantwortlich. Ähnlich verhält es sich für die beiden Kontrollgene *FOXP3* und *IL-4*. Da die Zellen genau nach diesen beiden Genprodukten sortiert wurden, dient die Expressionsstärke dieser Gene als Qualitätskontrolle für die Methode. Es zeigt sich, dass die *IL-4*-Expression in den FOXP3-/IL4+ gesorteten Zellen am höchsten ist, ebenso die *FOXP3*-Expression in den FOXP3+/IL4- Zellen. Man sieht jedoch auch bei diesen beiden Kontrollgenen, dass sich die Kulturen der beiden Sorts im Hinblick auf den absoluten Gen-Gehalt unterscheiden. So scheint es, als habe der zweite Sort in Bezug auf *IL-4* nur ein Viertel des cDNA-Gehalts des ersten, wohingegen in Bezug auf *FOXP3* das Verhältnis umgekehrt ist. Zusammenfassend ließ sich in beiden Experimenten eine positive Korrelation bezüglich der Genexpression für die positiv gesorteten Kontrollgenprodukte nachweisen, die Zellen separater Experimente unterscheiden sich aber in ihrem absoluten Gengehalt.

5.3.2 Upregulation von Th2-Genen in der FOXP3-negativen Treg-Subpopulation

Betrachtet man als Nächstes die Genexpression von *GATA3* in den gesorteten Treg-Subpopulationen, so zeigt sich in beiden Sorts eindeutig eine erhöhte Expression in der FOXP3-/IL4+ Population. *GATA3* ist, wie unter 1.3.2 beschrieben, ein linienspezifisches Gen für Th2-Zellen. Wie von unserer Arbeitsgruppe 2012 gezeigt, kommt es im Rahmen des Verlusts von FOXP3 im Kulturverlauf von Treg-Zellen zur Hochregulation von Th2-spezifischen Genen, unter anderem auch *GATA3* und *IL-4* sowie *IL-5* und *IL-13*. Die Th2-Differenzierung von ehemaligen Treg-Zellen nach Downregulation von *FOXP3* trat sogar unter nicht-polarisierenden Bedingungen auf und konnte durch Blockade der IL-4 Signalkaskade nicht unterdrückt werden (16).

Genau dieser erste Sachverhalt wurde in dieser Arbeit in Abbildung 4-14 dargestellt; *GATA3* wird vor allem in der Subpopulation exprimiert, die kein FOXP3, dafür aber IL-4 produziert.

5.3.3 RORc – Entwicklung zur Th17-Zelle?

Da *RORc* ein charakteristischer Transkriptionsfaktor der Th17-Zellen ist und diese weder IL-4 noch FOXP3 produzieren, erwartet man eine Genexpression vor allem in der doppelt negativen Population. Wie in Abbildung 4-14 gezeigt, konnte das erwartete Genexpressionsmuster in beiden Sorts nachgewiesen werden. Die Differenz zwischen den einzelnen Populationen ist

jedoch nur minimal, so dass die Relevanz der Expressionsunterschiede fragwürdig bleibt. Die Differenzierung von Treg- zu Th17-Zellen nach FOXP3-Verlust wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (18, 19, 61, 62). Hierfür wurden in aller Regel jedoch Th17-fördernde Kulturbedingungen eingesetzt. Unter den in dieser Arbeit eingesetzten neutralen Kulturbedingungen (CD3/28 und IL-2 Stimulation) scheint die Th17-Differenzierung keine Rolle zu spielen. Die Daten dieser Arbeit inklusive die von unserer Arbeitsgruppe publizierten Daten belegen, dass die Th2-Differenzierung nach *FOXP3*-Verlust dominiert.

5.3.4 LAG3 und LIF – zwei Treg-Gene?

Zudem wurden in dieser Arbeit zwei weitere Gene, nämlich *LAG3* und *LIF* (vgl. 1.3.4.2), untersucht, deren Signifikanz für die Treg-Population noch nicht abschließend geklärt werden konnte. *LAG-3* als CD-4 assoziiertes Gen mit Bindung an MHC-Moleküle der Klasse II wird hauptsächlich von natürlichen $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulatorischen T-Zellen nach Aktivierung exprimiert (16, 34). So zeigt sich korrelierend hierzu in Abbildung 14-4, dass *LAG3* von allem in der FOXP3+/IL4- Subpopulation vermehrt exprimiert wird; am geringsten ist die Produktion in der FOXP3-/IL4+ Subpopulation. Dieses Expressionsmuster wurde in unserer Arbeitsgruppe 2012 in anderem Zusammenhang bereits festgestellt. Vergleicht man diesen Sachverhalt nun mit dem unter 5.3.2 erläuterten, also dass Th2-spezifische Gene nicht in FOXP3-positiven Treg-Zellen exprimiert werden, so könnte man folgern, dass *LAG3* nur in Treg, nicht jedoch in Th2-Zellen exprimiert wird und somit als charakteristisches Gen für Treg gehandelt werden kann.

