

Proteinkinase B- und TGF β 1-Signalwege: Untersuchungen zu ihrer Interaktion bei der Th-Zelldifferenzierung

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 Biologin Mandy Pierau
geb. am 03.08.1978 in Stendal, Deutschland

Gutachter: PD Dr. Ursula Bommhardt
 Prof. Dr. Ottmar Janßen

eingereicht am: 26.09.2011
verteidigt am: 09.03.2012

1	Einleitung	5
1.1	Das Immunsystem	5
1.1.1	Entwicklung und Funktion von T-Helfer-Zellsubpopulationen	6
1.1.1.1	Th1-Zellen	9
1.1.1.2	Th2-Zellen	10
1.1.1.3	Regulatorische T-Zellen (Treg): nTreg und iTreg	11
1.1.1.4	Th17-Zellen	17
1.2	Transforming Growth Factor-β (TGFβ) im Immunsystem	20
1.2.1	Der TGF β 1-Signalweg	21
1.2.1.1	Die TGF β 1-Aktivierung.....	21
1.2.1.2	Der TGF β 1-induzierte Smad-abhängige Signalweg	22
1.2.1.3	TGF β -induzierte Smad-unabhängige Signalwege	24
1.3	Proteinkinase B (PKB/Akt)	26
1.3.1	Aktivierung der PKB.....	27
1.3.2	Substrate und Funktionen der PKB	30
1.3.3	PKB in Treg-Zellen	33
1.3.4	PKB-transgene und -defiziente Mäuse.....	34
1.4	Zielstellung der Arbeit	37
2	Material und Methoden	38
2.1	Material	38
2.1.1	Mauslinien.....	38
2.1.2	Medien und Puffer	38
2.1.2.1	Zellkulturmedium.....	38
2.1.2.2	Puffer für die Maus-Genotypisierung	39
2.1.2.3	Puffer für die Isolierung von CD4 ⁺ T-Zellen	40
2.1.2.4	FACS-Analyse.....	40
2.1.2.5	Puffer für SDS-Page und Western-Blot-Analyse	40
2.1.2.6	Puffer für Proteinextrakte	43
2.1.3	Antikörper (Ak).....	43
2.1.3.1	Antikörper zur Stimulation.....	43
2.1.3.2	Antikörper zur Zellisolation mittels MACS.....	44
2.1.3.3	Primär-Antikörper für Western-Blot.....	44
2.1.3.4	Sekundär-Antikörper für Western-Blot	45
2.1.3.5	FACS-Antikörper	46
2.1.3.6	Sonstige Farbstoffe	47
2.1.3.7	DNA- und Protein-Marker.....	47
2.1.4	Zytokine und Zellstimulanzen	47
2.1.5	Geräte	48

2.1.6	Verbrauchsmaterialien	49
2.1.7	Chemikalien und Kits	49
2.1.8	Radioisotope	51
2.2	Methoden.....	52
2.2.1	Maus-Genotypisierung.....	52
2.2.1.1	Präparation genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsaten	52
2.2.1.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	52
2.2.1.3	Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	54
2.2.2	Organentnahme	55
2.2.3	T-Zellisolation.....	55
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl	56
2.2.5	Isolierung naiver CD4 ⁺ bzw. CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	56
2.2.6	Proliferationstest	57
2.2.6.1	³ [H]-Thymidineinbau.....	57
2.2.6.2	CFSE-Markierung	58
2.2.7	FACS-Analyse	59
2.2.7.1	Oberflächenfärbung von T-Zellen	59
2.2.7.2	Intrazelluläre Messung von Proteinen durch FACS-Analyse.....	59
2.2.8	Induktion von iTreg-Zellen	60
2.2.9	Differenzierung von Th17-Zellen	60
2.2.10	Zytokinmessung	61
2.2.11	Proteinbiochemische Methoden	61
2.2.11.1	Herstellung von zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakten	61
2.2.11.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	62
2.2.11.3	Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)	62
2.2.11.4	Western-Blot-Analyse	63
2.2.12	Statistische Analyse der Daten	64
3	Ergebnisse.....	65
3.1	Einfluss aktiver PKB auf die T-Zellproliferation.....	65
3.1.1	Erhöhte PKB-Signale ermöglichen T-Zellproliferation in Anwesenheit von TGFβ1	65
3.1.2	Erhöhte PKB-Signale in stimulierten wt und CD28 ^{-/-} CD4 ⁺ T-Zellen induzieren mehrfache Zellteilungen in Anwesenheit von TGFβ1.....	66
3.1.3	PKBtg CD4 ⁺ T-Zellen proliferieren in Gegenwart hoher TGFβ1-Konzentrationen	68
3.1.4	Einfluss von TGFβ1- und PKB-Signalen auf den Phänotyp aktivierter T-Zellen	69
3.1.5	Exogenes IL-2 ermöglicht die Proliferation CD3-Ak+TGFβ1-stimulierter CD4 ⁺ T-Zellen	73
3.1.6	TGFβ1 hemmt die Proliferation „voraktivierter“ CD4 ⁺ T-Zellen.....	74

3.2	Einfluss von PKB auf TGFβ1-induzierte Differenzierung zu iTreg.....	75
3.2.1	Erhöhte PKB-Signale fördern die Foxp3-Expression und iTreg-Entwicklung von wt und CD28 ^{-/-} CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen	75
3.2.2	Verstärkte PKB-Signale fördern die Interleukinbildung in CD4 ⁺ T-Zellen unter iTreg-induzierenden Bedingungen	77
3.2.3	Erhöhte PKB-Signale fördern die Ausbildung zytokinproduzierender iTreg bei CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation	79
3.2.4	Analyse der Proteinexpression bei Stimulation mit CD3-Ak und TGFβ1	81
3.2.5	Analyse der Proteinexpression bei Stimulation mit CD3+CD28-Ak und TGFβ1	83
3.2.6	Expression von Transkriptionsfaktoren in CD28 ^{-/-} CD4 ⁺ T-Zellen bei iTreg-Differenzierung.....	85
3.3	Einfluss von PKB auf die Differenzierung von Th17-Zellen	88
3.3.1	Aktive PKB vermindert die Th17-Differenzierung <i>in vitro</i>	88
3.3.2	Aktive PKB hat keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion in CD4 ⁺ T-Zellen unter Th17-induzierenden Bedingungen	90
3.3.3	Verstärkte PKB-Signale reduzieren die Interleukinbildung in Th17-Zellen unter Th17-induzierenden Stimulationsbedingungen.....	91
3.3.4	Transkriptionsfaktor-Expression in wt und PKBtg CD4 ⁺ T-Zellen unter Th17-polarisierenden Stimulationsbedingungen.....	92
4	Diskussion.....	96
5	Zusammenfassung	108
6	Summary.....	109
7	Literatur	110
8	Abkürzungen	134
9	Curriculum vitae.....	137
10	Danksagung.....	141
11	Selbstständigkeitserklärung.....	143

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein hochdifferenziertes und anpassungsfähiges Verteidigungssystem, das den Organismus vor Infektionen schützt. Es erkennt und inaktiviert in den Organismus eingedrungene extrazelluläre Krankheitserreger und eliminiert virus-, bakterien- sowie pilzinfizierte Körperzellen bzw. Krebszellen. Eine erste Verteidigungslinie bilden mechanische und physiologische Barrieren, wie Haut, Schleimhaut, Magensäure und der Darm, die das Eindringen von Pathogenen erschweren. Neben diesen Barrieren untergliedert sich das Immunsystem in unspezifische und spezifische zelluläre Abwehrmechanismen. Das unspezifische oder angeborene Immunsystem ist physiologisch sehr alt und setzt unmittelbar nach einer Infektion ein. Es umfasst die Aktivierung des Komplementsystems, die Produktion von Zytokinen und die Aktivierung verschiedener Phagozyten, die viele der üblichen Mikroorganismen eliminieren. Die unspezifischen Abwehrmechanismen beruhen teils auf Rezeptoren auf Immunzellen, die allgemein vorkommende Strukturen von Krankheitserregern erkennen.

Die spezifische oder adaptive Immunabwehr setzt 4-7 Tage nach einer Infektion ein, ist induzierbar und erzeugt ein immunologisches Gedächtnis. Sie ist antigenspezifisch, erkennt körperfremdes und toleriert in der Regel körpereigenes Zellmaterial, jedoch werden auch körpereigene entartete Tumorzellen erkannt und bekämpft (Flajnik und Pasquier, 2004). Die adaptive Immunabwehr umfasst die zelluläre und humorale Immunantwort, die von antigenspezifischen Lymphozyten, den B- und T-Lymphozyten vermittelt wird. B-Lymphozyten sind durch die Ausbildung antigenspezifischer Antikörper (Ig=Immunglobuline) für die humorale Immunantwort verantwortlich. Die sezernierten Antikörper zirkulieren passiv im Blut und den Lymph- bzw. Gewebeflüssigkeiten und wandern nicht aktiv an den Ort einer Infektion. Intrazelluläre Infektionen, verursacht durch Bakterien, Parasiten oder Viren, werden im Rahmen der zellulären Immunantwort durch T-Lymphozyten bekämpft.

Die zellulären Komponenten des Immunsystems umfassen eine Vielzahl von Zellpopulationen, die aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks oder der fetalen Leber differenzieren. Aus pluripotenten Zellen gehen zwei spezialisierte Stammzelltypen hervor, die gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen (CLP=*common lymphoid progenitor*), aus denen sich natürliche

Killerzellen (NK-Zellen), B- und T-Lymphozyten bilden, und die gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CMP=*common myeloid progenitor*), aus denen die verschiedenen Typen der polymorphkernigen Leukozyten (Granulozyten), die Erythrozyten sowie Megakaryozyten differenzieren.

T-Lymphozyten reifen im Thymus und exprimieren als Antigenrezeptor den T-Zellrezeptor (TCR), der aus einer α - und β -Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind, besteht. Jede Kette enthält eine konstante und variable Immunglobulin-domäne sowie eine Transmembranregion und zytoplasmatische Domäne. Eine Minderheit der T-Zellen trägt einen strukturell ähnlichen TCR, den $\gamma\delta$ -TCR. B-Zellen dagegen reifen im Knochenmark und membrangebundene Immunglobuline auf der B-Zelloberfläche dienen als B-Zell-Antigenrezeptoren (BCR). Reife T- und B-Zellen zirkulieren zwischen dem Blut und peripheren lymphatischen Geweben. B-Zellen differenzieren nach Antigenkontakt zu antikörpersezernierenden Plasmazellen, während sich T-Zellen zu verschiedenen Effektorzelltypen entwickeln.

1.1.1 Entwicklung und Funktion von T-Helfer-Zellsubpopulationen

CD4⁺ T-Helfer-Zellen (Th) sezernieren nach Antigenerkennung und Aktivierung verschiedene Zytokine, die andere Komponenten des Immunsystems, z.B. Makrophagen und B-Zellen, aktivieren und somit den effektiven Ablauf einer Immunantwort steuern und zur Eliminierung der Erreger beitragen. Sie werden anhand des von ihnen ausgeschütteten Zytokinspektrums in verschiedene Th-Subpopulationen eingeteilt.

