

Einfluss von Proteinkinase B (PKB/Akt) auf
Differenzierungsprozesse von T-Helferzellen und den
Verlauf der Experimentellen Autoimmunen
Enzephalomyelitis (EAE)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom Biologe Swen Engelmann
geb. am 07.11.1976 in Cottbus

Gutachter: PD Dr. Ursula Bommhardt
Prof. Dr. Thomas Herrmann

eingereicht am: 25.05.2011

verteidigt am: 25.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.1	T-Zellentwicklung.....	1
1.1.2	Natürliche Regulatorische T-Zellen (nTregs).....	4
1.1.2.1	nTreg-Homöostase.....	8
1.1.3	Induzierbare Tregs (iTregs).....	10
1.1.4	Th17-Zellen.....	10
1.1.5	Migration von T-Zellen.....	12
1.2	Proteinkinase B (PKB).....	12
1.2.1	Physiologische Funktionen der PKB.....	13
1.2.2	Der PKB-Signalweg.....	14
1.2.3	PKB und T-Zellmigration.....	17
1.2.4	PKB und Apoptose.....	18
1.2.5	PKB und Tregs.....	19
1.2.6	PKB transgene (tg) Mäuse.....	19
1.3	Multiple Sklerose (MS).....	21
1.3.1	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE).....	22
1.4	Zielstellung der Arbeit.....	24
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Antikörper.....	25
2.1.2	Puffer und Medien.....	27
2.1.3	Zytokine und Stimulanzen.....	32
2.1.4	Sonstige Chemikalien und Materialien.....	33
2.1.5	Geräte.....	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Transgene Mauslinien und deren Genotypisierung.....	34
2.2.2	Organentnahme.....	37
2.2.3	Zellisolation.....	37
2.2.3.1	Isolierung von CD4 ⁺ CD25 ⁻ (naiven) und CD4 ⁺ CD25 ⁺ (nTreg) T-Zellen.....	38
2.2.4	Proliferation von nTregs.....	38
2.2.5	Suppression durch nTregs.....	39
2.2.6	FACS-Analyse.....	39
2.2.7	Treg-Induktion.....	39
2.2.8	Th17-Induktion.....	40
2.2.9	<i>In vitro</i> Apoptose Test.....	40
2.2.10	<i>In vivo</i> Migration von wt und PKBtg nTregs.....	40
2.2.11	Proteinbiochemische Methoden.....	41
2.2.11.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	41
2.2.11.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	41
2.2.11.3	Western-Blot-Analyse.....	42
2.2.12	EAE-Induktion.....	42
2.2.13	Statistische Analyse der Daten.....	43

3	Ergebnisse.....	44
3.1	Einfluss von PKB auf die Entwicklung und Funktion von Tregs.....	44
3.1.1	Verteilung von nTregs in wt und PKBtg Mäusen.....	44
3.1.2	Verteilung von nTregs in CD28 ^{-/-} und PKBtg CD28 ^{-/-} Mäusen.....	45
3.1.3	Expression von Treg-Markern auf wt und PKBtg nTregs.....	46
3.1.3.1	Expression von GITR und CTLA-4 auf wt und PKBtg nTregs.....	46
3.1.3.2	Expression von CD62L und LFA-1 auf wt und PKBtg nTregs.....	47
3.1.3.3	Expression von CD103 auf wt und PKBtg nTregs.....	48
3.1.3.4	Expression von IL-7R und OX40 auf wt und PKBtg nTregs.....	49
3.1.3.5	Expression von CD45RB auf wt und PKBtg nTregs.....	50
3.1.3.6	Expression von GARP auf wt und PKBtg nTregs.....	51
3.1.4	Untersuchungen zur Suppressoraktivität von wt und PKBtg nTregs.....	52
3.1.5	Proliferation von nTregs.....	53
3.1.6	Überleben von nTregs <i>in vitro</i>	55
3.1.7	Nachweis transgener PKB-Signale in nTregs.....	56
3.2	Untersuchungen zur Induktion peripherer Tregs (iTregs).....	57
3.2.1	<i>In vitro</i> Induktion von wt und PKBtg CD4 ⁺ CD25 ⁺ iTregs.....	57
3.2.2	Untersuchungen zur Suppressoraktivität von wt und PKBtg iTregs.....	59
3.3	Untersuchungen zur Differenzierung von Th17-Zellen.....	60
3.3.1	<i>In vitro</i> Differenzierung von wt und PKBtg CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen zu Th17-Zellen.....	60
3.4	Einfluss transgener PKB auf den Verlauf der EAE.....	61
3.4.1	EAE-Induktion in wt und PKBtg Mäusen.....	61
3.4.2	EAE-Induktion in CD28 ^{-/-} und PKBtg CD28 ^{-/-} Mäusen.....	63
3.4.3	Treg- und Th17-Verteilung nach EAE-Induktion in wt und PKBtg Mäusen.....	64
3.4.4	GARP- und CD103-Expression auf wt und PKBtg Tregs nach EAE-Induktion.....	66
3.4.5	Untersuchungen zur Migration wt und PKBtg CD4 ⁺ T-Zellen <i>in vivo</i>	67
4	Diskussion.....	70
5	Zusammenfassung.....	80
6	Summary.....	81
7	Literatur.....	82
8	Abkürzungen.....	97
9	<i>Curriculum vitae</i>	100
10	Danksagung.....	103

1 Einleitung

1.1 *Das Immunsystem*

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor Infektionen zu schützen. Dazu gehören die Abwehr körperfremder Substanzen und die Eliminierung entarteter Körperzellen. Unspezifische mechanische Barrieren, wie Haut und Schleimhaut oder Magensäure, erschweren das Eindringen von Krankheitskeimen. Zu den zellulären Bestandteilen der unspezifischen Immunantwort gehören Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, welche durch Phagozytose und Produktion von Zytokinen im Zusammenwirken mit dem Komplementsystem eine erste Verteidigungslinie gegen viele Mikroorganismen bilden. Überwinden Krankheitserreger dennoch die unspezifischen Barrieren, greifen spezifische Mechanismen. Man unterscheidet dabei die zelluläre und humorale antigenspezifische Immunität: Die zelluläre Immunität wird durch T-Lymphozyten ausgeführt, die humorale Immunantwort hingegen durch Antikörper, die von B-Lymphozyten gebildet werden. Zur erfolgreichen Erfüllung seiner spezifischen Funktion muss das Immunsystem zwischen körperfremden und körpereigenen Substanzen unterscheiden können (1).

1.1.1 T-Zellentwicklung

Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl von Zellpopulationen, die sich aus gemeinsamen omnipotenten Stammzellen entwickeln. Diese reifen im Knochenmark und können unterschiedliche Differenzierungswege einschlagen. Über die Lymphopoese werden B- und T-Lymphozyten gebildet. Aus der myeloiden Entwicklungslinie entstehen Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Mastzellen, Monozyten und dendritische Zellen (DC). Einige lymphoide Vorläuferzellen wandern zur Differenzierung in den Thymus, wo sie zu T-Lymphozyten oder NK-Zellen reifen. Im Laufe des Reifungsprozesses durchlaufen Thymozyten verschiedene Entwicklungsstadien, die durch die Expression bestimmter Oberflächenmarker charakterisiert sind. Die wichtigsten Marker in diesem Zusammenhang sind die Oberflächenmoleküle CD4, CD8 und die Moleküle des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR). Die frühen T-Zellvorläufer exprimieren keines dieser Moleküle und werden aufgrund der fehlenden

Einleitung

CD4- bzw. CD8-Expression als doppelt-negativ (DN) bezeichnet. Aus diesen Vorläuferzellen können sich zwei unterschiedliche T-Zell-Linien entwickeln, α/β -TCR- (etwa 95% der T-Zellen) sowie γ/δ -TCR- (5% der T-Zellen) positive T-Zellen. Alle T-Zellen unterscheiden sich in der Spezifität des TCR. Die Gene für die β -, γ - und δ -Ketten des TCR werden in der Entwicklung der Thymozyten auf dem DN-Stadium umgeordnet. Das Rearrangement der α -Kette erfolgt erst im doppelt-positiven ($CD4^+CD8^+$, DP) Stadium. DN-Zellen exprimieren daher einen γ/δ -TCR oder einen sog. prä-TCR, welcher aus der prä-TCR- α -Kette (pT α) und der β -Kette besteht. In Abhängigkeit der Signale reifen entweder α/β - oder γ/δ -T-Zellen heran. Das DN-Stadium kann anhand der Expression des Adhäsionsmoleküls CD44 und von CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) weiter unterteilt werden. Zunächst exprimieren DN-Thymozyten CD44, aber kein CD25 (DN1). Im nächsten Stadium sind die Zellen $CD44^+CD25^+$ (DN2). Im Anschluss wird die Expression von CD44 verringert. In diesem $CD44^{\text{niedrig}}CD25^+$ Stadium (DN3) wird das Gen für die β -Kette umgelagert und der prä-TCR zusammen mit CD3-Molekülen exprimiert. Gelingt die Umlagerung der β -Kette nicht, verbleiben die Zellen in diesem Stadium und gehen durch apoptotische Vorgänge zugrunde. Prä-TCR-Signale führen dazu, dass sich DN3-Zellen vermehren, die Umlagerung weiterer β -Ketten gestoppt wird und die Korezeptoren CD4 und CD8 exprimiert werden (sog. β -Selektion). Nach erfolgreicher Umlagerung der α -Kette des TCR im DP-Stadium sind die Thymozyten „reif“ für die Selektionsprozesse. Für diese Prozesse interagieren DP-Thymozyten mit residenten antigenpräsentierenden Zellen (APC) im Thymus. Bei der positiven Selektion entscheidet sich, ob DP-Zellen zu $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen weiterreifen. Hierbei ist bestimmend, mit welcher Affinität die TCRs der DP-Zellen an die MHC/Selbstpeptid-Komplexe binden und wie dicht die MHC/Selbstpeptid-Komplexe auf den Thymusepithelzellen exprimiert werden. Wichtig für die positive Selektion sind die kortikalen Thymusepithelzellen. Sie bilden ein dichtes Geflecht von Ausläufern, in welchem DP-Zellen in Kontakt mit den MHC/Selbstpeptid-Molekülen auf den Epithelzellen treten. Nach der Aviditätshypothese führt ein Signal „mittlerer“ Stärke zur positiven Selektion der Zellen, welche sodann zu einfach-positiven (SP) T-Zellen differenzieren. DP-Thymozyten, welche Selbstpeptide auf MHC-Molekülen der Klasse II erkennen, reifen in der Regel zu $CD4$ SP T-Zellen. Bei Erkennung von Selbstpeptiden auf MHC-I-Molekülen reifen DP-Zellen zu $CD8$ SP T-Zellen. Die Expression des jeweils anderen Korezeptors wird nach der MHC-Erkennung abgeschaltet ($CD4/CD8$ -Linienentscheidung).

Einleitung

Die negative Selektion im Thymus erfolgt unter Beteiligung von DCs und Makrophagen, sowie medullären Epithelzellen. Ein „starkes“ TCR-Signal löst dabei den programmierten Zelltod (Apoptose) aus und führt zur negativen Selektion. In DP-Zellen, welche Selbst-Peptide auf MHC-Molekülen nicht erkennen oder diese nur mit „schwacher“ Affinität binden, wird ebenfalls Apoptose ausgelöst. Dieser Vorgang wird als Tod durch Vernachlässigung (*death by neglect*) bezeichnet. Dies bedeutet, dass ein- und derselbe TCR durch MHC/Selbstpeptid-Komplexbindung positive oder negative Selektion bewirken kann. Erst wenn DP-Thymozyten das 2-fache *screening* der positiven und negativen Selektion durchlaufen haben, reifen sie zu SP T-Zellen heran, CD4⁺ T-Helferzellen (Th) oder CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL), die nach und nach in die Peripherie entlassen werden. Abb. 1 zeigt eine vereinfachte Übersicht der verschiedenen Entwicklungsstadien von murinen Thymozyten.

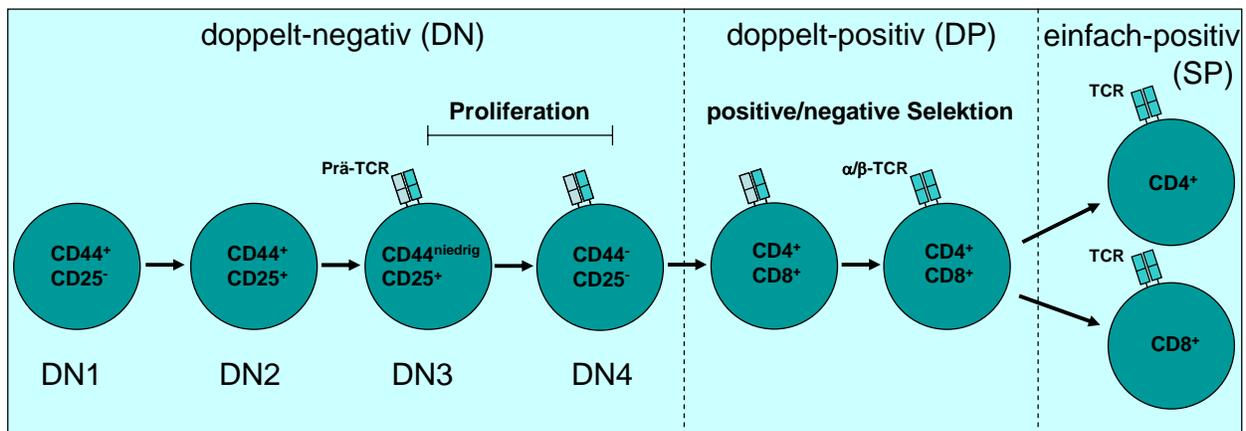


Abb. 1: **Reifung von murinen T-Zellen.** Die T-Zellreifung erfolgt im Thymus und läuft in mehreren Entwicklungsstufen ab. Unreife Vorläufer-T-Zellen durchlaufen ein doppel-negatives (DN) und doppel-positives (DP) Stadium mit entsprechendem Rezeptorprofil, bis sie nach erfolgreicher positiver Selektion als einfach-positiv (SP) CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen in die Peripherie freigesetzt werden.

Makrophagen, welche aus Monozyten differenzieren, und DCs spielen neben der Negativselektion im Thymus auch eine wichtige Rolle bei der antigenspezifischen Stimulation peripherer CD4⁺ Th-Zellen. CD4⁺ T-Zellen reagieren auf Antigene, die von extrazellulären Quellen stammen und auf MHCII-Molekülen auf APCs präsentiert werden (2). Abhängig vom Stimulus und dem Zytokinmilieu differenzieren naive CD4⁺ T-Zellen nach Antigenerkennung in verschiedene Subklassen. Inflammatorische Th1-Zellen bilden entzündungsfördernde Zytokine, wie IFN γ oder TNF- β . Th2-Zellen bilden eine Reihe von Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10

Einleitung

und IL-13. In den letzten Jahren gewannen weitere Subpopulationen von CD4⁺ T-Zellen besondere Bedeutung, Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen (Tregs). Th17-Zellen bilden inflammatorische Zytokine, wie IL-17, TNF α/β , IL-6, IL-21 und IL-23 und sind bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen involviert. Tregs dagegen haben immunregulatorische Funktionen (siehe Kapitel 1.1.2 und 1.1.4).

CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigene, welche intrazellulär synthetisiert werden, z.B. virale Peptide, und durch MHC I-Komplexe an der Oberfläche präsentiert werden. CD8⁺ T-Zellen differenzieren nach Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen (CTL) (3), die virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen eliminieren. Die Freisetzung verschiedener zytotoxischer Effektormoleküle, wie Perforine und Granzyme, bewirken das Abtöten der Zielzellen durch Zerstörung der Zellmembran und Induktion des Zelltodes. Zusätzlich spielen die durch CTL freigesetzten Zytokine IFN γ und TNF α/β eine Rolle. Sie aktivieren antigenpräsentierende Makrophagen, und IFN γ kann direkt die virale Replikation hemmen (4, 5).

1.1.2 Natürliche Regulatorische T-Zellen (nTregs)

Natürlich vorkommende Tregs (nTregs) sind CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, die im Thymus gebildet werden und etwa 5-10% der CD4⁺ T-Zellpopulation bilden. Die Entwicklung zu nTregs wird im Maussystem durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 determiniert, wobei die Treg-Linienentscheidung erst relativ spät im Verlauf der Thymozytenreifung während der Differenzierung der DP-Zellen zu SP-Zellen erfolgt. Analysen an Foxp3^{GFP} tg Mäusen ergaben, dass Foxp3 in α/β -TCR T-Zellen, jedoch nicht in γ/δ -TCR T-Zellen exprimiert wird (6). Immunhistochemische Untersuchungen an Mäusen, denen das RAG (Rekombination aktivierendes Gen)-Protein fehlt, das zur erfolgreichen Genumlagerung der TCR- und BCR-Ketten nötig ist, zeigten außerdem, dass in nicht-hämatopoetischen Geweben kein Foxp3 exprimiert wird (6, 7). Die Mehrzahl der Foxp3⁺ Zellen ist CD4⁺, aber eine kleine Population Foxp3-exprimierender Zellen ist CD8⁺ bzw. DP. Die Foxp3-Induktion in Thymozyten erfordert ein starkes TCR-Signal, CD28-Signale und die Expression eines hochaffinen IL-2R (CD25) sowie Signale weiterer Zytokinrezeptoren, wie dem IL-7R oder IL-15R (8-13).

Einleitung

Die essentielle Bedeutung von Foxp3 für die Entwicklung und Funktion von Tregs wurde durch intensive Studien an Foxp3-defizienten Mäusen (*scurfy mice*) belegt (14, 15). Tregs haben anti-inflammatorische Funktionen, indem sie die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen hemmen. Ihre Eliminierung bei Foxp3-Defizienz führt daher zur Induktion schwerer Autoimmunerkrankungen, inklusive Gastritis oder Thyreoiditis (16-19).

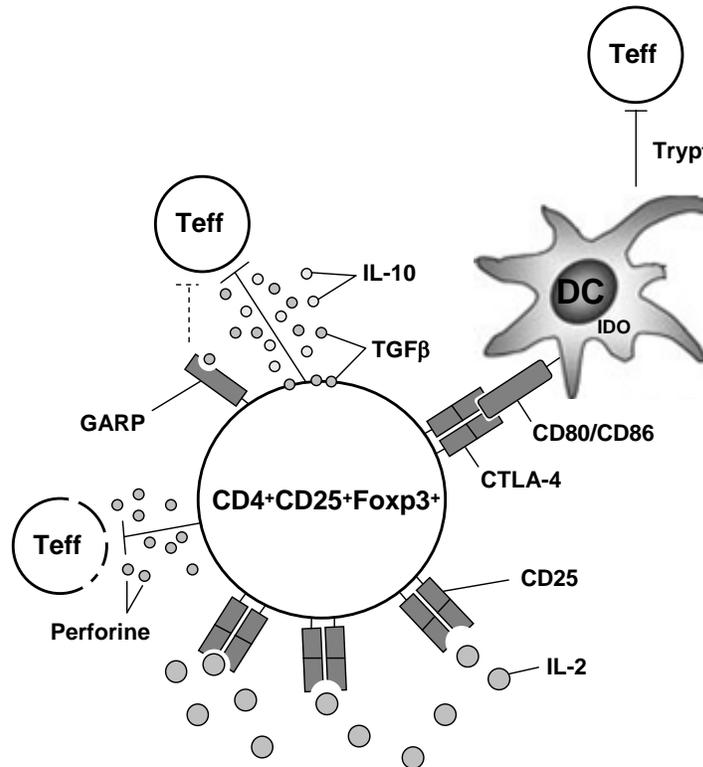


Abb. 2: **Suppressormechanismen von Tregs.** Tregs supprimieren die Aktivierung von T-Effektorzellen (Teff) durch Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine (TGF β , IL-10) oder Anregung der IDO-Produktion durch DCs über Interaktion von CTLA-4 auf Tregs mit CD80/CD86 auf DCs. Durch konstitutive CD25-Expression wird freies IL-2 schnell gebunden und fehlt somit Teff zur Expansion. Durch Perforine können Effektorzellen direkt eliminiert werden. Zusätzlich wird eine mögliche Suppressorfunktion von GARP durch Bindung von TGF β über einen noch ungeklärten Mechanismus angenommen.

Tregs erfüllen ihre Suppressorfunktion über verschiedene Mechanismen. Eine Zell-Zell-Kontakt-abhängige Suppression wurde in Kokulturen von Tregs mit Effektorzellen aufgezeigt, welche durch eine semipermeable Membran getrennt wurden (20, 21). Bei Zell-Zell-Kontakt können Tregs Effektorzellen durch granzym- und perforinabhängige Mechanismen direkt eliminieren (22-24). Weiterhin wird durch Zellkontakt mit Tregs die Funktion der APCs beeinflusst. Über das auf Tregs exprimierte Oberflächenmolekül CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated*

Einleitung

protein 4) werden DCs angeregt, das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zu bilden. Dieses katalysiert den Umbau von Tryptophan zu Kynurenin, einer für T-Effektorzellen toxischen Verbindung, und der Mangel an freiem Tryptophan verhindert eine optimale Aktivierung der T-Zellen (25, 26). Zusätzlich können Tregs antigenabhängig Aggregate mit DCs bilden, wodurch der physikalische Kontakt zwischen Effektorzellen und DCs verhindert wird. Der Treg-DC-Kontakt wird durch *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) vermittelt, ist jedoch unabhängig von CTLA-4. CTLA-4 reguliert allerdings die CD80/86-Expression auf DCs, wie an Studien mit CTLA-4^{-/-} Mäusen gezeigt wurde. Über CTLA-4 inhibieren Tregs die Expression von CD80 und CD86 auf unreifen und induzieren die Herunterregulation dieser Liganden auf reifen DCs, wodurch eine optimale Aktivierung von Effektorzellen verhindert wird. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem Zwei-Stufen-Prozess, der LFA-1-abhängigen CTLA-4-unabhängigen Aggregation von Tregs und DCs, sowie der LFA-1-unabhängigen und CTLA-4-abhängigen CD80/86-Modulation auf DCs durch Tregs. Durch beide Schritte wird eine stabile Interaktion zwischen DCs und T-Zellen und damit deren optimale Aktivierung verhindert (27, 28). In aktuellen Publikationen wurde ein neues transmembranes Protein namens GARP (*glycoprotein A repetitions predominant*) beschrieben, welches durch leucinreiche extrazelluläre Regionen charakterisiert ist. Über solche Motive können Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht werden (29). Es wurde gezeigt, dass GARP vorrangig auf aktivierten nTregs exprimiert wird und GARP-exprimierende Zellen starke supprimierende Eigenschaften aufweisen. Struktur-Funktionsanalysen von GARP ergaben, dass die extrazelluläre Domäne, jedoch nicht die zytoplasmatische Region für die Funktion von GARP von Bedeutung ist. Dies deutet darauf hin, dass GARP mit anderen Rezeptoren oder Liganden im Rahmen der Suppressorfunktion interagiert. Der genaue Mechanismus, durch den GARP Suppressorfunktion vermittelt, ist jedoch ungeklärt (30-32).

Auch verschiedene Zytokine spielen bei der Treg-vermittelten Suppressoraktivität eine wesentliche Rolle. TCR/CD28-Signale sind für die Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen erforderlich, wobei CD28-Kostimulation über den Phosphatidylinositol-3-kinase/Proteinkinase B (PI3K/PKB)-Signalweg Signale liefert, die zur optimalen Produktion von IL-2 beitragen. IL-2- und IL-2R-defiziente Mäuse weisen, ebenso wie CD28-defiziente (CD28^{-/-}) Mäuse, eine sehr geringe Zahl an nTregs in der Peripherie auf. Ein Merkmal von Tregs ist, dass sie, anders als naive T-Zellen, gegenüber TCR/CD28-Stimulation „anerg“ sind, d.h. sie proliferieren nicht und bilden kein eigenes IL-2. IL-2 ist jedoch zur optimalen Aktivierung von Tregs erforderlich. Tregs

Einleitung

weisen eine konstitutiv hohe CD25-Expression auf, wodurch exogenes IL-2 schnell gebunden werden kann. Dies führt zum raschen Verbrauch von IL-2 durch Tregs, was wiederum eine optimale Aktivierung naiver T-Zellen verhindert. IL-2 ist somit nicht nur ein wichtiger Faktor für die Entwicklung und das Überleben von Tregs, sondern indirekt auch in die Treg-Funktion involviert (11, 33). Die Transkription von IL-2 in T-Zellen wird durch NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), AP-1 (*activator protein 1*) und NFκB (*nuclear factor κB*) reguliert, welche über spezifische DNA-Motive am IL-2-Promotor binden. Auch für den Transkriptionsfaktor Foxp3 existieren potentielle Bindungsstellen am IL-2-Promotor, welche der Bindungssequenz von AP-1 ähneln. Foxp3 hemmt die IL-2-Transkription wahrscheinlich durch Interaktion mit dem NFAT-AP-1-Komplex, wobei AP-1 verdrängt und ein NFAT-Foxp3-Komplex gebildet wird. Foxp3⁺ Tregs produzieren daher kein eigenes IL-2 und sind zur Expansion und zur Homöostase von exogenem IL-2 abhängig (34).

Die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und *Transforming growth factor beta* (TGFβ₁) spielen in der Immunpathologie etlicher Krankheiten eine essentielle Rolle. Beispielsweise sind IL-10-defiziente Mäuse besonders anfällig für intestinale Entzündungen. Studien mit monoklonalen Antikörpern (Ak) gegen IL-10 und TGFβ₁ zeigten, dass Tregs der so behandelten Mäuse nicht in der Lage sind, die Entzündung zu kontrollieren (35, 36). IL-10 hemmt zudem die Makrophagenfunktion, womit einer überschießenden Entzündungsreaktion entgegengewirkt wird, und fördert die Th2- gegenüber einer Th1-Immunantwort. Darüber hinaus begünstigen IL-10 und IL-13 die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen.

Die Bedeutung von TGFβ₁ als immunsuppressives Zytokin zeigt sich besonders an TGFβ-defizienten Mäusen. Diese entwickeln Autoimmunerkrankungen ähnlich zum Phänotyp Foxp3-defizienter Mäuse (37). Neben Zell-Zell-Kontakt-abhängiger Suppression über LFA-1 und CTLA-4 ist TGFβ₁-Sekretion ein weiterer Mechanismus, durch den Tregs ihre Suppressorfunktion ausüben können. Abhängig von der Stärke und Art des TCR-Signals sind Tregs in der Lage, TGFβ₁ zu sekretieren oder membrangebundenes TGFβ₁ zu exprimieren. Stimulation mit kreuzvernetztem CD3-Ak generiert sowohl sekretiertes als auch membrangebundenes TGFβ₁. Im Gegensatz dazu wird bei antigenspezifischer Stimulation durch APCs TGFβ₁ nur in sehr geringer Menge sekretiert und hauptsächlich membrangebundenes TGFβ₁ gebildet (36, 38). *Transwell*-Studien zeigten, dass *in vitro* der Zell-Zell-Kontakt für die

Einleitung

Treg-Suppressoraktivität erforderlich ist, und mit Ak gegen TGF β ₁ konnte die Suppression durch Tregs aufgehoben werden. Daraus wurde gefolgert, dass die Suppression durch membrangebundenes TGF β ₁ vermittelt wird. Untersuchungen zur Expression von membrangebundenem TGF β ₁ auf unstimulierten und aktivierten Tregs versus konventioneller T-Zellen ergaben, dass nach Stimulation membrangebundenes TGF β ₁ auf der Oberfläche von Tregs, jedoch nicht auf CD4⁺CD25⁻ Zellen angereichert wird. Dies bestätigte die Hypothese, dass die Suppressoraktivität von Tregs durch membrangebundenes TGF β ₁ in Zell-Zell-Kontakt abhängiger Weise vermittelt wird (36, 38).

1.1.2.1 nTreg-Homöostase

Tregs sind nicht in der Lage, eigenes IL-2 zu produzieren und daher zur Proliferation auf exogenes IL-2 angewiesen. Zur Aufrechterhaltung der Homöostase, aber auch als Teil ihrer Suppressoraktivität, verfügen Tregs über eine konstitutiv hohe CD25-Expression. Umgekehrt wirken Apoptose-auslösende Rezeptoren der Treg-Proliferation als Kontrollmechanismus entgegen. Dazu gehören Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie, welche das Überleben, aber auch die Funktion von Tregs regulieren, wie OX40 (CD134), *glucocorticoid-induced TNF receptor family related protein* (GITR), TNF-Rezeptor 2 und der Fas-Rezeptor (39-41).

Die zentrale Rolle von IL-2 für die Homöostase von T-Zellen wurde in den letzten Jahren belegt. IL-2- und CD25-defiziente Mäuse zeigen massive lymphoproliferative Syndrome, begleitet von schweren Autoimmunerkrankungen. IL-2 sowie der IL-2R sind daher für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz essentiell, da sie bei der Entwicklung und dem Überleben von Tregs eine bedeutende Rolle spielen (42-44). IL-2 aktiviert über den Transkriptionsfaktor STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) Gene, die für das Überleben wichtig sind. Allerdings kann STAT5 nicht nur über IL-2-Signale aktiviert werden, was IL-2 als alleinigen Überlebensfaktor für Tregs ausschließt. Man geht daher davon aus, dass neben IL-2 andere Zytokine bei der Entwicklung und Homöostase von Tregs beteiligt sind (45).

IL-7 und IL-15 aktivieren ebenfalls STAT5 und sind daher von besonderer Bedeutung. Der IL-7R (CD127) vermittelt Signale, die das Überleben von T-Zellen durch verstärkte Expression verschiedener anti-apoptotischer Moleküle, wie Bcl-2 und dem Glukosetransporter, unterstützen.

Einleitung

Foxp3⁺ Tregs weisen eine schwache Expression des IL-7R auf, welcher hinreichende Signale liefert, das Überleben von nTregs zu fördern (46-48).

Im Gegensatz zu naiven T-Zellen exprimieren Tregs OX40 (CD134). Nach Aktivierung weisen beide Zellpopulationen eine vergleichbar starke OX40-Expression auf. Bindung des OX40-Liganden fördert die Zytokinproduktion, Proliferation und das Überleben von T-Zellen. Bezüglich des Überlebens führen OX40-Signale zur Aktivierung anti-apoptotischer Moleküle, wie Bcl-xL und Bcl-2. Für Tregs wurde *in vitro* gezeigt, dass besonders in Anwesenheit von IL-2 OX40-Signale das Überleben und die Proliferation begünstigen (49, 50).

Ein weiterer Vertreter der TNF-Rezeptor-Familie ist der Treg-Marker GITR. Naive T-Zellen weisen eine schwache GITR-Expression auf. Nach T-Zellaktivierung wird die GITR-Expression auf naiven T-Zellen hochreguliert (39, 40). Im Gegensatz dazu zeigen Tregs eine konstitutiv hohe GITR-Expression. GITR weist eine hohe Sequenzhomologie mit OX40 auf und führt zur Aktivierung von NF- κ B und damit zur Förderung von Proliferation und Überleben von T-Zellen (51). GITR-Signale haben, ähnlich zu CD28-Signalen, eine kostimulatorische Funktion, da sie die Proliferation, Expression von Aktivierungsmarkern und Zytokinproduktion fördern. Jedoch ist der kostimulatorische Effekt schwächer als der von CD28, was darauf hinweist, dass andere intrazelluläre Signalwege aktiviert werden könnten (52). Abhängig von den Stimulationsbedingungen können über GITR aber auch apoptoseinduzierende Signale vermittelt werden. Bei suboptimaler TCR-Stimulation, aber starken GITR-Signalen tritt die kostimulatorische Funktion zu Tage, während bei starker TCR-Aktivierung GITR-Stimulation zur Induktion von Apoptose führt (53, 54). GITR-Kostimulation von Tregs *in vitro* führt dazu, dass sie ihre Suppressoraktivität verlieren. Jedoch wurde dies in Kokulturen von Tregs mit Effektorzellen gezeigt, so dass nicht unterschieden werden konnte, ob der GITR-Effekt die Tregs oder die Effektorzellen betraf. Kokulturen GITR-defizienter Effektorzellen mit wt Tregs zeigten sodann, dass die Treg-Aktivität durch GITR-Signale gehemmt wird. Tregs verlieren durch GITR-Kostimulation, ähnlich wie nach Kostimulation über CD28 in Anwesenheit von IL-2, ihren anergen Status und werden zur Proliferation angeregt. GITR fungiert daher als ein „Negativregulator“ von Tregs (40, 55).

1.1.3 Induzierbare Tregs (iTregs)

Die Generation von Tregs ist nicht auf den Thymus beschränkt. In der Peripherie bewirken TCR/CD28-Signale in Kombination mit $TGF\beta_1$ die Differenzierung $CD4^+CD25^-$ naiver T-Zellen zu Foxp3-exprimierenden $CD4^+CD25^+$ induzierten Tregs (iTregs). iTregs weisen gleiche phänotypische und funktionelle Eigenschaften wie im Thymus gereifte nTregs auf, d.h. sie zeigen Suppressoraktivität, verhalten sich anerg und produzieren kein eigenes IL-2. Durch adoptiven Transfer *in vitro* generierter iTregs wurde nachgewiesen, dass iTregs im Mausmodell effektiv die Pathogenese verschiedener inflammatorischer Krankheiten unterdrücken können. B-T-Zellkontakte führen *in vitro* und *in vivo* ebenfalls zur Induktion regulatorischer Eigenschaften in T-Zellen. Die Ausbildung des Treg-Phänotyps ist hierbei jedoch unabhängig von Foxp3 (56, 57). In früheren Studien wurde gezeigt, dass IL-10 für die Treg-Entwicklung wichtig ist. IL-10-produzierende B-Zellen sind für die Kontrolle der Immunantwort von großer Bedeutung, da sie als wirksame Negativregulatoren entzündlicher oder autoimmuner Erkrankungen identifiziert wurden und daher als regulatorische B-Zellen (Bregs) oder B10-Zellen bezeichnet werden (56, 58-62).

1.1.4 Th17-Zellen

Th17-Zellen wurden als eine unabhängige Th-Subpopulation mit charakteristischen Differenzierungs- und Transkriptionsfaktoren identifiziert. Sie produzieren verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie IL-17A, $TNF\alpha/\beta$, IL-6, IL-21 und IL-22. Der erhebliche Einfluß dieser Zytokine bei der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose, Psoriasis oder Morbus Crohn, wurde in unterschiedlichen Studien belegt (63, 64). In Anwesenheit von IL-6 wird die durch TCR/CD28-plus $TGF\beta_1$ -Signale induzierte Foxp3-Expression gehemmt und reziprok die Entwicklung inflammatorischer Th17-Zellen induziert (65-69). IL-6-Signale fördern dabei auch die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 auf Th17-Zellen, über den das Einwandern der entzündungsfördernden Th17-Zellen in den Entzündungsherd vermittelt wird (70-72). Die Expression von CCR6 und IL-17 wird über die Transkriptionsfaktoren $ROR\gamma t$ (*retinoic acid receptor-related orphan receptor γt*) und $ROR\alpha$ reguliert. Die Aktivität von $ROR\gamma t$ wird durch

Einleitung

Foxp3 beeinflusst, wobei Bindung von Foxp3 an ROR γ t zur verringerten Bindung von ROR γ t an den IL-17-Promotor führt (70, 73, 74). Foxp3 interagiert und inhibiert außerdem den Transkriptionsfaktor Runx1, der die ROR γ t-Expression veranlasst. In Anwesenheit von TGF β ₁ und IL-6 oder IL-21 wird die Foxp3-Expression inhibiert, so dass Runx1 die ROR γ t-Expression und die darauffolgende IL-17-Expression bewirkt.