Für das Gen *LIF* lassen sich mehrere Vermutungen anstellen, warum das Gen vor allem in den IL4+ und in den FOXP3- Zellen exprimiert wird, wie dies in Abbildung 4-14 dargestellt ist; hier exprimiert die FOXP3-/IL4+ Population am meisten *LIF*. Dass die Expression verstärkt in der FOXP3-/IL4+ Population stattfindet, zeigt zum einen, dass - wie bei Cao W. et al. (2001) beschrieben - *LIF* die Th17-Zelldifferenzierung hemmen, zum anderen, dass nur in Abwesenheit von IL-4 eine Th17-Zelldifferenzierung stattfinden kann (8, 20, 63). Hinzu kommt, dass die Expression von *LIF* die *FOXP3*-Expression herunter regulieren kann (64). Fasst man diese drei Aussagen zusammen, so müssten Zellen, die *LIF* exprimieren, FOXP3- sein, und da *LIF* und IL-4 die Th17-Expression synergistisch hemmen, diese beiden Gene eventuell im gleichen Zelltyp auftreten. Somit kann *LIF* eher als ein Th2-Marker gehandelt werden, der nicht in FOXP3+-Treg produziert wird.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend ist es in dieser Arbeit gelungen, eine Methode zu entwickeln, mit der man Treg nach IL-4 und FOXP3 sortieren und in Hinblick auf ihr Genexpressionmuster näher untersuchen kann. Diese Methode bietet nun die Möglichkeit, globale Expressionsmuster unterschiedlicher Differenzierungsstufen humaner Treg-Zellen zu untersuchen, um die Linienstabilität bzw. das Differenzierungspotential dieser Zellpopulation aufzuklären. Wichtige Parameter zur erfolgreichen Durchführung der Methode sind eine möglichst kurze Fixierungsdauer mit 0.25%-igem Paraformaldehyd und eine Permeabilisierung mit 70% Ethanol mit anschließender Färbung und zügiger durchflusszytometrischer Zellsortierung sowie eine Inkubation mit Lysepuffer für 1 Stunde bei 65°C vor der RNA-Extraktion mit Trizol.

Trotz der erfolgreichen Etablierung der Methode zeigt die hohe Variabilität zwischen verschiedenen Experimenten, dass weiterer Optimierungsbedarf besteht. Hierfür sollten in zukünftigen Experimenten zum Beispiel folgende Aspekte untersucht werden: Möglichkeit der PFA-freien Zytokinfixierung, Optimierung der Zeitintervalle während der Zellverarbeitung und Möglichkeit der Kultivierung nach durchflusszytometrischer Zellsortierung zu weiteren Plastizitäts-Studien.

6 Literaturverzeichnis

1. Neumann, J. **Immunbiologie - Eine Einführung.** 1. Auflage. Heidelberg : Springer Verlag, 2008, S. 1 ff.

2. Schütt C, Bröcker B. **Grundwissen Immunologie.** 2. Auflage. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2009, S. 5 ff.

3. Ferenčík, M. **Kompendium der Immunologie.** 1. Auflage. Wien : Springer, 2006, S. 44 ff.

4. Ferenčík, M. **Kompendium der Immunologie.** 1. Auflage. Wien : Springer, 2006, S. 57 ff.

5. Murphy K. **Janeway Immunologie.** 7. Auflage. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2009, Kapitel 7.

6. Murphy K. **Janeway Immunologie.** 7. Auflage. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2009, Kapitel 8.

7. Zhou L, Chong MMW and Littman DR. **Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation.** *Immunity.* 2009, 30:646-655.

8. O'Connor RA, Taams LS and Anderton SM. **Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: CD4+ T helper cells: functional plasticity and differential sensitivity to regulatory T cell-mediated regulation.** *Clin Exp Immunol.* 2009, 159:1365-2249.