Th-Zellen reifen im Thymus aus Vorläuferzellen, die keinen TCR und keine Korezeptormoleküle (CD4 und CD8) auf der Zelloberfläche exprimieren und daher als doppelt-negative (DN) Thymozyten bezeichnet werden. DN-Thymozyten durchlaufen mehrere Entwicklungsstadien (DN1-4), in denen zunächst der prä-TCR, bestehend aus einer β -Kette und Ersatz- α -Kette (präT α), gebildet wird. Erst nachdem über den prä-TCR erfolgreich Signale übertragen wurden (sog. β -Selektion), können die DN3-Zellen weiter reifen (Groettrup und von Boehmer, 1993). DN4-Zellen beginnen die Korezeptoren CD4 und CD8 zu exprimieren und differenzieren zu doppelt-positiven (DP)-Thymozyten. Anschliessend werden in den DP-Thymozyten die Gene für die α -Kette umgeordnet. Im weiteren Verlauf der T-Zellentwicklung

findet im Kortex des Thymus die positive Selektion der DP-Zellen statt. Erkennt der „reife“ α/β -TCR körpereigene MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) auf korticalen Thymusepithelzellen im Kontext mit Selbst-Peptiden mit mittlerer Affinität werden die DP-Thymozyten positiv selektioniert. Wenn der TCR allerdings keine oder nur eine inadäquate Wechselwirkung mit dem Selbst-MHC-Peptid-Komplex eingeht, wird die Zelle durch Apoptose (*death by neglect*) eliminiert. In der Medulla des Thymus werden DP-Zellen negativ selektioniert, deren TCRs eine zu starke Affinität für durch dendritische Zellen (DC) und medulläre Epithelzellen (mTEC) präsentierte Autoantigene aufweisen. Positive und negative Selektion gewährleisten die Entstehung eines funktionellen T-Zellrepertoires und zentrale T-Zelltoleranz (Kappler et al., 1987; Bommhardt et al., 2004; von Boehmer und Melchers, 2010). Nur etwa 5% der DP-Thymozyten überleben diese strengen Ausleseprozesse und reifen zu einfach-positiven (SP=*single positive*) T-Zellen: CD8-Korezeptor-exprimierende zytotoxische T-Zellen (CTL) oder CD4-Korezeptor-exprimierende Th-Zellen. Reife SP-T-Zellen werden in die Peripherie entlassen, wo sie nach antigenspezifischer Aktivierung ihre Aufgaben als T-Effektorzellen wahrnehmen. CD8⁺ T-Zellen erkennen Peptide präsentiert über MHC-I-Moleküle, wohingegen CD4⁺ Th-Zellen Antigene erkennen, die über MHC-II-Moleküle präsentiert werden. MHC-I-Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren von intrazellulären Proteinen generierte Peptide. MHC-II-Moleküle werden auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie DC, B-Zellen und Makrophagen, exprimiert. Sie präsentieren Peptide von extrazellulären Antigenen, die von den APC aufgenommen und endosomal durch Proteasen prozessiert werden. Dabei erkennen T-Zellen das vom MHC-Komplex präsentierte Peptid über ihren spezifischen TCR (Arstila et al., 1999).

Für die Aktivierung einer naiven T-Zelle sind neben der Bindung von TCR und Korezeptor an die MHC/Antigen-Komplexe kostimulatorische Signale nötig. Diese werden vornehmlich durch Interaktion von CD28 auf naiven T-Zellen mit B7-Liganden (CD80, CD86) auf der Oberfläche von APC vermittelt. Nach erfolgreicher Aktivierung wird durch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren die Produktion von Zytokinen und die klonale Expansion der Th-Zellen sowie die Differenzierung zu verschiedenen T-Effektorzellen bewirkt (Radvanyi et al., 1996; Zhu und Paul, 2010).

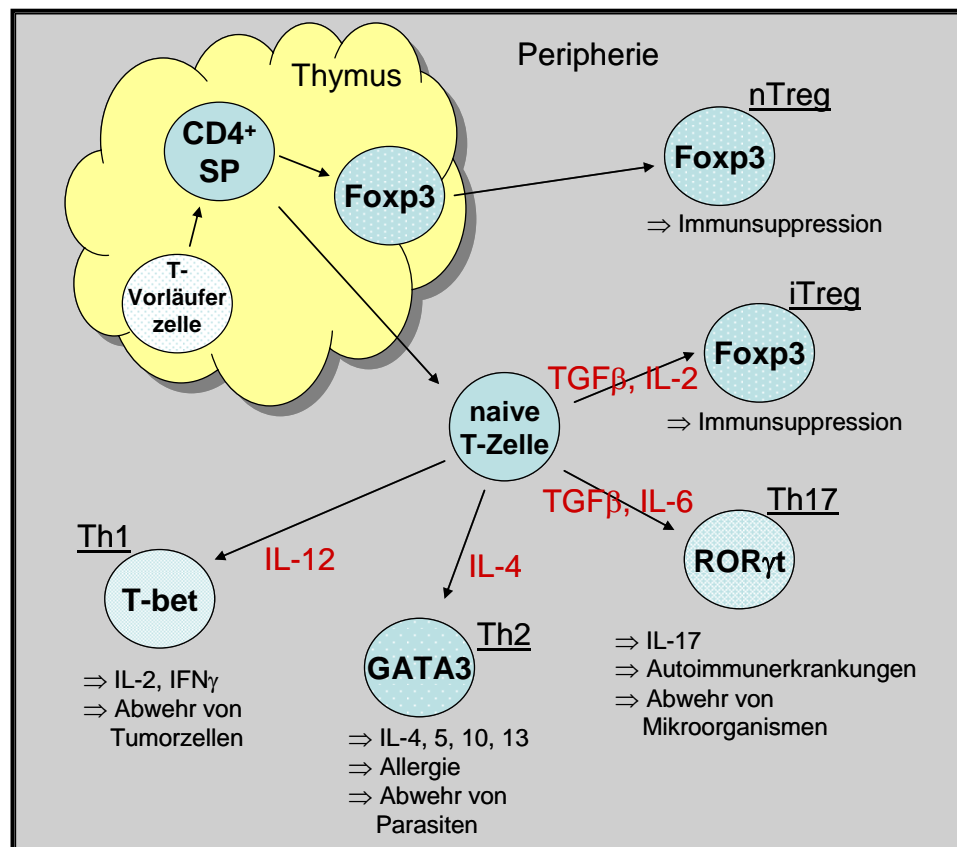


Abb. 1: Reifung und Differenzierung von CD4⁺ Th-Zellen. T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder der fetalen Leber reifen im Thymus zu CD4⁺ T-Zellen. Ein kleiner Teil der DP-Thymozyten entwickelt sich im Thymus zu natürlichen Treg-Zellen (nTreg). Periphere naive Th-Zellen differenzieren nach Antigenstimulation in Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu in verschiedene T-Effektorzellen, wie induzierte Treg (iTreg), Th-17-Zellen, Th1- oder Th2-Zellen. Die diversen T-Effektorzellen sind durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, das sekretierte Zytokinprofil und ihre speziellen Effektorfunktionen charakterisiert (Abb. verändert nach Sakaguchi et al., 2008).

Aktivierte naive CD4⁺ T-Zellen differenzieren abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu in verschiedene Th-Subklassen (Abb. 1). Dabei wirken Zytokine, die die Ausreifung einer Subpopulation begünstigen, oftmals auf die Ausdifferenzierung in eine andere Effektor-T-Zellsubpopulation hemmend. Lange Zeit galt das Th1/Th2-Paradigma als Erklärung für unterschiedliche Immunantworten (Mosmann et al., 1986). In den letzten Jahren wurden jedoch neue Th-Zellsubpopulationen, wie immunsuppressive regulatorische Th-Zellen (Treg) (Sakaguchi et al., 1995) und proinflammatorische Th17-Zellen (Infante-Duarte et al., 2000; Park et al., 2005; Harrington et al., 2005) entdeckt, die im Zusammenspiel mit Th1- und Th2-Zellen die Immunantworten regulieren.

1.1.1.1 Th1- Zellen

Die Differenzierung aktivierter CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen wird durch Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-12 (IL-12) induziert, wobei IFN- γ u.a. durch NK-Zellen und IL-12 von Makrophagen und DC sezerniert wird (Scharton und Scott, 1993). Th1-Zellen regulieren Immunantworten gegen intrazelluläre Erreger, wie Viren, Parasiten und Bakterien, spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der Tumorabwehr (Abb. 1).

Th1-Zellen sezernieren die proinflammatorischen Zytokine IL-2, IFN- γ und Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α), wodurch die Aktivierung, Proliferation oder Differenzierung von CTL, Makrophagen und NK-Zellen induziert wird (Pardo-Govea et al., 2005). Vor allem IFN- γ ist ein potenter Makrophagen-Aktivator, der diese zur Phagozytose von Pathogenen, deren Abtötung und Sekretion antimikrobieller Stoffe anregt (Stenger et al., 1994; Agnello et al., 2003).

IFN- γ signalisiert über den heterodimeren IFN- γ -Rezeptor (IFN- γ -R), der aus einer α - und β -Kette (IFNGR1, 2) besteht (Boulay et al., 2003). Der IFN- γ -R besitzt keine intrinsische Kinaseaktivität und wird durch nichtkovalent gebundene Janus-Kinasen (JAK) phosphoryliert und aktiviert. Nach IFN- γ -Bindung dimerisieren JAK1 und JAK2 und aktivieren sich durch Tyrosinphosphorylierung gegenseitig. Unmittelbar nach der Rezeptoraktivierung binden STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*)-Proteine über ihre SH2 (*src homology 2*)-Domäne an den tyrosinphosphorylierten IFN- γ -R und werden sodann von den JAK-Dimeren phosphoryliert. Die aktivierten STATs bilden Homodimere und wandern in den Zellkern, wo sie u.a. die Transkription des T-box Transkriptionsfaktors T-bet (*T-box-expressed in T cells*) initialisieren (Ihle, 1995; Levy und Darnell, 2002). T-bet ist der zentrale Transkriptionsfaktor für die Th1-Differenzierung und IFN- γ -Produktion und unterdrückt gleichzeitig die Transkription der Gene für die Th2-Differenzierung. Nach T-bet-Expression sezernieren Th1-Zellen IFN- γ , das für eine effektive autokrine Verstärkung der Th1-Differenzierung sorgt (Szabo et al., 2000, 2002).

Neben dem IFN- γ /STAT1-Signalweg führt auch der IL-12/STAT4-Signalweg zur Expression von T-bet und IFN- γ -Produktion. Um die durch APC-Kontakt aktivierte T-Zelle empfänglicher für IL-12 zu machen, wird die STAT4-vermittelte Expression der β 2-Kette des IL-12-Rezeptors (IL-12-R) auf der T-Zelloberfläche verstärkt, hingegen wird die β 1-Kette des IL-12-R konstitutiv exprimiert (Afkarian et al., 2002; Weaver et

al., 2007). Das von aktivierten Makrophagen und DC sezernierte IL-12 führt in den T-Zellen über JAK2 und TYK2 (*tyrosine kinase 2*) (Bacon et al., 1995) zur Aktivierung von STAT4, welcher zusammen mit STAT1 die IFN- γ -Produktion verstärkt und damit die Differenzierung zu Th1-Zellen begünstigt (Hsieh et al., 1993). In Anwesenheit von IL-18 kann IL-12 sogar eine TCR-unabhängige IFN- γ -Produktion induzieren (Yang et al., 1999).