Der IL-6R besteht aus einer IL-6 bindenden (CD126) und einer signalübertragenden Untereinheit (gp130). Über gp130 werden der SHP-2/ERK- und der STAT3-Signalweg aktiviert. Verringerte Aktivierung des SHP-2/ERK-Signalweges, aber verstärkte Aktivierung von STAT3 nach gp130-Aktivierung führen interessanterweise zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, bei denen Th17-Zellen eine maßgebliche Rolle spielen (75, 76). Signale über STAT3, welche neben IL-6 auch durch IL-21 und IL-23 vermittelt werden, induzieren die Differenzierung von Th17-Zellen, so dass bei STAT3-Defizienz die Differenzierung von Th17-Zellen gestört ist. Somit regulieren STAT5 und STAT3 die Differenzierung naiver T-Zellen in Tregs und Th17-Zellen in reziproker Weise (77-79).

Darüber hinaus spielt der Transkriptionsfaktor IRF-4 (*interferon regulatory factor 4*), der mit ROR γ t interagiert bei der Th17-Differenzierung eine Rolle. In IRF-4^{-/-} T-Zellen findet in Anwesenheit von TGF β ₁ und IL-6 keine Polarisierung zu Th17-Zellen statt, und IRF-4^{-/-} Mäuse erkranken nicht an der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Mausmodell für Multiple Sklerose (80).

Die IL-21-Expression wird durch IL-6 gefördert und ist von STAT3, jedoch nicht von ROR γ t abhängig. Unter Einfluss von TGF β ₁ ist IL-21, wie IL-6, in der Lage, ROR γ t-Expression und Th17-Differenzierung zu induzieren. Es wird vermutet, dass in einer „gesunden“ Situation, wo nur wenig IL-6 vorliegt, IL-21 einen gewissen „Pegel“ an Th-17-Vorläuferzellen aufrecht erhält. IL-21 induziert zudem die Expression von IL-23, das die Entwicklung und Expansion von Th17-Zellen stabilisiert. IL-23 fördert die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, u.a. IL-17, und supprimiert die Expression anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-10. Die genaue Funktion von IL-23 ist noch nicht vollständig aufgeklärt (81).

1.1.5 Migration von T-Zellen

Um ihre Suppressorfunktion ausüben zu können, müssen Tregs in physischen Kontakt mit ihren Zielzellen treten, was das Wandern von Tregs erfordert. T-Zellen exprimieren CD62L, $\alpha 4\beta 7$ -Integrin (CD103) und LFA-1, die an verschiedenen Migrationsprozessen, wie dem *rolling*, *tethering* und der Adhäsion sowie dem Durchdringen der Zellmembran (Diapedese) beteiligt sind. Beim *rolling* und *tethering* wird durch Selektine, zu denen auch CD62L gehört, die Bewegung der T-Zellen im Blutstrom verlangsamt. CD62L vermittelt eine schwache Interaktion mit E- und P-Selektinen auf dem Blutgefäßendothel. Im Anschluss wird durch Integrine (CD103, LFA-1, VLA-4) eine feste Bindung mit dem Gefäßendothel hergestellt. Das Durchdringen des Endothelverbandes ist der nächste Schritt im Prozess der Migration von Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe oder Entzündungsherde. Die Wanderung durch die Endothelschicht wird durch die feste Bindung der Integrine VLA-4 (*very late antigen 4*) und LFA-1 an VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) bzw. ICAM1 (*intercellular adhesion molecule 1*) ermöglicht. Chemokine sind wichtige Integrin-aktivierende Mediatoren und spielen daher eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Migrationsprozesse an der Endothelwand (82, 83). Durch Chemokine wird auch die anschließende Migration der Lymphozyten durch das Gewebe zum genauen Bestimmungsort reguliert. Neben dem Eintritt werden auch der Verbleib sowie der Austritt der T-Zellen aus dem Gewebe durch verschiedene Adhäsionsmoleküle reguliert. CD103 ist ein $\alpha E\beta 7$ Integrin, das mit E-Cadherin auf Epithelzellen interagiert und spielt eine wichtige Rolle für den Verbleib eingewanderter Zellen im entzündeten Gewebe. Tregs exprimieren neben LFA-1 und CD62L auch CD103 und werden durch Letzteres im Entzündungsherd festgehalten, wo sie ihre Suppressorfunktion erfüllen können (84-87).

1.2 Proteinkinase B (PKB)

Proteinkinase B (PKB/Akt) wurde als virales Onkogen des Retrovirus AKT8 aus T-Zell-Lymphomzellen identifiziert (88). In Säugerzellen sind drei Gene für PKB isoliert (PKB α , PKB β , PKB γ /Akt1, Akt2, Akt3). Jeder „Isotyp“ der PKB-Familie besitzt eine N-terminale Pleckstrin-Homolog (PH)-Domäne, eine zentrale katalytische Domäne und eine C-terminale regulatorische Domäne (Abb. 3) (89). Die katalytische Kinase-Domäne der PKB ist

Einleitung

charakteristisch für eine Reihe von Ser/Thr-Kinasen, die starke Sequenzhomologien in dieser Domäne aufweisen, den sog. AGC-Kinasen. Der Begriff bezeichnet eine Familie von Proteinkinasen, die mit *cAMP-dependent protein kinase* (PKA), *cGMP-dependent protein kinase* (PKG) und *protein kinase C* (PKC) verwandt sind. Daher auch der Name Proteinkinase B. AGC-Kinasen vermitteln viele wichtige zelluläre Funktionen, wie Proteinsynthese, Wachstum, Proliferation und Überleben.

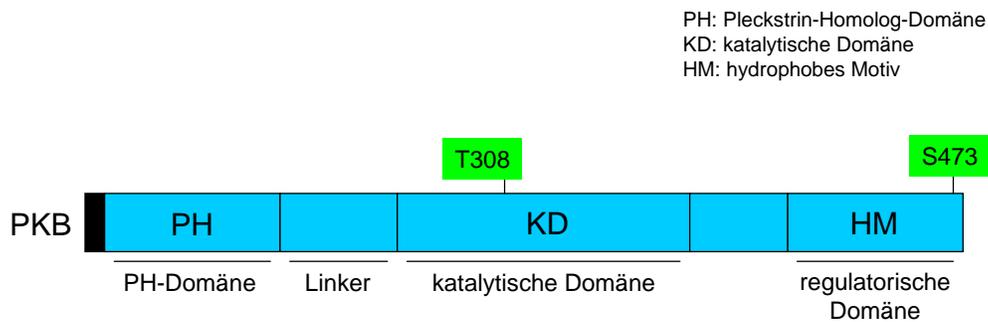


Abb. 3: **PKB-Struktur.** PKB besteht aus der N-terminalen PH-Domäne, der katalytischen Domäne und einer C-terminalen regulatorischen Domäne. Multiple Phosphorylierungsstellen regulieren die PKB-Aktivität. Zur vollen Aktivierung von PKB ist die Phosphorylierung an Thr308 sowie Ser473 erforderlich (90).

1.2.1 Physiologische Funktionen der PKB

Die physiologischen Aufgaben der PKB sind, abhängig von den beeinflussten Zielproteinen, sehr vielfältig. Aktive PKB reguliert das Überleben, die Differenzierung, Proliferation und den Metabolismus von Zellen. Fehlregulation der PKB-Aktivität steht daher in Verbindung mit der Entwicklung verschiedener Krankheiten, wie neurodegenerativen Erkrankungen, Diabetes mellitus oder der Tumorbildung. Abb. 4 zeigt einige der wichtigsten Zielproteine von PKB und deren physiologische Bedeutung (91).

PKB-Effektoren bezüglich des Zellmetabolismus sind GSK3 β (Glykogensynthase-Kinase3 β) und mTOR. Inaktivierende Phosphorylierung von GSK3 β und die indirekte Aktivierung von mTOR durch PKB fördern die Proliferation und Glykogen- und Proteinsynthese. Darüber hinaus ist GSK3 β ein wichtiger Regulator des Gleichgewichts zwischen inflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokinproduktion in der Peripherie und dem ZNS. PKB kann über Inhibierung von GSK3 β daher Entzündungsvorgänge beeinflussen. Der Einsatz von GSK3 β -

Einleitung

Inhibitoren in Tiermodellen für Sepsis, MS, Arthritis oder Kolitis zeigte bereits deren therapeutisches Potenzial (92-95).

Darüber hinaus wurde eine regulatorische Funktion von PKB auf die Aktivität der Raf (*rapidly growing fibrosarcoma*)-Kinase beschrieben. PKB kann Raf inhibieren, wodurch der Raf/MAPK-Signalweg abgeschaltet wird, welcher ebenfalls bei der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert ist (96-98). Allerdings wurde dies an transfizierten Myoblastomzellen gezeigt (99). Ob dieser Mechanismus auch in T-Zellen eine Rolle spielt ist nicht bekannt.

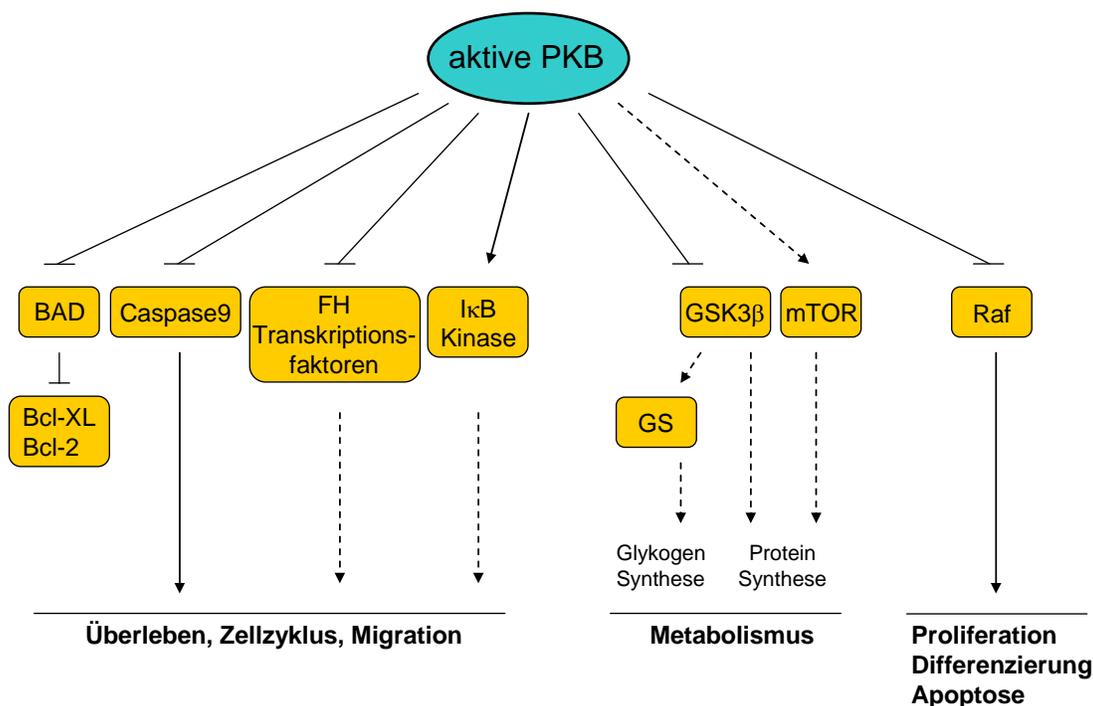


Abb. 4: **Zielproteine der PKB**. Durchgezogene Linien kennzeichnen eine direkte Phosphorylierung durch PKB, gestrichelte Linien einen indirekten Einfluss von PKB auf die Phosphorylierung des jeweiligen Proteins. Pfeile zeigen, dass das Protein durch PKB aktiviert wird, horizontale Linien stellen einen inhibitorischen Effekt dar (91).

1.2.2 Der PKB-Signalweg

PKB gehört zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und kann durch eine Vielzahl von Liganden aktiviert werden. Dazu gehören TCR- und BCR-Ligation, CD28-Kostimulation, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Bei der Aktivierung von PKB spielt die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) eine entscheidende Rolle, die durch Phosphorylierung des in der Zellmembran

Einleitung

integrierten Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) das als *second messenger* agierende Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) generiert (Abb. 5). PIP₃ rekrutiert Signalmoleküle an die Plasmamembran, welche über ihre PH-Domäne PIP₃ binden können (100). PKB besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, und Phosphorylierung der Serin- und Threoninreste reguliert die PKB-Aktivität. Für die volle Aktivierung von PKB ist die Phosphorylierung an Thr308 in der katalytischen Domäne sowie an Ser473 in der regulatorischen Domäne erforderlich (101, 102). Die Thr308-Phosphorylierung erfolgt durch die 3-phosphoinositol-abhängige Kinase PDK1, die ebenfalls über eine PH-Domäne verfügt, so dass PKB und PDK1 durch Bindung an PIP₃ in unmittelbarer Nähe lokalisiert sind (103). Die Mechanismen, welche zur Phosphorylierung an Ser473 und damit zur vollständigen Aktivierung von PKB führen, sind nicht vollständig geklärt.

PDK1^{-/-} Zellen zeigten eine zu wt Zellen vergleichbare Phosphorylierung an Ser473 (104). Im Gegensatz dazu konnte in Zellen mit erhöhter PDK1-Aktivität eine verstärkte Phosphorylierung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass PDK1 indirekten Einfluss auf die PKB-Phosphorylierung an Ser473 hat. Andere Studien wiesen darauf hin, dass PKB Ser473 autophosphoryliert. Eine weitere Kinase, PDK2, wurde ebenfalls mit der Phosphorylierung an Ser473 in Verbindung gebracht. Auch die mit Integrinen gekoppelte Kinase (ILK) kann Ser473 phosphorylieren. Jedoch ist bisher nicht geklärt, ob ILK Ser473 direkt phosphoryliert oder die Phosphorylierung durch andere Enzyme unterstützt (105, 106).

Nach neueren Befunden erfolgt die Phosphorylierung an Ser473 durch mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) (107, 108) (Abb. 5). Es gibt zwei mTOR-Komplexe, mTORC1 (mTOR-Komplex 1) besteht aus mTOR, mLST8 (*mammalian lethal with sec13 protein 8*), dem Inhibitor Deptor und dem Rapamycin-sensitiven Gerüstprotein Raptor. mTORC2 dagegen ist nicht sensitiv auf Rapamycin und wird aus den Proteinen Rictor, SIN1 (*stress-activated-protein-kinase-interacting protein 1*), mLST8 und mTOR gebildet und kann ebenfalls durch Deptor inhibiert werden. Das gemeinsame mLST8 reguliert durch Stabilisierung der Kinase-Domäne die mTOR-Aktivität und übt ebenso wie SIN1 eine Funktion bei der Aktin-Organisation aus. mTORC1 wird durch die aktivierte GTPase Rheb (in der aktiven GTP-gebundenen Form) aktiviert. Rheb-eigene GTPase-Aktivität führt wiederum zum Umbau in die GDP-gebundene inaktive Form. *Tuberous sclerosis protein 2* (TSC2) fördert die Rheb-eigene GTPase-Aktivität und damit den Verbleib von mTORC1 im inaktiven Zustand. Phosphorylierung von TSC2 durch PKB verringert dessen Fähigkeit als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) zu wirken. Damit wird

Einleitung

durch aktive PKB über Inaktivierung von TSC2 aktives Rheb-GTP angehäuft und mTORC1 aktiviert. Aktiviertes mTORC1 phosphoryliert im weiteren Verlauf dieser Signalkaskade die p70S6-Kinase, welche wiederum das ribosomale Protein S6 aktiviert und somit die Proteinsynthese fördert. mTORC2 wird ebenfalls durch den TSC1/TSC2-Komplex aktiviert. In der Folge phosphoryliert mTORC2 PKB an Ser473 und führt damit zu einer verstärkten Aktivierung von mTORC1. Ein negativer *feedback-loop* führt dazu, dass durch mTORC1 aktivierte p70S6-Kinase (p70S6K) mTORC2 hemmt und damit eine weitere volle Aktivierung der PKB verhindert wird (109-111) (Abb. 5).

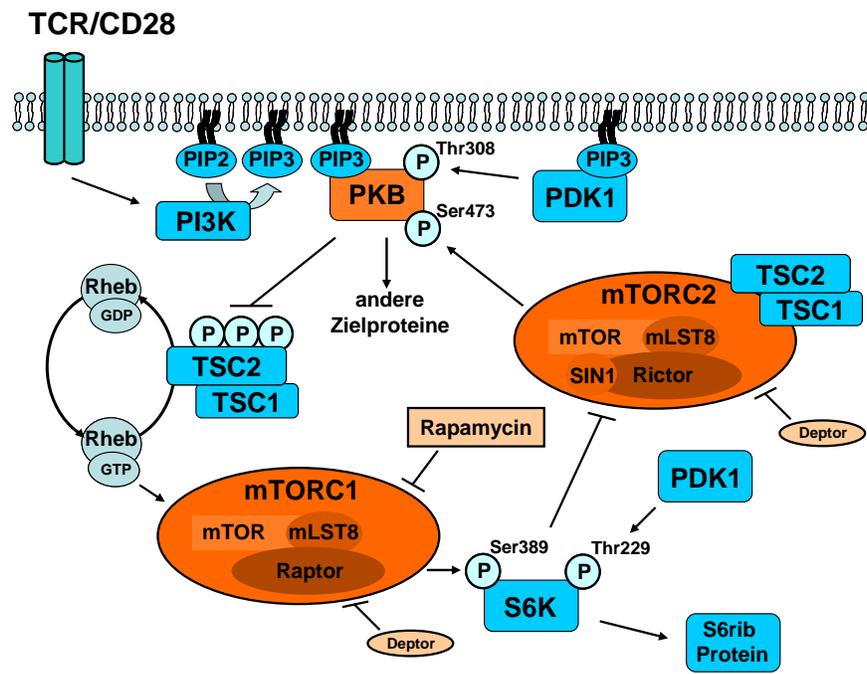


Abb. 5: **Der PI3K/PKB/mTOR-Signalweg.** Aktivierte PI3K generiert durch Phosphorylierung von PIP2 den *second messenger* PIP3. PIP3 dient als Membrananker und rekrutiert PKB an die Zellmembran, wodurch PKB in unmittelbare Nähe von PDK1 gelangt. Diese teilaktiviert PKB durch Phosphorylierung an Thr308. PKB-vermittelte Phosphorylierung und Inaktivierung des TSC1/TSC2-Komplexes verringert dessen Fähigkeit Rheb und damit mTORC1 zu inhibieren. Die Aktivierung von mTORC1 führt im weiteren Verlauf zur Förderung der Proteinsynthese durch Aktivierung des ribosomalen Proteins S6. mTORC1, jedoch nicht mTORC2, ist durch Rapamycin inhibierbar. Der durch TSC1/TSC2 aktivierte mTORC2-Komplex phosphoryliert PKB an Ser473 und verstärkt die PKB-Aktivität. Die mTORC2-Aktivität wird durch p70S6K negativ reguliert (109-111).

Aktiviert PKB wandert in das Zytoplasma und auch in den Zellkern und phosphoryliert dort verschiedene Substrate (Abb. 4). Die PKB-Aktivität unterliegt der Regulation durch verschiedene Mechanismen. Hemmung der PI3K, welche sensitiv auf die pharmakologischen Inhibitoren

Einleitung

LY294002 und Wortmannin reagiert, führt indirekt zur Inaktivierung der PKB. Zudem kann PKB durch Phosphatasen, wie PP2A (Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2A) und PHLPP (*PH domain and leucin rich repeat protein phosphatase*) an Thr308 und Ser473 dephosphoryliert und damit inaktiviert werden (112-115). Eine weitere wichtige Phosphatase wurde im Jahre 1997 entdeckt, PTEN (*phosphatase and tensin homologue localized on chromosome ten*). PTEN dephosphoryliert PIP3, was die Membranlokalisation und damit die Aktivierung von PKB verhindert (116).

1.2.3 PKB und T-Zellmigration

PI3K/PKB-Signale regulieren die Wanderungseigenschaften von T-Zellen, die kontinuierlich zwischen dem Blut und den lymphatischen Organen zirkulieren. Für den Eintritt in lymphatische Organe ist die Expression von CD62L erforderlich. In Kombination mit dem Chemokinrezeptor CCR7 erfolgt über CD62L das Anheften naiver T-Zellen an die HEVs (*high endothelial venules*) für den Eintritt in die Lymphknoten. Nach Aktivierung der T-Zellen wird die Expression von CD62L herunterreguliert, wodurch diese in die sekundären lymphatischen Organen nicht mehr einwandern können (82, 117). Für den Austritt von T-Zellen aus den Lymphknoten ist der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor (S1P1) erforderlich. Der Ligand für diesen Rezeptor, S1P, wird in großen Mengen durch rote Blutzellen gebildet und liegt in hoher Konzentration im Blut vor. Im Gegensatz dazu ist die S1P-Konzentration in lymphatischen Geweben, wie Thymus, Lymphknoten oder Milz sehr gering, so dass sich ein Konzentrationsunterschied zwischen Blut und Gewebe, der S1P-Gradient, ergibt. Dieser Gradient ermöglicht das Wandern S1P1-exprimierender Zellen aus dem lymphatischen Gewebe in den Blutstrom. Die Regulation der S1P1-Expression hat somit entscheidenden Einfluss auf die Verweildauer der Zellen in den lymphatischen Organen, was für die Immunkontrolle von großer Bedeutung ist.

Nach T-Zellstimulation wird der Aktivierungsmarker CD69 an der Oberfläche exprimiert, welcher mit S1P1 einen Komplex bildet. Dadurch wird die Herunterregulation von S1P1 veranlasst und so der Austritt aus den Lymphknoten verhindert. Sobald S1P1 wieder exprimiert wird, wandern die Lymphozyten in Folge des S1P-Gradienten aus den Lymphknoten in das Blut (118-121). Die Expression der *homing* Rezeptoren S1P1, CD62L und CCR7 wird durch den Transkriptionsfaktor KLF2 (*krüppel like factor 2*) reguliert. Die Transkription des KLF2-Gens wird wiederum durch Foxo1 (*forkhead box protein O1*) reguliert. Aktivierte PKB phosphoryliert

Einleitung

Foxo1, wodurch der Transkriptionsfaktor aus dem Kern wandert und KLF2 sowie die durch KLF2 regulierten Gene nicht transkribiert werden. In aktivierten T-Zellen mit aktivem PI3K/PKB-Signalweg wird daher die Expression von CD62L, CCR7 und S1P1 negativ reguliert, wodurch der PI3K/PKB-Signalweg das Wanderungsverhalten naiver versus aktivierter T-Zellen beeinflusst (121, 122).

1.2.4 PKB und Apoptose

Durch Apoptose wird die Homöostase und Selbsttoleranz des Immunsystems aufrecht erhalten. Apoptose tritt während der negativen Selektion und dem *death by neglect* von Thymozyten auf, welche ihren TCR nicht erfolgreich umbilden konnten oder Autoantigene mit hoher Affinität erkennen. In peripheren T-Zellen tritt Apoptose auf, wenn bei wiederholter Aktivierung der Zellen über den TCR *activation induced cell death* (AICD) induziert wird. Über diesen Prozess werden beispielsweise Effektor-T-Zellen eliminiert, wenn sie nach einer erfolgreichen Infektabwehr nicht mehr benötigt werden (klonale Kontraktion). Zusätzlich könnte AICD dafür verantwortlich sein, dass autoreaktive T-Zellen in der Peripherie beseitigt werden. AICD wird durch Interaktion des Fas-Rezeptors mit dem Fas-Liganden ausgelöst. Defekte in Bezug auf diese Moleküle führen zu Autoimmunerkrankungen, was die Wichtigkeit der Apoptose unterstreicht. Die über den Fas-Rezeptor initiierte Apoptose wird durch kostimulatorische CD28-Signale inhibiert und beruht auf der Induktion des PI3K/PKB-Signalweges. Das proapoptische Molekül BAD (*Bcl2-associated agonist of cell death*), welches an Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*) oder Bcl-XL (*Bcl-2 like protein*) gebunden deren antiapoptische Funktion verhindert, wird durch die „Überlebenskinase“ PKB phosphoryliert. Dadurch wird BAD zugänglich für die Bindung an 14-3-3-Proteine, wodurch BAD von Bcl-2/Bcl-XL entfernt und deren antiapoptische Funktion ermöglicht wird. Weitere proapoptische Moleküle, wie Mitglieder der Foxo-Familie und die Kinase I κ B, werden ebenfalls über Phosphorylierung durch PKB inhibiert.

Foxo wird nach Phosphorylierung durch PKB aus dem Kern ausgeschleust, wodurch dessen inhibitorische Wirkung verloren geht und die durch Foxo gehemmte Transkription des Zellzyklusproteins Cyclin D aktiviert wird. Der NF κ B-Inhibitor I κ B wird nach Phosphorylierung degradiert, was die Kernlokalisation von NF- κ B und damit die Transkription von Genen verschiedener antiapoptischer Proteine, wie Bcl-XL und c-Myb (*myeloblastosis oncogene*),

Einleitung

ermöglicht (123, 124). Darüber hinaus wird über NF κ B die Expression von FasL in negativer Weise reguliert. Der Transkriptionsfaktor NFAT, welcher ebenfalls der Regulation durch PKB unterliegt, fördert die FasL-Expression. Durch Bindung von NFAT an den FasL-Promotor wird die FasL-Expression induziert. Phosphorylierung von NFAT durch PKB führt zu dessen Kernausschluß, und die FasL-Expression wird nicht veranlasst (125-129).

1.2.5 PKB und Tregs

Neuere Publikationen zeigen, dass der PI3K/PKB-Signalweg auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Homöostase und Funktion von Tregs spielt. So zeigen PI3Kp110 $\delta^{D910A/D910A}$ *knock-in* Mäuse, die eine inaktive PI3K exprimieren, eine erhöhte nTreg-Zahl im Thymus, aber eine geringere Zahl von nTregs in der Peripherie (130). In nTregs ist PKB im Vergleich zu konventionellen T-Zellen weniger aktiv, und retrovirale Expression aktiver PKB in humanen Treg-Zelllinien schwächte deren Suppressorkapazität (131). Hemmung des PI3K/PKB-Signalweges durch pharmakologische Inhibitoren führte zu erhöhter Foxp3-Expression, und die Hemmung von mTOR förderte die Foxp3-Expression und die Entwicklung von iTregs (132-134). Die Phosphatase PTEN, ein Negativregulator des PI3K/PKB-Signalweges, wird nach T-Zellaktivierung abgeschaltet, ist aber in nTregs relativ stärker exprimiert, was zu einer Abnahme von PI3K/PKB-Signalen in Tregs führen würde. Im Gegensatz dazu ergaben Studien in PTEN-defizienten Mäusen, die erhöhte PI3K/PKB-Signale aufweisen, dass die Entwicklung und Suppressorfunktion von nTregs nicht beeinflusst ist (135). Die exakte Funktion der PKB bei der Generation von Tregs und deren Suppressoraktivität ist daher unvollständig verstanden.

1.2.6 PKB transgene (tg) Mäuse

Um den Einfluss von PKB auf die zahlreichen Zielproteine in Immunzellen zu untersuchen, wurden in den letzten 10 Jahren verschiedene PKBtg bzw. PKB-defiziente Mäuse erzeugt. PKB $\alpha^{-/-}$ Mäuse weisen eine erhöhte Apoptose im Thymus und ein verringertes Körpergewicht auf und versterben zu 40% im frühen Alter (136). PKB $\beta^{-/-}$ Mäuse sind überlebensfähig, neigen aber zur Entwicklung eines schweren Diabetes mellitus, was die essentielle Bedeutung der PKB β im Glukose-Metabolismus verdeutlicht (137). Analysen von PKB $\gamma^{-/-}$ Mäusen, welche eine etwa

Einleitung

25%-ige Reduktion des Hirngewichts und der Hirngröße aufweisen, ließen darauf schließen, dass PKB γ eine zentrale Funktion bei der Hirnentwicklung spielt (138). Da Mäuse mit Verlust eines der drei PKB-Proteine überlebensfähig sind, deutet dies darauf hin, dass PKB α , PKB β und PKB γ das Fehlen einer „Isoform“ jeweils kompensieren können. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass PKB α/β -doppelt-defiziente Mäuse kurz nach der Geburt versterben und außerdem eine stark reduzierte Körpergröße, begleitet von Defekten in der Haut-, Knochen- und Muskelentwicklung aufweisen (139). Sie zeigen eine stark reduzierte Zellzahl im Thymus und eine Zunahme von Thymozyten im DN3-Stadium, was auf eine Rolle von PKB bei der β -Selektion hinweist. PKB α/γ -doppelt-defiziente Thymozyten haben Defekte beim Übergang vom DN4-Stadium zum DP-Stadium. PKB α/γ - sowie PKB $\alpha/\beta/\gamma$ -defiziente Mäuse versterben bereits im Embryonalstadium (140, 141). Insgesamt zeigte sich, dass alle drei Gene, aber insbesondere PKB α , für die Thymozytenentwicklung wichtig sind.

Ein Mausmodell mit konstitutiv aktiver myristylierter PKB (myrPKB) wurde von Thompson et al generiert (142). Der Myristylrest führt dazu, dass PKB an die Zellmembran gebunden ist, wodurch die Kinase zugänglich für Phosphorylierungen und daher konstitutiv aktiv wird. Naive T-Zellen myrPKB tg Mäuse sind zur vollen Aktivierung von CD28-Kostimulation abhängig, zeigen erhöhte Zellgröße, verstärkten Glukose-Metabolismus und ein besseres Überleben als wt T-Zellen. In diesem Zusammenhang zeigte sich in myrPKB tg Mäusen eine erhöhte Anzahl CD4⁺ T-Zellen, und ältere Mäuse neigten zur Entwicklung von Lymphomen (142).

Die in dieser Arbeit verwendete myrPKB tg Mauslinie wurde in Dr. Bommhardts Labor etabliert. Die Mauslinie exprimiert eine humane myrPKB α cDNA, die unter der Kontrolle des humanen CD2-Promotors steht. Zusätzlich zum Lck-Myristylierungs-/Palmitoylierungs-Signal zur Bindung an die Zellmembran beinhaltet das Konstrukt ein Hämagglutinin (HA)-Epitop. Frühere Studien an diesen Mäusen zeigten eine verstärkte Aktivierung von Lck und des Raf-MEK-Erk-Signalwegs, zusammen mit verstärkter T-Zell-Proliferation nach TCR-Aktivierung. MyrPKB tg DP-Thymozyten zeigten eine verstärkte Selektion in Richtung der CD4⁺ T-Zelllinie, was zu einem erhöhten Verhältnis von CD4⁺:CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie beiträgt. In myrPKB tg Thymozyten von HY-TCR tg Mäusen war die Negativselektion reduziert, während in OT1-TCR tg Thymozyten myrPKB zu erhöhter negativer Selektion führte. In OT2-TCR tg Thymozyten wurde dagegen kein Einfluss erhöhter PKB-Signale auf die Negativselektion festgestellt. Je nach verwendeter TCR-Spezifität hat myrPKB demnach steigernde, reduzierende oder keine Effekte

Einleitung

auf die negative Selektion (143). Periphere myrPKBtg T-Zellen weisen eine reduzierte Kernlokalisierung von NFAT, NF κ Bp65 und RelB nach CD3-Stimulation auf. Es wurde zudem gezeigt, dass PKB und NFAT miteinander interagieren, was darauf hindeutet, dass PKB die NFAT-Aktivität direkt regulieren könnte (127). Weiterhin konnte unter septischen Bedingungen für myrPKB tg Mäuse vergleichend mit wt Mäusen eine 50% höhere Überlebensrate beobachtet werden. In diesem Zusammenhang wurde für myrPKB tg Lymphozyten eine deutlich reduzierte Apoptose aufgedeckt. Letzteres demonstriert die Bedeutung, die PKB bezüglich der Regulation von Überlebensvorgängen einnimmt.

1.3 Multiple Sklerose (MS)

Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunkrankheit, die sich gegen das zentrale Nervensystem (ZNS) richtet. Weltweit sind etwa 2,5 Mio. Menschen vorwiegend im Alter von 20 bis 40 Jahren betroffen. Die Krankheit hat einen nicht vorhersagbaren und zum Teil tödlichen Verlauf (144). Das ZNS gilt als ein immunprivilegiertes Organ, das durch die Blut-Hirn-Schranke vor entzündlichen Vorgängen geschützt ist. Der Zusammenbruch dieser Barriere und das Einwandern von Entzündungszellen in das ZNS sind für die Induktion der Erkrankung entscheidend. Autoreaktive T-Lymphozyten, die spezifisch Antigene des ZNS erkennen, lösen unter Beteiligung von B-Lymphozyten und Autoantikörpern gegen Myelinantigene entzündliche Prozesse an der die Nervenbahnen schützenden Myelinschicht aus. Diese führen zur Zerstörung der Myelinschicht und zur Bildung sog. sklerotischer Plaques. Th17-Zellen sind an entzündlichen Prozessen bei der MS entscheidend beteiligt (81). Mikroarray-Analysen ergaben, dass die IL-17-Transkription in T-Zellen bei MS erhöht ist. Darüber hinaus wurden in der Hirnflüssigkeit von MS-Patienten erhöhte IL-17- und IL-8-Konzentrationen nachgewiesen (145-147). Ergebnisse aus neueren *in vitro* Studien deuten darauf hin, dass Th17-Zellen in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu durchbrechen und in das ZNS einzudringen (148, 149). Die genauen Mechanismen, die zur Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke führen sind aber weitgehend ungeklärt. Auch die immunologischen Prozesse, die das Krankheitsbild der MS prägen, sind nach wie vor unzureichend verstanden.

Es werden vier Verlaufsformen der MS unterschieden, die sich im Krankheitsverlauf und bezüglich des Auftretens im Alter und dem Geschlecht der betroffenen Personen unterscheiden.