9. Zhu J, Yamane H and Paul WE. **Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations.** *Annu Rev Immunol.* 2010, 28:445–89.

10. Wan, YY. **Multi-tasking of helper T cells.** *Immunology.* 2010, 130:1365-2567.

11. Cope A, Le Friec G, Cardone J and Kemper C. **The Th1 life cycle: molecular control of IFN-γ to IL-10 switching.** *Trends Immunol.* 2011, 32:278-286.

12. Lipscomb MW, Chen L, Taylor JL, Goldbach C, Watkins SC, Kalinski P, Butterfield LH, Wesa AK and Storkus WJ. **Etopic T-bet expression licenses dendritic cells for interleukin (IL)-12-independent priming of Type-1 T cells in vitro.** *J Immunol.* 2009, 183:7250–7258.

13. Jarry A, Bossard C, Sarrabayrouse G, Mosnier JF and Laboisse CL. **Loss of Interleukin-10 or Transforming Growth Factor-β Signaling in the Human Colon Initiates a T-Helper 1 Response via distinct pathways.** *Gastroenterology.* 2011, 141:1887–1896.

14. Hosoya T, Maillard I and Engel JD. **From the cradle to the grave: activities of GATA-3 throughout T-cell development and differentiation.** *Immunol Rev.* 2010, 238:110–125.

15. Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, Hu-Li J, Zhu J and Paul WE. **Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101:3880–3885.

16. Hansmann L, Schmidl C, Kett J, Steger L, Andreesen R, Hoffmann P, Rehli M and Edinger M. **Dominant Th2 Differentiation of Human Regulatory T Cells upon Loss of FOXP3 Expression.** *J Immunol.* 2012, 188:1275-1282.

17. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L and Paul WE. **GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanism: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors.** *Cell Research.* 2006, 16:3-10.

18. Alonso MN, Wong MT, Zhang AL, Winer D, Suhoski MM, Tolentino LL, Gaitan J, Davidson MG, Kung TH, Galel DM, Nadeau KC, Kim J, Utz PJ, Söderström K and Engleman EG. **TH1, TH2, and TH17 cells instruct monocytes to differentiate into specialized dendritic cell subsets.** *Blood.* 2011, 118:3311-3320.

19. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI and Lord GM. **The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease.** *Clin Exp Immunol.* 2007, 148:32-46.

20. Peck, A and Mellins ED. **Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example.** *Immunology.* 2009, 129:147–153.

21. Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, Chen Y, Tato CM, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Hunter CA, Cua DJ and Kastelein RA. **IL-27 Blocks RORc Expression to Inhibit Lineage Commitment of Th17 Cells.** *J Immunol.* 2009, 182:5748-5756.

22. Dong, C. **Genetic controls of Th17 cell differentiation and plasticity.** *Exp Mol Med.* 2011, 43:1-6.

23. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and 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.

24. Edinger, M and Hoffmann P. **Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences.** *Curr Opin Immunol.* 2011, 23:679–684.

25. Sakaguchi, S. **Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.** *Nat Immunol.* 2005, 6:345-352.

26. Zhou X, Bailey-Bucktrout S, Jeker LT and Bluestone JA. **Plasticity of CD4+ FoxP3+ T cells.** *Curr Opin Immunol.* 2009, 21:281–285.

27. Hori S, Nomura T and Sakaguchi S. **Control of regulatory T cell development by the transcription factor FOXP3.** *Science.* 2003, 299:1057-1061.

28. Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY. **Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.** *Nat Immunol.* 2003, 4:330-336.

29. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG and Rudensky AY. **Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3.** *Immunity.* 2005, 22:329-341.

30. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G , McEuen M, Proll S, Appleby M and Brunkow ME. **X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy.** *Nat Genet.* 2001, 27:18-20.

31. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark L B, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF and Ramsdell F. **Disruption of a new forkhead/winged-helix profein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder on the scurfy mouse.** *Nat Genet.* 2001, 27:68-73.

32. Vignali DAA, Collison LW and Workman CJ. **How regulatory T cells work.** *Nat Rev Immunol.* 2008, 8:523-532.

33. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS and Vignali DAA. **The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function.** *Nature.* 2007, 450:566-569.

34. Okamura T, Fujio K, Shibuyai M, Sumitomo S, Shoda H, Sakaguchi S and Yamamoto K. **CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcriptions factor Egr-2.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106:13974–13979.