1.1.1.2 Th2- Zellen

Die Th2-Polarisierung wird vorwiegend durch das Zytokin IL-4 induziert (Abb. 1) (Le Gros et al., 1990; Swain et al., 1990). Th2-Zellen-vermittelte Immunantworten sind v.a. bei der Abwehr extrazellulärer Parasiten von Bedeutung und überschießende Th2-Immunantworten sind mit allergischen Reaktionen, wie Asthma, assoziiert. Th2-Zellen sezernieren u.a. die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Mosmann et al., 1986), die die Mechanismen, die zur Th1-Differenzierung führen, hemmen. Insbesondere IL-10 hemmt die Makrophagenaktivierung und somit die IFN- γ - und IL-12-Produktion. IL-13 stimuliert Mastzellen und regt damit die Histaminproduktion an. Histamine inhibieren die durch DC-vermittelte IL-12- und fördern stattdessen die IL-10-Produktion (Weaver et al., 2007). IL-4 und IL-5 induzieren die Bildung neutralisierender Antikörper, d.h. sie regulieren den Isotypwechsel aktivierter B-Zellen zu IgA, IgG und IgE (Snapper und Paul, 1987), und sie rekrutieren eosinophile Granulozyten. Das von NK1.1 T-Zellen, basophilen Granulozyten und Mastzellen produzierte IL-4 (Seder et al., 1991; Yoshimoto und Paul, 1994; Shinkai et al., 2002; Min et al., 2004) bindet an den IL-4-R, bestehend aus der IL-4-spezifischen α -Kette und der γ_c -Kette, und führt über Phosphorylierung/Aktivierung von JAK1 und JAK3 zur Aktivierung von STAT6 (Wurster et al., 2000). STAT6 initiiert die Transkription des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors GATA3, **dem** zentralen Faktor der Th2-Differenzierung (Zheng und Flavell, 1997; Kurata et al., 1999). Durch Änderung der Chromatinstruktur erleichtert GATA3 anderen Th2-spezifischen Transkriptionsfaktoren die Bindung an entsprechende Genabschnitte und somit die Genexpression von IL-4, IL-5 und IL-13 (Yamashita et al., 2004). Eine hohe IL-4-Konzentration führt zur Autoaktivierung von GATA3 und zur Transaktivierung der IL-4-, IL-5- und IL-13-Promotoren. Autoaktiviertes GATA3 kann ohne weitere externe Stimuli und

unabhängig von IL-4 und STAT6 die Differenzierung von Th2-Zellen fortsetzen. Dagegen wird die Transkription essentieller Komponenten der Th1-Differenzierung, wie von STAT4 und der IL-12-R- β 2-Kette, durch IL-4 gehemmt (Ouyang et al., 1998 und 2000; Ferber et al., 1999). An der Th2-Differenzierung sind ferner die Transkriptionsfaktoren IRF4 (*interferon regulatory factor 4*) und NFATc2 (*nuclear factor of activated T-cells 2*), welche die IL-4-Transkription verstärken, beteiligt (Lohoff et al., 2002; Rengarajan et al., 2002).

1.1.1.3 Regulatorische T-Zellen (Treg): nTreg und iTreg

Treg werden über ihre suppressive Aktivität auf Immunantworten definiert (Abb. 1). Sie kontrollieren die Aktivierung, Proliferation und Funktion von autoreaktiven und „fremdreaktiven“ peripheren T-Zellen. Durch ihre suppressive Wirkung auf T-Effektorzellen schützen Treg den Organismus vor verschiedenen Krankheiten, wie Allergien und Autoimmunerkrankungen; sie sind zuständig für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz (Sakaguchi et al., 1995; Akbari et al., 2003), beenden frühzeitig Immunantworten zur Verhinderung von Gewebeschäden und sind verantwortlich für die Tolerierung des Fötus während der Schwangerschaft (Zenclussen, 2006) und von Organtransplantaten (Chai et al., 2005). Allerdings kann erhöhte Treg-Aktivität der Eliminierung von Erregern während einer Infektion (Mendez et al., 2004) und der Bekämpfung von Tumoren (Curiel et al., 2004) entgegenwirken.

Treg sind CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und unterteilen sich in sog. natürlich vorkommende (nTreg) und induzierbare (iTreg) Subpopulationen. nTreg reifen im Thymus und machen 5-10% der peripheren CD4⁺ T-Zellen aus (Sakaguchi et al., 1995). nTreg verlassen den Thymus als funktionell aktive und differenzierte Suppressor-T-Zellen (Itoh et al., 1999; Seddon und Mason, 2000), die bereits auf ihre immunsuppressive Funktion spezialisiert sind, bevor sie mit einem spezifischen Antigen in Kontakt kommen (Shevach, 2002; Sakaguchi, 2004).

Im Maussystem ist der zur *Forkhead*-Familie gehörende Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead box protein 3*) der spezifische Treg-Marker (Ziegler, 2006). Im humanen System wird Foxp3 auch nach TCR-Stimulation naiver T-Zellen exprimiert und ist somit nicht für Treg spezifisch, obwohl humane CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen als Suppressorzellen fungieren (Walker et al., 2003; Ziegler, 2007). Die Foxp3-Induktion erfordert ein TCR-Signal, CD28-kostimulatorische Signale und die Expression eines

hochaffinen IL-2-R, sowie Signale durch den IL-7- oder IL-15-R (Salomon et al., 2000; Fontenot et al., 2005; Tai et al., 2005; Burchill et al., 2007; Malek, 2008; Vang et al., 2008). IL-2- sowie IL-2-R-defiziente Mäuse zeigen, ebenso wie CD28-defiziente (CD28^{-/-}) Mäuse, eine verminderte nTreg-Zellzahl in der Peripherie.

Foxp3 ist für die Entwicklung und Funktion von nTreg essentiell, was anhand Foxp3-defizienter Mäuse (*scurfy mice*) belegt wurde (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Die Eliminierung von Foxp3, und somit Treg, führt zu schweren Autoimmunkrankheiten, wie Gastritis, Thyreoiditis oder systemischen Lupus erythematodes (SLE) (Sakaguchi et al., 2008). Foxp3-defiziente Mäuse zeigen daher einen durch Autoimmunität geprägten Phänotyp, mit massiver Proliferation der lymphatischen Zellen und damit verbundener Lymphadenopathie, Splenomegalie, Hepatomegalie und frühzeitigem Tod im Alter von ungefähr 3 Wochen (*Scurfy-Syndrom*) (Brunkow et al., 2001). Menschen mit einem defekten Foxp3-Gen entwickeln ein polyendokrines autoimmunes IPEX-Syndrom (*immuno-dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) (Wildin et al., 2001).

Treg verhalten sich *in vitro* anerg (Shevach et al., 2001, 2002), d.h. sie proliferieren weder nach alleiniger TCR-Stimulation noch nach TCR+CD28-Kostimulation (Dieckmann et al., 2001). Da sie kein eigenes IL-2 produzieren, sind Treg zur Proliferation und Homöostase auf exogenes IL-2 angewiesen (Fontenot et al., 2005; Earle et al., 2005). Die Transkription des IL-2-Gens wird durch die Transkriptionsfaktoren NFAT, AP-1 (*activating protein-1*) und NF κ B (*nuclear factor κ B*) gesteuert, die über ihre spezifischen DNA-Motive an den IL-2-Promotor binden. Auch für Foxp3 existieren potentielle Bindungsstellen am IL-2-Promotor, die den Bindungsmotiven von AP-1 sehr ähneln. Es wurde gezeigt, dass Foxp3 mit NFAT interagiert und dieser Komplex scheint die IL-2-Transkription zu hemmen (Ho und Crabtree, 2006).

Die Expression von CD4 und die konstitutive Expression von CD25 sind die gebräuchlichsten Treg-Marker. Allerdings ähnelt dieser Phänotyp dem aktivierter T-Zellen ohne suppressive Eigenschaften. Weitere Aktivierungsmarker von T-Zellen sind ebenfalls auf Treg exprimiert. Dazu gehören CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein*), CD62L, CD103, Ox40 und GARP (*glycoprotein-A repetitions predominant*), sowie der IL-7-R (CD127) und die Tyrosinphosphatase CD45RB (CD45) (Sakaguchi, 2004). GITR unterstützt als kostimulatorisches Molekül die Proliferation von nTreg

(McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002) und CTLA-4 spielt eine wichtige Rolle bei der Suppressorfunktion (Sakaguchi et al., 2009). Der *homing* Rezeptor CD62L ermöglicht T-Lymphozyten das Eintreten in die Lymphknoten. Ermann et al. (2005) zeigten, dass CD62L⁺ Treg, im Gegensatz zu CD62L⁻ Treg, vor akuter GVHD (*graft versus host disease*) schützen können. CD103, ein α E-Integrin, spielt eine wesentliche Rolle für den Verbleib eingewanderter Zellen im Gewebe. Treg exprimieren CD103 und werden durch die Interaktion mit Epithelzellen im Entzündungsherd fixiert, so dass sie ihre Suppressorfunktion erfüllen können (Lehmann et al., 2002; Sharma et al., 2009). Über den IL-7-R vermittelte Signale fördern das Überleben von Treg (Foxwell et al., 1995; Bayer et al., 2008). Ebenso vermögen dies OX40-Signale, diese verringern jedoch die Suppressoraktivität der Treg (Takeda et al., 2004; Croft et al., 2009). Für CD45RB wurde gezeigt, dass nTreg mit hoher Suppressorkapazität eine schwache CD45RB-Expression aufweisen. Neben T-Zellen können auch B-Zellen in ihrer Proliferation, Immunglobulin-Produktion und im Isotyp-Klassenwechsel durch Treg gehemmt werden (Nakamura et al., 2004; Lim et al., 2005). Zudem supprimieren nTreg die zytotoxische Funktion von NK- und NKT-Zellen sowie die Reifung und Funktion von DC (Azuma et al., 2003; Misra et al., 2004; Ghiringhelli et al., 2006).

Hinsichtlich der Treg-vermittelten Suppression gibt es mehrere Mechanismen/Hypothesen. Es ist bekannt, dass nTreg räumliche Nähe zu den Effektorzellen brauchen, um diese supprimieren zu können. Trennung der nTreg von den T-Effektorzellen durch eine semipermeable Membran in Transwell-Experimenten hebt die Treg-vermittelte Suppression auf (Takahashi et al., 1998; Thornton und Shevach, 1998). Bei Zell-Zell-Kontakt könnte über Freilassung von Perforinen und Granzymen eine direkte Zytotoxizität auf die Effektorzellen ausgeübt werden (Cao et al., 2007). Zell-Zell-Kontakt ist auch bei der Suppression von DC erforderlich. Diese produzieren, nach Bindung an CTLA-4-exprimierende Treg das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). IDO katalysiert den Umbau von freiem Tryptophan zu Kynurenin, welches auf T-Effektorzellen toxisch wirkt (Fallarino et al., 2006). CTLA-4 auf Treg reguliert zudem die CD80/CD86-Expression auf DC. In Studien mit CTLA-4-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass Treg mittels CTLA-4 die Expression von CD80 und CD86 auf unreifen DC hemmen und deren Herunterregulation auf reifen DC induzieren. Durch das Fehlen optimaler Kostimulation durch DC wird die Aktivierung von T-Zellen somit verhindert (Schneider et al., 2005; Sakaguchi et al.,

2009). Treg können den Kontakt zwischen Effektorzellen und DC zudem inhibieren, indem sie antigenabhängig Komplexe mit DC bilden, wobei der Kontakt zwischen Treg und DC über LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) vermittelt wird. Ein anderer Suppressionsmechanismus ist, dass Treg cAMP (*cyclic adenosin-monophosphate*) über Zell-Zell-Kanäle, die sog. *gap junctions*, direkt in die Effektorzellen transferieren und damit die Synthese von IL-2 in den Zellen hemmen (Bopp et al., 2007). Effektorzellen können auch direkt über Protein-Protein-Interaktionen inhibiert werden, etwa über das auf aktivierten nTreg exprimierte Protein GARP, das über Interaktion mit anderen Rezeptoren durch noch ungeklärte Mechanismen eine Suppressorfunktion vermittelt (Battaglia und Roncarolo, 2009; Tran et al., 2009; Wang et al., 2009).