Einleitung

Bei der RR (*relapsing remitting*)-MS treten einzelne Schübe auf. Die Symptome bilden sich danach zurück. Die SP (*secondary progressive*)-MS ist durch die langsame Zunahme neurologischer Funktionsstörungen charakterisiert. Es können zusätzlich im späteren Verlauf Krankheitsschübe auftreten. Etwa 15% der MS-Patienten leiden unter PP (*primary progressive*)-MS, die durch einen späten Ausbruch und schleichende irreversible Zerstörung der Nervenfunktionen ohne schubartigen Verlauf charakterisiert ist. Auch eine gutartig verlaufende Form der Erkrankung wurde beschrieben. Die Betroffenen zeigen nur schwache Defizite und bedürfen keiner therapeutischen Behandlung (150, 151). Derzeit werden vorwiegend vier Therapeutika eingesetzt: Beta-Interferone, Copaxone, Mitoxantron und Natalizumab. Spezifische Wirkungsmechanismen kommen dabei zum Tragen. Senkung der Schubrate, Hemmung des Lymphozytenwachstums, der Antigenpräsentation und Zytokinproduktion sowie Hemmung des Einwanderns entzündlicher Zellen in das ZNS sind die geläufigsten Therapieansätze (152-155). In allen Verlaufsformen kann aber lediglich eine Verminderung der Symptomatik erreicht werden. Zudem führen die Wirkstoffe zu erheblichen Nebenwirkungen. Die Forschung arbeitet daran, die Remyelinisierung der Nervenzellen zu fördern und die Entwicklung der an entzündlichen Prozessen beteiligten pro- und antiinflammatorischen Immunzellen zu hemmen bzw. zu fördern. Auch durch Stammzelltherapien konnten einige Erfolge erzielt werden (156, 157).

1.3.1 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Viele der derzeit verwendeten therapeutischen Ansätze zur MS wurden in Tiermodellen entwickelt. Die EAE ist ein anerkanntes Tiermodell zur Studie der T-Zellreaktion auf Autoantigene der Myelinschicht. Drei Myelinproteine stehen dabei im Vordergrund. Myelin-Basisches Protein (MBP), Proteolipidprotein (PLP) und Myelin Oligodendroglia Glykoprotein (MOG) besitzen spezifische Epitope, die von autoreaktiven T-Zellen erkannt werden können. Synthetisch hergestellte Peptide, die diese spezifischen Epitope tragen, werden suszeptiblen Versuchstieren zusammen mit Adjuvantien subkutan injiziert. Nach der Immunisierung der Versuchstiere treten sehr ähnliche pathologische Symptome wie bei der MS auf, die täglich graduiert werden, um den Krankheitsverlauf zu verfolgen.

Einleitung

Derzeitige Studien im Mausmodell gehen davon aus, dass entzündlich wirkende Th-17-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathologie der EAE spielen (158, 159). IL-6- bzw. TGF β -Defizienz in Mäusen führt früheren Studien zufolge, einhergehend mit verringertem Auftreten IL-17-produzierender T-Zellen im ZNS, zu Resistenz gegenüber einer EAE-Induktion (160-162). Jedoch zeigten neuere Studien, dass auch andere Faktoren in die Th17-Differenzierung involviert sind. Diesbezügliche Analysen ergaben, dass IL-21, welches von Th17-Zellen selbst gebildet wird, deren eigene Differenzierung unterstützt (163-165). Mäuse mit IL-23-Defizienz, einem Zytokin, das Th17-Zellen *in vivo* stabilisiert, sind ebenfalls resistent gegenüber einer EAE-Induktion (166). IL-17 beeinflusst auch Epithelzellen und Endothelzellen, die durch IL-17 angeregt werden, proinflammatorische Zytokine und Chemokine zu produzieren (159, 167), was zum Verlust der Immuntoleranz und Ausbildung einer schweren Autoimmunerkrankung beiträgt. Für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz sind Tregs von essentieller Bedeutung. Ihr Fehlen oder Fehlfunktion von Tregs führt daher zu Autoimmunerkrankungen (15-18). Frühere Studien zeigten, dass Tregs nicht in das ZNS eindringen, sondern das Eindringen autoreaktiver T-Zellen in das ZNS verhindern (168). Neuere Untersuchungen dagegen unterstützen die Ansicht, dass Tregs selbst in das ZNS gelangen und dort über verschiedene Mechanismen Suppressoraktivität ausüben (169), z.B. durch IL-10-Produktion. Die Ausschüttung des antiinflammatorischen Zytokins steht in direktem Zusammenhang mit der Bekämpfung der EAE-Erkrankung, da IL-10-defiziente Mäuse besonders anfällig für die EAE-Erkrankung sind und die Rückbildung der Krankheit verschlechtert ist (35, 170, 171). IL-10 tg Mäuse dagegen zeigen Resistenz gegenüber einer EAE-Induktion (170). Desweiteren ist bei der EAE anti-inflammatorisch wirkendes TGF β von großer Bedeutung. TGF β unterstützt die Differenzierung von iTregs und wirkt als membranständiges oder sekretiertes Molekül bei der Suppression durch Tregs mit (36, 38, 172) Welche Rolle PKB-Signale bei der Induktion und dem Verlauf der EAE spielen, ist bisher unbekannt und Gegenstand dieser Promotionsarbeit.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Die Regulierung der Balance von entzündlichen und immunregulatorischen Zellen ist ein entscheidender Prozess im Rahmen der Homöostase des Immunsystems. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die Rolle der PKB bei Differenzierungsprozessen von Th-Zellen im Rahmen der Immunhomöostase zu charakterisieren. Da die EAE-Erkrankung über immunsuppressive Tregs und inflammatorische Th17-Zellen gesteuert wird, wurde der Einfluss aktiver PKB auf die Entwicklung, Funktion und das Überleben dieser T-Zell-Subtypen *in vitro* und in der EAE untersucht.

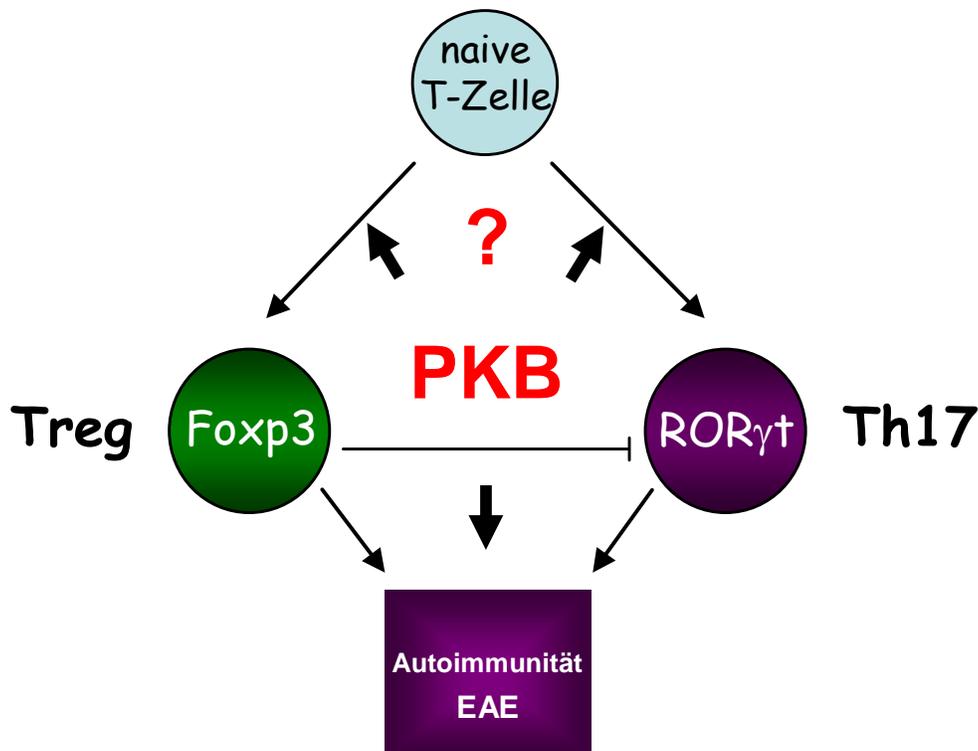


Abb. 6: **Zielstellung.** Analyse der Rolle aktiver PKB bei der Differenzierung naiver T-Zellen zu inflammatorischen Th17-Zellen und immunsuppressiven Tregs und deren Funktion bei der EAE.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

	Spezies / Klon	Konzentration	Quelle
Stimulations-Antikörper			
CD3 ϵ	<i>Armenian</i> Hamster monoklonaler Antikörper (145-2C11)	0,5 mg/ml	BD Pharmingen
CD28	<i>Syrian</i> Hamster monoklonaler Antikörper (37.51)	0,5 mg/ml	BD Pharmingen
MACS-Antikörper			
CD25-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper IgM (7D4)	0,5 mg/ml 1:2500 in MACS-Puffer	BD Pharmingen
CD8-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper IgG2 α (53-6.7)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Pharmingen
CD45R/B220-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper IgG2 α (RA3-6B2)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Pharmingen
NK1.1-Bio	Maus monoklonaler Antikörper IgG2 α (PK136)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Pharmingen
I-A ^d /I-E ^d MHCII-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper IgG2 α (2G9)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Pharmingen
CD11b-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper IgG2 β (M1/70)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Pharmingen
Ter-119-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper IgG2 β (TER-119)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Pharmingen
α Maus IgG (H+L)	Ziege polyklonaler Antikörper	1,3 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	Dianova
α Ratte IgG (H+L)	Maus polyklonaler Antikörper	1,8 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	Dianova
Primär-Antikörper			
pPKB (Ser473)	Kaninchen monoklonaler Antikörper IgG (D9E)	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling
pPKB (Thr308)	Kaninchen monoklonaler Antikörper IgG (C31E5)	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling
PKB (pan)	Kaninchen monoklonaler Antikörper IgG (C67E7)	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling
pGSK-3 β (Ser9)	Kaninchen polyklonaler Antikörper	1:1000 in 0,5% BSA	Cell Signaling
pS6 ribosomales Protein (Ser240/244)	Kaninchen polyklonaler Antikörper	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling

Material und Methoden

pTSC2 (Thr1462)	Kaninchen polyklonaler Antikörper	1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling
β-Aktin	Maus monoklonaler Antikörper IgG2α (AC-40)	1:1000 in 5% BSA	Sigma
Sekundär-Antikörper			
anti-Kaninchen	Ziege polyklonaler Antikörper	1:5000 in Blockpuffer	Dianova
anti-Maus	Ziege polyklonaler Antikörper	1 :5000 in Blockpuffer	Dianova
FACS-Antikörper (anti-Maus)			
CD4-APC	Ratte monoklonaler Antikörper (RM4-5)	0,2 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
CD4-PE	Ratte monoklonaler Antikörper (GK1.5)	0,2 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
CD8-FITC	Ratte monoklonaler Antikörper (53-6.7)	0,5 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
CD45R/B220-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper (RA3-6B2)	0,5 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
CD25-PE	Ratte monoklonaler Antikörper (PC61)	0,2 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
CD62L-FITC	Ratte monoklonaler Antikörper (Mel-14)	0,5 mg/ml 1:300 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
LFA1-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper (M17/4)	0,5 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
OX40-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper (OX-86)	0,5 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
IL-7R-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper (B12-1)	0,5 mg/ml 1:100 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
CD45RB-Bio	Ratte monoklonaler Antikörper (RA3-6B2)	0,5 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
GITR-PE	Ratte monoklonaler Antikörper (DTA-1)	0,1 mg/ml 1:20 in FACS-Puffer	eBioscience
CTLA-4-PE	Ratte monoklonaler Antikörper (UC10-4B9)	0,2 mg/ml 1:80 in FACS-Puffer	eBioscience
IL-2-PE	Ratte monoklonaler Antikörper (JES6-5H4)	0,2 mg/ml 1:100	eBioscience
IL-10-PE	Ratte monoklonaler Antikörper (JES5-16E3)	0,2 mg/ml 1:100	eBioscience
IL-17-PE	Ratte monoklonaler Antikörper (TC11-18H10)	0,2 mg/ml 1:100	BD Pharmingen
GARP-PE	Ratte monoklonaler Antikörper (YGIC86)	0,2 mg/ml 1:100 in FACS-Puffer	eBioscience
CD103-PE	Ratte monoklonaler Antikörper (M290)	0,2 mg/ml 1:100 in FACS-Puffer	BD Pharmingen

Material und Methoden

IgG2 α -FITC	Ratte monoklonaler Antikörper (R35-95)	0,5 mg/ml	BD Pharmingen
IgG2 α -PE	Ratte monoklonaler Antikörper (R3-34)	0,2 mg/ml	BD Pharmingen
IgG2 α -PE	Ratte monoklonaler Antikörper (R35-95)	0,2 mg/ml	BD Pharmingen
IgG2 α -Bio	Ratte monoklonaler Antikörper (R35-95)	0,5 mg/ml	BD Pharmingen
PE-Cy5-Streptavidin		0,2 mg/ml 1:400 in FACS-Puffer	BD Pharmingen
andere Farbstoffe			
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)		5,0 μ M für <i>in vivo</i> Migration 2,0 μ M für <i>in vitro</i> Proliferation	Invitrogen
Dodecyldimethylamine oxide (DDAO)		0,5 μ M für <i>in vivo</i> Migration	Invitrogen

2.1.2 Puffer und Medien

Phosphatpuffer/Saline (PBS)

	Menge	Bezugsquelle
10x PBS		
NaCl	58,44 g	Roth
KCL	74,56 g	Roth
Na ₂ HPO ₄	141,96 g	Roth
KH ₂ PO ₄	136,09 g	Roth
ddH ₂ O	ad 1000 ml	
pH 7,4		

Material und Methoden

TAP-Puffer

	Menge	Bezugsquelle
50x TAP		
Tris	242 g	Roth
37% Essigsäure	57,1 ml	J.T.Baker
EDTA (Titrierkomplex 3)	37,2 g	Roth
ddH ₂ O	ad 1000 ml	
pH 8,0		

FACS-Puffer

	Endkonzentration	Bezugsquelle
10x PBS	1x	Roth
BSA	0,5%	Roth
Na-Azid	0,01%	Roth

MACS-Puffer

	Endkonzentration	Bezugsquelle
10x PBS	1x	Roth
BSA	0,5%	Roth
EDTA	2 mM	Roth

Annexin-Puffer

	Endkonzentration	Bezugsquelle
Hepes pH 7,4	10 mM	Roth
NaCl	140 mM	Roth
CaCl ₂	2,5 mM	Roth

Material und Methoden

Zellkulturmedium

Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 + Ca²⁺ + Mg²⁺ der Firma Biochrom AG verwendet. Zum Erzielen optimaler Kulturbedingungen wurden verschiedene Zusätze (*supplemental complete*) hinzugegeben.

	Endkonzentration	Menge	Bezugsquelle
SC (supplemental complete 20x)			
FCS (hitzeinaktiviert)		500 ml	PAN Biotec GmbH
100 mM Na-Pyruvat	12,2 mM	100 ml	Roth
100x nicht-essentielle Aminosäuren	10 mM	100 ml	GIBCO
Penicillin-Streptomycin	10000 U/ml - 10 mg/ml	100 ml	Invitrogen
Glutamin-Lösung	5%	40,25 ml	GIBCO
β-Mercaptoethanol	50 μM	5 ml	GIBCO

	Endkonzentration	Menge
RPMI complete (10% FCS)		
RPMI 1640		500 ml
SC		25 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	5%	25 ml
β-Mercaptoethanol	50 μM	1,7 μl

Material und Methoden

Gey's Lösung

	Menge	Bezugsquelle
Stock A		
NH ₄ Cl	35 g	Roth
KCl	1,85 g	Roth
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	1,50 g	Roth
KH ₂ PO ₄	0,12 g	Roth
Glukose	5,50 g	Roth
ad 1000 ml ddH ₂ O		
Stock B		
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	0,42 g	Roth
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,14 g	Roth
CaCl ₂	0,34 g	Roth
ad 100 ml ddH ₂ O		
Stock C		
NaHCO ₃	2,25 g	Roth
ddH ₂ O	ad 100 ml	
Endlösung		
70 Volumenteile ddH ₂ O	210 ml	
20 Volumenteile Stock A	60 ml	
5 Volumenteile Stock B	15 ml	
5 Volumenteile Stock C	15 ml	

Zell-Lysepuffer

	Endkonzentration	Bezugsquelle
Zell-Lysepuffer		
Nonidet P40	1%	SIGMA
NaCl	100 mM	Roth
Hepes pH 7,4	50 mM	Roth
EDTA	5 mM	Roth
Laurylmaltosid	1%	Calbiochem
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	1 mM	Roth
Na-Orthovanadat	1 mM	SIGMA
Na-Fluorid	50 mM	Roth
Na-Pyrophosphat	10 mM	SIGMA

Material und Methoden

Gelelektrophorese- und Blotpuffer

	Endkonzentration	Bezugsquelle
4x Sammelgelpuffer		
Tris	0,5 M	Roth
SDS	0,4 % (w/v)	SIGMA
pH 6,8		
4x Trenngelpuffer		
Tris	1,5 M	Roth
SDS	0,4 % (w/v)	SIGMA
pH 8,8		
10x Elektrophoresepuffer		
Tris Base	0,25 M	Roth
Glycin	1,92 M	Roth
SDS	1% (w/v)	SIGMA
Blotpuffer		
Glycin	192 mM	Roth
Tris	25 mM	Roth
Methanol	20%	Roth

Proteingelzusammensetzung

	Endkonzentration	Menge	Bezugsquelle
Trenngel (20 ml)			
ddH ₂ O		10 ml	
40% Acrylamid	10%	5 ml	Roth
4x Trenngelpuffer	1x	5 ml	
10% APS	0,03%	66 µl	Roth
TEMED	0,05%	10 µl	Roth
Sammelgel (10 ml)			
ddH ₂ O		5,65 ml	
40% Acrylamid	5%	1,15 ml	Roth
4x Sammelgelpuffer	1x	2,5 ml	
Glycerol		700 µl	Apotheke Uniklinik Magdeburg
10% APS	0,03%	33 µl	Roth
TEMED	0,2%	20 µl	Roth

Material und Methoden

Block- und Waschpuffer

	Endkonzentration	Bezugsquelle
Waschpuffer (TBST) 1x		
Tris	25 mM	Roth
NaCl	137 mM	Roth
Tween 20	0,05%	Roth
pH 7,6		
Blockbuffer		
TBST	1x	
Milchpulver	5,0% (w/v)	Roth
Ponceau-Rot-Lösung		
Ponceau S	0,2%	SIGMA
Tri-Chloressigsäure	3,0%	SIGMA

2.1.3 Zytokine und Stimulanzen

	Endkonzentration	Bezugsquelle
PMA	100 ng/ml	SIGMA
Ionomycin	800 ng/ml	SIGMA
Brefeldin A	2 µg/ml	Calbiochem
IL-2	20 ng/ml	Biochrom
IL-6	20 ng/ml	eBioscience
TGFβ ₁	1 ng/ml	R&D Systems
Pertussis Toxin (List biological Lab Inc)	200 ng/200µl	Quadrant Ltd.
Freunds Adjuvanz		SIGMA
<i>M.Tuberculosis</i> H37 Ra	10 mg/ml	BD Pharmingen
MOG ₃₅₋₅₅ -Peptid	200 µg/200 µl	Dr. Jürgen Faust Universität Halle

Material und Methoden

2.1.4 Sonstige Chemikalien und Materialien

	Endkonzentration	Bezugsquelle
DNA-Marker	3 μ l	Invitrogen
Protein-Standard (<i>PageRuler</i> 10-170 kDa)	3 μ l	Fermentas
Ethidiumbromid	0,005%	Roth
Super Signal West Pico-Chemilumineszenz Substrat	0,1 ml/cm ²	Pierce
³ [H]-Thymidin	0,2 μ Ci	MP Biomedicals
Nitrozellulose		Amersham

2.1.5 Geräte

	Firma
Laborwaage 440-47N	Kern
Feinwaage	Adventurer/OHAUS
pH-Meter pH Level1	inoLab
Magnetrührer RHbasic	IKA Labortechnik
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik)
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Tischzentrifuge Micro 200R	Hettich Laborzentrifugen
Wippe Duomax 1030	Heidolph
Thermomixer 5436	Eppendorf
Vortexer	IKA Labortechnik
Thermocycler PTC200	MJ Research
Stromversorgungsgerät E835	Consort
FACS advantage DIVA	Becton Dickinson
FACS Calibur	Becton Dickinson
LSRFortessa	Becton Dickinson
Entwicklermaschine Cawomat2000 IR	Agfa
β -Counter 1450 microbeta	Perkin Elmer life science
Geldokumentationssystem Win32	Herolab
autoMACS	Miltenyi Biotec

2.2 Methoden

2.2.1 Transgene Mauslinien und deren Genotypisierung

Die verwendeten heterozygoten myrPKB transgenen (PKBtg) Mäuse exprimieren konstitutiv eine aktive Form der humanen PKB α . Für einige Experimente wurden Foxp3-GFP knock-in (Foxp3-GFP) Mäuse sowie CD28-defiziente (CD28^{-/-}) Mäuse verwendet. Foxp3-GFP Mäuse wurden von Dr. A. Rudensky (Universität Seattle, USA) und CD28^{-/-} Mäuse von Dr. F. Lühder (Universität Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Wildtyp (wt), PKBtg, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäuse wurden mit Foxp3-GFP Mäusen gekreuzt, um homozygote Foxp3-GFP Allele auf diesen Hintergründen zu erhalten. Die Tierhaltung erfolgte im zentralen Tierlabor der Otto-von-Guericke-Universität unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen. Für Experimente wurden Mäuse im Alter von 6-10 Wochen aus der eigenen Zucht verwendet. Für EAE-Experimente waren die Mäuse 10-12 Wochen alt.

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte im Alter von 3-4 Wochen mit isolierter DNA aus Schwanzbiopsien. Dazu wurden den Tieren wenige Millimeter der Schwanzspitze abgeschnitten und diese anschließend mit 400 μ l Lysepuffer für 2 h bei 60°C in einem Eppendorfgefäß lysiert.

Schwanzlyse-Puffer

	Endkonzentration	Bezugsquelle
Tris pH 8,0	50 mM	Roth
EDTA	100 mM	Roth
NaCl	100 mM	Roth
SDS	1%	SIGMA
ad 100 ml ddH ₂ O		

Danach erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 18620 g (14000 upm Hettich Zentrifuge Mikro 200R). Der Überstand wurde abgenommen und mit 400 μ l Isopropanol überschichtet. Mit Glasangeln wurde die ausfallende DNA aufgefangen und anschließend 20 min bei 60°C in 200 μ l H₂O (DEPC) gelöst. 2 μ l dieses Ansatzes wurden zur Genotypisierung mittels PCR verwendet. Dafür wurden folgende Primer verwendet:

Material und Methoden

Primer	Sequenz
PKB fwd F5	5'-TGT CAC CAG GTA TTT TGA TGA-3'
PKB rev	5'-TGT TGG ACC AGC TTT GCA G-3'
GFP Foxp3 fwd	5'-CCT CTG ACA AGA ACC CAA TG-3'
GFP Foxp3 rev1	5'-CCT TGA TGC CGT TCT TCT G-3'
GFP Foxp3 rev2	5'-GCA TAA GTC AGA CTT GCC TG-3'
CD28 fwd	5'-GGT AAA GCA GTC GCC CCT GCT-3'
CD28 rev1	5'-CCT GAG TCC TGA TCT GTC AGA CT-3'
CD28 rev2	5'-ATT CGC CAA TGA CAA GAC GCT GG-3'

Die PCR-Ansätze enthielten folgende Komponenten:

PCR Komponente	Konzentration	Menge
PKB- und 2D2-PCR		
Forward-Primer	10,0 µM	1,0 µl
Reverse-Primer	10,0 µM	1,0 µl
dNTPs	12,5 µM	0,4 µl
MgCl ₂	25,0 mM	2,0 µl
5x Green Go Taq [®] Flexi Buffer		4,0 µl
Go Taq [®] Flexi DNA Polymerase	5 Units/µl	0,1 µl
Template DNA		2,0 µl
H ₂ O (DEPC)		9,5 µl
Foxp3- und CD28-PCR		
Forward-Primer	10,0 µM	1,0 µl
Reverse-Primer 1	10,0 µM	1,0 µl
Reverse-Primer 2	10,0 µM	1,0 µl
dNTP's	12,5 µM	0,4 µl
MgCl ₂	25,0 mM	2,0 µl
5x Green Go Taq [®] Flexi Buffer		4,0 µl
Go Taq [®] Flexi DNA Polymerase	5 Units/µl	0,1 µl
Template DNA		2,0 µl
H ₂ O (DEPC)		8,5 µl

Material und Methoden

Die PCR-Reaktionen wurden mit folgenden Programmen durchgeführt:

PKB-PCR		PCR-Schritt
94°C 5 min		Denaturierung
94°C 1 min	32 Zyklen	Denaturierung
56°C 1 min		Annealing
72°C 1 min		Elongation
72°C 5 min		Elongation
4°C		Lagerung
Foxp3-PCR		PCR-Schritt
95°C 5 min		Denaturierung
95°C 1 min	30 Zyklen	Denaturierung
57°C 1 min		Annealing
72°C 1 min		Elongation
72°C 5 min		Elongation
4°C		Lagerung
CD28-PCR		PCR-Schritt
95°C 5 min	40 Zyklen	Denaturierung
95°C 1 min		Denaturierung
58°C 1 min		Annealing
72°C 1 min		Elongation
72°C 5 min		Elongation
4°C		Lagerung

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1%-iges mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetztes Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V für 45 min. Die unter UV-Licht sichtbaren DNA-Fragmente wurden mit dem Geldokumentationssystem von Herolab aufgenommen. Das PCR-Produkt für tg PKB hat eine Länge von 900 Basenpaaren (bp). Die erwartete Länge des PCR-Produktes für Foxp3-GFP beträgt 520 bp. DNA-Fragmente ohne GFP-Insert sind 350 bp lang. Mit DNA aus CD28^{-/-} Tieren wurden mit den hier verwendeten Primern DNA-Fragmente mit einer Länge von 800 bp amplifiziert. Ohne den CD28-*Knockout* beträgt die Länge des PCR-Produktes 700 bp. Als Negativkontrolle wurde bei jeder PCR für einen Ansatz DEPC H₂O anstelle genomischer DNA verwendet.

Material und Methoden

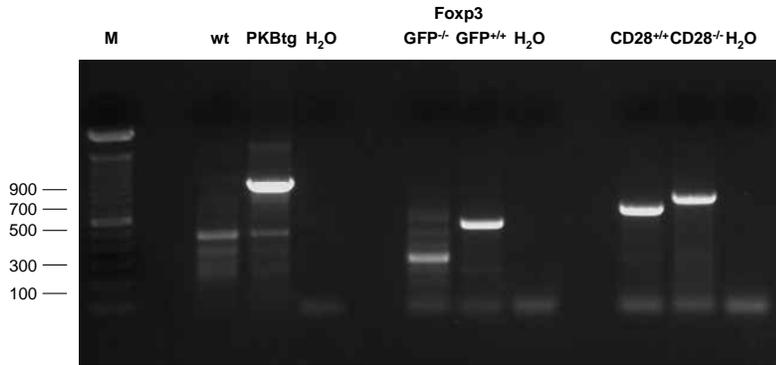


Abb. 7: **Genotypisierung tg Mauslinien.** PCR-Produkte zur Genotypisierung von wt, PKBtg sowie GFPtg (GFP^{+/+}) DNA. Ferner werden PCR-Produkte für wt Mäuse (CD28^{+/+}) im Vergleich zu CD28^{-/-} Mäusen gezeigt. Als DNA-Größenstandard wurde ein Marker der Firma Invitrogen aufgetragen.

2.2.2 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte mit sterilen Arbeitsmaterialien unter sterilen Bedingungen. Mit CO₂ wurden die Tiere eingeschläfert und sodann mit der Bauchseite nach oben fixiert. Mit einer Schere und Pinzette wurde das Bauchfell vom Schwanz bis zum Kopf geöffnet. Mit spitzen Pinzetten wurden dann die inguinalen, brachialen, axillären und zervikalen Lymphknoten entnommen. Im Anschluß wurde die Bauchhaut geöffnet und die mesenterialen Lymphknoten sowie die Milz präpariert. Rechts- und linksseitig wurde sodann der Brustkorb mit einer Schere geöffnet und der Thymus entnommen. Die Organe wurden dabei in separate Gefäße mit RPMI 1640 Kompletmedium überführt.

2.2.3 Zellisolation

Die jeweiligen Organe wurden in ein 70 µm Nylonsieb überführt und der Gewebeverband in frischem RPMI 1640 Kompletmedium (10% FCS) durch vorsichtiges Drücken mit dem Stempel einer sterilen 1 ml Plastikspritze gelockert. Mit einer Plastik-Pasteurpipette wurden die Zellen mit RPMI 1640 Kompletmedium durch das Sieb in ein steriles Röhrchen gespült. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 300 g (1300 upm Heraeus Multifuge 3 S-R) wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet der Lymphknoten- und Thymozytensuspensionen in 10 ml RPMI 1640 Kompletmedium aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Für Analysen der Milzzellen wurden diese nach dem ersten Waschschrift in 3 ml Gey's Lösung aufgenommen und 3 min bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrift, und die Zellen wurden in komplettem RPMI 1640 aufgenommen und gezählt.

2.2.3.1 Isolierung von CD4⁺CD25⁻ (naiven) und CD4⁺CD25⁺ (nTreg) T-Zellen

Für die Isolierung von CD4⁺CD25⁻ Zellen wurden die Lymphknoten-Zellen mit MACS-Puffer gewaschen, in 100 µl MACS-Puffer pro 1x10⁷ Zellen aufgenommen und mit Antikörpercocktail für die negative Selektion von CD4⁺ T-Zellen für 20 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen und das Zellpellet in 90 µl MACS-Puffer pro 1x10⁷ Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl Streptavidin-MicroBeads (Miltenyi Biotec) pro 1x10⁷ Zellen erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min bei 4°C. Danach wurden die Zellen ein weiteres Mal gewaschen und in 1 ml MACS-Puffer pro 1x10⁸ Zellen aufgenommen. Die Aufreinigung der CD4⁺ Zellen erfolgte durch negative Selektion mit dem Auto-MACS-Gerät von Miltenyi Biotec mit dem Programm *DepleteS*. Die Reinheit der isolierten CD4⁺ Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt und lag bei >95%. Die Isolierung von CD4⁺CD25⁺ nTregs erfolgte mit dem Treg-Isolation-Kit von Miltenyi Biotec entsprechend der Beschreibung des Herstellers mit den Programmen *depl025* für die Negativselektion und *2x possel* für die Anreicherung CD4⁺CD25⁺ nTregs oder durch durchflußzytometrisches Sortieren CD25⁺Foxp3⁺ und CD25⁻Foxp3⁻ Zellen am FACS Advantage DIVA von Becton Dickinson. Dafür wurden aus wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen zunächst wie oben beschrieben, jedoch ohne CD25-Ak-Zusatz im Antikörpercocktail, die CD4⁺ Zellen isoliert. Im Anschluss wurden die CD4⁺ Zellen mit einem PE-gekoppelten CD25-Ak (Klon PC61) markiert und mit dem Programm FACS DIVA 5.03 die CD25⁺Foxp3⁺ Zellen sowie CD25⁻Foxp3⁻ Zellen elektronisch sortiert.

2.2.4 Proliferation von nTregs

1x10⁵ FACS-sortierte CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ und CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Zellen aus wt und PKBtg Mäusen wurden mit plattengebundenen CD3/CD28 Ak (2 und 5 µg/ml) für 3 Tage in Anwesenheit und ohne IL-2 (100 ng/ml) bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Im Anschluss erfolgte für 16 h der ³[H]-Thymidineinbau (0,2 µCi) zur Messung der Proliferation der Zellen. Für Proliferationsexperimente mit CFSE wurden mittels MACS isolierte wt und PKBtg nTregs nach der Isolation 3x mit RPMI 1640 ohne Zusätze gewaschen und anschließend in 1 ml je 1x10⁷ Zellen in zusatzfreiem RPMI aufgenommen, da Proteinzusätze (FCS) im Medium CFSE binden und damit den Eintritt dieses Farbstoffes in die Zellen verhindern würde. Sodann erfolgten die Zugabe von 2 µM CFSE und eine anschließende Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die gefärbten Zellen in komplettem RPMI (10% FCS) 2x gewaschen und die

Material und Methoden

Zellen in 1 ml je 2×10^6 Zellen aufgenommen. Anschließend wurden in 96-Loch-Platten 1×10^5 Zellen je Loch mit plattengebundenen CD3/CD28 Ak (2 und 5 $\mu\text{g/ml}$) für 3 Tage in Anwesenheit und ohne IL-2 (100 ng/ml) bei 37°C und 5% CO_2 stimuliert. Die Anzahl der Zellteilungen wurde sodann durchflußzytometrisch bestimmt.

2.2.5 Suppression durch nTregs

$\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ (T-Effektorzellen) und $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ (nTreg) T-Zellen aus Lymphknoten von wt und PKBtg Mäusen wurden mit dem Treg-Isolation-Kit von Miltenyi Biotec entsprechend der Herstellervorschrift isoliert. Die Reinheit der isolierten Zellpopulationen wurde durch FACS-Analyse bestimmt und lag bei $>90\%$. Für den Suppressionsversuch wurden 1×10^5 naive wt bzw. PKBtg T-Effektorzellen mit wt und PKBtg Suppressorzellen in den angegebenen Verhältnissen in Kokultur gebracht und mit löslichem CD3 Ak (2 $\mu\text{g/ml}$) in Anwesenheit von 1×10^5 bestrahlten wt Milzzellen (30 Gy) für 3 Tage bei 37°C und 5% CO_2 stimuliert. Im Anschluss erfolgte für 8 h der $^3\text{[H]}$ -Thymidineinbau zur Bestimmung der Proliferation der T-Effektorzellen.

2.2.6 FACS-Analyse

Zur Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen wurden 1×10^6 Zellen aus Lymphknoten, Milz oder Thymus in 2 ml PBS aufgenommen und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten oder biotinylierten Ak in 100 μl FACS-Puffer suspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die mit Fluorochrom-gekoppelten Ak behandelten Proben in 200 μl PBS aufgenommen. Proben mit biotinyliertem Ak wurden mit PE-Cy5-Streptavidin in 100 μl FACS-Puffer 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 200 μl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung der Proben erfolgte am FACS Calibur. Intrazelluläre Färbungen wurden mit dem *Inside Stain* Kit von eBioscience durchgeführt. Die Färbung wurde gemäß der Herstellervorschrift ausgeführt.

2.2.7 Treg-Induktion

3×10^6 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Zellen aus wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen wurden mit plattengebundenen CD3 Ak (2 $\mu\text{g/ml}$) oder CD3/CD28 Ak (2 und 5 $\mu\text{g/ml}$) in Anwesenheit von TGF- β_1 (R&D Systems; 1 ng/ml) für 3 und 5 Tage bei 37°C und 5% CO_2 stimuliert. Anschließend wurde die

Material und Methoden

Expression von CD25, Foxp3, GITR und CTLA-4 auf den aktivierten Zellen durchflußzytometrisch untersucht.