35. Lass A., Weiser W., Munafo A. **Leukemia inhibitory factor in human reproduction.** *Fertil Steril.* December 2001, 76(6).

36. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, de St. Groth BF, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF and Bluestone JA. **CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells.** *J Exp Med.* 2006, 203:1701-1711.

37. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A and de St. Groth BF. **Expression of interleukin (IL)-2 and IL-17 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells.** *J Exp Med.* 2006, 203:1693-1700.

38. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y and Shevach EM. **Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells.** *J Immunol.* 2010, 184:3433-3441.

39. Schmidl C, Klug M, Boeld TJ, Andreesen R, Hoffmann P, Edinger M and Rehli M. **Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity.** *Genome Res.* 2009, 19:1165-1174.

40. Huehn J, Polansky JK and Hamann A. **Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?** *Rev Immunol.* 2009, 9:83-89.

41. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ,Hoffmann P, Edinger M, Türbachova I, Hamann A, Olek S and Huehn J. **DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells.** *Eur J Immunol.* 2007, 37:2378–2389.

42. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K and Rudensky AY. **Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate.** *Nature.* 2010, 463:808-812.

43. Hyoung-Pyo, K and Warren JL. **CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation.** *J Exp Med.* 2007, 204:1543-1551.

44. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A and Huehn J. **Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells.** *PLoS Biol.* 2007, 5:169-178.

45. Lal, G and Bromberg JS. **Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression.** *Blood.* 2009, 114:3727-3735.

46. Wilson CB, Rowell E and Sekimata M. **Epigenetic control of T-helper-cell differentiation.** *Nat Rev Immunol.* 2009, 9:91-105.

47. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Piseshka B, Dada A, Niemand C, Assenmacher M, Orsó E, Andreesen R, Holler E and Edinger M. **Isolation of CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells for Clinical Trials.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006, 12:267-274.

48. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, Olek S, Dietmaier W, Andreesen R and Edinger M. **Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repititive in vitro stimulation.** *Eur J Immunol.* 2009, 39:1088-1097.

49. Deknuydt F, Bioley G, Valmori D and Ayyoub M. **IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells.** *Clin Immunol.* 2009, 131:298-307.

50. Koenen HJPM, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E,Boots AMH and Joosten I. **Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells.** *Blood.* 2008, 112:2340-2352.

51. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreesen R and Edinger M. **Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion.** *Blood.* 2006, 108:4260-4267.

52. Niu Q, Cai B, Huang ZC, Shi YY and Wang LL. **Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis.** *Rheumatol Int.* August, 32:2731–2736.

53. Rahman, Ph. D. Misha. **Introduction to Flow Cytometry.** s.l. : AbD serotec, 2010.

54. Hansmann L, Schmidl C, Boeld TJ, Andreesen R, Hoffmann P, Rehli M and Edinger M. **Isolation of intact genomic DNA from FOXP3-sorted human regulatory T cells for epigenetic analyses.** *Eur J Immunol.* 2010, 40:1510-1512.

55. Katia Boniface, Wendy M. Blumenschein, Katherine Brovont-Porth, Mandy J. McGeachy, Beth Basham, Bela Desai, Robert Pierce, Terrill K. McClanahan, Svetlana Sadekova and René de Waal Malefyt. **Human Th17 Cells Comprise Heterogeneous**

Subsets including IFN-γ-Producing Cells with Distinct Properties from Th1 Lineage. *J Immunolog.* 2010, S. 679-687.

56. Kück, U. **Praktikum der Molekulargenetik.** s.l. : Springer-Verlag, 2005, S. 254 ff.

57. Schütt C, Bröcker B. **Grundwissen Immunologie.** 2. Auflage. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2009, S. 137 ff.

58. Kwok, S and Higuchi R. **Avoiding false positives with PCR.** *Nature.* 1989, 139:237-238.

59. Boniface K, Blumenschein WM, Brovont-Porth K, McGeachy MJ, Basham B, Desai B, Pierce R, McClanahan TK, Sadekova S and de Waal Malefyt R. **Human Th17 Cells Comprise Heterogeneous Subsets including IFN-γ-Producing Cells with Distinct Properties from Th1 Lineage.** *J Immunol.* 2010, 185:679-687.

60. Srinivasan M, Sedmak D and Jewell S. **Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids.** *Am J Pathol.* 2002, 161:1961-1971.