Bei der Zellkontakt-unabhängigen Treg-vermittelten Suppression spielen verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. IL-2 ist für die Generierung, Homöostase und Aktivierung von Treg erforderlich. Aufgrund der hohen konstitutiven Expression der IL-2-R α -Kette (CD25) binden Treg viel IL-2, so dass es für die optimale Aktivierung von T-Effektorzellen nicht zur Verfügung steht (de la Rosa et al., 2004). *In vivo* (Annacker et al., 2001), aber nicht *in vitro* (Shevach et al., 2006), übernehmen auch die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β (*transforming growth factor beta*) eine wichtige Funktion in der Treg-vermittelten Suppression. In Allergie- und Asthma-Modellen sind IL-10 und TGF β für die Treg-vermittelte Suppression essentiell (Hawrylowicz et al., 2005; Joetham et al., 2007). In Mäusen, die mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-10 und TGF β behandelt wurden, sind Treg nicht in der Lage, entsprechende Entzündungen zu kontrollieren (Annacker et al., 2001; Nakamura et al., 2004). Bei UV-induzierter Karziogenese ist die IL-10-Produktion der Treg eine wichtige Komponente, durch die die Tumorabwehr blockiert wird (Loser et al., 2007).

TGF β ^{-/-} Mäuse entwickeln, ähnlich zu Foxp3^{-/-} Mäusen, Autoimmunerkrankungen (Huber et al., 2004). Treg sekretieren TGF β oder exprimieren membrangebundenes TGF β . Bei Stimulation über APC wird TGF β nur in geringen Mengen sekretiert und hauptsächlich membrangebundenes TGF β gebildet (Nakamura et al., 2001). Bei Stimulation von Treg mit TCR/CD3-Ak wird TGF β sekretiert und membranständig exprimiert, wobei die Suppression durch membrangebundenes TGF β in Zell-Zell-Kontakt-abhängiger Weise vermittelt wird (Nakamura et al., 2001, 2004). Keiner der erwähnten Mechanismen scheint allein für die supprimierende Wirkung der Treg

verantwortlich zu sein, sondern die verschiedenen Suppressionsmechanismen wirken wahrscheinlich synergistisch.

Stimulation peripherer naiver $CD4^+CD25^-$ T-Zellen *in vitro* mittels CD3+CD28-Ak oder *in vivo* mittels MHCII-präsentierter Antigene führt in Anwesenheit von TGF β 1 zur Differenzierung von iTreg (Chen et al., 2003; Kretschmer et al., 2005; Liang et al., 2005). Diese sind im ausdifferenzierten Stadium phänotypisch und funktionell von nTreg nicht zu unterscheiden, d.h. sie exprimieren CD25, CTLA-4, GITR und Foxp3, zeigen Suppressoraktivität und verhalten sich anerg. Adoptiver Transfer *in vitro* generierter iTreg im Mausmodell hat gezeigt, dass iTreg effektiv die Pathogenese verschiedener inflammatorischer Krankheiten unterdrücken können.

Für die aktive Transkription von Foxp3 werden TGF β 1-, TCR- und CD28-kostimulatorische Signale sowie Zytokin-Rezeptor-vermittelte Signale benötigt (Abb. 2). Nach TCR-Stimulation humaner T-Zellen binden die Transkriptionsfaktoren NFAT und AP1 an den Foxp3-Promotor (Mantel et al., 2006). Für murine T-Zellen wurde zudem die Bindung der Transkriptionsfaktoren CREB (*cyclic-AMP-responsive-element-binding-protein*) und ATF (*activating transcription factor*) an den *enhancer* des Foxp3-Gens nachgewiesen (Kim und Leonard, 2007). Mäuse defizient für Proteinkinase C θ (PKC θ) oder Calcineurin A β , beide Proteine aktivieren NFAT, zeigen eine drastisch reduzierte Treg-Zellzahl (Gupta et al., 2008). Da PKC θ den Foxp3-Promotor aktiviert, wird vermutet, dass PKC θ über den Ca²⁺-Calcineurin-NFAT-Signalweg die Foxp3-Expression verstärkt und somit die iTreg-Differenzierung fördert (Huehn et al., 2009). Ferner inhibieren hohe Konzentrationen des Calcineurin-Inhibitors Cyclosporin A die iTreg-Induktion und deren Funktion im humanen und murinen System, während niedrige Cyclosporin A-Konzentrationen die iTreg-Differenzierung bei Patienten mit atopischem Ekzem fördern. Auch eine suboptimale TCR-Stimulation *in vitro* oder *in vivo* fördert die iTreg-Differenzierung im Gegensatz zu starken TCR-Signalen. Somit sind die Dauer und Stärke des TCR-Signals ausschlaggebende Faktoren für die Foxp3-Expression und iTreg-Differenzierung (Kretschmer et al., 2005; Kim und Rudensky, 2006).

Zusätzlich zur TCR-Stimulation sind CD28-kostimulatorische Signale für die Foxp3-Expression in nTreg und iTreg wichtig. CD28-Kostimulation TCR-aktivierter Thymozyten ist für die Foxp3-Expression und nTreg-Differenzierung erforderlich (Tai et al., 2005). Dagegen mindert Kostimulation naiver peripherer T-Zellen *in vivo* (Benson et al., 2007) oder ein zu starkes TCR/CD28-Signal *in vitro* die

Differenzierung zu iTreg (Gabrysova et al., 2011). Somit scheint CD28-Kostimulation für die Differenzierung von nTreg und iTreg im unterschiedlichen Ausmaß notwendig zu sein. Die Foxp3-Expression ist auch abhängig vom verwendeten T-Zelltyp (Thymozyten, naive periphere T-Zellen) oder Versuchsaufbau und viele Analysen zeigen, dass der PI3K/PKB/mTOR-Signalweg der Foxp3-Expression in peripheren naiven T-Zellen entgegenwirkt (Sauer et al., 2008; Haxhinasto et al., 2008).

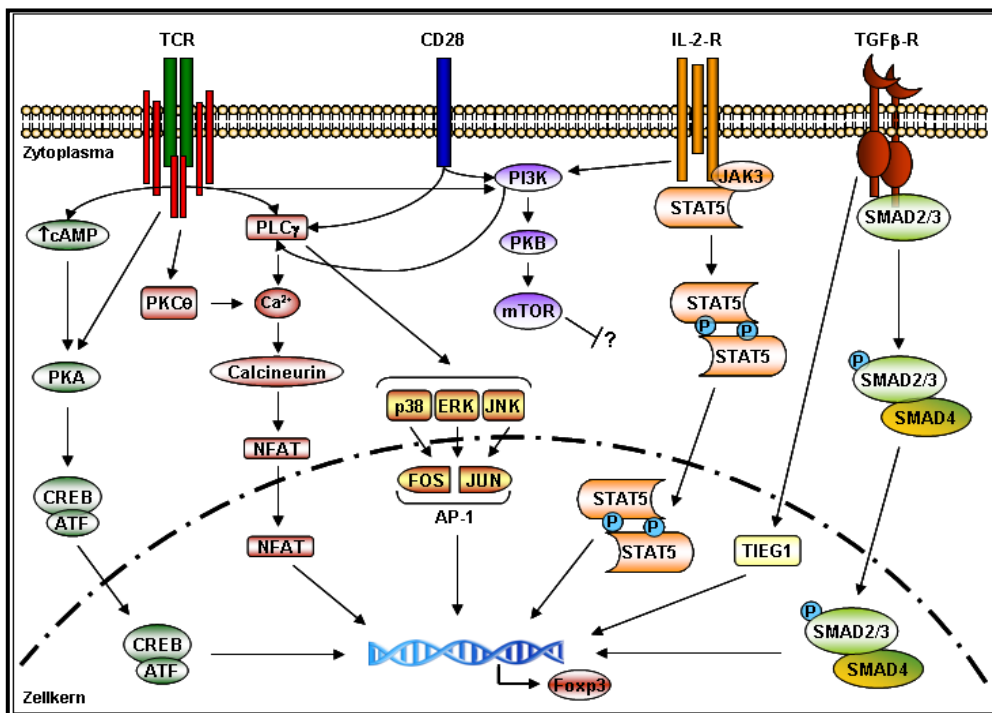


Abb. 2: Schematische Darstellung der multiplen Signalwege, die für die Foxp3-Expression benötigt werden. Für die aktive Transkription von Foxp3 werden TGFβ₁-, TCR- und CD28-kostimulatorische Signale sowie IL-2-Rezeptor-vermittelte Signale benötigt. Diese führen zur Aktivierung und nukleären Lokalisation der Transkriptionsfaktoren CREB, ATF, NFAT, AP-1, STAT5, TIEG1 und des Smad-Komplexes und gemeinsam regulieren sie die Foxp3-Expression (Abb. verändert nach Huehn et al., 2009).

Auch Zytokin-vermittelte Signale sind für die Foxp3-Expression essentiell. Mäuse defizient für die Zytokin-Rezeptor-γ_c-Kette, welche u.a. Bestandteil des IL-2-R ist, generieren keine Treg. Bindung von IL-2 an den IL-2-R führt über Phosphorylierung von JAK1 und JAK3 zur STAT5-Aktivierung. STAT5 bindet an den Foxp3-Promotor und ist für die Foxp3-Expression erforderlich. STAT5^{-/-} Mäuse zeigen daher eine stark reduzierte und JAK3^{-/-} Mäuse überhaupt keine Foxp3-Expression. IL-2^{-/-}, IL-2-

$R\alpha^{-/-}$ und $IL-2-R\beta^{-/-}$ Mäuse bilden ebenfalls keine Treg (Mayack und Berg, 2006; Yao et al., 2007).