Für Suppressionsversuche mit induzierten Tregs (iTregs) wurden 3×10^6 CD4⁺CD25⁻ Zellen aus wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen mit plattengebundenen CD3 Ak (2 µg/ml) oder CD3/CD28 Ak (2 und 5 µg/ml) in Anwesenheit von TGF-β₁ (1 ng/ml) für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Die induzierten Foxp3⁺ Zellen wurden elektronisch sortiert und mit frisch isolierten CD4⁺CD25⁻ Zellen aus wt Mäusen in den angegebenen Verhältnissen in Kokultur gebracht und mit löslichem CD3 Ak (2 µg/ml) in Anwesenheit von 2×10^5 bestrahlten wt Milzzellen (30 Gy) 3 Tage bei 37°C stimuliert. Der ³[H]-Thymidineinbau erfolgte für 8 h.

2.2.8 Th17-Induktion

3×10^6 CD4⁺CD25⁻ Zellen aus wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen wurden mit plattengebundenen CD3/CD28 Ak (2 und 5 µg/ml) mit und ohne IL-6 (20 ng/ml) in Anwesenheit von TGF-β₁ (1 ng/ml) stimuliert. An Tag 3 wurden die Zellen durch Zugabe von PMA und Ionomycin (100 und 800 ng/ml) für 4 h in Anwesenheit von Brefeldin A (2 µg/ml) restimuliert. Durch FACS-Analyse wurde sodann die Expression von CD4, Foxp3 und IL-17 in den verschiedenen Zellansätzen bestimmt.

2.2.9 *In vitro* Apoptose Test

1×10^5 mittels Treg-Isolation-Kit isolierte CD4⁺CD25⁺ Zellen aus wt und PKBtg Mäusen wurden mit plattengebundenen CD3/CD28 Ak (1 und 3 µg/ml) in Anwesenheit oder ohne IL-2 (20 ng/ml) in 48 Loch-Platten stimuliert. Zur Bestimmung apoptotischer und toter Zellen wurden nach 3 und 5 Tagen die Proben mit FITC-gekoppeltem AnnexinV von BD Pharmingen (1:100) und Propidiumiodid (PI) (2 µg/ml) in 100 µl AnnexinV-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden 400 µl des AnnexinV-Puffers zu den Proben pipettiert und der prozentuale Anteil der lebenden AnnexinV⁻/PI⁻ Zellen innerhalb 1 h mittels FACS bestimmt.

2.2.10 *In vivo* Migration von wt und PKBtg nTregs

3×10^6 isolierte CD4⁺ T-Zellen aus wt und PKBtg Mäusen wurden gezählt und für Migrationsexperimente mit DDAO bzw. CFSE gefärbt. Wt CD4⁺ T-Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und das Pellet in 300 µl PBS je 1×10^6 Zellen aufgenommen und mit 0,5 µM DDAO 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbung durch Zugabe von PBS

Material und Methoden

5% FCS gestoppt. Nach 2-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS aufgenommen und erneut gezählt. PKBtg CD4⁺ T-Zellen wurden 3x mit RPMI 1640 ohne Zusätze gewaschen und das Zellpellet in 1 ml je 1x10⁷ Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 mM CFSE 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgten 2 Waschschriffe mit PBS und das erneute Zählen der Zellen. Wt und PKBtg Zellen wurden auf eine Konzentration von 1x10⁶ Zellen/50 µl eingestellt, im Verhältnis 1:1 gemischt und durchflußzytometrisch die korrekte Einstellung des Verhältnisses überprüft. Gegebenenfalls erfolgte die Zugabe CFSE⁺ bzw. DDAO⁺ Zellen und die erneute FACS-Kontrolle. Sodann wurden 100 µl des Zellgemisches intravenös in wt Mäuse injiziert. Nach 1, 4 und 12 h wurden die Tiere getötet und Milz und Lymphknoten entnommen. Durch FACS-Analyse wurde der prozentuale Anteil DDAO⁺ und CFSE⁺ Zellen bestimmt, wobei das DDAO-Signal über den FL4- und CFSE über den FL1-Kanal gemessen wurde.

2.2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.2.11.1 Herstellung von Proteinextrakten

Isolierte CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Zellen aus wt und PKBtg Mäusen wurden gezählt und 2x mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 100 µl eiskaltem Lysepuffer pro 1x10⁷ Zellen resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 30 min auf Eis. Zelltrümmer wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation (14000 rpm) auf den Boden des Eppendorfgefäßes sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, sofort mit 1x RotiLoad versetzt und die Proben 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.11.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteinlysate von 1x10⁶ FACS-sortierten oder mit dem Treg-Isolation-Kit isolierten CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Zellen aus wt und PKBtg Mäusen wurden in gleicher Proteinkonzentration gelelektrophoretisch im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dafür wurde das Mini Protean 3 Gel- und Transblotsystem von BIO-RAD verwendet. Es wurden 1,5 mm dicke Gele und 15 Zahn-Kämme für 25 µl Probe eingesetzt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurden 3 µl eines Protein-Standards (PageRuler 10-170 kDa von Fermentas) aufgetragen. Trenngele enthielten 10%, Sammelgele 5% Polyacrylamid. Die Elektrophorese erfolgte bei einer

Material und Methoden

Stromstärke von 40 mA in Elektrophoresepuffer für ca. 60-90 min, bis die Lauffront des Ladepuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.2.11.3 Western-Blot-Analyse

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Nass-Transfer (Mini Protean 3 Western Transblot System von BIO-RAD) auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V für 90 min in Blotpuffer. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran mit Ponceau Rot-Lösung gefärbt und anschließend 1 h in Block-Puffer bei Raumtemperatur langsam geschwenkt. Dies diente zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran. Die Inkubation der Membran in 10 ml Primärantikörper-Lösung erfolgte über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur bei langsamem Schwenken. Die Inkubation mit Sekundärantikörpern erfolgte 1 h bei Raumtemperatur. Ungebundene Ak wurden jeweils durch Waschen der Membran (3x10 min) in Waschpuffer entfernt. Die Detektion der so markierten Proteine erfolgte mit dem Chemielumineszenz Substrat SuperSignal West Pico von Thermo Scientific. Dabei katalysiert die am Sekundärantikörper gebundene *Horseradish Peroxidase* die Oxidation von Luminol bei der „kaltes“ Licht emittiert wird. Durch Belichtung von Röntgenfilmen (Super RX von Fuji) und anschließender Entwicklung mit dem Cawomat 2000 IR von Agfa konnte die Menge des spezifischen Proteins oder dessen Phosphorylierung auf der Membran detektiert werden.

2.2.12 EAE-Induktion

Wt, PKBtg, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäuse wurden mit 200 µg Myelin-Oligodendrozyten-Peptid p35-55 (MOG₃₅₋₅₅-Peptid) immunisiert, welches in 200 µl komplettem Freund's Adjuvanz mit 800 µg hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* gelöst wurde. Es wurden 50 µl der weißen Immunisierungspaste subkutan an den vier Flanken jeder Maus injiziert. Zusätzlich wurde an Tag 0 und Tag 2 intraperitoneal 200 ng in 200 µl PBS gelöstes Pertussis Toxin injiziert. Die EAE-Versuche wurden gemäß des Tierversuchsantrags und ethischen Grundsätzen durchgeführt. Tiere mit klinischen Merkmalen höher als Grad 3 wurden daher aus ethischen Gründen euthanisiert.

Material und Methoden

Der klinische Verlauf der Krankheit wurde täglich überprüft und nach folgender Graduierung beurteilt:

Grad	Symptome
0	keine Symptome
1	Tonusverlust des Schwanzes
2	Parese mind. einer hinteren Extremität
3	Plegie mind. einer hinteren Extremität
4	Parese mind. einer vorderen Extremität
5	Tetraplegie, Tod

2.2.13 Statistische Analyse der Daten

Die statistische Signifikanz von Unterschieden in der prozentualen Zellverteilung, Zellzahl und Proliferation wurden mit dem Student t-Test bestimmt. Der statistische Vergleich der EAE-Verläufe verschiedener Mauslinien wurde mit dem nonparametrischen Wilcoxon 2 Sample Test durchgeführt. p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Abweichung vom Mittelwert des EAE-Erkrankungsgrades wurde als mittlerer Standardfehler (SEM) angegeben. Dieser berechnet sich unter Einbeziehung der verwendeten Mausezahl aus der Standardabweichung. Hierbei wird die Standardabweichung mit der Wurzel der Mausezahl dividiert ($SEM = \frac{\text{Standardabweichung}}{\sqrt{\text{Mausezahl}}}$).

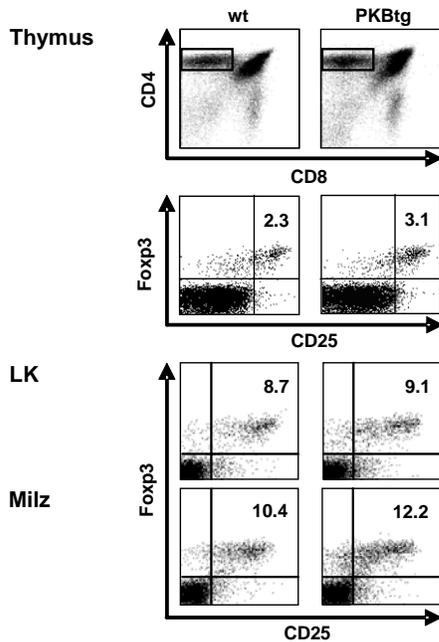
3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von PKB auf die Entwicklung und Funktion von Tregs

3.1.1 Verteilung von nTregs in wt und PKBtg Mäusen

Für die Entwicklung von nTregs im Thymus und deren Homöostase in der Peripherie sind Signale über den TCR und CD28-Korezeptor erforderlich (12, 173). Da PKB wesentlich an der Übertragung von TCR/CD28-Signalen beteiligt ist, wurde zunächst untersucht, ob erhöhte PKB-Signale in der T-Zelllinie die Entwicklung von nTregs beeinflussen.

A.



B.

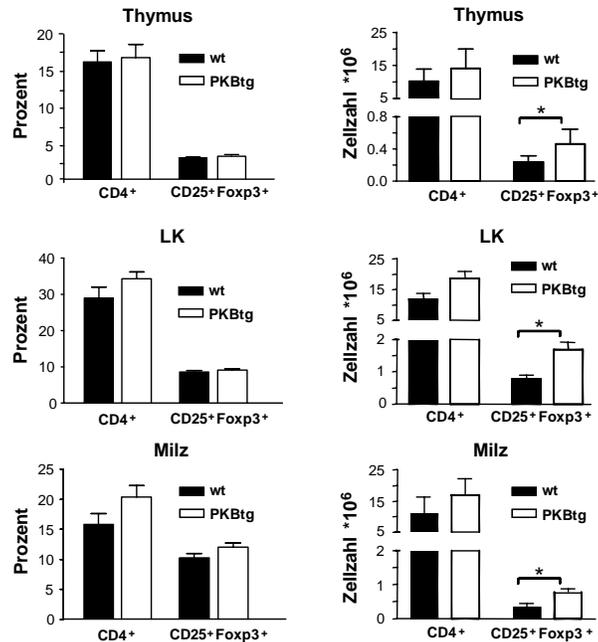


Abb. 8: Verstärkte PKB-Signale in wt Mäusen erhöhen die Anzahl von CD4⁺ T-Zellen und nTregs. Thymozyten wurden mit CD4-, CD8- und CD25-Ak, Lymphknoten- und Milzzellen mit CD4- und CD25-Ak gefärbt. Die Zellen wurden sodann durchflußzytometrisch analysiert. **A:** Prozentuale Verteilung der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in Thymus (n=7), Lymphknoten und Milz (n=4) von wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen. **B:** Absolute Zellzahlen der CD4⁺ und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in den entsprechenden Organen von wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen; *p<0,05

Ergebnisse

Für die Analyse der nTreg-Entwicklung in wt und PKBtg Mäusen wurden Tiere verwendet, in denen Foxp3 mit GFP (Foxp3-GFP) gekoppelt ist. Wie in Abb. 8A ersichtlich, exprimiert die Mehrzahl der CD4⁺CD25⁺ Zellen den Treg-Marker Foxp3. Die prozentuale Verteilung CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in wt und PKBtg Mäusen ist vergleichbar. Jedoch ist eine 2-fach erhöhte Zellzahl CD25⁺Foxp3⁺ nTregs in Thymus, Lymphknoten und Milz von PKBtg Mäusen zu beobachten (Abb. 8B). Zugleich wurde eine erhöhte Zellzahl CD4⁺ T-Zellen festgestellt. Dies zeigt, dass erhöhte PKB-Signale die Akkumulation von CD4⁺ Zellen und von nTregs fördern.

3.1.2 Verteilung von nTregs in CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäusen

CD28-Signale sind essentiell für die Entwicklung und Homöostase von Tregs (12). Da in CD28^{-/-} Mäusen die nTreg-Entwicklung stark reduziert ist (12) und PKB-Signale *downstream* von CD28 agieren, wurden CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäuse auf Foxp3-GFP Hintergrund hinsichtlich der prozentualen Verteilung und Zellzahl von nTregs in Thymus, Lymphknoten und Milz untersucht.

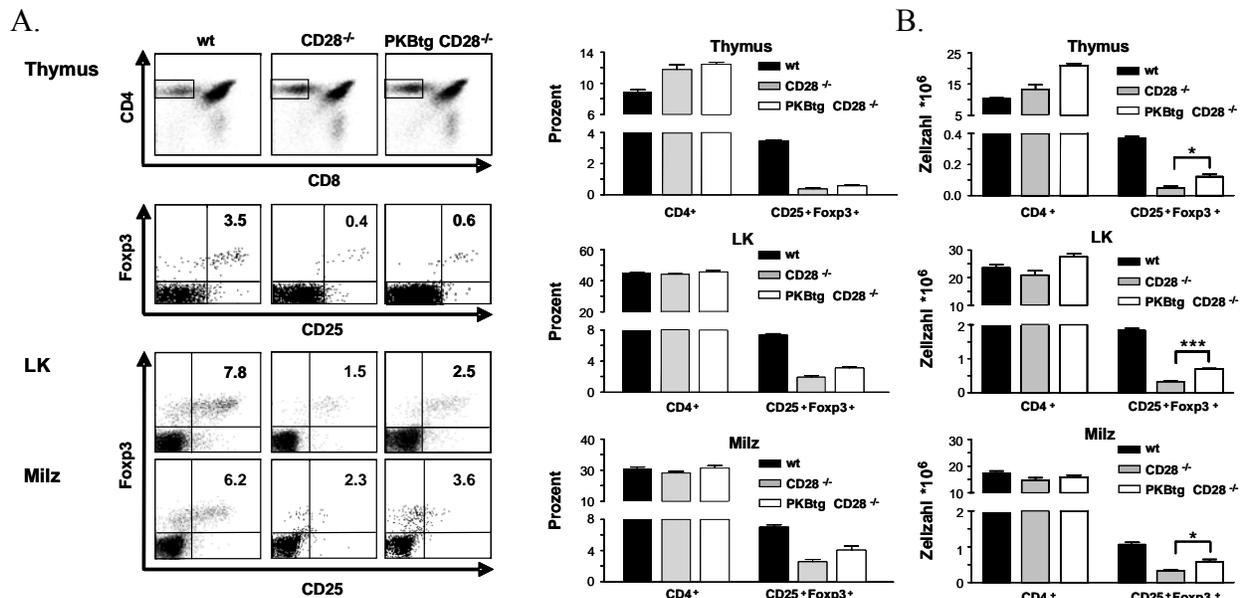


Abb. 9: Verstärkte PKB-Signale fördern die Ausbildung von nTregs in CD28^{-/-}-Mäusen nur bedingt. Thymozyten von wt, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäusen wurden mit CD4-, CD8- und CD25-Ak, Lymphknoten- und Milzzellen mit CD4- und CD25-Ak gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. **A:** Prozentuale Verteilung der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTregs in Thymus, Lymphknoten und Milz von wt, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Foxp3-GFP Mäusen (je n=4). **B:** Absolute Zellzahlen für CD4⁺ und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in den entsprechenden Organen von wt, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäusen auf Foxp3-GFP Hintergrund; * p<0,05 und *** p<0,001.

Ergebnisse

Abb. 9 zeigt, dass in CD28^{-/-} Mäusen im Vergleich zu wt Mäusen in allen untersuchten Organen der Prozentsatz und die Zellzahl von nTregs stark reduziert ist. Die Expression tg PKB in CD28^{-/-} Mäusen führt zu einer leichten Erhöhung des Prozentsatzes und der Zellzahl CD4⁺ Zellen in Thymus und Lymphknoten und zu einer 2-fachen Zunahme an nTregs in Thymus, Lymphknoten und Milz. Die absolute Zellzahl von nTregs in PKBtg CD28^{-/-} ist im Vergleich zu wt Mäusen dennoch stark verringert (Abb. 9B). Dies zeigt, dass verstärkte PKB-Signale nur einen begrenzten Einfluss auf die Bildung von nTregs ausüben und diesbezüglich CD28-Signale nicht vollständig ersetzen können.

3.1.3 Expression von Treg-Markern auf wt und PKBtg nTregs

nTregs sind als CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen beschrieben. Darüber hinaus exprimieren sie verschiedene Oberflächenmoleküle, über die ihre Funktion (CTLA-4, GITR), das Überleben (IL-7R, OX40), die Aktivität (CD45RB, GARP) und ihre Migration (CD62L, LFA-1, CD103) gesteuert werden. Es wurde zunächst analysiert, ob sich wt und PKBtg nTregs hinsichtlich der Expression dieser Moleküle unterscheiden.

3.1.3.1 Expression von GITR und CTLA-4 auf wt und PKBtg nTregs

Die vorherigen Analysen zeigten, dass verstärkte PKB-Signale die Anzahl von nTregs steigern. Die Funktion von nTregs wird zum Teil über verschiedene Oberflächenmoleküle reguliert (20, 21, 25). Um Rückschlüsse auf den Einfluss aktiver PKB auf die Funktion von nTregs zu ziehen, wurde der Phänotyp von nTregs aus wt und PKBtg Mäusen verglichen. GITR unterstützt als kostimulatorisches Molekül die Proliferation von nTregs und CTLA-4 spielt eine wichtige Rolle bei der Suppressorfunktion von nTregs. Abb. 10 zeigt, dass bezüglich der GITR-Expression keine Unterschiede zwischen wt und PKBtg nTregs festgestellt wurden. Wt nTregs zeigten jedoch eine signifikant stärkere Expression von CTLA-4 im Vergleich zu PKBtg nTregs. Die veränderte CTLA-4-Expression lässt vermuten, dass aktive PKB die supprimierenden Eigenschaften von nTregs beeinflussen könnte.

Ergebnisse

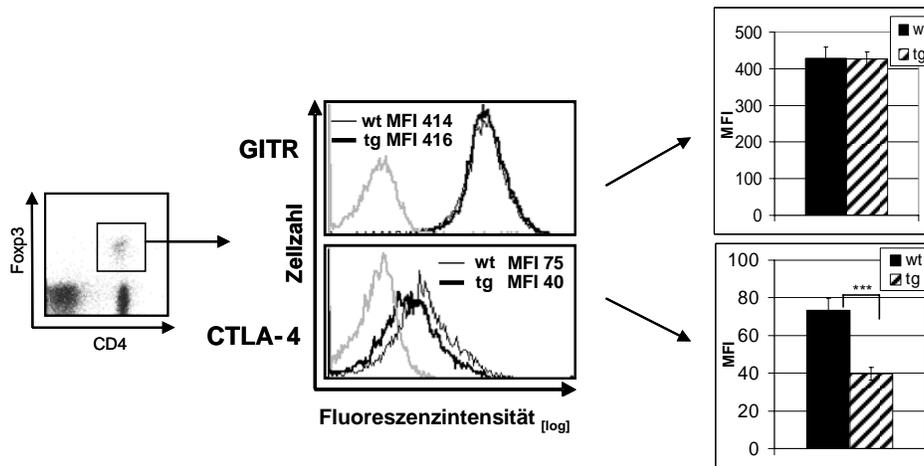


Abb. 10: **Verminderte CTLA-4-Expression auf PKBtg nTregs.** Expression von GITR und CTLA-4 auf wt (dünne Linien) und PKBtg (dicke Linien) nTregs. Die graue Linie zeigt die Isotypkontrolle der jeweiligen Färbung. Die MFI (*mean fluorescent intensity*)-Werte der Graphen repräsentieren den Mittelwert aus jeweils 4 wt und PKBtg Mäusen. Die Histogramme zeigen ein repräsentatives von 3 Experimenten; *** $p < 0,001$.

3.1.3.2 Expression von CD62L und LFA-1 auf wt und PKBtg nTregs

Um den nTreg-Phänotyp weiter zu charakterisieren, wurde die Expression von CD62L und LFA-1 auf wt und PKBtg nTregs bestimmt. Der *homing* Rezeptor CD62L ermöglicht das Eintreten der Lymphozyten in die Lymphknoten und LFA-1 vermittelt das Einwandern der Zellen in den Entzündungsherd. Bezüglich der CD62L-Expression wurden in der Durchflusszytometrie drei Populationen ermittelt, CD62L^{low/neg}, CD62L^{medium} und CD62L^{high} Zellen (Abb. 11). Der prozentuale Anteil der CD62L^{low/neg} Zellen in der PKBtg nTreg-Population war im Vergleich zu wt nTregs leicht erhöht, die PKBtg CD62L^{medium} und CD62L^{high} nTreg-Populationen waren dagegen verringert. Der prozentuale Anteil LFA-1^{high} PKBtg nTregs war im Vergleich zu den wt nTregs leicht, aber signifikant erhöht. Auch die Expressionsstärke von LFA-1 auf nTregs (wt: MFI 362, tg: MFI 429) war in den PKBtg Mäusen leicht erhöht. Verstärkte PKB-Aktivität beeinflusst somit die Expression, wenn auch in geringem Maße, von Rezeptoren, welche die Migration von T-Zellen regulieren, was zu einer veränderten Migration PKBtg nTregs führen könnte.

Ergebnisse

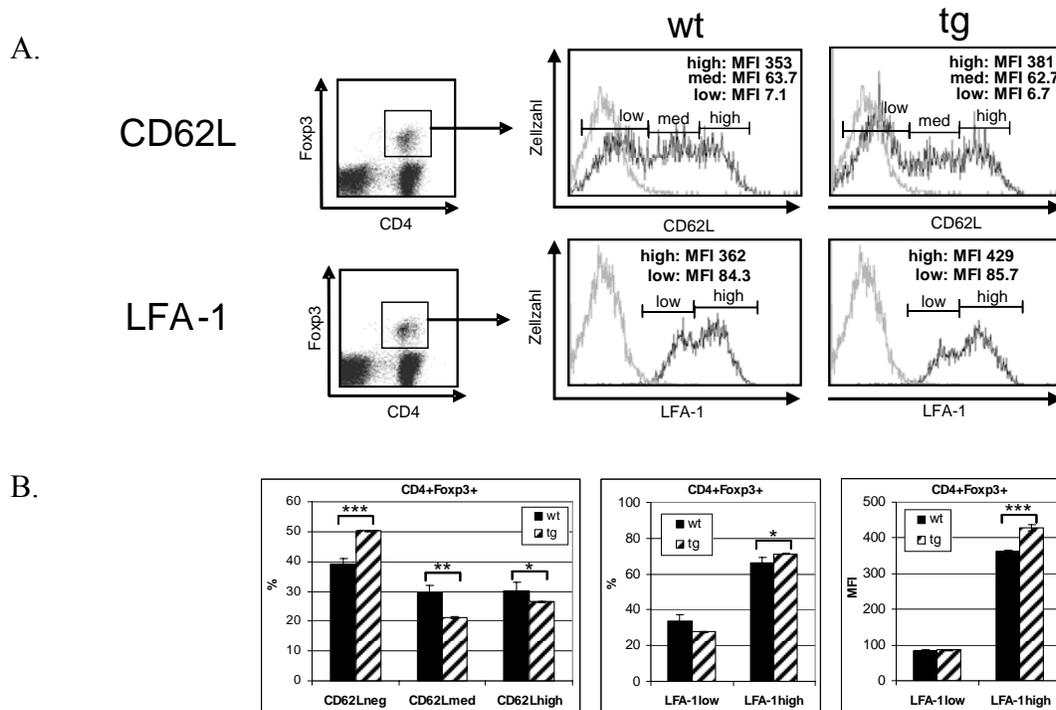


Abb. 11: **Veränderte Expression von CD62L und LFA-1 auf PKBtg nTregs.** **A:** Expression von CD62L und LFA-1 auf wt und PKBtg nTregs. Die graue Linie in den Histogrammen zeigt die Isotypkontrolle der jeweiligen Färbung. Die angezeigten MFIs repräsentieren den Mittelwert aus je 4 wt und PKBtg Mäusen. **B:** Die Graphen zeigen die statistische Auswertung zur Expression von CD62L und LFA-1 auf wt und PKBtg nTregs. Abb. 11 stellt ein repräsentatives von 3 Experimenten dar; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3.1.3.3 Expression von CD103 auf wt und PKBtg nTregs

CD103, ein αE -Integrin, spielt eine wesentliche Rolle für den Verbleib eingewanderter Zellen im Gewebe. Nach Expression von CD103 werden die Zellen durch dessen Interaktion mit Epithelzellen daran gehindert, das Gewebe wieder zu verlassen (84, 85). Abb. 12 zeigt, dass $CD4^+Foxp3^-$ Zellen kein CD103 auf der Oberfläche exprimieren. Die Mehrheit $CD4^+Foxp3^+$ nTregs von wt und PKBtg Mäusen zeigen dagegen eine mittlere bis starke CD103-Expression. Die Stärke der CD103-Expression war zwischen wt und PKBtg Tregs jedoch vergleichbar. Erhöhte PKB-Signale haben daher unter nicht-inflammatorischen Bedingungen keinen Einfluss auf die CD103-Expression von nTregs.

Ergebnisse

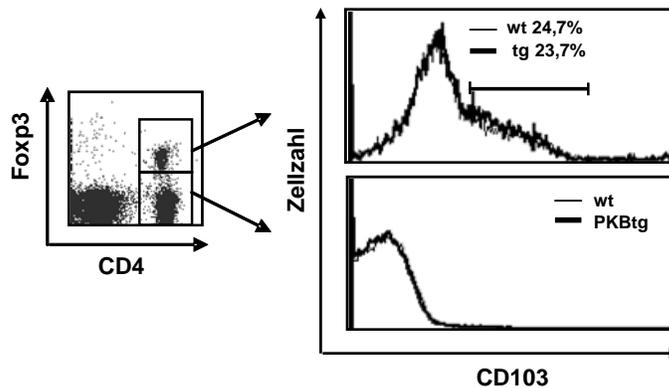


Abb. 12: **Expression von CD103 auf wt und PKBtg nTregs sowie CD4⁺Foxp3⁺ Zellen.** Die dünnen Linien in den Histogrammen zeigen die CD103-Expression auf wt, die dicken Linien die Expression von CD103 auf PKBtg Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von jeweils 4 analysierten Mäusen.

3.1.3.4 Expression von IL-7R und OX40 auf wt und PKBtg nTregs

nTregs sind für das Überleben auf über den IL-7R vermittelte Signale angewiesen (46, 47). Signale über OX40 fördern ebenfalls das Überleben von nTregs, sie verringern jedoch ihre Suppressoraktivität (50). Anhand Abb. 13A zeigten PKBtg nTregs keine und wt nTregs eine nur sehr schwache Expression des IL-7R.

Bezüglich der OX40-Expression waren 80% der wt und PKBtg nTregs positiv. PKBtg nTregs zeigten einen leicht geringeren Prozentsatz und leicht verringerte MFI-Werte innerhalb der OX40^{high}-Zellen (Abb. 13B). Die Expression der mit dem Überleben von nTregs zusammenhängenden untersuchten Rezeptoren wird daher durch erhöhte PKB-Signale kaum beeinflusst.

Ergebnisse

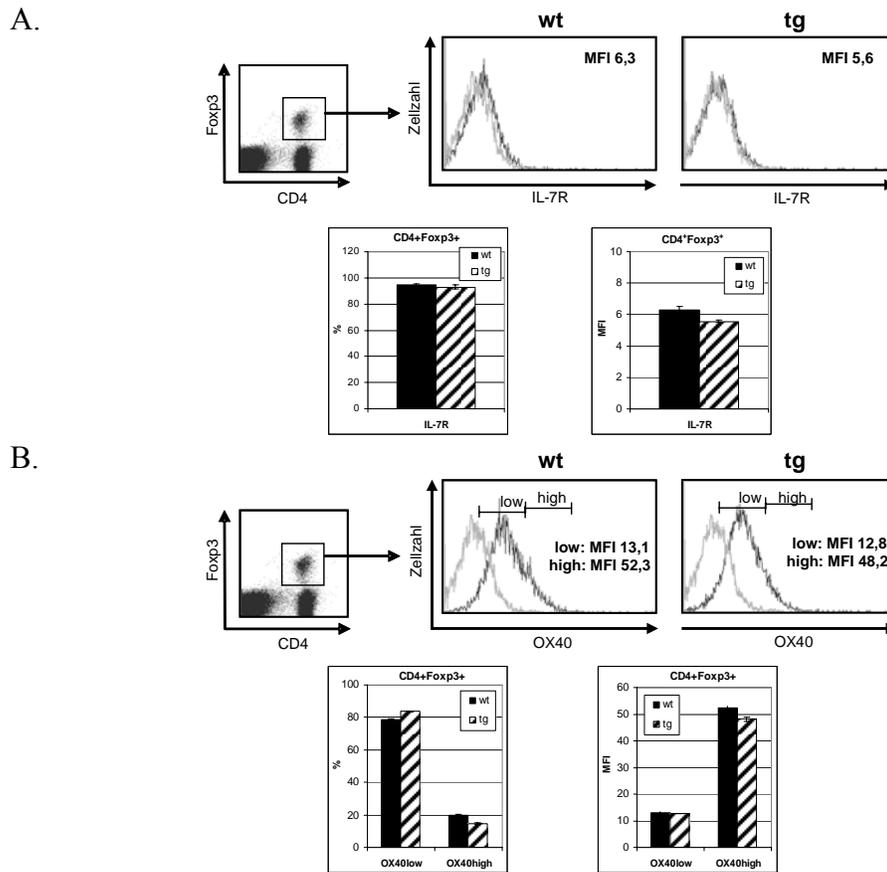


Abb. 13: **Expression von IL-7R und OX40 auf wt und PKBtg nTregs.** Die Histogramme zeigen die Expression des IL-7R (**A**) und von OX40 (**B**) auf wt und PKBtg nTregs. Die grauen Linien in den Histogrammen zeigen die Isotypkontrolle der jeweiligen Färbung. Die angezeigten MFIs und die prozentuale Verteilung in den Graphen repräsentieren den Mittelwert aus jeweils 4 wt und PKBtg Mäusen.

3.1.3.5 Expression von CD45RB auf wt und PKBtg nTregs

Die Tyrosin-Phosphatase CD45 ist für eine effiziente Signaltransduktion nach Stimulation über den TCR und Zytokinrezeptoren essentiell. Dephosphorylierung der Src-Kinasen Lck und Fyn durch CD45 initiiert die Aktivierung der Rezeptor-vermittelten Signalkaskade (174). Es wurde gezeigt, dass nTregs mit hoher Suppressorkapazität eine schwache CD45RB-Expression aufweisen. In den untersuchten nTreg-Populationen wurden Zellen mit hoher, mittlerer und schwacher Expressionsstärke von CD45RB ermittelt. In wt nTregs war der Prozentsatz von CD45RB^{medium} und CD45RB^{high} Zellen im Vergleich zu PKBtg nTregs nur leicht erhöht (Abb.

Ergebnisse

14). Der Prozentsatz PKBtg $CD45RB^{neg/low}$ nTregs war im Vergleich zu wt nTregs dagegen schwach erhöht, aber nicht signifikant. Die Daten weisen demnach darauf hin, dass erhöhte PKB-Signale die CD45RB-Expression auf nTregs nicht wesentlich beeinflussen.

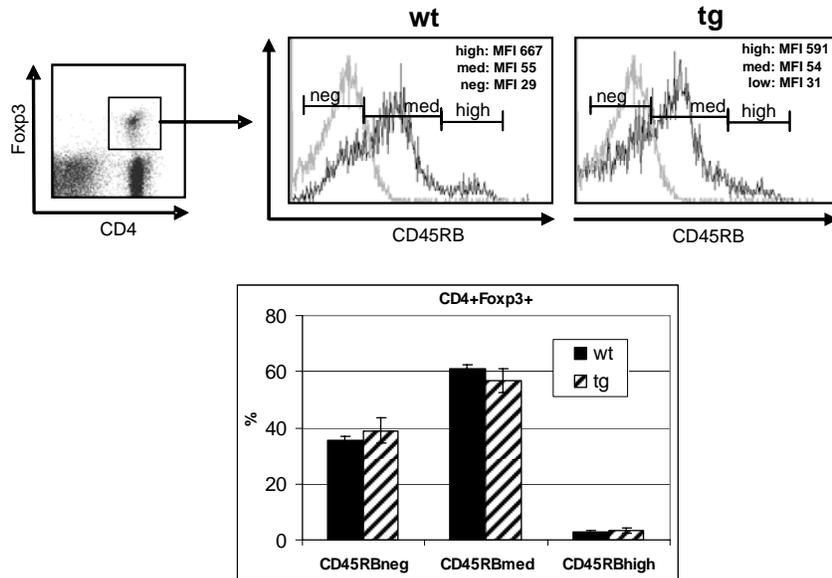


Abb. 14: **Expression von CD45RB auf wt und PKBtg nTregs.** Die graue Linie in den Histogrammen zeigt die Isotypkontrolle der jeweiligen Färbung. Die angezeigten MFIs und prozentualen Verteilungen repräsentieren den Mittelwert aus jeweils 4 wt und PKBtg Mäusen.

3.1.3.6 Expression von GARP auf wt und PKBtg nTregs

Das kürzlich beschriebene Oberflächenmolekül GARP (*glycoprotein-A repetitions predominant*) wird auf aktivierten nTregs, jedoch nicht auf konventionellen T-Zellen exprimiert, und aktivierte GARP⁺ nTregs zeigen starke suppressierende Eigenschaften (30, 32). Daher wurde auch die GARP-Expression auf wt und PKBtg nTregs sowie konventionellen T-Zellen untersucht (Abb. 15). Die Analysen zeigten, dass CD4⁺Foxp3⁻ Zellen aus wt und PKBtg Mäusen keine GARP-Expression aufweisen. Dagegen exprimierten nTregs beider Mauslinien GARP auf der Oberfläche und mit gleicher Intensität. Erhöhte PKB-Aktivität hat somit keinen Einfluss auf die GARP-Expression von nTregs.