61. Komatsu N, Kazuo O, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone J and Takayanagi H. **Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into Th17 cells in autoimmune arthritis.** *Nature Medicine.* 2014, 20:62-68.

62. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H and Hori S. **Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity.** *Proc. Natl. Acadf. Sci. USA.* 2009, 106:1903-1908.

63. Murphy K. **Janeway Immunologie. 7.** Auflage. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2009, Kapitel 8.

64. Zhao X, Ye F, Chen L, Lu W and Xie X. **Human epithelial ovarian carcinoma cell-derived cytokines cooperatively induce activated CD4+CD25-CD45RA+ naïve T cells to express forkheadbox protein 3 and exhibit suppressive ability in vitro.** *Cancer Sci.* 2009, 100:2143–2151.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Hämatopoese 9
Abb. 1-2: Übersicht über die Funktionen CD4-positiver T-Zellen 12
Abb. 1-3: Die Differenzierung der verschiedenen CD4+ T-Zell-Linien 12
Abb. 1-4: Koordination der Immunreaktion von aktivierten Th1-Zellen 13
Abb. 4-1: Einfluss von Lysepuffer bei der RNA-Extraktion aus unfixierten Zellen mit Trizol auf die Absorption bei λ = 260nm 42
Abb.4-2: Einfluss von Lysepuffer bei der RNA-Extraktion aus unfixierten Zellen mit Trizol auf in Integrität der RNA 43
Abb. 4-3: Gegenüberstellung von FOXP3-Färbung und RNA-Gel nach Permeabilisierung und Fixierung mit eBioscience 44
Abb. 4-4: Gegenüberstellung verschiedener Methoden zur kombinierten FOXP3- und IFNγ-Färbung 46
Abb. 4-5: Einfluss der PFA-Konzentration auf die Zytokin-positive Population 47
Abb. 4-6: Gegenüberstellung von FOXP3-Färbung und RNA-Gel nach Permeabilisierung und Fixierung mit 1%PFA und 70%Ethanol 48
Abb. 4-7: Einfluss der Fixierungsdauer mit 1%PFA auf die Anfärbbarkeit fixierter Zellen für FOXP3 und IL-4 49
Abb. 4-8: Einfluss der Fixierungsdauer und der PFA-Konzentration auf die Anfärbbarkeit fixierter Zellen für FOXP3 und IL-4 51
Abb. 4-9: RNA-Integritätsprüfung mittels RNA-Gel nach verschiedenen Färbemethoden 53
Abb. 4-10: Einfluss der Fixierung der Zellen auf den Fluoreszenzanstieg während der Replikation verschiedener Genomabschnitte 56
Abb. 4-11: Einfluss verschiedener Fixierungen/Permeabilisierungen auf die Verteilung des Genomverlusts der jeweiligen Zellen für *CD4* und *B2M* 57
Abb. 4-12: Vergleich des *CD4/B2M*-Quotienten zwischen Roche-Kit und Trizol/LP 60
Abb. 4-13: Vorgehen bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung nach FOXP3 und IL4 62
Abb. 4-14: Gegenüberstellung des Genexpressionsmusters zweier nach FOXP3 und IL-4 gesorteter Kulturen 64

7.2 Publikationen

Hansmann L, Schmidl C, Kett J, Steger L, Andreesen R, Hoffmann P, Rehli M and Edinger M. **Dominant Th2 Differentiation of Human Regulatory T Cells upon Loss of FOXP3 Expression.** *J Immunol.* 2012, 188:1275-1282.

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Daten und Konzepte sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Sankt Gallen, den _____ _____

(Lena Steger)