Neben IL-2 spielt $TGF\beta 1$ eine wichtige Rolle für die iTreg-Differenzierung, obwohl die Notwendigkeit von $TGF\beta 1$ für die nTreg-Differenzierung im Thymus umstritten ist. iTreg und nTreg benötigen $TGF\beta 1$ für die Aufrechterhaltung ihres Phänotyps und für ihre Homöostase. In Abwesenheit von $TGF\beta 1$ behalten *in vitro* und *in vivo* nur wenige nTreg und iTreg einen $CD4^+CD25^+Foxp3^+GITR^+$ Phänotyp, die meisten verlieren diesen nach 2-4 Tagen (Selvaraj und Geiger, 2007; Floess et al., 2007). Der durch $TGF\beta 1$ induzierte Transkriptionsfaktor TIEG1 (*TGF β -inducible early gene 1*) bindet an den Foxp3-Promotor und reguliert zusammen mit der Ubiquitin-Ligase ITCH (*itchy E3 ubiquitin protein ligase homologue*) die Foxp3-Expression (Venuprasad et al., 2008). Auch der durch $TGF\beta 1$ aktivierte Transkriptionsfaktor Smad3 (*mothers against decapentalegic homologue 3*) bindet an den Foxp3-Promotor sowie -Enhancer, interagiert mit NFAT und kontrolliert somit die Foxp3-Expression (Tone et al., 2008). Retinsäure, ein Vitamin A-Metabolit, fördert im Zusammenspiel mit $TGF\beta 1$ die Expression und Phosphorylierung von Smad3 in T-Zellen (Xiao et al., 2008).

Negative Regulatoren der iTreg-Differenzierung sind vor allem Th1-, Th2- und Th17-spezifische Transkriptionsfaktoren. Die durch IL-4 induzierten Faktoren GATA3 und STAT6 sowie IFN- γ -induziertes IRF1 (*interferon-regulatory factor 1*) inhibieren die Foxp3-Transkription (Mantel et al., 2007; Fragale et al., 2008; Takaki et al., 2008). Durch IL-6 aktiviertes STAT3 ist ebenfalls ein negativer Regulator der Foxp3-Expression. Ob die STAT-vermittelte reduzierte Foxp3-Transkription direkt oder indirekt abläuft, ist unklar. Obwohl viele Daten darauf hinweisen, dass eine genau geregelte Balance zwischen TCR-, CD28- und Zytokin-vermittelten Signalen für die Induktion der Foxp3-Expression erforderlich ist, ist noch wenig darüber bekannt, wie die Foxp3-Transkription auf molekularer Ebene abläuft.

1.1.1.4 Th17-Zellen

In Anwesenheit von IL-6, z.B. im Rahmen einer Entzündungsreaktion, wird die durch TCR/CD28-Stimulation plus $TGF\beta$ -Signale hervorgerufene Foxp3-Expression und somit die iTreg-Induktion inhibiert. Stattdessen wird die $ROR\gamma t$ (*retinoic acid receptor-related orphan receptor γt*)-Expression und die Differenzierung zu inflammatorischen

Th17-Zellen gefördert (Weaver et al., 2006; Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006; Veldhoen und Stockinger, 2006). Th17-Zellen produzieren IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-6 und TNF- α (Langrish et al., 2005). Dabei induziert das pleiotrope Zytokin IL-17 v. a. die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α und vermittelt über diese Entzündungsreaktionen im Gewebe (Moseley et al., 2003; Kolls und Linden, 2004). IL-6-Signale fördern die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 auf Th17-Zellen, welcher das Einwandern der entzündungsfördernden Th17-Zellen in den Infektionsherd reguliert (Singh et al., 2008; Yamazaki et al., 2008; Wang et al., 2009). Andererseits sind Th17-Zellen bei der Bekämpfung von Bakterien durch Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen (Ye et al., 2001) förderlich. Th17-Zellen spielen bei vielen Autoimmunerkrankungen, wie dem SLE, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA), den Mausmodellen für Multiple Sklerose und rheumatoider Arthritis, eine wichtige Rolle (Wong et al., 2000; Tzartos et al., 2008). Bis zur Entdeckung der Th17-Zellen, wurden diese Erkrankungen primär der Funktion von Th1-Zellen zugeschrieben. Neben Th17-Zellen wurde IL-17-Produktion auch in $\gamma\delta$ -Th-Zellen, CD8⁺ Gedächtniszellen, Eosinophilen, Neutrophilen und Monozyten nachgewiesen (Shin et al., 1999; Molet et al., 2001; Ferretti et al., 2003; Zhou et al., 2005; Lockhart et al., 2006).

Für die Induktion der Th17-Differenzierung ist ein Zusammenspiel von IL-6- und TGF β 1-Signalen (Mangan et al., 2006) oder auch von IL-21 und TGF β 1 erforderlich (Korn et al., 2007) (Abb. 3). Die IL-21-Expression wird durch IL-6/STAT3 gefördert, ist jedoch nicht von ROR γ t abhängig (Zhou et al., 2007). Somit könnte von Th17-Zellen produziertes IL-21 zur Autoamplifikation der Th17-Zellen führen.

IL-6 wird von DC, Makrophagen, Mastzellen und aktivierten B- und T-Zellen sezerniert. IL-6 bindet an den IL-6-R, der aus der TGF β -induzierten IL-6-bindenden (IL-6-R α , CD126) und der konstitutiv exprimierten signalübertragenden Untereinheit gp130 besteht. IL-6-R-Signale werden über JAK1, JAK2, Tyk2 und STAT3 weitergeleitet und führen zur Expression der Transkriptionsfaktoren ROR α und ROR γ t (Ivanov et al., 2006; Yang et al., 2008), die zur IL-17-Transkription beitragen. Neben IL-6 aktivieren auch IL-21 und IL-23 STAT3. STAT3 und ROR γ t induzieren auch die Expression des IL-23-R. IL-23 allein kann jedoch keine Th17-Zellen induzieren, unterstützt vielmehr die Reifung, Stabilisierung und das Überleben der Th17-Zellen (Parham et al., 2002; Veldhoen et al., 2006). Die Aktivität von ROR γ t wird durch

Foxp3 negativ beeinflusst, welcher ROR γ t bindet und so die IL-17-Transkription verhindert (Zhou et al., 2008; Zhang et al., 2008). In Anwesenheit von IL-6 oder IL-21 wird diese inhibitorische Interaktion aufgehoben.

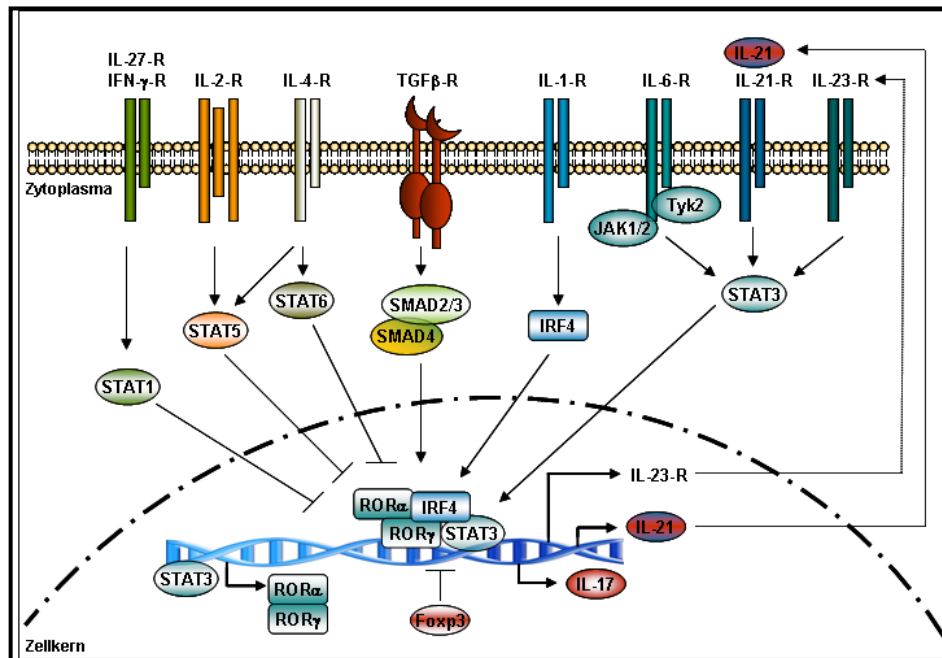


Abb. 3: Essentielle Zytokin-Signale und Transkriptionsfaktoren für die Regulation der Th17-Differenzierung. Die durch IL-6 oder IL-21 und TGF β 1 vermittelte Expression und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT3, IRF4 und ROR γ t regulieren die IL-17-Transkription. Foxp3 sowie die durch Zytokin-Rezeptoren aktivierten Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT5 und STAT6 inhibieren die Th17-Differenzierung. Die IL-23-Rezeptor-Expression unterstützt die Reifung und terminale Differenzierung der Th17-Zellen (Abb. verändert nach Adamson et al., 2009; Hwang, 2010).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Th17-Differenzierung ist IRF4 (*interferon regulatory factor 4*), welcher mit ROR γ t kooperiert. IRF4-defiziente Mäuse zeigen keine Th17-Antwort bzw. es findet keine Polarisierung zu Th17-Zellen statt und die Mäuse erkranken nicht an EAE (Brustle et al., 2007). Die Überexpression von ROR γ t in IRF4-defizienten T-Zellen reicht nicht aus, Th17-Zellen zu induzieren, was darauf hindeutet, dass ROR γ t und IRF4 die Th17-Differenzierung gemeinsam regulieren.

IL-2/STAT5 und IL-6/STAT3 regulieren die Differenzierung naiver T-Zellen in Treg- und Th17-Zellen daher in reziproker Weise (Harris et al., 2007; Laurence et al., 2007). Durch IL-27 und IFN- γ aktiviertes STAT1 inhibiert die Th17-Differenzierung (Batten et al., 2006; Cruz et al., 2006; Stumhofer et al., 2006). Obwohl IL-6 die Aktivierung von STAT3 und STAT1 induziert, wird in Th17-Zellen die STAT3-Aktivierung aufrechterhalten und die STAT1-Aktivierung unterdrückt (Kimura et al.,

2007). IL-2 hemmt über STAT5 und IL-4 über STAT6 die Th-17-Differenzierung (Laurence et al., 2007). Somit können Mitglieder der STAT-Familie, aktiviert über verschiedene Zytokine, die Th17-Entwicklung positiv oder negativ beeinflussen (Adamson et al., 2009).

1.2 ***Transforming Growth Factor- β* (TGF β) im Immunsystem**

TGF β wurde aufgrund der Fähigkeit, Fibroblasten der Niere zum Wachstum zu stimulieren, 1981 zum ersten Mal beschrieben (Roberts et al., 1981). Das Zytokin gehört zur TGF β -Superfamilie, die heute mehr als 40 verschiedene Wachstumsfaktoren umfasst, u.a. die Inhibine, Aktivine, *bone morphogenetic proteins* (BMP) und Wachstums-Differenzierungs-Faktoren, wie Myostatin, Lefty (*left-right determination factors*) oder die *Müllarian-inhibiting substance* (MIS) (Chang et al, 2002). In Säugetieren wurden drei verschiedene TGF β -Isoformen identifiziert (TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3), wobei TGF β 1 die vorherrschende Form im Immunsystem ist (Li et al., 2006).