Ergebnisse

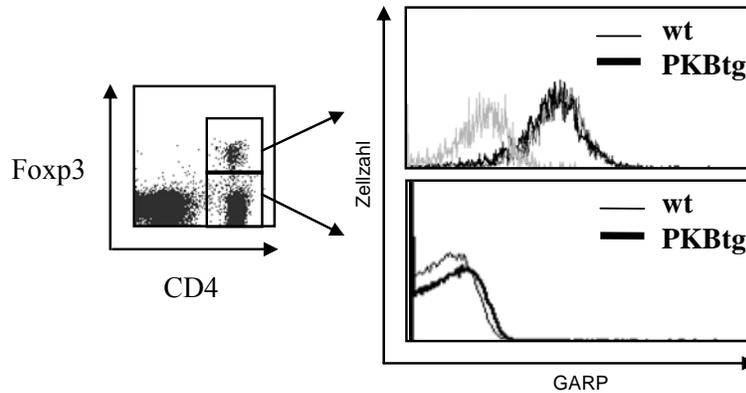


Abb. 15: **Expression von GARP auf wt und PKBtg nTregs sowie CD4⁺Foxp3⁻ Zellen.** Die dünne Linie in den Histogrammen zeigt die GARP-Expression der wt Zellen. Die Expression von GARP auf PKBtg Zellen wird durch dicke Linien angezeigt. Als graue Linie ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines Experiments mit jeweils 4 wt und PKBtg Mäusen.

Insgesamt ergaben obige Analysen, dass sich wt und PKBtg nTregs im Expressionsmuster der untersuchten Oberflächenmoleküle nur wenig unterscheiden. Verstärkte PKB-Signale führen aber dazu, dass PKBtg nTregs einen leicht „aktivierteren“ Phänotyp aufweisen als wt nTregs. Der markanteste Unterschied war die verringerte CTLA-4-Expression auf PKBtg nTregs, was darauf hinweist, dass erhöhte PKB-Signale in nTregs mit einer Abschwächung der CTLA-4-Expression „kompensiert“ werden könnten.

3.1.4 Untersuchungen zur Suppressoraktivität von wt und PKBtg nTregs

Die Untersuchungen zur Expression von CTLA-4 und OX40 deuteten darauf hin, dass erhöhte PKB-Signale einen Einfluss auf die Funktion von nTregs haben könnten. Um dies zu klären, wurden konventionelle CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (als Effektorzellen bezeichnet) von wt und PKBtg Mäusen in Kokultur mit wt oder PKBtg nTregs untersucht. Im Teff:nTreg-Verhältnis von 5:1 und 10:1 zeigten PKBtg nTregs im Vergleich zu wt nTregs eine verstärkte Suppression der wt Effektorzellen (Abb. 16 schwarze Balken). Interessanterweise waren PKBtg Effektorzellen (gestreifte Balken) resistenter gegen Suppression durch wt und PKBtg nTregs als entsprechende wt Effektorzellen. Bei einem Teff:nTreg-Verhältnis von 5:1 und 10:1 proliferierten PKBtg Effektorzellen 1,5 bis 4 mal stärker als wt Effektorzellen, was eine schwächere Supprimierbarkeit der PKBtg Effektorzellen durch nTregs anzeigt. Allerdings gab es keine Unterschiede bei der

Ergebnisse

Suppression PKBtg Effektorzellen durch wt bzw. PKBtg nTregs. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PKBtg nTregs erhöhte Suppressoraktivität aufweisen und PKBtg Effektorzellen deutlich resistenter gegenüber nTreg-vermittelter Suppression sind.

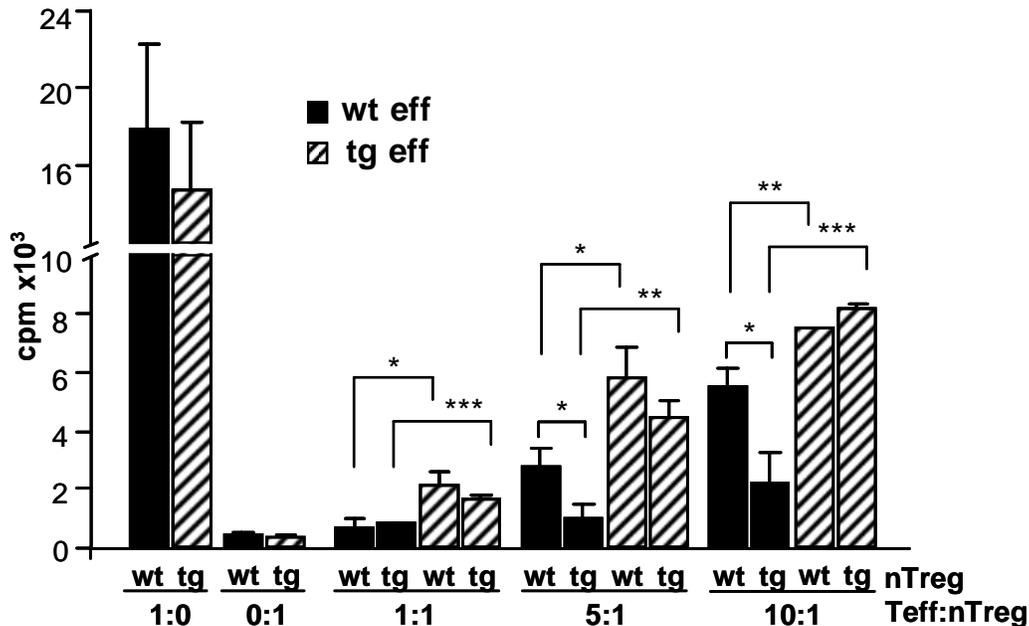


Abb. 16: **Suppressoraktivität von wt und PKBtg nTregs und Supprimierbarkeit von wt und PKBtg CD4⁺CD25⁻ T-Zellen.** Wt (schwarze Balken) und PKBtg (gestreifte Balken) CD4⁺CD25⁻ (Teff) Zellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit nTregs aus wt und PKBtg Mäusen in Gegenwart von bestrahlten Milzzellen und CD3-Ak kokultiviert. Nach 72 h wurde mittels ³[H]-Thymidineinbau (cpm) die Proliferation der Teff-Zellen bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives von 3 Experimenten; * p<0,05 ; ** p<0,01 und *** p<0,001.

3.1.5 Proliferation von nTregs

Wie zuvor in Abb. 8 und 9 gezeigt, führen erhöhte PKB-Signale in PKBtg Mäusen zu einer erhöhten Anzahl von nTregs im Thymus und den peripheren lymphatischen Organen. Mögliche Ursachen dafür könnten u.a. eine verstärkte homöostatische Proliferation oder ein besseres Überleben PKBtg nTregs sein. Daher wurde die Reaktion der nTreg-Populationen auf Stimulation *in vitro* untersucht. *Ex vivo* FACS-sortierte wt und PKBtg CD4⁺CD25⁺ Zellen wurden mit CD3+CD28-Ak in An- oder Abwesenheit von IL-2 stimuliert. Nach 3 Tagen erfolgte die Messung der Proliferation mittels ³[H]-Thymidineinbau. Zusätzlich wurde unter gleichen

Ergebnisse

Stimulationsbedingungen die Anzahl der Zellteilungen bestimmt. Dafür wurden MACS-isolierte $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^-$ Zellen von wt und PKBtg Mäusen vor der Stimulation mit CFSE markiert und an Tag 3 durchflußzytometrisch analysiert.

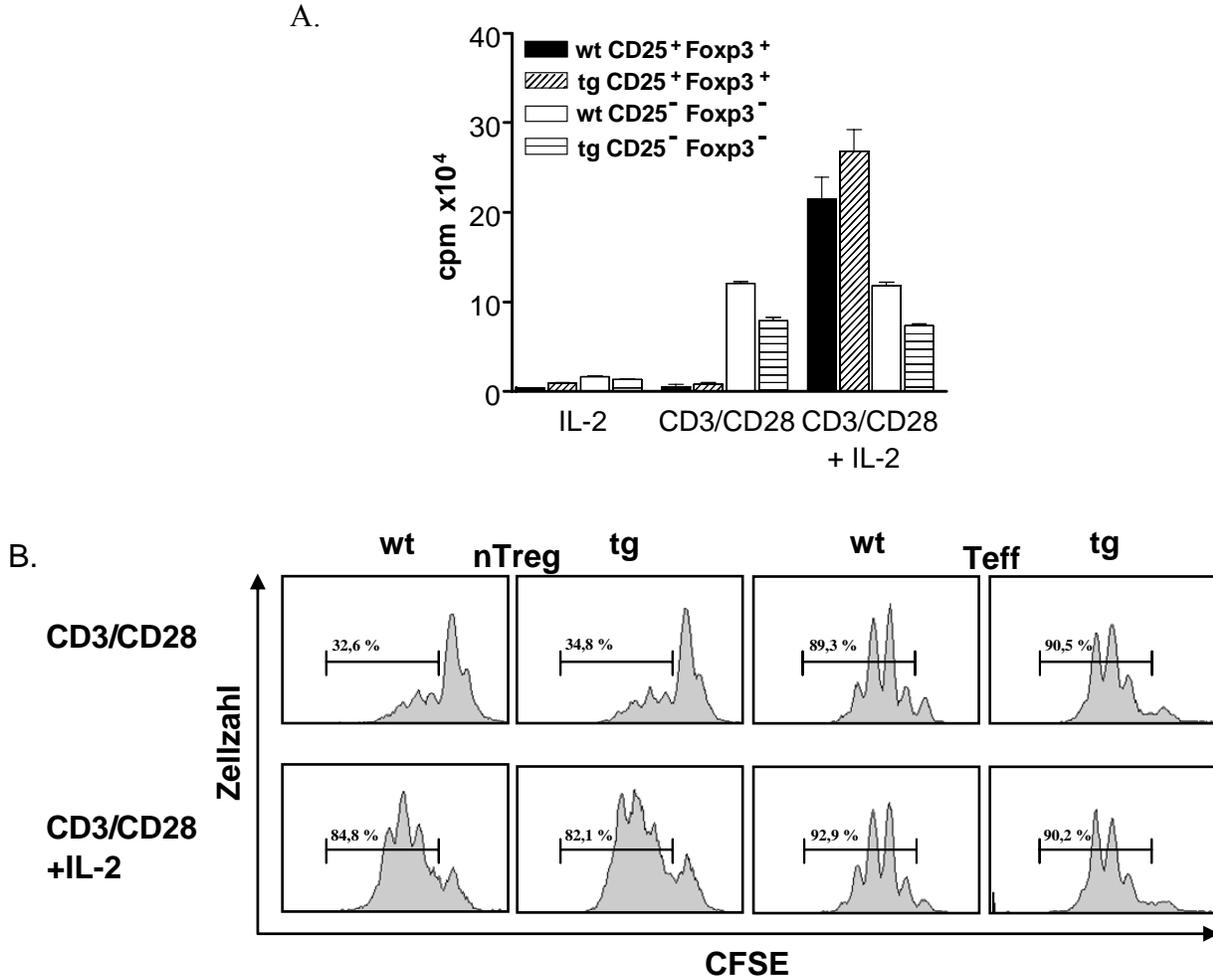


Abb. 17: **PKBtg nTregs benötigen exogenes IL-2 für die Proliferation.** **A.** FACS-sortierte wt und PKBtg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ und $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ Zellen wurden entweder mit IL-2, CD3+CD28-Ak oder in Kombination mit IL-2 stimuliert. Nach 72 h wurde mittels $^3[H]$ -Thymidineinbau (cpm) die Proliferation der Zellen bestimmt. **B.** MACS-isolierte $CD4^+CD25^+$ Zellen und $CD4^+CD25^-$ Zellen aus wt und PKBtg Mäusen wurden mit CFSE markiert und mit CD3+CD28-Ak in An- oder Abwesenheit von IL-2 stimuliert. Nach 72 h wurde die Expansion der Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Der prozentuale Anteil der proliferierten Zellen ist in den jeweiligen Histogrammen angezeigt.

Ergebnisse

Wie in Abb. 17A dargestellt, zeigten PKBtg nTregs, ebenso wie wt nTregs, keine signifikante Reaktion auf Stimulation mit IL-2 allein oder auf CD3+CD28-Ak. Bei Zugabe von IL-2 zu CD3+CD28-Ak-stimulierten wt und PKBtg nTregs konnte für beide nTreg-Populationen eine starke Proliferation beobachtet werden, wobei die PKBtg nTregs sogar eine erhöhte Proliferation zu dem gemessenen Zeitpunkt aufwiesen. Die entsprechenden CD4⁺CD25⁻ Zellen reagierten dagegen auf alleinige Stimulation mit CD3+CD28-Ak, und Zugabe von IL-2 verstärkte deren Proliferation zu dem gemessenen Zeitpunkt nicht. Abb. 17B zeigt die Zellteilungen der CFSE-markierten Zellen. Stimulation mit CD3+CD28-Ak führte nur bei einer Subpopulation (30-40%) zu einer erheblichen und vergleichbaren Expansion der wt und PKBtg nTregs. Konventionelle T-Zellen beider Mauslinien dagegen zeigten intensive Zellteilungen nach alleiniger CD3+CD28-Ak-Stimulation und die Zugabe von IL-2 hatte keinen verstärkenden Effekt auf die Zellteilungen. Jedoch förderte exogenes IL-2 die Proliferation CD3+CD28-Ak-stimulierter nTregs in wt und PKBtg Kulturen drastisch (82-85%) und in gleichem Ausmaß. Die Ergebnisse zeigen daher, dass PKBtg nTregs „anerg“ sind und ebenso wie wt nTregs bezüglich der Proliferation auf exogenes IL-2 angewiesen sind.

3.1.6 Überleben von nTregs *in vitro*

Wie zuvor dargelegt, könnte ein erhöhtes Überleben PKBtg nTregs eine Ursache für die erhöhte Anzahl von nTregs in PKBtg Mäusen sein. Ebenso könnte ein verstärktes Überleben zur erhöhten Suppressoraktivität PKBtg nTregs, wie sie in Suppressionstests (Abb. 16) zu beobachten war, beitragen. Zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit wurden nTregs aus wt und PKBtg Mäusen isoliert und *in vitro* in An- und Abwesenheit von IL-2 mit CD3+CD28-Ak stimuliert. Nach 3 und 5 Tagen wurden die stimulierten Zellen mit AnnexinV und Propidiumiodid (PI) gefärbt, um die Anzahl der lebenden Zellen zu ermitteln (Abb. 18). Wie in Abb. 18 gezeigt, wurden nach 3 Tagen in Abwesenheit von IL-2 vergleichbar viele AnnexinV/PI⁻, d.h. lebende wt und PKBtg nTregs ermittelt. Überraschenderweise waren in Anwesenheit von IL-2 weniger PKBtg nTregs AnnexinV/PI⁻, obgleich IL-2-Zugabe das Überleben in beiden Kulturen signifikant förderte. Nach 5-tägiger Kultur ohne IL-2 waren 16% der wt nTregs und 11% der PKBtg nTregs lebendig. IL-2-Zugabe förderte das Überleben von wt und PKBtg nTregs, jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden nTreg-Populationen. Insgesamt zeigen die Experimente, dass erhöhte Signale der „Überlebenskinase“ PKB in nTregs deren Überleben *in vitro* nicht fördern.

Ergebnisse

A.

3 Tage				
Exp.	wt	PKBtg	wt	PKBtg
1	12,5	12,4	34,4	25,9
2	16,5	19,9	32,6	24,5
3	25,5	19,3	29,4	27,7
4	16	15,4	28,7	27,4
Ø	18,0%	16,8%	31,3%	26,4%
	CD3/CD28		CD3/CD28 + IL-2	

5 Tage				
Exp.	wt	PKBtg	wt	PKBtg
1	21,4	15,5	30,5	23,0
2	12,6	9,9	21,9	21,1
3	13,8	13,2	25,5	19,5
Ø	16,0%	11,1%	26,0%	21,2%
	CD3/CD28		CD3/CD28 + IL-2	

B.

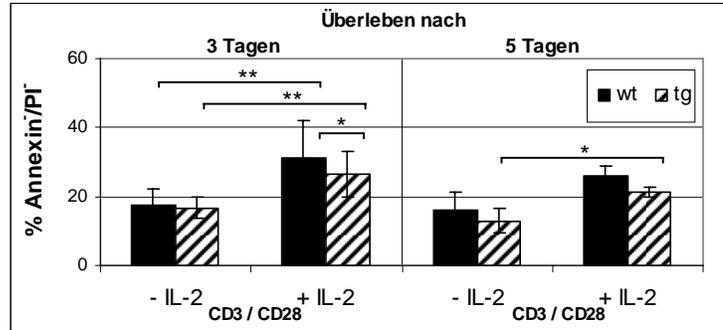


Abb. 18: **Überleben von wt und PKBtg nTregs *in vitro***. MACS-isolierte wt und PKBtg nTregs wurden in An- und Abwesenheit von IL-2 mit CD3+CD28-Ak für 3 und 5 Tage stimuliert. Sodann wurde der jeweilige Prozentsatz lebender AnnexinV/PI⁺ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. **A:** Die Tabellen zeigen den prozentualen Anteil überlebender wt und PKBtg nTregs nach 3 und 5 Tagen von 3-4 Versuchen. **B:** Der Graph zeigt den Prozentsatz lebender wt und PKBtg nTregs von 4 bzw. 3 Experimenten; ** p<0,01 ; * p<0,05.

3.1.7 Nachweis transgener PKB-Signale in nTregs

Um zu klären, in wieweit der PKB-Signalweg in PKBtg nTregs angeschaltet ist, wurde die Expression bzw. Phosphorylierung von PKB, den PKB-Substraten *Tuberous sclerosis protein 2* (TSC2) und Glykogensynthase-Kinase3 β (GSK3 β) sowie die Phosphorylierung von ribosomalem Protein S6 (S6) in *ex vivo* isolierten wt und PKBtg nTregs und CD4⁺CD25⁻ Zellen untersucht. Western-Blot-Analysen (Abb. 19) zeigten, dass nTregs aus PKBtg Mäusen neben endogener PKB auch tg PKB exprimieren. Außerdem ist in PKBtg nTregs PKB an Serin 473 phosphoryliert, was auf einen aktivierten Zustand der tg PKB hinweist. Wt nTregs zeigten hingegen keine phosphorylierte PKB. PKBtg nTregs wiesen im Vergleich mit wt nTregs zudem eine stärkere Phosphorylierung von TSC2 und GSK3 β , jedoch nicht von S6 auf.

Ergebnisse

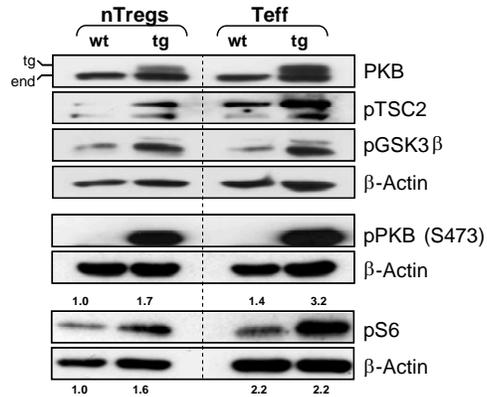


Abb. 19: **PKB-Signalgebung in wt und PKBtg nTregs und konventionellen T-Zellen.** MACS-isolierte $CD4^+CD25^-$ (Teff) und nTregs aus wt und PKBtg Mäusen wurden in Western-Blot-Analysen hinsichtlich der Expression und Phosphorylierung der angezeigten Proteine untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives von 3 Experimenten. Die angegebenen Zahlen kennzeichnen die relative Expression des entsprechenden Proteins im Vergleich zur Expression in wt nTregs nach densitometrischer Evaluation.

Die Expression aktiver tg PKB wurde ebenfalls in PKBtg Teff-Zellen vorgefunden, und diese wiesen im Vergleich mit wt Teff-Zellen eine stärkere Phosphorylierung von TSC2, GSK3β und S6 auf (Abb. 19 rechter Teil). Die Phosphorylierung von TSC2 und S6 in PKBtg nTregs war im Vergleich zu PKBtg $CD4^+CD25^-$ Zellen etwas geringer. Dies zeigt, dass aktive PKB in tg nTregs exprimiert ist, aber im Vergleich zu tg $CD4^+CD25^-$ Zellen eine schwächere und hinsichtlich S6 veränderte Signalgebung aufweist.

3.2 Untersuchungen zur Induktion peripherer Tregs (iTregs)

3.2.1 *In vitro* Induktion von wt und PKBtg $CD4^+CD25^+$ iTregs

TCR- plus CD28-Signale führen in Anwesenheit von $TGF\beta_1$ zur Induktion $CD25^+Foxp3^+$ Tregs (iTregs) aus naiven peripheren T-Zellen (66). Es sollte untersucht werden, ob TCR+ $TGF\beta_1$ -Signale allein, d.h. ohne CD28-Kostimulation, ausreichend sind, PKBtg $CD4^+CD25^-$ Zellen in $CD4^+Foxp3^+$ Zellen zu differenzieren. Wt und PKBtg $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden daher mit CD3-Ak allein bzw. CD3+CD28-Ak in Anwesenheit von $TGF\beta_1$ stimuliert.

Ergebnisse

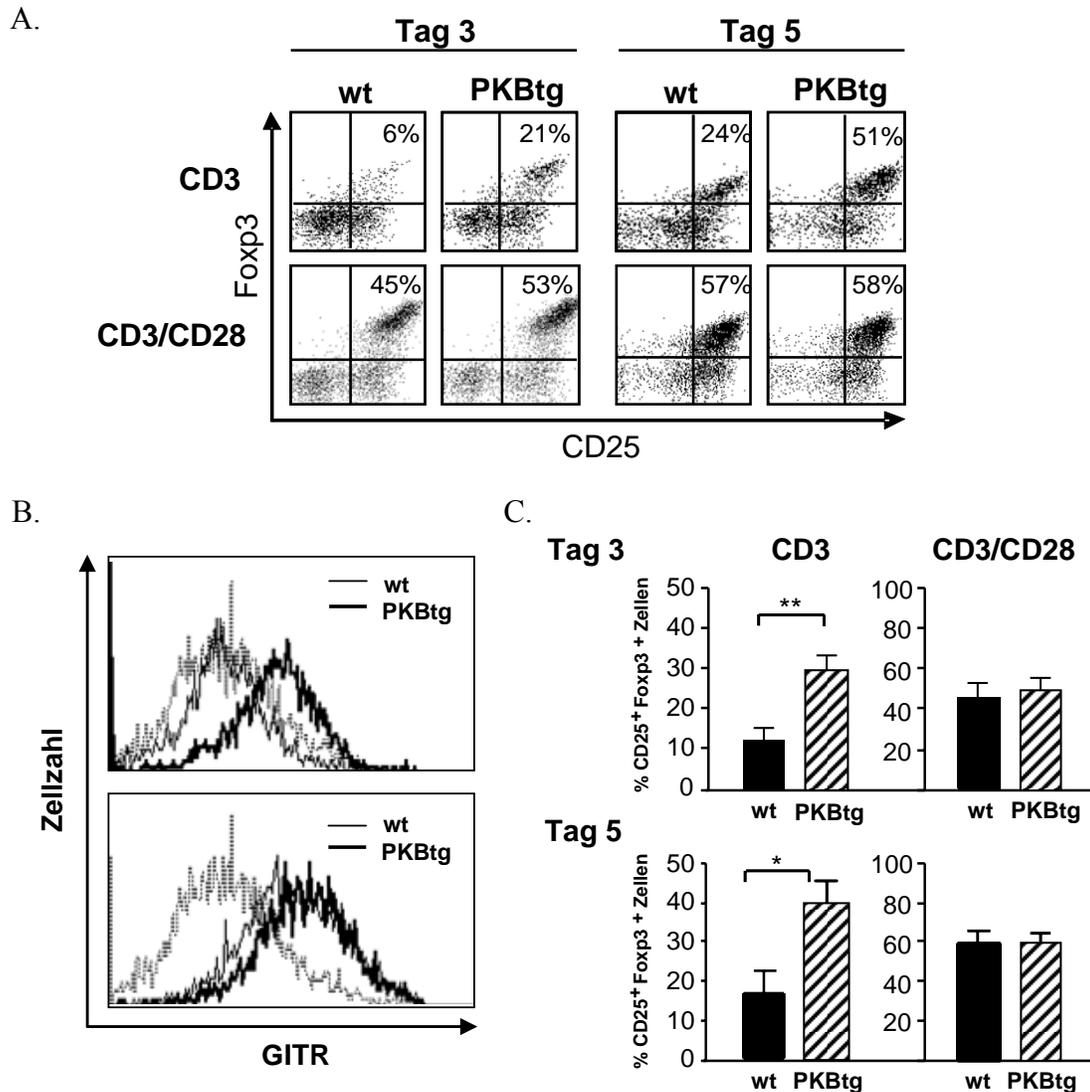


Abb. 20: **Verstärkte PKB-Signale fördern die Foxp3-Induktion und die Ausbildung eines Treg-Phänotyps.** CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen wurden 3 und 5 Tage in Anwesenheit von TGFβ₁ (1 ng/ml) mit CD3-Ak oder mit CD3 (2 μg/ml) + CD28-Ak (5 μg/ml) stimuliert. Die Expression von CD25, Foxp3 und GITR wurde mittels FACS analysiert. **A.** Prozentuale Verteilung CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in wt und PKBtg Kulturen. Gezeigt ist eine repräsentative FACS-Analyse von 3 Experimenten **B.** GITR-Expression auf wt (dünne Linie) und PKBtg (dicke Linie) CD25⁺Foxp3⁺ Zellen nach 3 Tagen. Die grauen Linien repräsentieren die Isotypkontrolle der jeweiligen Färbung. **C.** Prozentuale Verteilung CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in wt und PKBtg Kulturen nach 3- und 5-tägiger Stimulation mit CD3-Ak bzw. CD3+CD28-Ak in Anwesenheit von TGFβ. Dargestellt sind die Resultate von 3 unabhängigen Experimenten; * p<0,05 und ** p<0,01.

Ergebnisse

Nach 3 und 5 Tagen wurde die Expression von CD25 und Foxp3 in den kultivierten Zellen analysiert. Nach Stimulation mit CD3+CD28-Ak für 3 Tage waren 45% CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in den wt Kulturen und 53% CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in den PKBtg Kulturen vorhanden (Abb. 20A, C). Nach 5 Tagen exprimierten 57% der wt und 58% der PKBtg Zellen die Treg-Marker CD25 und Foxp3. Stimulation mit TGFβ₁ und CD3-Ak allein führte in wt Kulturen nach 3 Tagen in 6% der Zellen und nach 5 Tagen in 24% der Zellen zur Expression von CD25 und Foxp3. In den PKBtg Kulturen waren dagegen 21% bzw. 51% der Zellen CD25⁺Foxp3⁺ (Abb. 20A, C). Zusätzlich wurde nach 3-tägiger Stimulation mit CD3-Ak bzw. CD3+CD28-Ak die Expression des Treg-Markers GITR analysiert (Abb. 20B). Die Expression von GITR auf CD3-Ak+TGFβ₁-induzierten PKBtg CD25⁺Foxp3⁺ Zellen war im Vergleich zu den entsprechenden wt Zellen deutlich erhöht (MFI wt 53; MFI PKBtg 210). Bei Kostimulation mit CD28-Ak war die Expression von GITR in PKBtg (MFI 410) sowie wt (MFI 283) CD25⁺Foxp3⁺ Zellen stark hochreguliert, in den tg Zellen sogar verstärkt. Die Ergebnisse zeigen, dass erhöhte PKB-Signale die zur iTreg-Differenzierung naiver T-Zellen nötigen CD28-Signale ersetzen und eine effiziente iTreg-Entwicklung nach CD3-Ak+TGFβ₁-Stimulation induzieren.

3.2.2 Untersuchungen zur Suppressoraktivität von wt und PKBtg iTregs

Im Folgenden wurde untersucht, in welchem Maße TGFβ₁+CD3-Ak-induzierte PKBtg iTregs Suppressoraktivität aufweisen. Wt und PKBtg CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Foxp3-GFP Mäusen wurden mit CD3-Ak allein bzw. CD3+CD28-Ak in Anwesenheit von TGFβ₁ stimuliert. Nach 3 Tagen wurden induzierte CD25⁺Foxp3⁺ Zellen mittels FACS sortiert und mit frisch isolierten konventionellen T-Zellen aus wt Mäusen in Kokultur gebracht. Nach 3-tägiger Inkubation wurde die Proliferation mittels ³[H]-Thymidineinbau bestimmt. Mit CD3-Ak+TGFβ₁ induzierte PKBtg iTregs zeigten eindeutige Suppressorfunktion. Sie hemmten die Proliferation konventioneller wt T-Zellen so effektiv wie die mit CD3+CD28-Ak+TGFβ₁-induzierten wt und PKBtg iTregs (Abb. 21). Erhöhte PKB-Aktivität fördert daher die Induktion von Suppressoraktivität in mit CD3-Ak+TGFβ₁-behandelten naiven T-Zellen und somit die Entwicklung funktioneller iTregs.

Ergebnisse

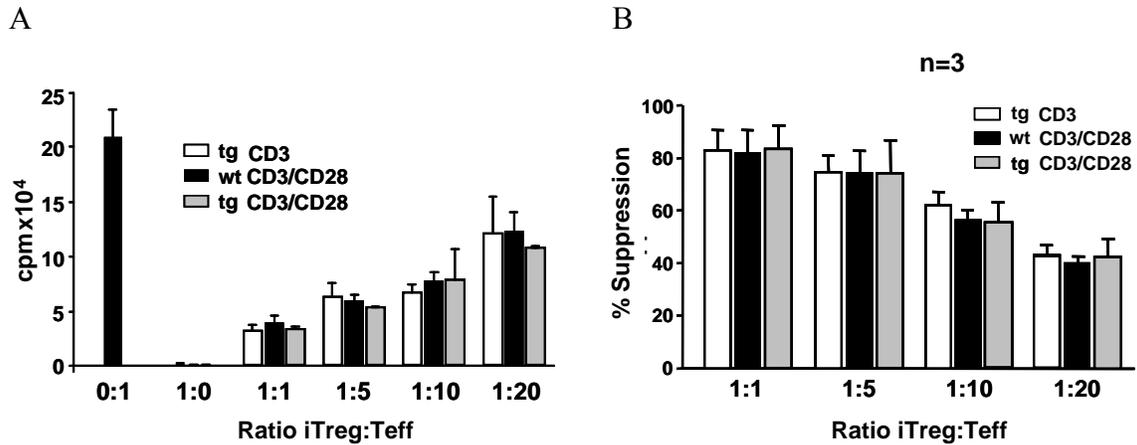


Abb. 21: **Verstärkte PKB-Signale induzieren Suppressoraktivität in mit CD3-Ak+TGFβ₁ stimulierten konventionellen T-Zellen.** 3*10⁶ CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen wurden in Anwesenheit von TGFβ₁ (1 ng/ml) mit CD3-Ak (2 μg/ml) allein (tg CD3) oder mit CD3+CD28-Ak (5 μg/ml) stimuliert (wt CD3/CD28, tg CD3/CD28). Nach 3 Tagen wurden CD25⁺Foxp3⁺ Zellen mittels FACS sortiert und mit frisch isolierten CD4⁺CD25⁻ wt Effektorzellen in verschiedenen Verhältnissen und bestrahlten (30 Gy) wt Milzzellen für weitere 3 Tage in Kokultur gebracht. Die CD3 (2 μg/ml) Ak-induzierte Proliferation der Effektorzellen wurde mittels ³[H]-Thymidineinbau an Tag 3 analysiert. **A.** Proliferation der wt Effektorzellen in Kokultur mit induzierten CD25⁺Foxp3⁺ wt und PKBtg Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives von 3 unabhängigen Experimenten. **B.** Suppression durch die induzierten iTreg-Populationen relativ zur maximalen Proliferation der wt Effektorzellen (100%) ermittelt aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.3 Untersuchungen zur Differenzierung von Th17-Zellen

3.3.1 *In vitro* Differenzierung von wt und PKBtg CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu Th17-Zellen

Die vorhergehenden Versuche zeigten, dass erhöhte PKB-Signale die Foxp3-Expression fördern. Daher sollte geklärt werden, ob verstärkte PKB-Signale auch die Entwicklung von Th17-Zellen beeinflussen. Wt und PKBtg CD4⁺CD25⁻ Zellen wurden mit CD3+CD28-Ak+TGFβ₁ mit und ohne IL-6 kultiviert. Nach 3 Tagen wurde der Anteil IL-17-produzierender Zellen mittels intrazellulärer Färbung und die Foxp3-Expression anhand der Foxp3-GFP-Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Abb. 22A zeigt ein repräsentatives Ergebnis von 4 Versuchen mit den prozentualen Anteilen IL17⁺ und Foxp3⁺ Zellen.

Ergebnisse

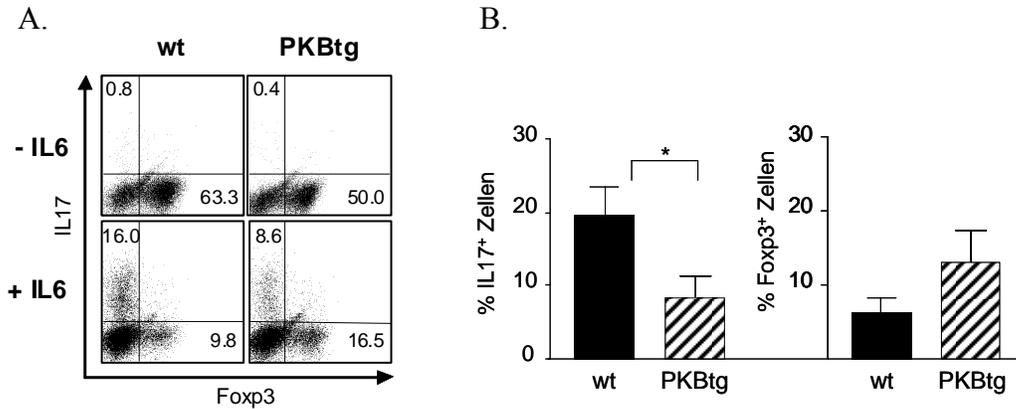


Abb. 22: **Erhöhte PKB-Signale beeinträchtigen die Entwicklung von Th17-Zellen.** CD4⁺CD25⁻ konventionelle T-Zellen von wt und PKBtg Fopx3^{GFP} Mäusen wurden in Anwesenheit von TGFβ₁ (1 ng/ml) mit CD3 (2 µg/ml)+CD28 (5 µg/ml)-Ak mit und ohne IL-6 (20 ng/ml) stimuliert. **A.** Durchflußzytometrisch bestimmte Expression von Fopx3 und IL-17 nach 3-tägiger Kultur. **B.** Prozentuale Verteilung IL-17⁺ und Fopx3⁺ Zellen in wt und PKBtg Kulturen unter Th17-Differenzierungsbedingungen von 6 unabhängigen Experimenten; * p<0,05.