7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich in so vielfältiger Weise während der gesamten Zeit unterstützt haben.
Zuallererst danke ich Prof. Dr. Matthias Edinger und Dr. Petra Hoffmann für das angebotene Thema, für das in mich gesetzte Vertrauen sowie die fachliche Unterstützung und kompetente Beratung bei der Umsetzung und natürlich die Korrektur der gesamten Arbeit.
Ebenso ein großes Dankeschön geht an meinen Betreuer Dr. Leo Hansmann, welcher mich darin unterstützt hat, ein wissenschaftliches Denken und Arbeiten zu entwickeln und mir in der Umsetzung meiner Ideen tatkräftig zur Seite stand. Da er jedoch im Juni 2012 für einen Fellowship nach Standford ging, übernahm ab diesem Zeitpunkt Tina Böld die weitere Betreuung. Vielen Dank für das kurzfristige Einspringen und die uneingeschränkte Unterstützung, Tina!
Auch Rüdiger Eder gebührt großer Dank für das Kultivierung und Sorten „meiner“ Zellen. Noch ein ganz persönlicher Dank geht an Jasmin Stahl für ihre fachliche und freundschaftliche Hilfe und dafür, dass sie mir zu jeder Tages- und Nachtzeit im Labor und am Sorter mit einer helfenden Hand und einem aufmunternden Wort zur Seite stand.
Sehr bedanken möchte ich mich ebenso bei Prof. Dr. Reinhard Andreesen, dem ehemaligen Leiter der hämatologischen Abteilung, für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und für die Unterstützung während dieser Zeit.
Ein herzliches Dankeschön geht auch an Prof Dr. Florian Obermeier, für die Bereitschaft, spontan als Zweitkorrektor und Zweitprüfer meiner Arbeit zu fungieren.
Nicht zuletzt danke ich meiner ganzen Familie, insbesondere meiner Mutter für ihre „Deutsch-Korrektur“, meinem Freund und meinen Freunden von ganzem Herzen für ihre große Hilfsbereitschaft, ihre unerschöpfliche Geduld, ihre Flexibilität und ihre vielen offenen Ohren!

7.5 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name, Vorname:	Steger Lena Teresa
Anschrift:	[redacted]
Telefon:	
Handy:	
E-Mail:	
Geburtsdatum:	[redacted]
Geburtsort:	Regensburg
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Beruflicher Werdegang

01.03.2013-28.02.2014	Assistenzärztin im Departement Chirurgie (Leitung: Prof. Dr. med. Bruno Schmied) am Kantonsspital St. Gallen
Seit 01.03.2014	Assistenzärztin in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik (Leitung: Prof. Dr. med. Sandro Stöckli) am Kantonsspital St. Gallen

Berufsausbildung und Praktika

Hochschulausbildung

10.12.2012	Approbation
04.12.2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Abschluss: Staatsexamen, [redacted]
2008-2012	Klinische Ausbildung am Universitätsklinikum Regensburg
20.08.-04.09.2008	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“
2006-2008	Ausbildung im vorklinischen Studienabschnitt an der Universität Regensburg

Praktisches Jahr

18.06.-29.07.2012	Praktisches Jahr in der Uniklinik Regensburg, Departement internistisches Notfallzentrum und Innere Medizin (Leitung: Prof. Dr. Bernd Salzberger)
09.04.-17.06.2012	Praktisches Jahr in der Klinik Sundsvall, Schweden im Departement Innere Medizin unter der Leitung von Arvid Hamrin
19.12.2011-08.04.2012	Praktisches Jahr in der Kinderklinik St. Hedwig in Regensburg, Departement Pädiatrie (Leitung: Prof. Dr. Hugo Segerer)
29.08.-18.12.2011	Praktisches Jahr im Spital Grabs im Departement Chirurgie und Orthopädie unter Leitung von Dr. Beat Schmid

Famulaturen

März 2011	Famulatur in der Abteilung Anästhesie, Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg
August 2010	Famulatur in der Abteilung Handchirurgie, Akademiska Sjukhuset, Uppsala, Schweden

September 2009	Famulatur in der Abteilung Anästhesie, Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg
August 2009	Famulatur in der Abteilung pädiatrische Infektiologie, Kinderkrankenhaus Harlaching, München
Februar 2009	Famulatur in der Abteilung neonatologische ITS, Uniklinikum Bonn

Promotion

2010-2012	Experimentelle Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Edinger und Dr. Petra Hoffmann, Abteilung für Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Regenburg
Januar 2012	Publikation in „The Journal of Immunology“ mit dem Thema „Dominant Th2 Differentiation of Human Regulatory T Cells Upon Loss of FOXP3 Expression“

Zusätzliche berufliche Erfahrungen

Juli 2009-Dezember 2012	Regelmäßige Teilnahme am Notarztpraktikum der Uniklinik Regensburg
Juli 2013	ATLS-Kurs (AUC, Unterschleißheim)

Schulausbildung

1997-2006	Besuch des Goethe Gymnasiums Regensburg Abschluss: Abitur, [redacted]
1993-1997	Besuch der Grundschule Prüfening in Regensburg

Sankt Gallen, den _____ _____

(Lena Steger)