TGF β 1 ist ein regulatorisches Zytokin, welches von Immunzellen sowie nichthämatopoetischen Zellen sezerniert wird. Es spielt eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen, inklusive der Embryogenese, Karzinogenese, Zellreifung und -differenzierung, der Wundheilung und Immunregulation (Blobe et al., 2000). Die Hauptfunktion von TGF β 1 ist es, durch Hemmung der Proliferation, Differenzierung und der Effektorfunktionen von Immunzellen die periphere T-Zelltoleranz und Homöostase des Immunsystems aufrecht zu erhalten. TGF β 1 wirkt auch proinflammatorisch, indem es Neutrophile aktiviert und somit Entzündungen vermittelt. Interessanterweise führt TGF β 1 in Abhängigkeit des Zytokinmilieus, wie zuvor dargestellt, sowohl zur Differenzierung antiinflammatorischer Treg-Zellen (Hori et al., 2003), als auch proinflammatorischer Th17- und Th9-Zellen (Veldhoen et al., 2006, 2008; Dardalhon et al., 2008). TGF β 1-Dysfunktion trägt daher zum Toleranzverlust gegenüber Selbstantigenen bei und führt zu Autoimmunerkrankungen (Kuruville et al., 1991; Racke et al., 1991). Hinsichtlich der Kanzerogenese ist TGF β 1 ein wirksamer Inhibitor der

Zellproliferation (Thomas und Massague, 2005) und agiert zunächst als Tumorsuppressor. Jedoch werden die Zellen während der Tumorgenese gegenüber TGF β 1 resistent und dadurch das Zellwachstum gefördert und die Immunabwehr gemindert (Gorsch et al., 1992; Pollard et al., 2004; Teicher et al., 2007).

1.2.1 Der TGF β 1-Signalweg

1.2.1.1 Die TGF β 1-Aktivierung

Der TGF β 1-Signalweg wird bereits auf der Stufe der Liganden-Aktivierung reguliert (Taylor, 2009). Im Golgi-Apparat wird vom inaktiven Prä-Pro-TGF β 1-Vorläufermolekül durch eine Furin-ähnliche Peptidase der N-Terminus entfernt, wodurch das Pro-TGF β 1 Molekül entsteht (Abb. 4) (Gentry et al., 1988).

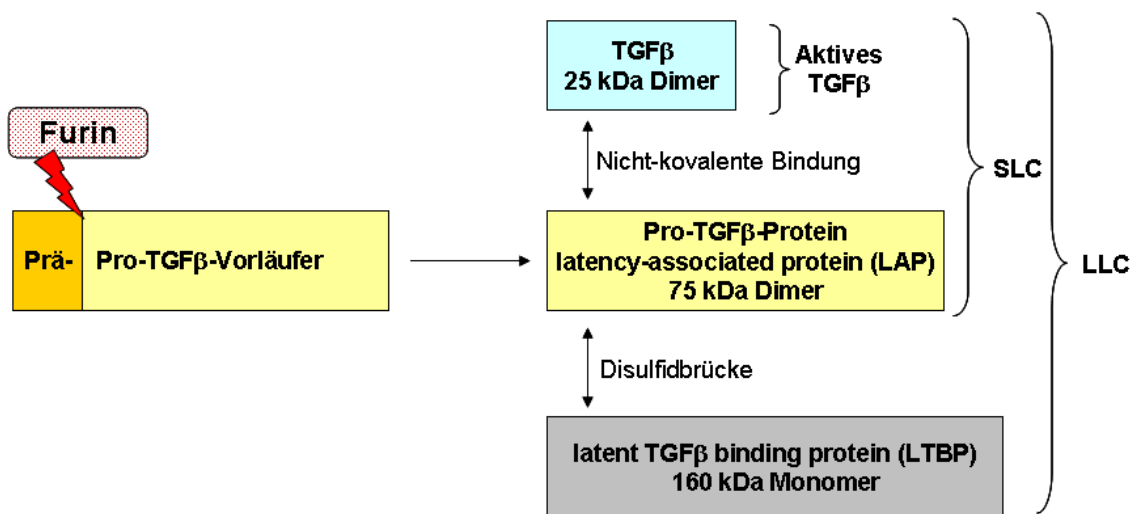


Abb. 4: Latente TGF β -Komplexe. Latentes TGF β ist Bestandteil des SLC (*small latent TGF β complex*) und des LLC (*large latent TGF β complex*). SLC besteht aus einem Pro-TGF β -Protein-Dimer, welches durch proteolytische Spaltung (Furin) aus dem Prä-Pro-TGF β -Vorläufer hervorgeht und nicht-kovalent an aktives TGF β gebunden ist. LLC setzt sich aus dem SLC und einem LTBP-Molekül (*latent TGF β binding protein*) zusammen (Abb. verändert nach Taylor, 2009).

Ein Pro-TGF β 1-Dimer (75 kDa), das sog. *Latency-associated protein* (LAP), ist nicht-kovalent an ein TGF β -Dimer (25 kDa) gebunden und zusammen bilden sie den inaktiven TGF β -Vorläuferkomplex (SLC=*small latent TGF β complex*). LAP kann zusätzlich über eine Disulfidbrücke einen Komplex mit dem *latent-TGF β -binding*

protein (LTBP) bilden, welches eine wichtige Rolle für die Assoziation mit der extrazellulären Matrix (ECM) spielt (Miyazono et al., 1991). Zusammen bilden LAP, LTBP und das TGF β 1-Dimer den LLC (*large latent TGF β complex*), welcher von den Zellen sekretiert und weiter prozessiert wird, um aktives TGF β 1 freizusetzen. Eine Konformationsänderung von LAP oder Proteolyse von LAP bzw. von LTBP durch Bindung des TGF β -Aktivierungsproteins (TA) führt zur Freisetzung des aktiven TGF β -Dimers, das an den TGF β -Rezeptor binden kann (Annes et al., 2003).

1.2.1.2 Der TGF β 1-induzierte Smad-abhängige Signalweg

Aktives TGF β 1 bindet an einen tetrameren-Rezeptor-Komplex, der aus jeweils zwei TypI- und TypII-TGF β -Rezeptoren (TGF β RI und TGF β RII) besteht (Abb. 5). Beide Rezeptoren besitzen eine Serin/Threonin-Kinaseaktivität, wobei TGF β RII diese zur Liganden-abhängigen Phosphorylierung von TGF β RI und zur konstitutiv aktiven Autophosphorylierung nutzt. Der aktivierte TGF β RI phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren Smad2 und Smad3 (R-Smad=*receptor-regulated-Smads*) (Shi und Massague, 2003; Massague und Gomis, 2006). Für die Rekrutierung der zytoplasmatischen R-Smads zum TGF β RI und ihre Phosphorylierung ist das Protein SARA (*smad anchor for receptor activation*) notwendig. Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 bewirkt deren Freisetzung vom TGF β RI und von SARA (Tsukazaki et al., 1998) und eine Heterodimerisierung oder -trimerisierung von Smad2 und/oder Smad3 mit dem zytoplasmatischen Co-Smad (*common mediator*) Smad4 (Zhang et al., 1996; Schmierer und Hill, 2007). Der aktivierte Smad-Komplex wandert sodann in den Zellkern, wo durch Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen die Transkription der TGF β -Zielgene positiv oder negativ beeinflusst wird. Aktive Smad-Komplexe binden selbst nur schwach an DNA. Eine höhere Affinität wird durch die Interaktion und funktionelle Kooperation mit DNA-assoziierten Transkriptionsfaktoren bzw. durch die Rekrutierung verschiedener Koaktivatoren (z.B. p300/CBP) oder Korepressoren, wie TGIF, c-Ski oder SnoN erzielt (Massague und Gomis, 2006).

Die inhibitorischen Smad-Proteine (I-Smad) Smad7 und Smad6 hemmen den TGF β 1-Signalweg. Sie konkurrieren mit den R-Smads um die Bindung an den aktivierten TGF β RI und verhindern damit deren Phosphorylierung (Hayashi et al.,

1997; Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997). Die I-Smads werden bei Aktivierung des TGF β 1-Signalweges vermehrt transkribiert und Smad7 wird zum TGF β R1 rekrutiert (Itoh et al., 1998). Dies weist auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus hin. Andererseits kann Smad7 an DNA und nukleäre Smad-Komplexe binden und damit die Transkription verschiedener Gene verhindern (Zhang et al., 2007).

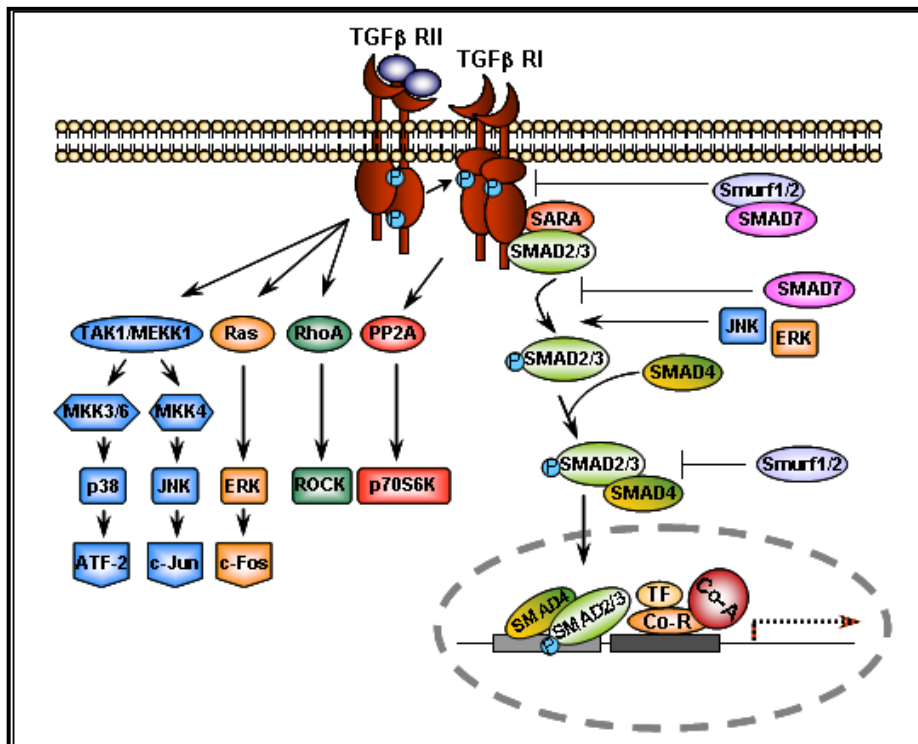


Abb. 5: TGF β 1-induzierte Smad-abhängige und Smad-unabhängige Signalwege. Durch Bindung von aktivem TGF β 1 an den TGF β RII wird ein tetramerer Rezeptor-Komplex aus TGF β RI und TGF β RII gebildet. Dabei wird der TGF β RII aktiviert und dieser phosphoryliert den TGF β RI. Der aktivierte TGF β RI phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren Smad2 und Smad3, die mit Smad4 einen Komplex bilden, welcher in den Nucleus wandert. Dort interagieren die Smad-Komplexe mit Koaktivatoren (Co-A) oder Korepressoren (Co-R), welche die Transkription der TGF β -Zielgene positiv oder negativ beeinflussen. Der aktivierte TGF β -R-Komplex reguliert auch Smad-unabhängige Signalwege, wie die p38-, ERK- und JNK-MAPKinase-Signalwege oder die GTPase RhoA und die Phosphatase PP2A. JNK und ERK wiederum können den Smad-abhängigen Signalweg modulieren (Abb. verändert nach Moustakas und Heldin, 2009).