In Abwesenheit von IL-6 wurde weder in den wt Kulturen noch in den PKBtg Kulturen eine signifikante IL-17-Produktion beobachtet. In Anwesenheit von IL-6 produzierten 16% der wt Zellen IL-17. Die PKBtg Kulturen zeigten jedoch eine signifikant kleinere IL-17⁺ Population (8,6%) (Abb. 22A). Der Anteil der IL-17⁺ Zellen war somit in den wt Zellen um etwa das 2-fache erhöht. Im Gegensatz dazu war bei Anwesenheit von TGFβ₁ und IL-6 der prozentuale Anteil Fopx3⁺ Zellen in den PKBtg Kulturen (16,5%) im Vergleich zu den wt Kulturen (9,8%) deutlich erhöht. In den Ansätzen ohne IL-6 differenzierten 63% der wt und 50% der PKBtg Zellen zu Fopx3⁺ Zellen, jedoch fast keine Zellen zu IL-17-produzierenden Zellen (Abb. 22A, B). Diese Daten zeigen, dass erhöhte PKB-Signale unter Th17-Bedingungen die Differenzierung zu IL-17-produzierenden Zellen hemmen, während sie die Expression von Fopx3 fördern.

3.4 Einfluss transgener PKB auf den Verlauf der EAE

3.4.1 EAE-Induktion in wt und PKBtg Mäusen

Th17-Zellen sowie Tregs spielen eine wesentliche Rolle bei der Induktion und dem Krankheitsverlauf der EAE. Die vorherigen *in vitro* Versuche zeigten, dass aktive PKB in T-Zellen die Fopx3-Expression fördert, aber die Entwicklung von Th17-Zellen reduziert. In der EAE, dem Mausmodell für Multiple Sklerose, sollte daher geklärt werden, ob erhöhte PKB-

Ergebnisse

Signale in Lymphozyten deren *in vivo* Funktion beeinflussen und somit einen Einfluss auf die Entwicklung der EAE haben könnten. Wt und PKBtg Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid in komplettem Freund's Adjuvanz (CFA) immunisiert, und der Krankheitsverlauf wurde bis Tag 30 täglich beurteilt (Abb. 23A). Ab Tag 8-9 nach der Immunisierung waren in beiden Mauslinien erste Symptome der Krankheit (leichte Parese des Schwanzes: Graduierung 0,5) zu verzeichnen. Bis zum Tag 16 kam es in wt und PKBtg Mäusen zum maximalen Ausbruch der Erkrankung, d.h. kompletter Tonusverlust des Schwanzes (Grad 1), Paresen der hinteren Extremitäten (Grad 2), Plegie der hinteren Extremitäten (Grad 3), Parese der vorderen Extremitäten (Grad 4) und Tod (Grad 5) konnten beobachtet werden.

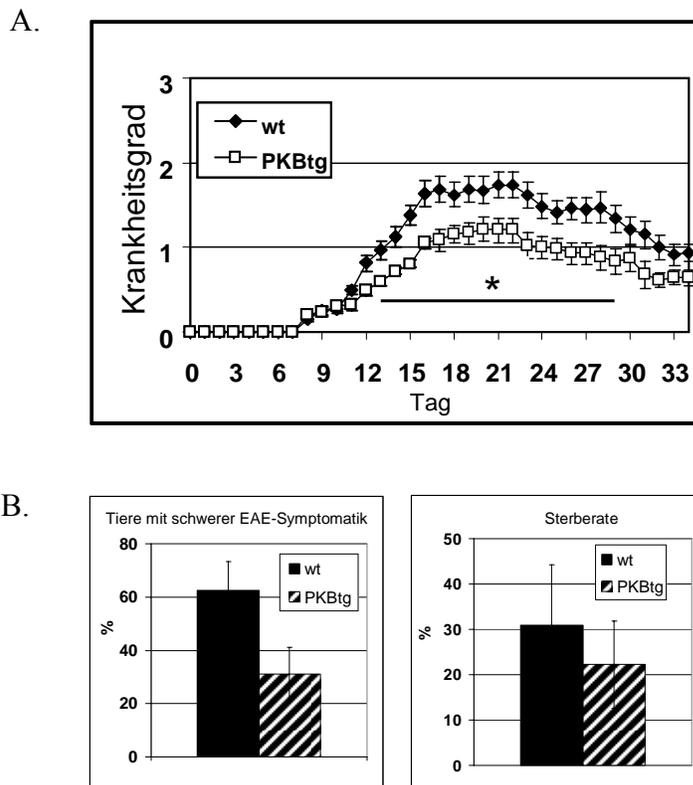


Abb. 23: **Verstärkte PKB-Signale in Lymphozyten schwächen das Krankheitsbild der EAE von wt Mäusen.** EAE wurde in wt (n=28) und PKBtg (n=18) Mäusen durch Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid + CFA induziert. **A:** Der Graph zeigt den Mittelwert des Krankheitsgrades wt bzw. PKBtg Mäuse \pm mittlerem Standardfehler (SEM). Die Signifikanz im unterschiedlichen Krankheitsverlauf beider Mauslinien wurde mit dem Wilcoxon Test berechnet; * $p < 0,05$. Der signifikant unterschiedliche Zeitraum des Krankheitsverlaufs wird durch die Linie repräsentiert. **B:** Die Diagramme zeigen den Anteil schwer an EAE erkrankter (Graduierung 2 und höher) bzw. gestorbener wt und PKBtg Tiere.

Ergebnisse

Nach einer etwa 4-tägigen Plateauphase (Tag 16-20) schwächten sich die Krankheitssymptome in beiden Mauslinien ab. Interessanterweise zeigten die PKBtg Mäuse im Vergleich zu den wt Mäusen im gesamten Verlauf der Erkrankung eine signifikant schwächere Symptomatik (Abb. 23A). Insgesamt wurden bei 31% der PKBtg Mäuse schwere Krankheitssymptome beobachtet, welche der klinischen Graduierung 2 und höher entsprachen. Dagegen wiesen 62% der wt Mäuse einen schweren Krankheitsverlauf auf. 31% der wt, aber nur 22% der PKBtg Mäuse verstarben an den Folgen der EAE (Abb. 23B). Erhöhte PKB-Signale in den tg Mäusen führen daher zu einer signifikanten Abschwächung der EAE-Symptomatik.

3.4.2 EAE-Induktion in CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäusen

Frühere Publikationen zeigten, dass in CD28^{-/-} Mäusen MOG-Immunisierung keine EAE induzieren kann, obwohl die Anzahl von nTregs in CD28^{-/-} Mäusen stark reduziert ist (12, 13, 175). Eigene Experimente zeigten, dass in PKBtg CD28^{-/-} Mäusen die nTreg-Anzahl gegenüber CD28^{-/-} Mäusen nur leicht erhöht ist (siehe Abb. 9). Die Experimente zur iTreg-Differenzierung legten aber dar, dass aktive PKB CD28-Signale *in vitro* ersetzen kann. Es sollte daher geklärt werden, wie verstärkte PKB-Signale in Lymphozyten auf die Induktion der EAE in CD28^{-/-} Mäusen wirken.

Wt, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid + CFA immunisiert und die Stärke der Erkrankung für 34 Tage bestimmt. Wie in der Literatur beschrieben, wiesen CD28^{-/-} Mäuse fast keine Symptome einer EAE-Erkrankung auf (Abb. 24). Wt Mäuse zeigten nach 9-10 Tagen erste Merkmale der EAE und entwickelten im weiteren Verlauf schwere Krankheitssymptome. Interessanterweise führten erhöhte PKB-Signale in CD28^{-/-} Mäusen zum Ausbruch der EAE-Erkrankung mit Schweregraden, die geringer als in wt Mäusen, jedoch vergleichbar zu denen in PKBtg Mäusen waren. Erhöhte PKB-Signale in T-Zellen können demnach sowohl einen fördernden (in CD28^{-/-} Mäusen) als auch einen hemmenden Einfluss (in wt Mäusen) auf den Verlauf der EAE-Erkrankung haben.

Ergebnisse

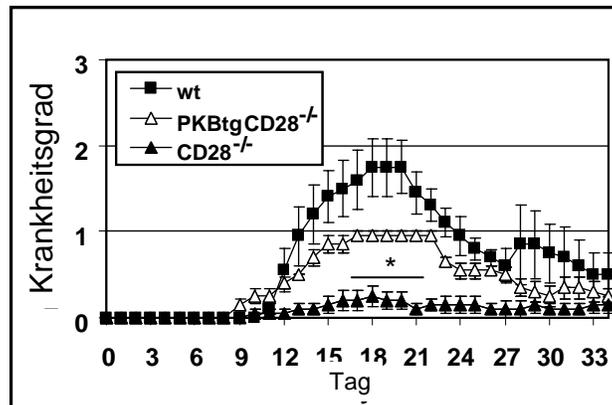


Abb. 24: **Verstärkte PKB-Signale in Lymphozyten führen zum Ausbruch der EAE-Erkrankung in CD28^{-/-} Mäusen.** EAE wurde in wt (n=5), CD28^{-/-} (n=5) und PKBtg CD28^{-/-} (n=5) Mäusen durch Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid induziert. Der Graph gibt den Mittelwert des klinischen Krankheitsgrades von wt, CD28^{-/-} sowie PKBtg CD28^{-/-} Mäusen ± mittleren Standardfehler (SEM) an. Die Signifikanz im unterschiedlichen Krankheitsverlauf von CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäusen wurde mit dem Wilcoxon Test berechnet; * p<0,05.

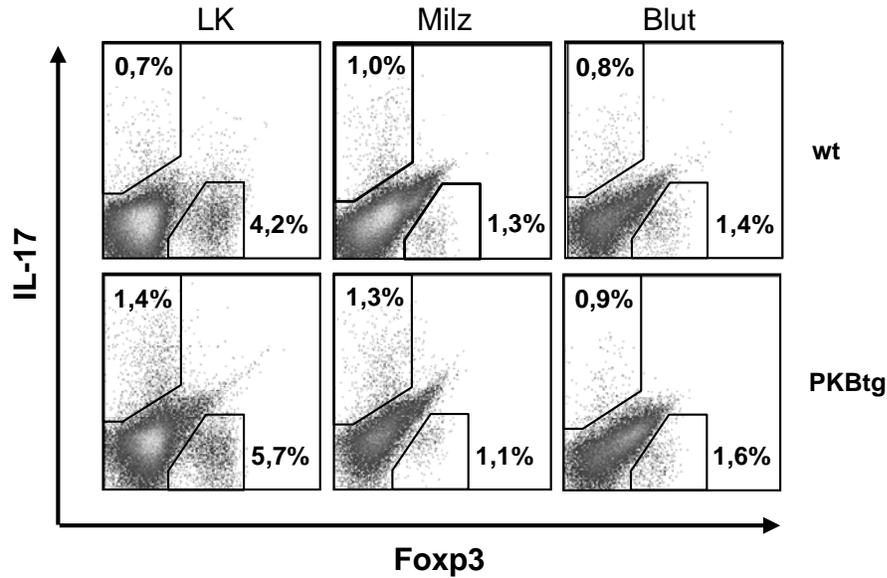
3.4.3 Treg- und Th17-Verteilung nach EAE-Induktion in wt und PKBtg Mäusen

Die Experimente zu Abb. 20 und Abb. 22 wiesen nach, dass aktive PKB *in vitro* einerseits die Treg-Induktion fördert, andererseits die Differenzierung naiver T-Zellen zu IL17-produzierenden Th17-Zellen vermindert. Da Tregs und Th17-Zellen eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung und dem Verlauf der EAE spielen und PKBtg Mäuse einen milderen Verlauf der EAE aufwiesen, sollte geklärt werden, ob in Letzteren die Verteilung von Tregs und Th17-Zellen während der EAE beeinflusst ist. Mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid + CFA immunisierte wt und PKBtg Mäuse wurden daher 10 Tage nach Immunisierung hinsichtlich der CD4⁺Foxp3⁺ und CD4⁺IL-17⁺ Populationen in Lymphknoten (LK), Milz und Blut analysiert. In Milz und Blut konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der prozentualen Verteilung IL-17⁺ und Foxp3⁺ Zellen zwischen wt und PKBtg Mäusen festgestellt werden. Der prozentuale Anteil IL-17⁺ und Foxp3⁺ T-Zellen in den inguinalen LK der wt Mäuse (0,7% IL-17⁺, 4,2% Foxp3⁺) war im Vergleich zu den PKBtg Tieren (1,4% IL-17⁺, 5,7% Foxp3⁺) jedoch leicht erniedrigt (Abb. 25A, B). Dies zeigt, dass zu dem gemessenen Zeitpunkt (Tag 10) keine drastischen Unterschiede zwischen wt und PKBtg Tieren hinsichtlich Th17- und Treg-Mobilisierung auftreten. Auch der Krankheitsgrad beider Maus-stämme war zu diesem Zeitpunkt vergleichbar. Es traten Symptome auf, welche der Graduierung 1 entsprachen. Die leichte Erhöhung im Prozentsatz IL-17⁺ und Foxp3⁺ Zellen in

Ergebnisse

den lateralen LK PKBtg Tiere könnte darauf hindeuten, dass sowohl Th17- als auch Treg-Zellen in den LK PKBtg Mäuse etwas stärker expandiert werden, und dass die verminderte EAE in PKBtg Mäusen eher auf Unterschieden in der Funktion beider Populationen zu späteren Zeitpunkten oder im Hirn beruhen könnte.

A.



B.

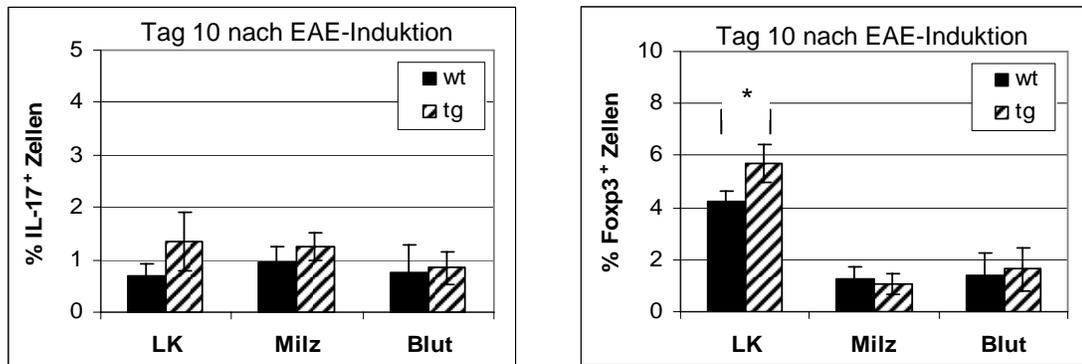


Abb. 25: **Prozentsatz CD4⁺IL-17⁺ und CD4⁺Foxp3⁺ Zellen im LK wt und PKBtg Mäuse nach EAE-Induktion.** Wt und PKBtg Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid + CFA immunisiert. An Tag 10 nach der Immunisierung wurden die entsprechenden Organe und Blut entnommen und der Anteil IL-17⁺ und Foxp3⁺ T-Zellen durchflußzytometrisch analysiert. **A:** Die Dotplots zeigen ein repräsentatives Ergebnis von jeweils 4 wt und PKBtg Mäusen. **B:** Die Graphen zeigen die Zusammenfassung eines von zwei unabhängigen Experimenten (wt n=4; PKBtg n=4), welche wie oben beschrieben durchgeführt wurden. Beide Experimente zeigten eine vergleichbare Tendenz; * p<0,05.

Ergebnisse

3.4.4 GARP- und CD103-Expression auf wt und PKBtg Tregs nach EAE-Induktion

Die periphere T-Zell-Toleranz gegenüber Selbstantigenen wird durch nTregs kontrolliert. Es ist jedoch, abgesehen von CTLA-4, nur wenig über die Effektormoleküle auf aktivierten nTregs bekannt. Das kürzlich entdeckte Protein GARP wird spezifisch auf nTregs nach Stimulation über den TCR exprimiert und GARP⁺ Zellen weisen starke Suppressoraktivität auf (30, 32). GARP könnte daher eine wichtige Rolle bei der nTreg-vermittelten peripheren T-Zell-Toleranz spielen. Daher wurde der nTreg-Phänotyp bezüglich GARP in wt und PKBtg Mäusen unter den inflammatorischen Bedingungen der EAE analysiert, ebenso die Expression von CD103, das für den Verbleib von Tregs im Gewebe wichtig ist.

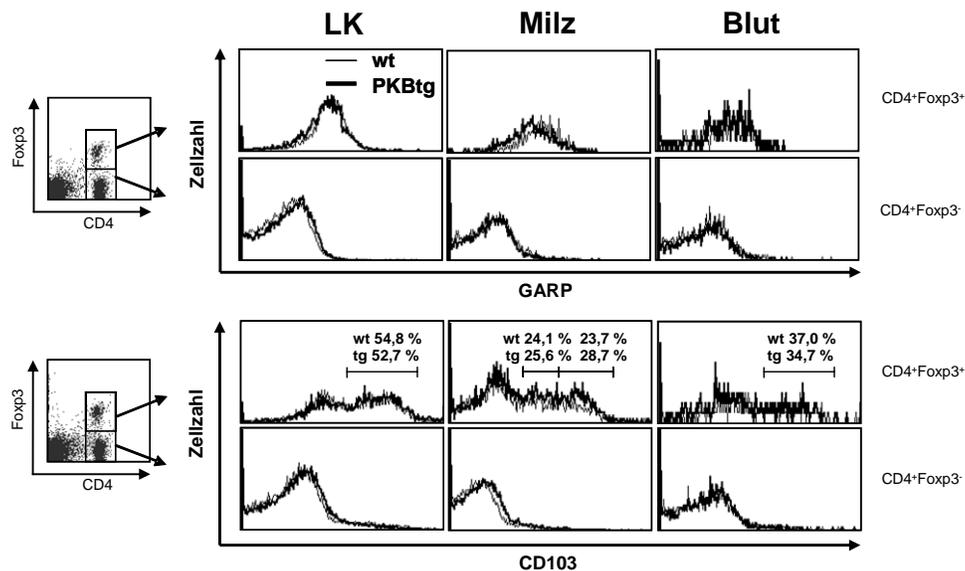


Abb. 26: **Analyse des Treg-Phänotyps unter inflammatorischen Bedingungen.** Wt und PKBtg Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid + CFA immunisiert. An Tag 10 nach der Immunisierung wurden die entsprechenden Organe und Blut entnommen und der Anteil GARP⁺ und CD103⁺ Tregs und CD4⁺Foxp3⁻ Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Histogramme sind repräsentativ für jeweils 4 wt und PKBtg Mäuse aus einem Experiment.

Abb. 26 zeigt, dass GARP-Expression auf CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen fehlt. Wt und PKBtg CD4⁺Foxp3⁺ Zellen aus LK, Milz und Blut dagegen waren positiv für GARP und die Expression war auf den Tregs aus LK und Blut vergleichbar. Auf wt Tregs aus der Milz war im Vergleich zu PKBtg Tregs eine schwach erhöhte GARP-Expression sichtbar (Abb. 26). Die CD103-Expression auf wt und PKBtg Tregs in LK und Blut war ebenfalls vergleichbar. 54,8% der wt

Ergebnisse

und 52,7% der PKBtg CD4⁺Foxp3⁺ LK-Zellen zeigten eine starke Expression von CD103. Im Blut waren nur 37% der wt bzw. 34,7% der PKBtg CD4⁺Foxp3⁺ Zellen CD103⁺. In der Milz wurden schwach und stark CD103-exprimierende CD4⁺Foxp3⁺ Zellen beobachtet, und wt und PKBtg Zellen waren ebenfalls vergleichbar. Bezüglich der GARP- und CD103-Expression sind daher keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

3.4.5 Untersuchungen zur Migration wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen *in vivo*

Die Wanderung von Immunzellen zu ihrem Bestimmungsort ist ein wichtiger Prozess im Rahmen immunregulatorischer Vorgänge. Migrationsvorgänge werden über spezielle Oberflächenrezeptoren auf Immun- und Gewebezellen vermittelt und die Expression dieser Moleküle unterliegt einer strikten Regulation. PKB nimmt eine wichtige Funktion bei der Regulation des *homing* Rezeptors CD62L ein (117). Daher sollte der Einfluss erhöhter PKB-Signale auf das Wanderungsverhalten von CD4⁺-Zellen *in vivo* getestet werden. Dazu wurden isolierte wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen entweder mit DDAO oder CFSE markiert und im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Zellsuspension wurde intravenös injiziert und die Verteilung der markierten Zellen in Milz und LK nach unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert.

Abb. 27A zeigt, dass vor der Injektion im Vergleich zu wt Zellen ein größerer Anteil der PKBtg CD4⁺ T-Zellen kein CD62L exprimierten. Eine Stunde nach Injektion waren deutlich mehr wt als PKBtg Zellen in die Milz eingewandert. Relativ zu den eingewanderten wt Zellen wurden etwa 50% weniger PKBtg Zellen ermittelt. Auch nach 4 Stunden waren relativ zu den wt Zellen weniger PKBtg Zellen in die Milz eingewandert (75%). Der Anteil migrierter wt und PKBtg Zellen war erst nach 12 Stunden vergleichbar. Bei beiden Populationen war auffällig, dass die vorhandene Zellzahl nach 12 Stunden geringer war als nach 1 und 4 Stunden. Dies könnte auf ein bereits erfolgtes Auswandern der migrierten Zellen aus der Milz zurückzuführen sein. Über den Zeitraum von 12 Stunden ließ sich eine Zunahme des relativen Anteils PKBtg Zellen beobachten. Das lässt darauf schließen, dass die PKBtg CD4⁺ T-Zellen entweder verzögert in die Milz einwandern bzw. wieder schneller aus der Milz auswandern. (Abb. 27B).

Ergebnisse

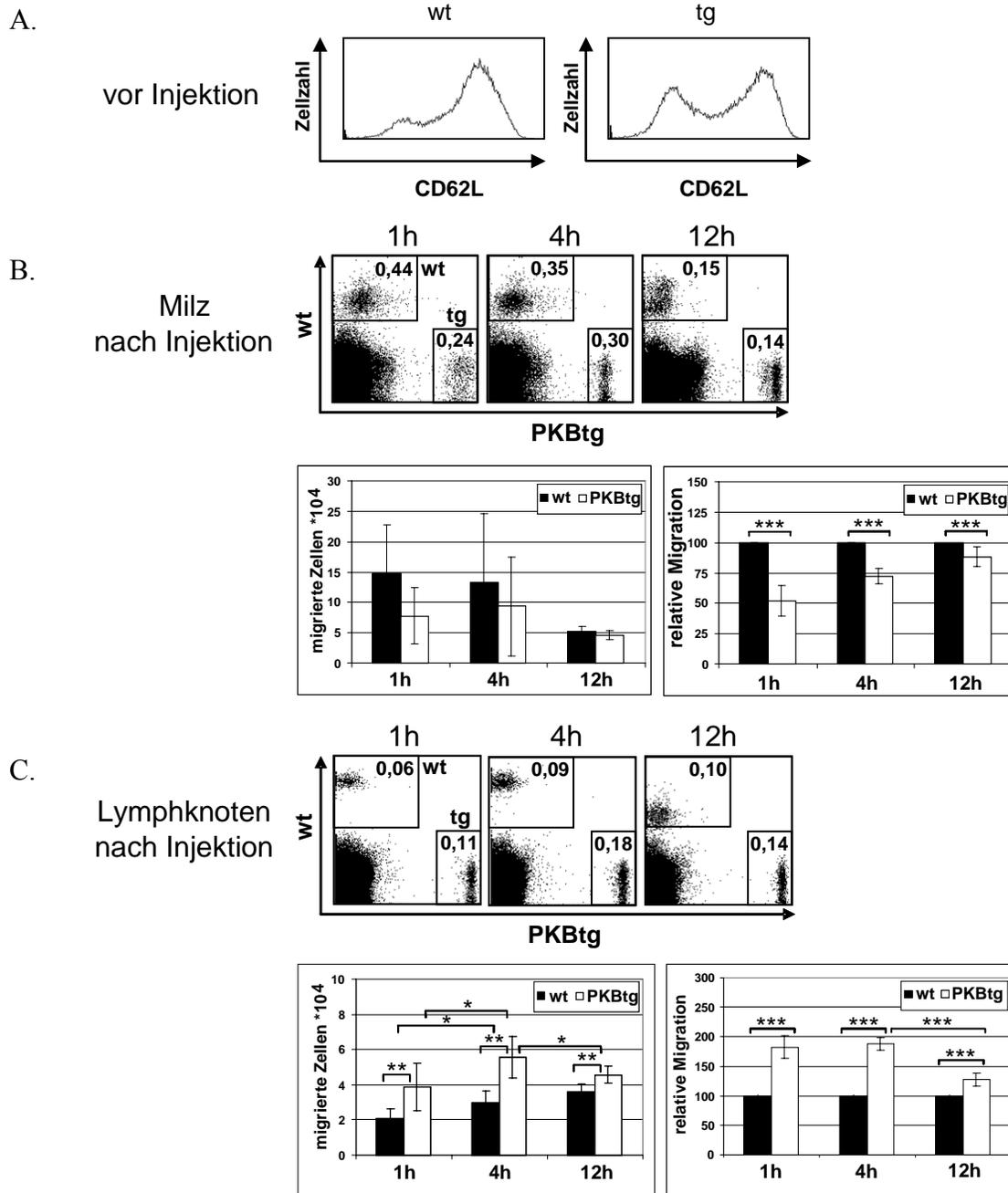


Abb. 27: **Veränderte Migration PKBtg CD4⁺ T-Zellen.** **A.** Die Expression von CD62L auf isolierten CD4⁺ T-Zellen aus wt und PKBtg Mäusen wurde mittels FACS-Analyse ermittelt. **B, C.** Isolierte CD4⁺ T-Zellen aus wt und PKBtg Mäusen wurden mit DDAO (wt) bzw. CFSE (PKBtg) markiert und im Verhältnis 1:1 i.v. injiziert. Nach 1, 4 und 12 Stunden wurde die prozentuale Verteilung (Zahlen in den Dotplots) und die Zellzahl (Diagramme) der eingewanderten Zellen in Milz und den inguinalen LK mittels FACS bestimmt; * p<0,05; ** p<0,01 und *** p<0,001. Für die Untersuchungen in den Milzen wurden in unabhängigen Versuchen insgesamt 6-12 und für Analysen in LK 11 wt und PKBtg Tiere je Zeitpunkt verwendet.

Ergebnisse

Im Gegensatz zur Milz ist die Expression von CD62L für das Einwandern von T-Zellen in die Lymphknoten erforderlich (176). Da in der PKBtg CD4⁺ T-Zell-Population mehr CD62L⁻ Zellen vorhanden waren, war es überraschend, dass zu allen 3 untersuchten Zeitpunkten eine erhöhte Zellzahl PKBtg Zellen im LK vorlag. Nach 1 und 4 Stunden waren im Vergleich zu wt Zellen etwa doppelt so viele PKBtg CD4⁺ T-Zellen in die inguinalen Lymphknoten eingewandert. Nach 12 Stunden nahm die Anzahl PKBtg Zellen ab, war aber im Vergleich zur wt Zellzahl immer noch signifikant erhöht (Abb. 27C). Möglicherweise wandern PKBtg T-Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits wieder aus den LK aus. Insgesamt zeigen die Daten, dass PKBtg CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu wt Zellen ein verändertes Migrationsverhalten *in vivo* aufweisen, wobei tg PKB das Einwandern in die LK förderte, die Migration in die Milz jedoch verzögerte.

4 Diskussion

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen erhöhter PKB-Aktivität in T-Zellen auf autoimmune Erkrankungen, wie der EAE, zu charakterisieren. Da bei der EAE-Erkrankung immunsuppressive Tregs und inflammatorische Th17-Zellen eine zentrale Rolle spielen, wurde der Einfluss aktiver PKB auf die Entwicklung und Funktion dieser T-Zell-Subtypen und den Verlauf der EAE untersucht. Dabei wurden wt und PKBtg Mäuse, die eine transgene konstitutiv aktive Form humaner PKB α exprimieren, Foxp3-GFP *knock-in* Mäuse (Foxp3-GFP), CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäuse eingesetzt. Bezüglich der prozentualen Verteilung von nTregs in wt und PKBtg Mäusen gab es keine signifikanten Unterschiede, jedoch war neben der erhöhten Anzahl CD4⁺ T-Zellen die Zellzahl CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in PKBtg Mäusen signifikant in Thymus, Lymphknoten und Milz erhöht. Erhöhte PKB-Signale fördern somit nicht nur die Akkumulation von CD4⁺ Zellen, sondern damit einhergehend auch die von nTregs (143). Da CD28-Signale unerlässlich für die Entwicklung und Homöostase von nTregs sind (12) und PKB ein wichtiges *downstream* Molekül von CD28 ist (177), wurde die nTreg-Verteilung in CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäusen verglichen. Der Prozentsatz und die Zellzahl von nTregs in CD28^{-/-} Mäusen war im Vergleich zu wt Mäusen, wie bereits publiziert (12), stark verringert. In PKBtg CD28^{-/-} Mäusen war die Anzahl von nTregs im Vergleich zu CD28^{-/-} Mäusen zwar verzweifacht, aber im Vergleich zu wt Mäusen dennoch um mehr als die Hälfte reduziert. Dies untermauert einerseits die fördernde Wirkung erhöhter PKB-Signale auf die nTreg-Entwicklung, zeigt aber andererseits, dass aktive PKB CD28-Signale hinsichtlich der nTreg-Entwicklung nicht vollständig ersetzen kann. Zusätzliche durch CD28-Stimulation induzierte Signale, bzw. stärkere PKB-Signale sind daher für die optimale Entwicklung von nTregs im Thymus erforderlich.

Die Rolle der PKB in der nTreg-Entwicklung und deren Funktion ist bisher nur unvollständig verstanden. PI3Kp110 δ ^{D910A/D910A} *knock-in* Mäuse, die eine inaktive PI3K exprimieren, weisen beispielsweise eine erhöhte nTreg-Zahl im Thymus, aber eine geringere Zahl von nTregs in der Peripherie auf. Entsprechend dazu wurde gezeigt, dass ein wichtiger Negativregulator des PI3K/PKB-Signalweges, die Phosphatase PTEN, in nTregs relativ stärker exprimiert ist (178). Im Gegensatz dazu ergaben Studien in PTEN-defizienten Mäusen, die erhöhte PI3K/PKB-Signale aufweisen, dass die Entwicklung von nTregs nicht beeinflusst ist (135). Pharmakologische Inhibitoren von PI3K/PKB und *downstream* von PKB liegenden Signalmolekülen, wie mTOR,

Diskussion

dagegen fördern die Expression von Foxp3 (132-134). Diese Daten weisen darauf hin, dass der Einfluss der PKB auf die Treg-Entwicklung vom verwendeten experimentellen System, murine oder humane Zellen, abhängig ist, dass es eine Rolle spielt, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung PKB aktiv wird und wie stark die PKB-vermittelten Signale sind. Starke PKB-Signale scheinen im allgemeinen der Treg-Entwicklung entgegenzuwirken. Die Expression aktiver PKB im hier verwendeten Modellsystem ist im Vergleich zu transfizierter PKB eher moderat und entspricht der Expression endogener PKB. Die erhöhten PKB-Signale in tg Zellen erwiesen sich auf die nTreg-Entwicklung nicht hinderlich und wirkten zudem auf deren Homöostase positiv.

PKB-Signale sind in die unterschiedlichsten zellulären Vorgänge involviert (91), neben der Homöostase auch in Migrationsvorgänge und das Überleben von T-Zellen. Da Suppressoraktivität, Migration und das Überleben von nTregs über verschiedene Oberflächenmoleküle vermittelt werden, war es wichtig zu klären, ob aktive PKB den Phänotyp von nTregs beeinflusst. Die Treg-Marker GITR und CTLA-4 sowie CD45RB liefern kostimulatorische Signale, die für die Aktivierung bzw. Suppressorfunktion von Tregs eine wichtige Rolle spielen. Die Expression von GITR war auf wt und PKBtg nTregs vergleichbar, jedoch war die Expression von CTLA-4 sowie CD45RB auf PKBtg nTregs im Vergleich zu den wt nTregs verringert. Da CTLA-4 bedeutsam für die Suppressorfunktion von nTregs ist, könnte dies auf eine verminderte Suppressoraktivität PKBtg nTregs hinweisen. Bezüglich CD45RB wurde jedoch gezeigt, dass nTregs mit hoher Suppressoraktivität eine schwache CD45RB-Expression aufweisen, was wiederum für eine verstärkte Suppressoraktivität PKBtg nTregs sprechen würde (179, 180). Das Oberflächenmolekül GARP ist ebenfalls in die Suppressoraktivität von Tregs involviert, seine genaue Funktionsweise ist bisher jedoch noch ungeklärt. Hinsichtlich der Expression von GARP auf nTregs ergaben sich keine Unterschiede zwischen wt und PKBtg Zellen. Erhöhte PKB-Signale haben daher nur bezüglich der hier untersuchten Moleküle CTLA-4 und CD45RB einen Effekt auf den nTreg-Phänotyp.

Die Oberflächenrezeptoren CD62L und LFA-1 auf T-Zellen spielen eine Rolle beim *homing* und dem Eintritt der Zellen in entzündetes Gewebe. CD103 dagegen reguliert den Verbleib der eingewanderten Zellen im Gewebe. Es wurde ein signifikant erhöhter Prozentsatz CD62L-negativer nTregs in PKBtg Mäusen im Vergleich zu wt Mäusen beobachtet. Erhöhte PKB-Signale fördern daher die Herunterregulation bzw. hemmen die Expression von CD62L auf der

Diskussion

nTreg-Oberfläche. Dies stimmt mit Ergebnissen von Finlay et al. überein, wonach PKB-Signale die Aktivität des Transkriptionsfaktors KLF2 hemmen, wodurch die Transkription der Gene für CD62L, S1P und CCR7 gehemmt wird (117). Der Prozentsatz LFA-1-positiver Zellen und auch die Stärke der Expression von LFA-1 auf PKBtg nTregs war im Vergleich zu wt nTregs hingegen signifikant erhöht. LFA-1 liefert, ähnlich wie GITR, kostimulatorische Signale zur optimalen T-Zellaktivierung und ist beim Eintritt von T-Zellen in entzündetes Gewebe involviert. Daher könnten PKBtg nTregs im Vergleich mit wt Tregs über vermehrte LFA-1-Signale eine stärkere Aktivierung erfahren und ein verbessertes Einwanderungsverhalten in Entzündungsgewebe aufweisen. Bezüglich der CD103-Expression wurden keine Unterschiede zwischen wt und PKBtg nTregs beobachtet. Erhöhte PKB-Signale nehmen daher Einfluss auf Rezeptoren, welche im Zusammenhang mit Migrationsvorgängen, aber nicht mit dem Verbleib der Zellen im Gewebe stehen.