Smad-Proteine werden zudem durch posttranskriptionelle Modifikationen, wie Ubiquitinierung (Lo und Massague, 1999), Sumoylierung (Lin et al., 2003), Acetylierung (Gronroos et al., 2002) und Phosphorylierung reguliert. Die E3-Ubiquitinligasen Smurf1 und Smurf2 (*smad-ubiquitination-regulatory factor 1/2*), ubiquitinieren u.a. die R-Smads, was zu deren proteosomaler Degradation führt

(Arora und Warrior, 2001). Smad7 interagiert ebenfalls mit Smurf1/2 und vermittelt die Ubiquitinierung und Degradation des TGF β RI (Kavsak et al., 2000; Ebisawa et al., 2001; Kowanetz et al., 2008).

1.2.1.3 TGF β -induzierte Smad-unabhängige Signalwege

Der durch Ligandenbindung aktivierte TGF β -R-Komplex reguliert nicht nur Smad-abhängige, sondern auch Smad-unabhängige Signalwege (Abb. 5). Durch bisher unbekannte Mechanismen erfolgt bei TGF β -Stimulation eine rapide Aktivierung der Ras-Erk1/2-, TAK-MKK4-JNK- (Engel et al., 1999), TAK-MKK3/6-p38- (Yu et al., 2002) und Rho-Rac-Cdc42- sowie der PI3K/PKB-Signalkaskaden (Derynck und Zhang, 2003).

Studien mit Smad4-defizienten Zellen oder transfizierten dominant-negativ-wirkenden Smads zeigten, dass die Aktivierung des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalwegs Smad-unabhängig ist (Engel et al., 1999). In Zellen mit mutiertem TGF β RI, d.h. mit defekter Smad-Aktivierung, wurde nach TGF β 1-Stimulation p38-MAPK-Aktivierung nachgewiesen (Yu et al., 2002). Eine schnelle Aktivierung von Ras bei TGF β -Stimulation in Epithelzellen impliziert, dass Ras bei der TGF β -induzierten Erk-Aktivierung involviert ist (Yue und Mulder, 2000).

JNK- und p38-MAPK werden in Abhängigkeit von den Stimulationsbedingungen durch verschiedene MAPKKK (*MAPK kinase kinase*) aktiviert. Dabei aktiviert der TGF β -R-Komplex zunächst die *TGF β -activated kinase 1* (TAK1), ein Mitglied der MAPKKK-Familie (Yamaguchi et al., 1999), bzw. die Serin/Threonin-Kinase MEKK1 (*MAP/Erk kinase kinase 1*). Es wird vermutet, dass MEKK1 und TAK1 nach TGF β -Stimulation über MKK4 (*MAPK kinase 4*) JNK und über MKK3 und MKK6 die p38-MAPK aktivieren. TGF β -vermittelte Erk- und JNK-Aktivierung führt zur Smad-Phosphorylierung und reguliert somit die Smad-Aktivierung (de Caestecker et al., 1998; Engel et al., 1999; Kretschmar et al., 1999; Funaba et al., 2002). Der durch TGF β aktivierte Ras/Erk-Signalweg führt zur TGF β -Expression und verstärkt somit die TGF β -Antwort bzw. induziert sekundäre TGF β -Signale. Die Aktivierung der MAPK-Signalwege bei TGF β -Stimulation könnte zudem die Transkription verschiedener Gene beeinflussen, z.B. mittels Smad-interagierender Transkriptionsfaktoren, wie dem JNK-Substrat c-Jun oder dem p38-MAPK-Substrat ATF-2

(*activating transcription factor 2*), wodurch ein Zusammenspiel zwischen TGF β -induzierten Smad-Proteinen und den MAPK-Signalwegen ermöglicht wird (Massague, 2000; Itoh et al., 2000; Moustakas et al., 2001).

Diese duale Möglichkeit der TGF β -vermittelten Smad- und MAPK-Aktivierung spielt bei der TGF β -induzierten epithelialen und mesenchymalen Transdifferenzierung eine wesentliche Rolle, die teilweise vom Erk- und/oder p38-Signalweg abhängt (Zavadil et al., 2001; Yu et al., 2002; Bakin et al., 2002). Obwohl das Zusammenspiel der Smad- und MAPK-Signalwege oft förderlich ist, können sich die Signalwege auch negativ beeinflussen. So wird Smad6-gebundene TAK1 inaktiviert (Kimura et al., 2000) und Smad7 kann die JNK-Aktivierung verlängern oder verstärken (Mazars et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor c-Jun inhibiert den Smad2-Signalweg durch Assoziation mit verschiedenen Smad-Korepressoren (Pessah et al., 2002). Allerdings ist zu erwähnen, dass diese Daten anhand transfizierter Zelllinien (Mv1Lu, MEF3T3, Cos7, 293-Zellen) generiert wurden. Ob dies auch für T-Zellen zutrifft, ist ungeklärt, weist aber darauf hin, dass die TGF β -vermittelte zelluläre Immunantwort von der Balance zwischen direkter Aktivierung der Smad- und MAPK-Signalwege abhängig sein könnte.

Abhängig von der Zelllinie aktiviert TGF β auch Rho-GTPasen, einschließlich RhoA (*Ras homolog gene family, member A*), Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*) und CDK1 (*cyclin dependent kinase 1*) (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002). Sie sind wichtige Regulatoren der Signaltransduktion und beeinflussen verschiedenste Zellfunktionen, wie Zelladhäsion, Migration, Umbau des Aktinzytoskeletts, Zellteilung, Endozytose und Onkogenese.

TGF β kann auch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und damit *downstream* über PDK1 (*phosphoinositide dependent kinase 1*) die Proteinkinase B (PKB) aktivieren (Bakin et al., 2000; Vinals und Pouyssegur, 2001). Hemmung der PI3K-Aktivität reduziert TGF β -vermittelte Smad2-Phosphorylierung und Transkription. TGF β RI-Aktivierung führt zudem zur Bindung der Serin/Threonin-Phosphatase 2A (PP2A) an den Rezeptor (Griswold-Prenner et al. 1998). PP2A interagiert mit der p70S6-Kinase (p70S6K), die eine Schlüsselrolle bei der Transkriptionskontrolle und dem Zellzyklusverlauf einnimmt (Petritsch et al., 2000). Die Interaktion mit PP2A führt zur Dephosphorylierung und damit einer verminderten p70S6K-Aktivität, was zu einem TGF β -vermittelten, Smad-unabhängigen Zellwachstumsstillstand in der G1-Phase führt.

Der TGF β -Signalweg hat zudem eine wichtige Funktion bei der Regulation der Proteinstabilität spezifischer Proteine, z.B. verstärkt er die Degradation des Smad-Korepressors SnoN (*Ski-related novel protein N*) (Kavsak et al., 2000; Ebisawa et al., 2001) und des TGF β RI (Stroschein et al., 2001; Wan et al., 2001; Lee et al., 2003). Für die TGF β -induzierte proteosomale SnoN-Degradation binden Smad2 oder Smad3 und die Smad-spezifische E3-Ubiquitin-Proteinligase Smurf2 an SnoN. Es ist noch unklar, ob auch andere Smad-interagierende Proteine der TGF β -induzierten Degradation zugeführt werden.

TGF β 1 reguliert zudem den Zellzyklus. Antimitotische Signale werden in der Zelle über die Hemmung der Zyklin-abhängigen Kinasen, den CDKs (*cyclin-dependent kinase*) vermittelt (Hannon et al., 1994; Reynisdottir et al., 1995). Nach TGF β -Stimulation werden vermehrt die CDK-Inhibitoren (CKI) p15^{Ink4B} (*cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B*), p21^{Cip1} (*cyclin dependent kinase (CDK)-interacting protein 1*) oder p27^{Kip1} (*kinase inhibitor protein 1*) exprimiert (Datto et al., 1995), wodurch die Aktivität der CDKs und somit die Progression des Zellzyklus unterbunden wird. Eine weitere Folge der gesteigerten Expression der CKIs ist, dass das hypophosphorylierte und damit aktive Tumorsuppressor-Protein Retinoblastom (Rb) im Zellkern akkumuliert und die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie inhibiert, wodurch der Eintritt der Zellen in die S-Phase verhindert wird (Hanahan und Weinberg, 2000; Moustakas et al., 2002; Das et al., 2005). Die durch TGF β aktivierten Smad2/3/4-Komplexe inhibieren auch die Transkription des c-myc Gens (Chen et al., 2001), das in vielen Karzinomen mutiert und hyperaktiv ist (Dang, 1999). Es ist darauf hinzuweisen, dass die dargestellte TGF β 1-Signalgebung vornehmlich in Epithelzellen und Zelllinien aufgeklärt wurde. Über die Signaltransduktion von TGF β 1 in T-Zellen und insbesondere über die Interaktion des TGF β 1-Signalwegs mit TCR/CD28-induzierten Signalwegen ist wenig bekannt.

1.3 Proteinkinase B (PKB/Akt)

Proteinkinase B (PKB/Akt) ist eine 60 kDa große Serin/Threonin-Kinase. PKB wurde als retrovirales Onkogen im murinen Leukämie Virus AKT8, bzw. basierend auf den Homologien zur Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) entdeckt (Bellacosa et al., 1991; Coffey und Woodgett, 1991; Jones et al., 1991).

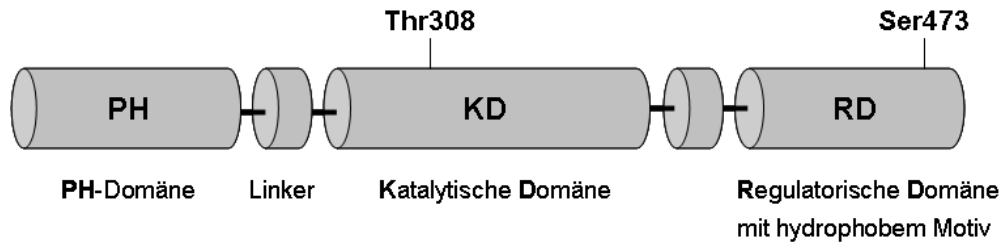


Abb. 6: Domänen-Struktur der PKB α /Akt1. PKB α besteht aus der N-terminalen PH-Domäne, der katalytischen Domäne und der C-terminalen regulatorischen Domäne. Phosphorylierung an Thr308 und Ser473 ist für die volle Aktivierung von PKB α essentiell (Abb. verändert nach Liao und Hung, 2010).

Im Genom der Säugetiere, lokalisiert auf den Chromosomen (human) 14q32, 19q13 und 1q44, wurden drei Gene identifiziert, die für drei Formen der Kinase kodieren: PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 und PKB γ /Akt3 (Datta et al., 1999). Alle drei Kinasen besitzen eine N-terminale Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne, eine zentrale katalytische Domäne sowie eine C-terminale regulatorische Domäne (Abb. 6). Die regulatorische Kinase-Domäne enthält ein hydrophobes Motiv, welches charakteristisch für AGC-Kinasen ist, zu denen auch PKA, PKG und PKC gehören. Die AGC-Kinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Proteinsynthese, Proliferation, dem Zellwachstum, Überleben und der Apoptose. Im Weiteren wird speziell auf PKB α /Akt1 eingegangen, da in dieser Arbeit die Funktion der PKB α untersucht wurde.