Das Überleben der Tregs in den peripheren lymphatischen Geweben und in entzündlichen Prozessen ist die Voraussetzung für eine optimale Suppression. OX40 und CD127 sind Rezeptoren, die Überlebens- bzw. antiapoptotische Vorgänge von nTregs regulieren (46, 49). Aktive PKB modifizierte die Expression dieser Moleküle auf nTregs nur in geringem Maße, da die Expression von OX40 und CD127 auf PKBtg nTregs im Vergleich zu wt nTregs nur leicht reduziert war. Dies weist aber überraschenderweise darauf hin, dass erhöhte PKB-Signale das Überleben von nTregs eher hemmen als fördern könnten. CTLA-4-Signale können den durch Aktivierung induzierten Zelltod (AICD) hemmen (181), was in Anbetracht der verminderten CTLA-4-Expression ebenfalls auf ein reduziertes Überleben PKBtg nTregs schließen lässt. In konventionellen T-Zellen fördern PKB-Signale *downstream* von CD28 das Überleben und die Expansion der T-Zellen durch Aktivierung verschiedener Zellzyklusproteine (91, 143). Für die Entwicklung und Homöostase von nTregs scheinen aber „limitierte“ PKB-Signale nötig zu sein (130, 135). Daher stellt die verminderte Expression von OX40, CD127 und insbesondere CTLA-4 möglicherweise einen Kompensationsmechanismus auf die verstärkten tg PKB-Signale dar, der trotz verstärkter PKB-Signale die Entwicklung und Homöostase von nTregs ermöglicht.

Im Gegensatz zur nTreg-Entwicklung scheinen stärkere PKB-Signale für die Funktion von nTregs nicht abträglich zu sein. PI3K110^{D910A/D910A} *knock-in* Mäuse mit einer katalytisch inaktiven PI3K und daher einem inaktiven PI3K/PKB-Signalweg zeigen Beeinträchtigungen in der nTreg-Suppressor-kapazität (130). Signale *downstream* von PI3K sind somit erforderlich, um

Diskussion

optimale Suppressoraktivität in Tregs zu generieren. Tatsächlich zeigen unsere Daten, dass erhöhte PKB-Signale die Suppressoraktivität von nTregs fördern. Im Vergleich zu wt nTregs wurde die Proliferation konventioneller wt T-Zellen durch PKBtg nTregs signifikant stärker unterdrückt. Die stärkere Aktivierung verschiedener Signalmoleküle *downstream* von PKB könnte eine verstärkte Expansion oder ein verstärktes Überleben PKBtg nTregs bewirken. Zusätzlich könnte auch eine erhöhte TGF β ₁-Expression und/oder Sekretion zur erhöhten Suppressoraktivität PKBtg nTregs beitragen (127, 143). nTregs aus PTEN^{-/-} Mäusen, die verstärkte PI3K/PKB-Signale aufweisen, expandieren in Anwesenheit von IL-2 allein (135). IL-2-Signale werden primär über den JAK/STAT5-Signalweg vermittelt (182). In *in vitro* und *in vivo* Studien wurde beschrieben, dass, im Gegensatz zum PI3K-Signalweg, der JAK/STAT-Signalweg eine wichtige Rolle für das Überleben von Tregs spielt (183) und dass in Tregs nach IL-2R-Aktivierung der PI3K/PKB-Signalweg mit den *downstream* liegenden Zielproteinen mTOR und p70^{s6k} schwächer als in konventionellen T-Zellen aktiviert wird (131, 178, 184). Das immunsuppressive Rapamycin, welches die mTOR-Aktivität hemmt, fördert dementsprechend die Expansion von Tregs (173). Zudem zeigten Untersuchungen an T-Zellen, welche defizient für Frap1 (*FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein*), dem für mTOR kodierenden Gen, sind, dass IL-2 die Expansion von nTregs zu fördern vermag (185). Diesbezügliche Untersuchungen mit den PKBtg nTregs ergaben, dass die Proliferation PKBtg nTregs mit der von wt nTregs vergleichbar ist. PKBtg nTregs sind daher trotz der erhöhten PKB-Signale „anerg“ bei alleiniger CD3/CD28-Stimulation und zur Proliferation auf exogenes IL-2 angewiesen. Die Treg-Entwicklung im Thymus PKBtg Mäuse ist jedoch, ebenso wie in PTEN^{-/-} Mäusen, nicht beeinflusst (135). Wir interpretieren dies derart, dass die Stärke der PKB-Signale einen gewissen Schwellenwert überschreiten muss, um den „anergen“ Zustand von nTregs aufzuheben. PTEN^{-/-} nTregs proliferieren in Anwesenheit von IL-2 allein, da das PKB-Signal dort vermutlich stärker ist als in dem verwendeten PKBtg System und zudem zusätzliche PI3K-gesteuerte Signalwege dort stark angeschaltet sind. Die PKB-Signale in den PKBtg nTregs reichen vermutlich nicht aus, die nTreg-Homöostase wesentlich zu verändern, obwohl eine 2-fache Zunahme der nTreg-Zellen beobachtet wurde. Sie sind jedoch hinreichend, eine optimale und sogar verstärkte Suppressoraktivität in nTregs zu etablieren.

Ein weiterer Grund für die erhöhte Suppressorkapazität PKBtg nTregs könnte ein besseres Überleben dieser Zellen im Vergleich zu wt nTregs sein. Wie oben erwähnt sind Tregs für ihr Überleben und ihre Expansion stärker auf IL-2 angewiesen als konventionelle T-Zellen (11, 186).

Diskussion

Die eigenen Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass IL-2 das Überleben von Tregs fördert. Überraschenderweise überlebten jedoch wt nTregs nach 3- und 5-tägiger Stimulation mit CD3/CD28 Ak in Anwesenheit von IL-2 besser als PKBtg nTregs.

Verschiedene pro- und antiapoptotische Wege regulieren das Überleben von T-Zellen. Die Aktivität der proapoptotischen Moleküle Bad, Bim und Bax stehen bei der Regulation des Überlebens im Gleichgewicht mit antiapoptotischen Molekülen, wie Bcl-2 und Bcl-XL. Phosphorylierung von Bad und Bim durch aktive PKB macht sie für Polyubiquitinierungen und proteasomalen Abbau zugänglich und verhindert so ihre proapoptotische Funktion (187, 188). Die Fähigkeit von IL-2, das Überleben zu fördern, ist über STAT5-Aktivierung mit der Induktion der antiapoptotischen Moleküle Bcl-XL und Bcl-2 assoziiert, wie von Lord et al. an T-Zellen gezeigt (189). Untersuchungen an Brustkarzinomzellen zeigten, dass die inhibitorische Phosphorylierung von Raf an Ser259 in der N-terminalen Domäne durch PKB dazu führt, dass der Raf/MAPK-Signalweg, an dessen Ende die Aktivierung der MAPK Erk steht, inhibiert wird (99, 190). Durch Inaktivierung dieses Signalweges wird das proapoptotische Molekül Bim durch Erk nicht mehr phosphoryliert und bleibt dadurch aktiviert (98). Weiterhin wird die durch Erk vermittelte Aktivierung der ribosomalen S6-Kinase (RSK) gehemmt, welche anderenfalls durch inhibitorische Phosphorylierung des proapoptotischen Moleküls BAD an Serin112 das Überleben fördern würde. Verstärkte inhibitorische Phosphorylierung von Raf und damit Abschaltung des Raf/MAPK-Signalweges könnte daher auch in nTregs ein möglicher Mechanismus sein, über welchen die Apoptose gesteuert wird. Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten allerdings in PKBtg T-Zellen sowie PKBtg nTregs nach TCR-Stimulation eine erhöhte Phosphorylierung von Erk (191). Ähnliche Studien an Tregs von Li et al. bestätigen unsere Ergebnisse, da sie in ihren Studien nach CD3/CD28-Stimulation in Anwesenheit von IL-2 Phosphorylierung von PKB und Erk vorfanden und die Expression von Bcl-XL in stimulierten Tregs in Anwesenheit von IL-2 erhöht war (186).

Das beobachtete verringerte Überleben und die IL-2-Abhängigkeit PKBtg Tregs sind Ergebnisse von *in vitro* Studien, welche möglicherweise nicht die *in vivo* Situation widerspiegeln. Im Gegensatz zu den limitierten Stimulationsbedingungen *in vitro* sind Tregs *in vivo* einer Reihe zusätzlicher Signale ausgesetzt, so dass nicht auszuschließen ist, dass PKBtg nTregs *in vivo* besser überleben könnten als wt nTregs, und daher zu der 2-fachen Zunahme von nTregs in den PKBtg Mäusen beitragen könnten. Beispielsweise spielen IL-7-Signale, welche ebenfalls zu

Diskussion

STAT5-Aktivierung führen, eine ebenso große Rolle für das Überleben von Tregs wie IL-2-Signale (46, 192, 193). PKBtg nTregs wiesen *ex vivo* allerdings eine geringere IL-7-Rezeptor-Expression auf. Um dies zu klären, müsste ein adoptiver Transfer markierter wt und PKBtg nTregs in wt Mäuse erfolgen und die Zahl der jeweiligen markierten Tregs in einer Zeitkinetik bestimmt werden.

Eine wichtige Frage war, inwieweit der PKB-Signalweg in den PKBtg Tregs angeschaltet ist, d.h. in welchem Ausmaß nTregs der PKBtg Mäuse erhöhte PKB-Signale aufweisen. Western-Blot-Analysen zeigten, dass in *ex vivo* isolierten PKBtg nTregs der PKB-Signalweg in der Tat aktiviert ist, da tg PKB und Zielmoleküle, wie TSC2, GSK3 β und S6 in phosphoryliertem Zustand vorlagen. Im Vergleich zu wt nTregs waren die PKB-Signale in PKBtg nTregs deutlich erhöht, allerdings waren sie schwächer als in PKBtg konventionellen T-Zellen. Der durch tg PKB induzierte PKB-Signalweg ist in PKBtg nTregs daher abgeschwächt. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten durch retroviralen Transfer von myrPKB oder pharmakologische Inhibitoren des PI3K/PKB-Signalweges, dass starke PKB-Signale die Treg-Entwicklung und deren Funktion hemmen (130, 131). Unsere Ergebnisse zeigen, dass erhöhte PKB-Signale die nTreg-Entwicklung und Funktion nicht negativ beeinflussen. Die erhöhten PKB-Signale in PKBtg Mäusen scheinen daher innerhalb einer „Toleranzzone“ Signale zu liefern, welche die Treg-Entwicklung und eine erhöhte Suppressorfunktion ermöglichen und sogar fördern, aber das anerge Verhalten von Tregs dennoch aufrecht erhalten.

Ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die Proliferation konventioneller PKBtg T-Zellen sowohl durch wt als auch PKBtg nTregs weniger inhibierbar ist. Die Resistenz gegenüber Treg-vermittelter Suppression spielt bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle. Cbl-b- oder TRAF6-defiziente Mäuse, deren T-Zellen einen aktivierten Phänotyp aufweisen, entwickeln Autoimmunerkrankungen, obwohl die Treg-Entwicklung und Treg-Funktion in diesen Mäusen nicht gestört sind (194, 195). Allerdings sind konventionelle T-Zellen dieser Tiere *in vitro* resistent gegenüber Treg-vermittelter Suppression. Konventionelle T-Zellen aus NFATc2/NFATc3 doppelt-defizienten Mäusen, sowie SHIP-defiziente T-Zellen werden ebenfalls schlechter durch Tregs inhibiert (196, 197). Dies deutet darauf hin, dass der „Aktivierungszustand“ konventioneller T-Zellen für die Empfänglichkeit gegenüber suppressiven Signalen entscheidend ist. Die eigenen Daten zeigen, dass auch erhöhte PKB-Aktivität in konventionellen T-Zellen Resistenz gegenüber Suppression durch Tregs

Diskussion

vermitteln kann. Somit wird über PKB, neben der Suppressorfunktion von nTregs, auch die Empfänglichkeit gegenüber suppressiven Signalen in konventionellen T-Zellen und damit die Balance zwischen Autoimmunität und Immunsuppression reguliert (194).

Ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis dieser Arbeit betrifft den Einfluss erhöhter PKB-Signale auf die TGF β_1 -vermittelte Differenzierung naiver T-Zellen zu Foxp3⁺ iTregs bzw. Th17-Zellen. Abhängig von den Stimulationsbedingungen und der Anwesenheit von Zytokinen fördert TGF β_1 die Entwicklung zu iTregs oder Th17-Zellen (63, 65-69, 198). CD28 kostimulatorische Signale sind erforderlich für die Induktion der Foxp3-Expression in naiven T-Zellen und zur peripheren Homöostase von Tregs. Darüber hinaus fördern CD28-Signale das Überleben von iTregs (13, 199-201). CD3/CD28 Ak-stimulierte wt und PKBtg konventionelle CD4⁺CD25⁻ T-Zellen waren in Anwesenheit von TGF β_1 hinsichtlich der Foxp3-Expression vergleichbar. Interessanterweise waren verstärkte PKB-Signale jedoch ausreichend, um in mit CD3 Ak + TGF β_1 stimulierten naiven CD4⁺ Zellen die Foxp3-Induktion und effiziente Entwicklung zu iTregs zu induzieren und somit die „notwendigen“ CD28-Signale zu ersetzen. Zudem konnten erhöhte PKB-Signale in CD4⁺CD25⁻ Zellen aus CD28^{-/-} Mäusen effizient die Foxp3-Expression induzieren (191). Dies unterstreicht, dass PKB-Signale ebenso gut wie CD28-Kostimulation die iTreg-Entwicklung ermöglichen. CD3 Ak + TGF β_1 -induzierte PKBtg Foxp3⁺ Zellen wiesen zudem Suppressoraktivität auf, da sie die Proliferation naiver wt CD4⁺-Zellen genauso gut supprimierten wie durch CD3/CD28 Ak + TGF β_1 differenzierte wt und PKBtg iTregs. Zu der erhöhten Anzahl von Tregs in der Peripherie PKBtg Mäuse könnte neben einer verstärkten homöostatischen Expansion daher auch die geförderte iTreg-Entwicklung beitragen.

Im Gegensatz zur iTreg-Induktion zeigten die Versuche unter Th17-Differenzierungsbedingungen, dass aktive PKB die Differenzierung zu Th17-Zellen mindert und stattdessen die Foxp3-Expression fördert. PKB-Signale könnten über verschiedene Mechanismen entweder direkt oder indirekt die Th17-Entwicklung beeinflussen. IFN γ , IL-4 oder Metabolite, wie Retinolsäure hemmen die Th17-Entwicklung, und die Transkriptionsfaktoren IRF4 und ROR γ t fördern die Th17-Differenzierung (80, 81, 202). Hinsichtlich der zugrunde liegenden Mechanismen wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass unter Th17-Bedingungen die Expression von IRF4 und ROR γ t in wt und PKBtg Kulturen naiver T-Zellen vergleichbar, jedoch die STAT-Expression verändert ist, so dass unter Th17-Bedingungen in PKBtg Zellen verstärkt die Foxp3-Expression gefördert wird (191). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PKB-

Diskussion

Signale die Differenzierung von Treg- bzw. Th17-Zellen entscheidend beeinflussen und PKB somit eine zentrale Rolle bei der Regulation entzündlicher und autoimmuner Prozesse versus Immunsuppression durch Tregs einnimmt.

Da tg PKB auf die *in vitro* Differenzierung von Tregs und Th17-Zellen sowie auf die Suppressoraktivität deutliche Effekte zeigte, wurden PKBtg Mäuse im EAE-Modell untersucht. PKBtg Mäuse wiesen im Vergleich zu wt-Mäusen eine deutlich verringerte Symptomatik der EAE-Erkrankung auf. Insgesamt erkrankten 31% der PKBtg Mäuse schwer, d.h. sie wiesen Plegien der hinteren und teilweise der vorderen Extremitäten auf, was der klinischen Graduierung 2 und höher entspricht. Im Gegensatz dazu zeigten 62% der wt Mäuse einen schweren Krankheitsverlauf. Weiterhin verstarben 31% der wt aber nur 22% der PKBtg Mäuse an den Folgen der EAE. Erhöhte PKB-Signale in den tg Mäusen führen daher zu einer signifikanten Abschwächung der EAE-Symptomatik. Tiere, welche Lähmungen der vorderen Extremitäten aufwiesen, was einer klinischen Graduierung von höher als 3 entspricht, wurden aus ethischen Gründen euthanisiert und für die Mittelwertberechnung der Erkrankung nicht mehr berücksichtigt. Dennoch war der Krankheitsverlauf der wt Tiere signifikant stärker als bei den PKBtg Tieren. Dieses interessante Ergebnis kann mit den *in vitro* Daten korreliert werden, welche zeigten, dass erhöhte PKB-Signale einen fördernden Einfluss auf die Entwicklung von iTregs sowie die Suppressoraktivität von nTregs haben. Experimente mit adoptivem Transfer PKBtg Tregs in wt-Mäuse müssten erfolgen, um zu klären, ob die verringerte EAE-Symptomatik in PKBtg Mäusen wesentlich durch eine veränderte Funktion PKBtg Tregs verursacht wird.

Des Weiteren wurden Hinweise auf ein verändertes Migrationsverhalten PKBtg T-Zellen aufgezeigt, was den Krankheitsverlauf der EAE ebenfalls beeinflussen könnte. Analysen zur Th17-Entwicklung zeigten zudem, dass durch erhöhte PKB-Signale die Entwicklung dieser entzündungsfördernden T-Zellpopulation vermindert wird, was sich ebenfalls abschwächend auf den Krankheitsverlauf auswirken könnte. In diesem Zusammenhang wurde der Anteil IL-17⁺ und Foxp3⁺ T-Zellen während der EAE-Erkrankung am Tag 10 ermittelt. In Milz und Blut konnten keine Unterschiede bezüglich des Prozentsatzes IL-17⁺ und Foxp3⁺ Zellen ermittelt werden. Die Analyse der Lymphknoten ergab, dass der Prozentsatz IL-17⁺ Zellen in den PKBtg Mäusen im Vergleich zu wt Mäusen leicht erhöht war. In Bezug auf die schwächere Ausprägung der EAE in PKBtg Mäusen ist dies schwer zu erklären. Ein verändertes Migrationsverhalten der Th17-Zellen in PKBtg Mäusen könnte eine Rolle spielen, d.h. möglicherweise werden PKBtg Th17-Zellen im

Diskussion

Lymphknoten zurückgehalten und können daher nur in verringertem Maße entzündliche Prozesse in Hirn und Rückenmark auslösen. Eine Charakterisierung des Expressionsmusters wt und PKBtg Th17-Zellen bezüglich Migrationsmarker könnte weiteren Aufschluss über deren Migrationsverhalten liefern. Zudem wäre die Verteilung und Funktion von Th17- und Treg-Zellen im Rückenmark während der EAE-Erkrankung in künftigen Experimenten aufzuklären. Hinsichtlich der GARP- und CD103-Expression auf nTregs während der EAE am Tag 10 zeigten wt und PKBtg Tregs vergleichbare GARP-Expression in LK und Blut, in der Milz dagegen war die GARP-Expression auf wt Tregs schwach erhöht. Für aktivierte Tregs wurde eine stärkere Suppressorkapazität gezeigt (203), was aber nicht entscheidend zu sein scheint, da wt Mäuse im Vergleich zu PKBtg Mäusen eine stärkere Ausprägung der EAE-Erkrankung aufweisen.

Durch CD103 werden Immunzellen in entzündlichem Gewebe zurückgehalten. Der prozentuale Anteil von Tregs mit starker CD103-Expression war in der Milz von PKBtg Mäusen leicht erhöht. Dies könnte darauf hindeuten, dass PKBtg Tregs in der Milz eventuell länger zurückgehalten werden und so die autoreaktiven T-Zellen dort besser kontrollieren könnten. Insgesamt haben die Untersuchungen in der Peripherie an Tag 10 der EAE-Erkrankung keine gravierenden Unterschiede zwischen wt und PKBtg Treg- und Th17-Populationen aufgezeigt. Es müsste daher zu früheren und späteren Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs die Verteilung von Tregs und Th17-Zellen in der Peripherie und insbesondere dem Rückenmark analysiert werden, sowie die Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in einer Kinetik bestimmt werden.

Interessanterweise lösten erhöhte PKB-Signale in CD28^{-/-} Mäusen, in denen durch MOG-Immunisierung keine EAE induziert werden kann (175), die EAE-Erkrankung aus. Die Symptomatik war dabei vergleichbar zu der von PKBtg Mäusen und somit schwächer als in entsprechenden wt Mäusen. In CD28^{-/-} Mäusen wurde gezeigt, dass MOG-spezifische T-Zellen normal aktiviert werden, jedoch fehlen die für die Expansion nötigen kostimulatorischen Signale. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CD28-Signale für die Migration der T-Zellen in das ZNS und ihre dortige Reaktivierung wichtig sind (204-206). Es ist zudem in Betracht zu ziehen, dass PKBtg konventionelle T-Zellen weniger gut supprimiert werden können, was zur EAE-Erkrankung in den PKBtg CD28^{-/-} Mäusen beitragen könnte. Es ist anzunehmen, dass erhöhte PKB-Signale in CD28^{-/-} T-Zellen die fehlenden kostimulatorischen Signale ersetzen oder

Diskussion

kompensieren, sodass es zur Aktivierung und Expansion MOG-spezifischer T-Zellen und damit zum Krankheitsausbruch kommt.

Die Versuche zur EAE zeigen, dass erhöhte PKB-Signale in T-Zellen einerseits einen fördernden Einfluss auf die Immuntoleranz haben können, andererseits zum Bruch der Toleranz und zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beitragen können. PKB ist somit ein zentraler Regulator des Gleichgewichts zwischen Immunaktivierung und Immunsuppression und damit der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase.

5 Zusammenfassung

Proteinkinase B (PKB/Akt) wird durch TCR- und CD28-Ligation aktiviert und kontrolliert die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen. Die Rolle von PKB bei der Entwicklung und Funktion immunsuppressiver regulatorischer T-Zellen (Tregs) und pro-inflammatorischer Th17-Zellen ist jedoch ungeklärt und wurde anhand myrPKB transgener Mäuse (PKBtg) untersucht. Die Entwicklung thymus-generierter $CD4^+CD25^+$ Tregs (nTregs) wurde durch erhöhte PKB-Signale nicht beeinflusst, jedoch wurde eine Zunahme von $CD4^+$ T-Zellen und damit einhergehend von nTregs bewirkt. Erhöhte PKB-Aktivität in $CD28^{-/-}$ Mäusen, die nur sehr wenige nTregs generieren, führte zwar zu einer Verdopplung, aber im Vergleich zu Wildtyp (wt)-Mäusen dennoch reduzierten nTreg-Zahl, sodass PKB-Signale fehlende CD28-Kostimulation diesbezüglich nicht ersetzen können. PKBtg nTregs verhielten sich wie wt nTregs bei TCR/CD28-Stimulation „anerg“, d.h. sie waren für die Proliferation auf exogenes IL-2 angewiesen. Sie zeigten jedoch deutlich stärkere Suppressoraktivität als wt nTregs. Konventionelle PKBtg T-Zellen wurden interessanterweise durch nTregs weniger stark supprimiert. Bei TCR/CD3-Stimulation in Anwesenheit von $TGF\beta_1$, d.h. ohne CD28-Kostimulation, differenzierten PKBtg, aber nicht wt konventionelle T-Zellen effizient zu $Foxp3^+$ iTregs. Diese wiesen gleiche Suppressoraktivität wie wt iTregs auf, die durch TCR/CD3+CD28-Stimulation plus $TGF\beta_1$ induziert wurden. Dagegen minderten erhöhte PKB-Signale die $TGF\beta_1$ - und IL-6-vermittelte Differenzierung naiver T-Zellen zu Th17-Zellen und förderten stattdessen die $Foxp3$ -Induktion. Dahingehend wiesen PKBtg Mäuse eine deutlich schwächere Symptomatik in der MOG₃₅₋₅₅-Peptid-induzierten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Mausmodell für Multiple Sklerose, auf. In $CD28^{-/-}$ Mäusen, in denen keine EAE induziert werden kann, führte tg PKB allerdings zur Ausprägung starker EAE-Symptome. Somit nimmt PKB bei der $TGF\beta_1$ -vermittelten Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen eine zentrale Rolle ein. Einerseits fördert PKB die Suppressoraktivität von nTregs und die iTreg-Bildung und dadurch die Immuntoleranz, andererseits führen erhöhte PKB-Signale in T-Zellen zu einer verminderten Suppression durch Tregs und kann zum Ausbruch von Autoimmunerkrankungen, wie der EAE in $CD28^{-/-}$ Mäusen, führen. PKB hat damit eine bis dato unerkannte zentrale Funktion bei der Kontrolle entzündlicher Immunprozesse versus peripherer T-Zelltoleranz und somit bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase.

6 Summary

Protein kinase B (PKB/Akt) is activated after TCR and CD28 ligation and controls T cell proliferation and differentiation. The role of PKB in the development and function of immunosuppressive regulatory T cells (Tregs) and pro-inflammatory Th17 cells is not fully understood and was analyzed in a tg mouse model with expression of constitutively active myrPKB α (PKBtg) in the T cell lineage. Elevated PKB signals had no major effect on the development of thymus-generated CD4⁺CD25⁺ Tregs (nTregs). However, PKBtg mice showed an increased cell number of CD4⁺ T cells and a concomitant increase in nTreg cells. In CD28^{-/-} mice, which only develop few nTregs, tg PKB led to a 2-fold increase in nTreg cell number, but it was still significantly lower than in wt mice, indicating that enhanced PKB signalling cannot fully compensate for CD28 co-stimulation. PKBtg nTregs were anergic in response to TCR/CD3 stimulation, as described for wt nTregs, and thus required exogenous IL-2 for proliferation. Strikingly, PKBtg nTregs showed higher suppressor capacity than wt nTregs and conventional PKBtg CD4⁺ T cells were markedly less suppressable by nTregs. Moreover, PKBtg but not wt naïve T cells effectively differentiated into Foxp3⁺ T cells in response to TCR/CD3 stimulation in the presence of TGF β ₁, i.e. in the absence of CD28 co-stimulation. Those induced CD4⁺Foxp3⁺ iTregs showed the same suppressive capacity as wt iTregs induced by TCR/CD3+CD28 stimulation and TGF β ₁. Reciprocally, TGF β ₁ plus IL-6 driven differentiation of naïve T cells into Th17 cells was strongly impaired by elevated PKB signals. In line with the *in vitro* data, PKBtg mice showed an ameliorated MOG₃₅₋₅₅-peptide driven experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the mouse model for multiple sclerosis. However, in CD28^{-/-} mice, which do not develop EAE, tg PKB initiated a severe EAE disease. Collectively, the data reveal an important role of PKB in TGF β ₁ driven differentiation processes of naïve CD4⁺ T cells. On one hand elevated PKB signals foster suppressor function of nTregs and iTreg formation, thereby enhancing immunologic tolerance, on the other hand they confer resistance to Treg mediated suppression and can cause initiation of autoimmune disorder as seen in CD28^{-/-} mice. Thus, PKB has a so far unrecognized important function in the regulation of inflammatory immune processes versus peripheral T cell tolerance and, thereby, in the maintenance of immune homeostasis.

7 Literatur

1. Flajnik, M.F., and L. Du Pasquier. 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology* 25:640-644.
2. Germain, R.N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-299.
3. York, I.A., and K.L. Rock. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annual Reviews of Immunology* 14:369-396.
4. Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, and P. Golstein. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science (New York, N.Y)* 265:528-530.
5. Vignaux, F., and P. Golstein. 1994. Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway? *European Journal of Immunology* 24:923-927.
6. Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22:329-341.
7. Josefowicz, S.Z., and A. Rudensky. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30:616-625.
8. Burchill, M.A., J. Yang, K.B. Vang, and M.A. Farrar. 2007. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunology Letters* 114:1-8.
9. Malek, T.R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26:453-479.
10. Vang, K.B., J. Yang, S.A. Mahmud, M.A. Burchill, A.L. Vegoe, and M.A. Farrar. 2008. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *Journal of Immunology* 181:3285-3290.
11. Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology* 6:1142-1151.
12. Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J.A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
13. Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2005. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nature Immunology* 6:152-162.
14. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y)* 299:1057-1061.
15. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology* 4:330-336.

Literatur

16. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. 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. *Journal of Immunology* 155:1151-1164.
17. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775-787.
18. Hori, S., T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2003. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. *Advances in Immunology* 81:331-371.
19. Baecher-Allan, C., and D.A. Hafler. 2006. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunological Reviews* 212:203-216.
20. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology* 10:1969-1980.
21. Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of Experimental Medicine* 188:287-296.
22. Grossman, W.J., J.W. Verbsky, B.L. Tollefsen, C. Kemper, J.P. Atkinson, and T.J. Ley. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 104:2840-2848.
23. Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, and R.J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of Immunology* 174:1783-1786.
24. Cao, X., S.F. Cai, T.A. Fehniger, J. Song, L.I. Collins, D.R. Piwnica-Worms, and T.J. Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635-646.
25. Fallarino, F., U. Grohmann, S. You, B.C. McGrath, D.R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M.L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *Journal of Immunology* 176:6752-6761.
26. von Boehmer, H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunology* 6:338-344.
27. Schneider, H., E. Valk, S. da Rocha Dias, B. Wei, and C.E. Rudd. 2005. CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:12861-12866.
28. Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, and T. Yamaguchi. 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology* 21:1105-1111.
29. Ollendorff, V., T. Noguchi, O. deLapeyriere, and D. Birnbaum. 1994. The GARP gene encodes a new member of the family of leucine-rich repeat-containing proteins. *Cell Growth and Differentiation* 5:213-219.
30. Battaglia, M., and M.G. Roncarolo. 2009. The Tregs' world according to GARP. *European Journal of Immunology* 39:3296-3300.

31. Tran, D.Q., J. Andersson, R. Wang, H. Ramsey, D. Unutmaz, and E.M. Shevach. 2009. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:13445-13450.
32. Wang, R., L. Kozhaya, F. Mercer, A. Khaitan, H. Fujii, and D. Unutmaz. 2009. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:13439-13444.
33. de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *European Journal of Immunology* 34:2480-2488.
34. Ho, L., and G. Crabtree. 2006. A Foxy tango with NFAT. *Nature Immunology* 7:906-908.
35. Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T.C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira. 2001. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *Journal of Immunology* 166:3008-3018.
36. Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *Journal of Immunology* 172:834-842.
37. Huber, S., C. Schramm, H.A. Lehr, A. Mann, S. Schmitt, C. Becker, M. Protschka, P.R. Galle, M.F. Neurath, and M. Blessing. 2004. Cutting Edge: TGF- β Signaling Is Required for the In Vivo Expansion and Immunosuppressive Capacity of Regulatory CD4+CD25+ T Cells. *Journal of Immunology* 173:6526-6531.
38. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of Experimental Medicine* 194:629-644.
39. McHugh, R.S., M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, and M.C. Byrne. 2002. CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311-323.
40. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunology* 3:135-142.
41. Tone, M., Y. Tone, E. Adams, S.F. Yates, M.R. Frewin, S.P. Cobbold, and H. Waldmann. 2003. Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:15059-15064.
42. Malek, T.R. 2003. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *Journal of Leukocyte Biology* 74:961-965.
43. Turka, L.A., and P.T. Walsh. 2008. IL-2 signaling and CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Front Biosci* 13:1440-1446.
44. Yu, A., L. Zhu, N.H. Altman, and T.R. Malek. 2009. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity* 30:204-217.

Literatur

45. Zorn, E., E.A. Nelson, M. Mohseni, F. Porcheray, H. Kim, D. Litsa, R. Bellucci, E. Raderschall, C. Canning, R.J. Soiffer, D.A. Frank, and J. Ritz. 2006. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 108:1571-1579.
46. Bayer, A.L., J.Y. Lee, A. de la Barrera, C.D. Surh, and T.R. Malek. 2008. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of Immunology* 181:225-234.
47. Foxwell, B.M., C. Beadling, D. Guschin, I. Kerr, and D. Cantrell. 1995. Interleukin-7 can induce the activation of Jak 1, Jak 3 and STAT 5 proteins in murine T cells. *European Journal of Immunology* 25:3041-3046.
48. Lin, J.X., T.S. Migone, M. Tsang, M. Friedmann, J.A. Weatherbee, L. Zhou, A. Yamauchi, E.T. Bloom, J. Mietz, S. John, and et al. 1995. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 2:331-339.
49. Croft, M., T. So, W. Duan, and P. Soroosh. 2009. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunological Reviews* 229:173-191.
50. Takeda, I., S. Ine, N. Killeen, L.C. Ndhlovu, K. Murata, S. Satomi, K. Sugamura, and N. Ishii. 2004. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *Journal of Immunology* 172:3580-3589.
51. Kwon, B., K.-Y. Yu, J. Ni, G.-L. Yu, I.-K. Jang, Y.-J. Kim, L. Xing, D. Liu, S.-X. Wang, and B.S. Kwon. 1999. Identification of a Novel Activation-inducible Protein of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily and Its Ligand. *Journal of Biological Chemistry* 274:6056-6061.
52. Ronchetti, S., O. Zollo, S. Bruscoli, M. Agostini, R. Bianchini, G. Nocentini, E. Ayroldi, and C. Riccardi. 2004. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *European Journal of Immunology* 34:613-622.
53. Nocentini, G., and C. Riccardi. 2005. GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *European Journal of Immunology* 35:1016-1022.
54. Spinicelli, S., G. Nocentini, S. Ronchetti, L.T. Krausz, R. Bianchini, and C. Riccardi. 2002. GITR interacts with the pro-apoptotic protein Siva and induces apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 9:1382-1384.
55. Ronchetti, S., G. Nocentini, C. Riccardi, and P.P. Pandolfi. 2002. Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood* 100:350-352.
56. Reichardt, P., B. Dornbach, S. Rong, S. Beissert, F. Gueler, K. Loser, and M. Gunzer. 2007. Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood* 110:1519-1529.
57. Gunzer, M., A. Schafer, S. Borgmann, S. Grabbe, K.S. Zanker, E.B. Brocker, E. Kampgen, and P. Friedl. 2000. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 13:323-332.
58. Fillatreau, S., C.H. Sweenie, M.J. McGeachy, D. Gray, and S.M. Anderton. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology* 3:944-950.

Literatur

59. Levings, M.K., R. Sangregorio, F. Galbiati, S. Squadrone, R. de Waal Malefyt, and M.G. Roncarolo. 2001. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *Journal of Immunology* 166:5530-5539.
60. Bouaziz, J.D., K. Yanaba, and T.F. Tedder. 2008. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunological Reviews* 224:201-214.
61. DiLillo, D.J., T. Matsushita, and T.F. Tedder. 2010. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183:38-57.
62. Bhattacharyya, S., J. Deb, A.K. Patra, D.A. Thuy Pham, W. Chen, M. Vaeth, F. Berberich-Siebelt, S. Klein-Hessling, E.D. Lamperti, K. Reifenberg, J. Jellusova, A. Schweizer, L. Nitschke, E. Leich, A. Rosenwald, C. Brunner, S. Engelmann, U. Bommhardt, A. Avots, M.R. Muller, E. Kondo, and E. Serfling. NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin-NFAT signaling network. *The Journal of Experimental Medicine* 208:823-839.
63. Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453:1051-1057.
64. Oukka, M. 2008. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67 Suppl 3:iii26-29.
65. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
66. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine* 198:1875-1886.
67. Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M.C. Nussenzweig, and H. von Boehmer. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature Immunology* 6:1219-1227.
68. Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
69. Veldhoen, M., and B. Stockinger. 2006. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends in Immunology* 27:358-361.
70. Wang, C., S.G. Kang, J.H. Lee, and C.H. Kim. 2009. CCR6 regulates the migration and effector function of Th17 cells in the gut. *The Journal of Immunology* 182:96.92-.
71. Singh, S.P., H.H. Zhang, J.F. Foley, M.N. Hedrick, and J.M. Farber. 2008. Human T Cells That Are Able to Produce IL-17 Express the Chemokine Receptor CCR6. *Journal of Immunology* 180:214-221.
72. Yamazaki, T., X.O. Yang, Y. Chung, A. Fukunaga, R. Nurieva, B. Pappu, N. Martin-Orozco, H.S. Kang, L. Ma, A.D. Panopoulos, S. Craig, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2008. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *Journal of Immunology* 181:8391-8401.
73. Zhou, L., J.E. Lopes, M.M. Chong, Ivanov, II, R. Min, G.D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y.P. Rubtsov, A.Y. Rudensky, S.F. Ziegler, and D.R. Littman. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* 453:236-240.

74. Zhang, F., G. Meng, and W. Strober. 2008. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nature Immunology* 9:1297-1306.
75. Ohtani, T., K. Ishihara, T. Atsumi, K. Nishida, Y. Kaneko, T. Miyata, S. Itoh, M. Narimatsu, H. Maeda, T. Fukada, M. Itoh, H. Okano, M. Hibi, and T. Hirano. 2000. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity* 12:95-105.
76. Atsumi, T., K. Ishihara, D. Kamimura, H. Ikushima, T. Ohtani, S. Hirota, H. Kobayashi, S.J. Park, Y. Saeki, Y. Kitamura, and T. Hirano. 2002. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *The Journal of Experimental Medicine* 196:979-990.
77. Harris, T.J., J.F. Grosso, H.R. Yen, H. Xin, M. Kortylewski, E. Albesiano, E.L. Hipkiss, D. Getnet, M.V. Goldberg, C.H. Maris, F. Housseau, H. Yu, D.M. Pardoll, and C.G. Drake. 2007. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *Journal of Immunology* 179:4313-4317.
78. Laurence, A., C.M. Tato, T.S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R.B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E.M. Shevach, and J. O'Shea J. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26:371-381.
79. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M.H. Xie, F.J. de Sauvage, and A.L. Gurney. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry* 278:1910-1914.
80. Brustle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T.W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature Immunology* 8:958-966.
81. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Reviews of Immunology* 27:485-517.
82. Kruger, K., and F.C. Mooren. 2007. T cell homing and exercise. *Exercise immunology review* 13:37-54.
83. Ward, S.G., and F.M. Marelli-Berg. 2009. Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *The Biochemical Journal* 418:13-27.
84. Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyra, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:13031-13036.
85. Sharma, R., S.S. Sung, C.E. Abaya, A.C. Ju, S.M. Fu, and S.T. Ju. 2009. IL-2 regulates CD103 expression on CD4+ T cells in Scurfy mice that display both CD103-dependent and independent inflammation. *Journal of Immunology* 183:1065-1073.
86. Suffia, I., S.K. Reckling, G. Salay, and Y. Belkaid. 2005. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection. *Journal of Immunology* 174:5444-5455.

Literatur

87. Van, V.Q., J. Darwiche, M. Raymond, S. Lesage, S. Bouguermouh, M. Rubio, and M. Sarfati. 2008. Cutting Edge: CD47 Controls the In Vivo Proliferation and Homeostasis of Peripheral CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells That Express CD103. *Journal of Immunology* 181:5204-5208.
88. Staal, S.P., and J.W. Hartley. 1988. Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus. *The Journal of Experimental Medicine* 167:1259-1264.
89. Liao, Y., and M.C. Hung. Physiological regulation of Akt activity and stability. *American Journal of Translational Research* 2:19-42.
90. Liao, Y., and M.C. Hung. 2010. Physiological regulation of Akt activity and stability. *American Journal of Translational Research* 2:19-42.
91. Vanhaesebroeck, B., and D.R. Alessi. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *The Biochemical Journal* 346 Pt 3:561-576.
92. Diehl, J.A., M. Cheng, M.F. Roussel, and C.J. Sherr. 1998. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Development* 12:3499-3511.
93. Welcker, M., J. Singer, K.R. Loeb, J. Grim, A. Bloecher, M. Gurien-West, B.E. Clurman, and J.M. Roberts. 2003. Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Molecular Cell* 12:381-392.
94. Yeh, E., M. Cunningham, H. Arnold, D. Chasse, T. Monteith, G. Ivaldi, W.C. Hahn, P.T. Stukenberg, S. Shenolikar, T. Uchida, C.M. Counter, J.R. Nevins, A.R. Means, and R. Sears. 2004. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nature Cell Biology* 6:308-318.
95. Beurel, E., S.M. Michalek, and R.S. Jope. 2010. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends in Immunology* 31:24-31.
96. Galetic, I., S.-M. Maira, M. Andjelkovic, and B.A. Hemmings. 2003. Negative Regulation of ERK and Elk by Protein Kinase B Modulates c-fos Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 278:4416-4423.
97. Zugasti, O., W. Rul, P. Roux, C. Peyssonnaud, A. Eychene, T.F. Franke, P. Fort, and U. Hübner. 2001. Raf-MEK-Erk Cascade in Anoikis Is Controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. *Molecular and Cellular Biology* 21:6706-6717.
98. Steelman, L.S., S.L. Abrams, J. Whelan, F.E. Bertrand, D.E. Ludwig, J. Basecke, M. Libra, F. Stivala, M. Milella, A. Tafuri, P. Lunghi, A. Bonati, A.M. Martelli, and J.A. McCubrey. 2008. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* 22:686-707.
99. Rommel, C., B.A. Clarke, S. Zimmermann, Nu, ntilde, L. ez, R. Rossman, K. Reid, K. Moelling, G.D. Yancopoulos, and D.J. Glass. 1999. Differentiation Stage-Specific Inhibition of the Raf-MEK-ERK Pathway by Akt. *Science (New York, N.Y)* 286:1738-1741.
100. James, S.R., C.P. Downes, R. Gigg, S.J. Grove, A.B. Holmes, and D.R. Alessi. 1996. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *The Biochemical Journal* 315 (Pt 3):709-713.
101. Franke, T.F., D.R. Kaplan, L.C. Cantley, and A. Toker. 1997. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science (New York, N.Y)* 275:665-668.

Literatur

102. Alessi, D.R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, and B.A. Hemmings. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal* 15:6541-6551.
103. Alessi, D.R., S.R. James, C.P. Downes, A.B. Holmes, P.R. Gaffney, C.B. Reese, and P. Cohen. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current Biology* 7:261-269.
104. Williams, M.R., J.S. Arthur, A. Balendran, J. van der Kaay, V. Poli, P. Cohen, and D.R. Alessi. 2000. The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol* 10:439-448.
105. Hill, M.M., M. Andjelkovic, D.P. Brazil, S. Ferrari, D. Fabbro, and B.A. Hemmings. 2001. Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276:25643-25646.
106. Toker, A., and A.C. Newton. 2000. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *Journal Biological Chemistry* 275:8271-8274.
107. Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S.N. Wei, S.Y. Jung, Q.J. Huang, J. Qin, and B. Su. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127:125-137.
108. Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, and D.M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science (New York, N.Y)* 307:1098-1101.
109. Chen, X.G., F. Liu, X.F. Song, Z.H. Wang, Z.Q. Dong, Z.Q. Hu, R.Z. Lan, W. Guan, T.G. Zhou, X.M. Xu, H. Lei, Z.Q. Ye, E.J. Peng, L.H. Du, and Q.Y. Zhuang. 2010. Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways. *Molecular Carcinogenesis* 49:603-610.
110. Foster, K.G., and D.C. Fingar. 2010. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *Journal of Biological Chemistry* 285:14071-14077.
111. Huang, J., and B.D. Manning. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochemical Society Transactions* 37:217-222.
112. Gao, T., F. Furnari, and A.C. Newton. 2005. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular Cell* 18:13-24.
113. Mendoza, M.C., and J. Blenis. 2007. PHLPPing it off: phosphatases get in the Akt. *Molecular Cell* 25:798-800.
114. Kuo, Y.C., K.Y. Huang, C.H. Yang, Y.S. Yang, W.Y. Lee, and C.W. Chiang. 2008. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *Journal of Biological Chemistry* 283:1882-1892.
115. Tremblay, M.L., and V. Giguere. 2008. Phosphatases at the heart of FoxO metabolic control. *Cell Metabolism* 7:101-103.
116. Maehama, T., and J.E. Dixon. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 273:13375-13378.

Literatur

117. Finlay, D., and D. Cantrell. 2010. Phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin pathways control T cell migration. *Annals of the New York Academy of Science* 1183:149-157.
118. Allende, M.L., J.L. Dreier, S. Mandala, and R.L. Proia. 2004. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *Journal of Biological Chemistry* 279:15396-15401.
119. Cyster, J.G. 2007. Specifying the patterns of immune cell migration. *Novartis Foundation Symposium* 281:54-61; discussion 61-54, 208-209.
120. Schwab, S.R., and J.G. Cyster. 2007. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature Immunology* 8:1295-1301.
121. Pappu, R., S.R. Schwab, I. Cornelissen, J.P. Pereira, J.B. Regard, Y. Xu, E. Camerer, Y.W. Zheng, Y. Huang, J.G. Cyster, and S.R. Coughlin. 2007. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science (New York, N.Y)* 316:295-298.
122. Waugh, C., L. Sinclair, D. Finlay, J.R. Bayascas, and D. Cantrell. 2009. Phosphoinositide (3,4,5)-triphosphate binding to phosphoinositide-dependent kinase 1 regulates a protein kinase B/Akt signaling threshold that dictates T-cell migration, not proliferation. *Molecular and Cellular Biology* 29:5952-5962.
123. Kane, L.P., V.S. Shapiro, D. Stokoe, and A. Weiss. 1999. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Current Biology* 9:601-604.
124. Barkett, M., and T.D. Gilmore. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6910-6924.
125. Kasibhatla, S., L. Genestier, and D.R. Green. 1999. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *Journal of Biological Chemistry* 274:987-992.
126. Patra, A.K., T. Drewes, S. Engelmann, S. Chuvpilo, H. Kishi, T. Hunig, E. Serfling, and U.H. Bommhardt. 2006. PKB rescues calcineurin/NFAT-induced arrest of Rag expression and pre-T cell differentiation. *Journal of Immunology* 177:4567-4576.
127. Patra, A.K., S.Y. Na, and U. Bommhardt. 2004. Active protein kinase B regulates TCR responsiveness by modulating cytoplasmic-nuclear localization of NFAT and NF-kappa B proteins. *Journal of Immunology* 172:4812-4820.
128. Zhang, J., X. Xu, and Y. Liu. 2004. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cellular & Molecular Immunology* 1:186-192.
129. Latinis, K.M., L.A. Norian, S.L. Eliason, and G.A. Koretzky. 1997. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *Journal of Biological Chemistry* 272:31427-31434.
130. Patton, D.T., O.A. Garden, W.P. Pearce, L.E. Clough, C.R. Monk, E. Leung, W.C. Rowan, S. Sancho, L.S. Walker, B. Vanhaesebroeck, and K. Okkenhaug. 2006. Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 delta is critical for the function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of Immunology* 177:6598-6602.
131. Crellin, N.K., R.V. Garcia, and M.K. Levings. 2007. Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4+CD25+ T regulatory cells. *Blood* 109:2014-2022.
132. Haxhinasto, S., D. Mathis, and C. Benoist. 2008. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *The Journal of Experimental Medicine* 205:565-574.

Literatur

133. Battaglia, M., A. Stabilini, and M.G. Roncarolo. 2005. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 105:4743-4748.
134. Sauer, S., L. Bruno, A. Hertweck, D. Finlay, M. Leleu, M. Spivakov, Z.A. Knight, B.S. Cobb, D. Cantrell, E. O'Connor, K.M. Shokat, A.G. Fisher, and M. Merckenschlager. 2008. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:7797-7802.
135. Walsh, P.T., J.L. Buckler, J. Zhang, A.E. Gelman, N.M. Dalton, D.K. Taylor, S.J. Bensinger, W.W. Hancock, and L.A. Turka. 2006. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+ CD25+ Tregs. *The Journal of Clinical Investigation* 116:2521-2531.
136. Cho, H., J.L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng, and M.J. Birnbaum. 2001. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *Journal of Biological Chemistry* 276:38349-38352.
137. Garofalo, R.S., S.J. Orena, K. Rafidi, A.J. Torchia, J.L. Stock, A.L. Hildebrandt, T. Coskran, S.C. Black, D.J. Brees, J.R. Wicks, J.D. McNeish, and K.G. Coleman. 2003. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β . *The Journal of Clinical Investigation* 112:197-208.
138. Tschopp, O., Z.Z. Yang, D. Brodbeck, B.A. Dummler, M. Hemmings-Mieszczak, T. Watanabe, T. Michaelis, J. Frahm, and B.A. Hemmings. 2005. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development (Cambridge, England)* 132:2943-2954.
139. Peng, X.D., P.Z. Xu, M.L. Chen, A. Hahn-Windgassen, J. Skeen, J. Jacobs, D. Sundararajan, W.S. Chen, S.E. Crawford, K.G. Coleman, and N. Hay. 2003. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & Development* 17:1352-1365.
140. Yang, Z.Z., O. Tschopp, N. Di-Poi, E. Bruder, A. Baudry, B. Dummler, W. Wahli, and B.A. Hemmings. 2005. Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Molecular and Cellular Biology* 25:10407-10418.
141. Dummler, B., O. Tschopp, D. Hynx, Z.Z. Yang, S. Dirnhofer, and B.A. Hemmings. 2006. Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Molecular and Cellular biology* 26:8042-8051.
142. Rathmell, J., R. Elstrom, R. Cinalli, and C. Thompson. 2003. Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma. *European Journal of Immunology* 33:2223-2232.
143. Na, S.-Y., A. Patra, Y. Scheuring, A. Marx, M. Tolaini, D. Kioussis, B. Hemmings, T. Hunig, and U. Bommhardt. 2003. Constitutively Active Protein Kinase B Enhances Lck and Erk Activities and Influences Thymocyte Selection and Activation. *Journal of Immunology* 171:1285-1296.
144. Weinshenker, B.G. 1996. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurologic Clinics* 14:291-308.

Literatur

145. Mangan, P.R., L.E. Harrington, D.B. O'Quinn, W.S. Helms, D.C. Bullard, C.O. Elson, R.D. Hatton, S.M. Wahl, T.R. Schoeb, and C.T. Weaver. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234.
146. McGeachy, M.J., K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, and D.J. Cua. 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nature Immunology* 8:1390-1397.
147. Aranami, T., and T. Yamamura. 2008. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergology International* 57:115-120.
148. Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher, and A. Prat. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Medicine* 13:1173-1175.
149. Huppert, J., D. Closhen, A. Croxford, R. White, P. Kulig, E. Pietrowski, I. Bechmann, B. Becher, H.J. Luhmann, A. Waisman, and C.R.W. Kuhlmann. 2010. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *The FASEB Journal* 24:1023-1034.
150. Noseworthy, J.H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez, and B.G. Weinshenker. 2000. Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 343:938-952.
151. Hebb, A.L., C.S. Moore, V. Bhan, and G.S. Robertson. 2008. Targeting apoptosis to treat multiple sclerosis. *Current Drug Discovery Technologies* 5:75-77.
152. Conway, D., and J.A. Cohen. 2010. Combination therapy in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 9:299-308.
153. Kieseier, B., H. Wiendl, V. Leussink, and O. Stüve. 2008. Immunomodulatory treatment strategies in multiple sclerosis. *Journal of Neurology* 255:15-21.
154. La Mantia, L., L.M. Munari, and R. Lovati. 2010. Glatiramer acetate for multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)* 5:CD004678.
155. Polman, C.H., P.W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D.H. Miller, J.T. Phillips, F.D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M.A. Panzara, and A.W. Sandrock. 2006. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 354:899-910.
156. Martino, G., R.J.M. Franklin, A.B. Van Evercooren, and D.A. Kerr. 2010. Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects. *Nature Reviews Neurology* 6:247-255.
157. Petratos, S., M.F. Azari, E. Ozturk, R. Papadopoulos, and C.C. Bernard. 2010. Novel therapeutic targets for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 69:323-334.
158. Bettelli, E. 2007. Building different mouse models for human MS. *Annals of the New York Academy of Science* 1103:11-18.
159. McFarland, H.F., and R. Martin. 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunology* 8:913-919.
160. Samoilova, E.B., J.L. Horton, B. Hilliard, T.S. Liu, and Y. Chen. 1998. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *Journal of Immunology* 161:6480-6486.

Literatur

161. Okuda, Y., S. Sakoda, C.C. Bernard, H. Fujimura, Y. Saeki, T. Kishimoto, and T. Yanagihara. 1998. IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *International Immunology* 10:703-708.
162. Mendel, I., A. Katz, N. Kozak, A. Ben-Nun, and M. Revel. 1998. Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *European Journal of Immunology* 28:1727-1737.
163. Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T.B. Strom, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484-487.
164. Nurieva, R., X.O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A.D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S.S. Watowich, A.M. Jetten, and C. Dong. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448:480-483.
165. Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D.E. Levy, W.J. Leonard, and D.R. Littman. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology* 8:967-974.
166. Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 201:233-240.
167. Lutton, J.D., R. Winston, and T.C. Rodman. 2004. Multiple sclerosis: etiological mechanisms and future directions. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J)* 229:12-20.
168. Kohm, A.P., P.A. Carpentier, H.A. Anger, and S.D. Miller. 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 169:4712-4716.
169. McGeachy, M.J., L.A. Stephens, and S.M. Anderton. 2005. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *Journal of Immunology* 175:3025-3032.
170. Bettelli, E., M.P. Das, E.D. Howard, H.L. Weiner, R.A. Sobel, and V.K. Kuchroo. 1998. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *Journal of Immunology* 161:3299-3306.
171. Moore, K.W., R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Reviews of Immunology* 19:683-765.
172. Li, M.O., Y.Y. Wan, and R.A. Flavell. 2007. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26:579-591.
173. Golovina, T.N., T. Mikheeva, M.M. Suhoski, N.A. Aqui, V.C. Tai, X. Shan, R. Liu, R.R. Balcarcel, N. Fisher, B.L. Levine, R.G. Carroll, N. Warner, B.R. Blazar, C.H. June, and J.L. Riley. 2008. CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function. *Journal of Immunology* 181:2855-2868.

Literatur

174. Tchilian, E.Z., and P.C. Beverley. 2006. Altered CD45 expression and disease. *Trends in Immunology* 27:146-153.
175. Karandikar, N.J., C.L. Vanderlugt, J.A. Bluestone, and S.D. Miller. 1998. Targeting the B7/CD28:CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *Journal of Neuroimmunology* 89:10-18.
176. Venturi, G.M., R.M. Conway, D.A. Steeber, and T.F. Tedder. 2007. CD25+CD4+ regulatory T cell migration requires L-selectin expression: L-selectin transcriptional regulation balances constitutive receptor turnover. *Journal of Immunology* 178:291-300.
177. Frauwirth, K.A., J.L. Riley, M.H. Harris, R.V. Parry, J.C. Rathmell, D.R. Plas, R.L. Elstrom, C.H. June, and C.B. Thompson. 2002. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 16:769-777.
178. Bensinger, S.J., P.T. Walsh, J. Zhang, M. Carroll, R. Parsons, J.C. Rathmell, C.B. Thompson, M.A. Burchill, M.A. Farrar, and L.A. Turka. 2004. Distinct IL-2 Receptor Signaling Pattern in CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Journal of Immunology* 172:5287-5296.
179. Asseman, C., S. Fowler, and F. Powrie. 2000. Control of experimental inflammatory bowel disease by regulatory T cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162:S185-189.
180. Powrie, F., J. Carlino, M.W. Leach, S. Mauze, and R.L. Coffman. 1996. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 183:2669-2674.
181. Schneider, H., E. Valk, R. Leung, and C.E. Rudd. 2008. CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B (PKB/AKT) sustains T-cell anergy without cell death. *Public Library of Science one* 3:e3842.
182. Frank, D.A., M.J. Robertson, A. Bonni, J. Ritz, and M.E. Greenberg. 1995. Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7779-7783.
183. Zeiser, R., and R.S. Negrin. 2008. Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)* 7:458-462.
184. Zeiser, R., D.B. Leveson-Gower, E.A. Zambricki, N. Kambham, A. Beilhack, J. Loh, J.Z. Hou, and R.S. Negrin. 2008. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood* 111:453-462.
185. Delgoffe, G.M., T.P. Kole, Y. Zheng, P.E. Zarek, K.L. Matthews, B. Xiao, P.F. Worley, S.C. Kozma, and J.D. Powell. 2009. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* 30:832-844.
186. Li, L., W.R. Godfrey, S.B. Porter, Y. Ge, C.H. June, B.R. Blazar, and V.A. Boussiotis. 2005. CD4+CD25+ regulatory T-cell lines from human cord blood have functional and molecular properties of T-cell anergy. *Blood* 106:3068-3073.
187. Datta, S.R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M.E. Greenberg. 1997. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* 91:231-241.

Literatur

188. Datta, S.R., A. Katsov, L. Hu, A. Petros, S.W. Fesik, M.B. Yaffe, and M.E. Greenberg. 2000. 14-3-3 Proteins and Survival Kinases Cooperate to Inactivate BAD by BH3 Domain Phosphorylation. *Molecular Cell* 6:41-51.
189. Lord, J.D., B.C. McIntosh, P.D. Greenberg, and B.H. Nelson. 2000. The IL-2 Receptor Promotes Lymphocyte Proliferation and Induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x Genes Through the trans-Activation Domain of Stat5. *Journal of Immunology* 164:2533-2541.
190. Moelling, K., K. Schad, M. Bosse, S. Zimmermann, and M. Schweneker. 2002. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *Journal of Biological Chemistry* 277:31099-31106.
191. Pierau, M., S. Engelmann, D. Reinhold, T. Lapp, B. Schraven, and U.H. Bommhardt. 2009. Protein Kinase B/Akt Signals Impair Th17 Differentiation and Support Natural Regulatory T Cell Function and Induced Regulatory T Cell Formation. *Journal of Immunology* 183:6124-6134.
192. Colpitts, S.L., N.M. Dalton, and P. Scott. 2009. IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of both CD62L^{high} central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania major* infection. *Journal of Immunology* 182:5702-5711.
193. Harnaha, J., J. Machen, M. Wright, R. Lakomy, A. Styche, M. Trucco, S. Makaroun, and N. Giannoukakis. 2006. Interleukin-7 is a survival factor for CD4⁺ CD25⁺ T-cells and is expressed by diabetes-suppressive dendritic cells. *Diabetes* 55:158-170.
194. Wohlfert, E.A., and R.B. Clark. 2007. 'Vive la Resistance!'--the PI3K-Akt pathway can determine target sensitivity to regulatory T cell suppression. *Trends in Immunology* 28:154-160.
195. King, C.G., J.L. Buckler, T. Kobayashi, J.R. Hannah, G. Bassett, T. Kim, E.L. Pearce, G.G. Kim, L.A. Turka, and Y. Choi. 2008. Cutting edge: requirement for TRAF6 in the induction of T cell anergy. *Journal of Immunology* 180:34-38.
196. Locke, N.R., S.J. Patterson, M.J. Hamilton, L.M. Sly, G. Krystal, and M.K. Levings. 2009. SHIP regulates the reciprocal development of T regulatory and Th17 cells. *Journal of Immunology* 183:975-983.
197. Bopp, T., A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, S. Schmitt, C. Richter, M. Klein, H. Schild, E. Schmitt, and M. Stassen. 2005. NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4⁺ T lymphocytes by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 201:181-187.
198. Apostolou, I., and H. von Boehmer. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 199:1401-1408.
199. Liu, Y., S. Amarnath, and W. Chen. 2006. Requirement of CD28 signaling in homeostasis/survival of TGF-beta converted CD4⁺CD25⁺ Tregs from thymic CD4⁺CD25⁻ single positive T cells. *Transplantation* 82:953-964.
200. Lyddane, C., B.U. Gajewska, E. Santos, P.D. King, G.C. Furtado, and M. Sadelain. 2006. Cutting Edge: CD28 controls dominant regulatory T cell activity during active immunization. *Journal of Immunology* 176:3306-3310.
201. Tang, Q., K.J. Henriksen, E.K. Boden, A.J. Tooley, J. Ye, S.K. Subudhi, X.X. Zheng, T.B. Strom, and J.A. Bluestone. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Journal of Immunology* 171:3348-3352.

Literatur

202. Mills, K.H. 2008. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *European Journal of Immunology* 38:2636-2649.
203. Chatila, T.A. 2005. Role of regulatory T cells in human diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116:949-959; quiz 960.
204. Chang, T.T., C. Jabs, R.A. Sobel, V.K. Kuchroo, and A.H. Sharpe. 1999. Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine* 190:733-740.
205. Srinivasan, M., I.E. Gienapp, S.S. Stuckman, C.J. Rogers, S.D. Jewell, P.T. Kaumaya, and C.C. Whitacre. 2002. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using peptide mimics of CD28. *Journal of Immunology* 169:2180-2188.
206. Perrin, P.J., C.H. June, J.H. Maldonado, R.B. Ratts, and M.K. Racke. 1999. Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 163:1704-1710.

8 Abkürzungen

AICD	<i>activation induced cell death</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	Antigen Präsentierende Zelle
BAD	<i>Bcl2-associated agonist of cell death</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>Bcl-2 like protein</i>
bp	Basenpaare
Breg	regulatorische B-Zelle
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CFA	<i>complete Freund's adjuvans</i>
CFSE	<i>Carboxyfluoresceinsuccinimidylester</i>
c-Myb	<i>cellular myeloblastosis oncogene</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CTL	zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
DC	dendritische Zelle
DDAO	<i>Dodecyldimethylamineoxide</i>
DN	doppelt-negativ
DP	doppelt-positiv
EAE	experimentelle autoimmune enzephalomyelitis
Erk	<i>extracellular signal related kinase</i>
Fitc	Fluoreszeinisothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box P3 protein</i>
GARP	<i>glycoprotein A repetitions predominant</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNF receptor family related protein</i>
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 Beta
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon

Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILK	Integrin gekoppelte Kinase
IRF-4	<i>interferon regulatory factor 4</i>
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
KLF2	<i>krüppel like factor 2</i>
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mLST8	<i>mammalian lethal with sec13 protein 8</i>
MOG	Myelin Oligodendroglia Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
PDK1	3-phosphoinositol-abhängige Kinase 1
PE	Phycoerythrin
PHLPP	<i>PH domain and leucin rich repeat protein phosphatase</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PP2A	Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue localized on chromosome ten</i>
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
RAG	Rekombination aktivierendes Gen
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RORγt	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor γt</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
Ser	Serin

Abkürzungsverzeichnis

SHP	<i>SH2 domain-containing phosphatase</i>
SIN1	<i>stress-activated-protein-kinase-interacting protein 1</i>
SP	einfach positiv
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
tg	transgen
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
Th	T-Helfer-Zelle
Thr	Threonin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
ToB	<i>T of B</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
TSC2	<i>tuberous sclerosis protein 2</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VLA-4	<i>very late antigen 4</i>
wt	Wildtyp, wildtypisch

9 *Curriculum vitae*

Name: Swen Engelmann
Geburtstag: 07.11.1976
E-Mail: swen.engelmann@med.ovgu.de
swennemann@web.de
Tel.: Büro: +49 391 6717897
Privat: +49 391 5909323
Anschrift: Bergstrasse 8b
39116 Magdeburg
Deutschland
Geschlecht: männlich
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Beruflicher Hintergrund

seit 06/2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe A. Reinhold an der Otto von-Guericke-Universität Magdeburg, Projekt: „Der ADAP/SKAP-HOM-Komplex und seine Rolle bei der Adhäsion und Migration antigenpräsentierender Zellen“

11/2005 – 05/2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe U. Bommhardt an der Otto von-Guericke-Universität Magdeburg, Projekt: „Einfluss der Proteinkinase B (PKB/Akt) auf Differenzierungsprozesse von T-Helferzellen und den Verlauf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)“

Curriculum vitae

10/1997 - 09/2000 Ausbildung zum Medizinisch Technischen Laborassistenten an der Medizinischen Fachschule am Carl-Thiem-Klinikum in Cottbus

Hochschulausbildung

11/2005 – 05/2010 Anfertigung der Dissertation zum Thema: „Einfluss der Proteinkinase B (PKB/Akt) auf Differenzierungsprozesse von T-Helferzellen und den Verlauf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)“ bei PD Dr. Ursula Bommhardt im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg

10/2000 – 09/2005 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
Abschluss: Diplom, Note: gut Diplomarbeit in der Forschungsgruppe Einsle im Institut für Strukturbiologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
Titel: „Untersuchungen zur Stickstofffixierung in *Geobacter sulfurreducens* und *Wolinella succinella*“

Veröffentlichungen

1. Publikationen

04/2011 Bhattacharyya S, Deb J, Patra AK, Thuy Pham DA, Chen W, Vaeth M, Berberisch-Siebelt F, Klein-Hessling S, Lamperti ED, Reifenberg K, Jellusova J, Schweizer A, Nitschke L, Leich E, Rosenwald A, Brunner C, **Engelmann S**, Bommhardt U, Avots A, Müller MR, Kondo E und Serfling E. NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin-NFAT signaling network. J Exp Med. 2011 Apr 11;208(4):823-39

11/2009 Pierau M*, **Engelmann S***, Reinhold D, Lapp T, Schraven B und Bommhardt UH. Protein Kinase B/Akt Signals Impair Th17 Differentiation and Support nTreg Function and iTreg Formation. J Immunol., 2009 Nov 15;183(10):6124-34

*Erstkoautorenschaft

Curriculum vitae

10/2006 Patra AK, Drewes T, **Engelmann S**, Chuvpilo S, Kishi H, Hünig T, Serfling E, Bommhardt UH. PKB rescues calcineurin/NFAT-induced arrest of Rag expression and pre-T cell differentiation. J Immunol. 2006 Oct 1;177(7):4567-76

2. Poster

09/2010 Pierau M, **Engelmann S**, Drewes T, Lapp T, Schraven B und Bommhardt UH. On the crosstalk of Akt/PKB and TGF β 1 signaling cascades in T cells. Posterpräsentation auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (Dgfi). Leipzig, Deutschland 2010.

09/2009 Pierau M, **Engelmann S**, Reinhold D, Schraven B und Bommhardt UH. PKB/Akt signals support Treg differentiation and function but oppose Th17 generation. Posterpräsentation auf dem 2. Europäischen Immunologie Kongress (ECI). Berlin, Deutschland 2009.

09/2007 Pierau M, **Engelmann S**, Drewes T, Reinhold, Lapp T, Schraven B und Bommhardt UH. Cross-talk of PKB/Akt with TGF- β signaling in T cell activation. Posterpräsentation auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfi). Heidelberg, Deutschland 2009.

10 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank meiner Betreuerin PD Dr. Ursula Bommhardt. Ihr verdanke ich die Überlassung des interessanten und spannenden Themas, welches vielseitige Forschungsansätze geboten hat. Sie hat sich stets kritisch mit meiner Arbeit auseinandergesetzt und dessen Fortschreiten vorangetrieben, so dass diese am Ende von Erfolg gekrönt war. Ich habe mich unter ihrer Leitung als Wissenschaftler entscheidend weiterentwickelt.

Für die Möglichkeit am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie zu arbeiten und für die Unterbreitung von vielen hilfreichen Vorschlägen und Ideen möchte ich Prof. Dr. Burkart Schraven danken. Seine wissenschaftlichen Anregungen motivierten mich stets und halfen mir ebenfalls mich weiter zu entwickeln.

Prof. Dirk Reinhold hat mich bei der Durchführung der Tierversuche tatkräftig unterstützt, sei es durch das zur Verfügung stellen von Reagenzien und Materialien oder dem geduldigen Anlernen eines jungen Doktoranden *in punkto* Mausimmunisierung. Dafür und für seinen tiefgründigen Frohsinn, der mich immer wieder motiviert hat, bin ich ihm überaus dankbar.

Gleiches gilt für die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe Gabi Weitz, Mandy Pierau, Thomas Drewes und Thabo Lapp. Neben der liebenswerten und familiären Art mit der sie mich stets in Laborfragen unterstützt haben, möchte ich ihnen besonders dafür danken, dass sie in allen Lebenslagen immer ein offenes Ohr für mich hatten. Die sehr entspannte Atmosphäre hat mir oft geholfen den Kopf nicht hängen zu lassen und mich immer wieder hoch motiviert. Besonders ans Herz gewachsen sind mir Mandy und Gabi, deren guter Laune man sich nur schwerlich entziehen kann, und das ist auch gut so. Desweiteren waren sie unermüdlich um mein seelisches und Leibliches wohl bedacht. Dafür bin ich unendlich dankbar.

Ein weiterer Dank gilt Mauro Togni. Auch er hat mir in Laborfragen sehr geholfen. Unvergeßlich ist jedoch sein nicht enden wollendes Repertoire an Witzen und sein unschlagbarer Humor.

Besonders dankbar bin ich auch Annegret Reinhold. Sie gab mir die Möglichkeit nach Auslaufen des Vertrages bei der AG Bommhardt, in ihrem Labor weiter beschäftigt zu sein. Ich weiß das sehr zu schätzen und bin sehr dankbar dafür, dass sie mir die Möglichkeit des „bezahlten“ Schreibens eröffnet hat.

Für unglaublichen Muskelkater, der mich andere Schmerzen vergessen ließ möchte ich Mike und Anja danken. Die regelmäßigen Strapazen waren der perfekte Ausgleich zum alltäglichen Laborleben.

Danksagung

Besonders während der Schreibphase hat mir Clemens moralische Unterstützung im Büro zu teil werden lassen, danke dafür.

Auch allen hier ungenannten Mitarbeitern des Institutes für Molekulare und Klinische Immunologie gilt mein herzlicher Dank. Ich bedanke mich bei allen für ihre hilfsbereite Unterstützung. Besonderen Dank bekunden möchte ich hierbei Anja Polantzki. Ich bin ihr sehr verbunden für zahlreiche Liter Kaffee und dem geduldigen Ertragen meiner Sorgen. Die tägliche Kaffeepause möchte ich nicht mehr missen.

Zu guter letzt, aber nicht minder von Bedeutung ist der Dank, der meiner Familie und meinen Freunden gilt. Sie haben es geschafft, nie den Glauben an mich zu verlieren. Für die Unterstützung während meiner Doktorandenzeit möchte ich ihnen meinen Dank aussprechen. Sie haben mich zudem stets daran erinnert, was wirklich wichtig ist und dass sie endlich was feiern wollen.