1.3.1 Aktivierung der PKB

Die Aktivierung zytoplasmatischer PKB erfolgt in mehreren Schritten, wobei die Rekrutierung an die Zellmembran sowie Phosphorylierungen eine Rolle spielen (Abb. 7). Bei der Aktivierung von PKB spielt PI3K eine entscheidende Rolle, welche sich aus der katalytischen Untereinheit p110 und der regulatorischen Untereinheit p85 zusammensetzt. PI3K wird u.a. nach TCR- oder BCR-Ligation, CD28-Kostimulation oder durch GPCRs (*G-protein coupled receptor*) aktiviert (Wymann et al., 2003). Aktive PI3K phosphoryliert das in der Zellmembran verankerte Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Das als *second messenger* agierende PIP₃ rekrutiert PKB und

andere Signalmoleküle, die über ihre PH-Domäne an PIP3 binden können, an die Zellmembran (James et al., 1996). Eine damit verbundene Konformationsänderung der PKB erlaubt die Phosphorylierung an Thr308 in der katalytischen Domäne sowie an Ser473 in der regulatorischen Domäne und führt zur vollen Aktivierung der PKB (Alessi et al., 1996; Franke et al., 1997).

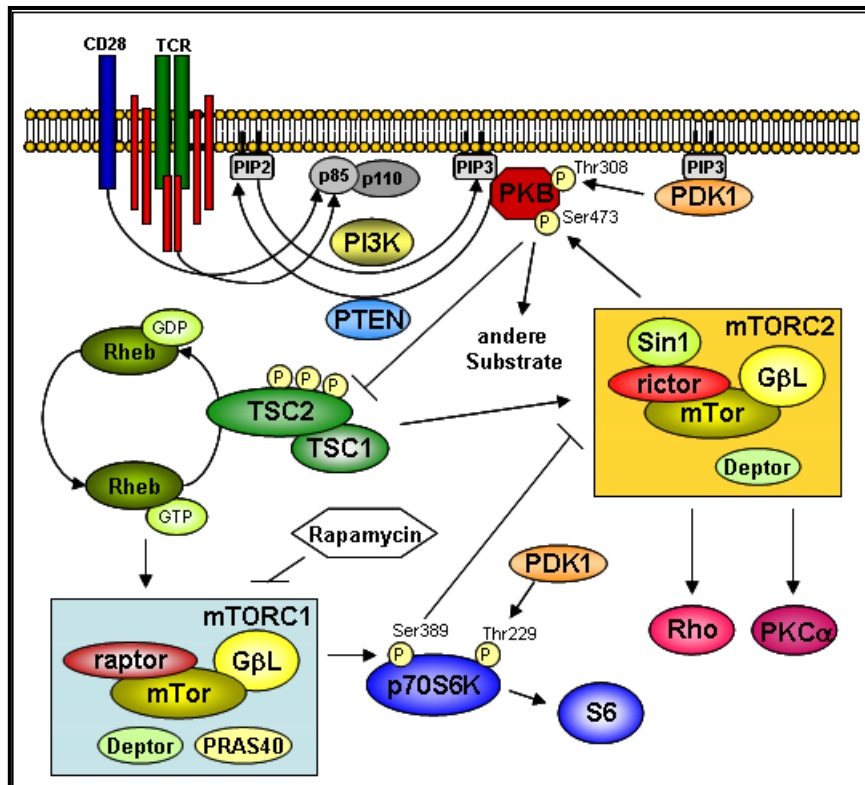


Abb. 7: Der PI3K/PKB/mTOR-Signalweg. Aktivierte PI3K setzt durch Phosphorylierung PIP2 zu PIP3 um. PIP3 rekrutiert PKB über deren PH-Domäne an die Zellmembran, wodurch PKB für PDK1 zugänglich wird. PDK1 aktiviert PKB durch Phosphorylierung an Thr308. PKB-vermittelte Phosphorylierung und Inaktivierung des TSC1/2-Komplexes führt zur Rheb-vermittelten mTORC1-Aktivierung. Der mTORC1-Komplex phosphoryliert zusammen mit PDK1 die p70S6K, die ribosomales S6 Protein und damit die Proteinsynthese aktiviert. Der durch den TSC1/2-Komplex aktivierte mTORC2-Komplex phosphoryliert PKB an Ser473 und führt zur vollen Aktivierung der PKB. p70S6K inhibiert den mTORC2-Komplex und Rapamycin inhibiert mTORC1, aber nicht mTORC2 (Abb. verändert nach Manning und Cantley et al., 2007).

PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*), die über ihre PH-Domäne und PIP3-Bindung ebenfalls an die Membran rekrutiert wird, phosphoryliert membranständige PKB an Thr308 (Andjelkovic et al., 1997; Anderson et al., 1998). Die Mechanismen, die zur Ser473-Phosphorylierung und damit zur vollen PKB-Aktivierung führen, sind nicht endgültig geklärt. Neueren Studien zufolge erfolgt diese durch den mTOR-

Komplex 2 (mTORC2) (Hresko und Mueckler, 2005; Sarbassov et al., 2005). An der Zellmembran aktivierte PKB wandert in das Zytoplasma und den Zellkern, wo die Kinase zahlreiche Substrate phosphoryliert und darüber u.a. das Zellüberleben, die Proliferation, den Zellzyklus und die Proteinbiosynthese reguliert (siehe 1.3.2).

Die Serin/Threonin-Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) bildet zwei funktionell unterschiedliche Multiprotein-Komplexe, mTORC1 (mTOR-Komplex 1) und mTORC2. mTORC1 besteht aus mTOR, mLST8/G β L (*mammalian lethal with sec 13 protein 8/G-protein β -subunit like protein*), PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40kDa*), Deptor (*DEP-domain containing mTOR-interacting protein*) und dem Rapamycin-sensitiven Gerüstprotein Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*). Deptor und PRAS40 wurden als Negativregulatoren von mTORC1 beschrieben (Sancak et al., 2007; Vander Haar et al., 2007; Peterson et al., 2009). mTORC2 besteht aus den Proteinen mTOR, mLST8/G β L, Deptor, mSIN1 (*mammalian stress-activated-protein-kinase-interacting protein 1*) sowie Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), welches durch Rapamycin nicht gehemmt wird (Laplante und Sabatini, 2009). mLST8/G β L stabilisiert mTOR und reguliert dadurch dessen Aktivität. Es gibt Hinweise, dass sich Rictor und mSIN1 gegenseitig stabilisieren und damit die strukturelle Basis von mTORC2 bilden (Frias et al., 2006; Jacinto et al., 2006).

mTORC1 wird durch die GTP-gebundene aktive GTPase Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) aktiviert. Dabei fördert TSC2 (*tuberous sclerosis protein 2*) die Rheb-eigene GTPase-Aktivität und führt zur Bildung der GDP-gebundenen inaktiven Form, wodurch mTORC1 im inaktiven Zustand verharrt. Die PKB-vermittelte Phosphorylierung von TSC2 an Thr1462 (Manning et.al 2002) verringert dessen Fähigkeit als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) zu wirken. Somit akkumuliert durch die Inaktivierung von TSC2 via PKB aktives Rheb und mTORC1 wird aktiviert. mTORC1 phosphoryliert im weiteren Verlauf der Signalkaskade die p70S6K, die wiederum das ribosomale Protein S6 aktiviert und damit die Proteinbiosynthese fördert.

Kürzlich wurde gezeigt, dass der TSC1/2-Komplex auch mTORC2 aktiviert, wodurch dieser PKB an Ser473 vermehrt phosphoryliert, was wiederum zu einer verstärkten mTORC1-Aktivität führt. Andererseits hemmt die durch mTORC1 aktivierte p70S6K die Funktion von mTORC2 und damit die volle Aktivierung der PKB (Huang und Manning, 2009; Chen et al., 2010; Foster und Fingar, 2010).

Neben der Aktivierung ist für eine ausgewogene Regulation des PKB-Signalwegs die Inhibition von PKB wichtig. Die Aktivität von PKB wird über die PI3K-Aktivität gesteuert, welche durch die pharmakologischen Inhibitoren LY294002 und Wortmannin gehemmt werden kann. Weiterhin wird PKB durch die Phosphatasen PP2A und PHLPP (*PH domain and leucine rich repeat protein phosphatases*) an Thr308 sowie Ser473 dephosphoryliert und damit inaktiviert (Gao et al., 2005; Kuo et al., 2008; Tremblay und Giguere, 2008). Die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue localized on chromosome ten*) dephosphoryliert PIP3, was die Membranlokalisation und damit indirekt die Aktivierung der PKB verhindert (Maehama und Dixon, 1998). Mutationen oder Verlust von PTEN sind somit mit einer dauerhaften Aktivierung des PI3K/PKB-Signalwegs verbunden.

1.3.2 Substrate und Funktionen der PKB

PKB phosphoryliert über 100 Substrate und ist somit ein zentraler Regulator vieler physiologischer Prozesse, inklusive Zellproliferation, Zellüberleben, Apoptose, Differenzierung und Metabolismus. Eine Deregulation der PKB wurde vielfach in verschiedenen Krebsarten vorgefunden und wird mit der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen und Diabetes mellitus in Verbindung gebracht. Für die Funktion von PKB als Onkogen ist sowohl eine konstitutive Aktivierung der Kinase, als auch eine permanente Rekrutierung an die Plasmamembran von Bedeutung (Aoki et al., 1998). Posttranskriptionelle Modifikation durch Myristoylierung am N-Terminus der viralen Akt (v-Akt) führt zu einer ständigen Lokalisation von v-Akt an die Plasmamembran, was deren dauerhafte Aktivierung zur Folge hat (Ahmed et al., 1993). Die E17K-Mutation in der PH-Domäne der PKB α führt zur PI3K- und PIP3-unabhängigen Membranlokalisation und Aktivierung der PKB (Carpten et al., 2007). Deregulation der PKB kann auch aus der permanenten Aktivierung der PI3K resultieren. PTEN, der Gegenspieler der PI3K, gehört zu den am häufigsten mutierten Genen in verschiedenen Tumoren (Liaw et al., 1997). Da in vielen sporadischen Tumoren eine Fehlregulation und Hyperaktivität von PKB nachweisbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass PKB ein entscheidender Faktor in der Onkogenese ist.

Eine der wichtigsten physiologischen Funktionen von PKB ist es den Zellmetabolismus zu regulieren. PKB phosphoryliert und inaktiviert GSK3 β (*glucose-synthase-kinase 3 β*) in Gegenwart hoher Insulin-Konzentrationen, was letztlich zur Aktivierung der Glykogensynthese führt (Abb. 8). Ein weiteres wichtiges PKB-Substrat bezüglich des Zellmetabolismus ist TSC1/2. Wie zuvor dargelegt, hebt Phosphorylierung von TSC1/2 durch PKB dessen hemmenden Einfluss auf den mTORC1-Komplex auf, wodurch die Translationsmaschinerie und Proteinbiosynthese initiiert wird (Hay und Sonenberg, 2004; Wang und Proud, 2006). Zugleich hemmt mTORC1 den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E-BP1 (*4E-binding protein 1*), welcher durch Bindung an eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) die Translation hemmt und damit die Zellproliferation inhibiert (De Benedetti et al., 1991).

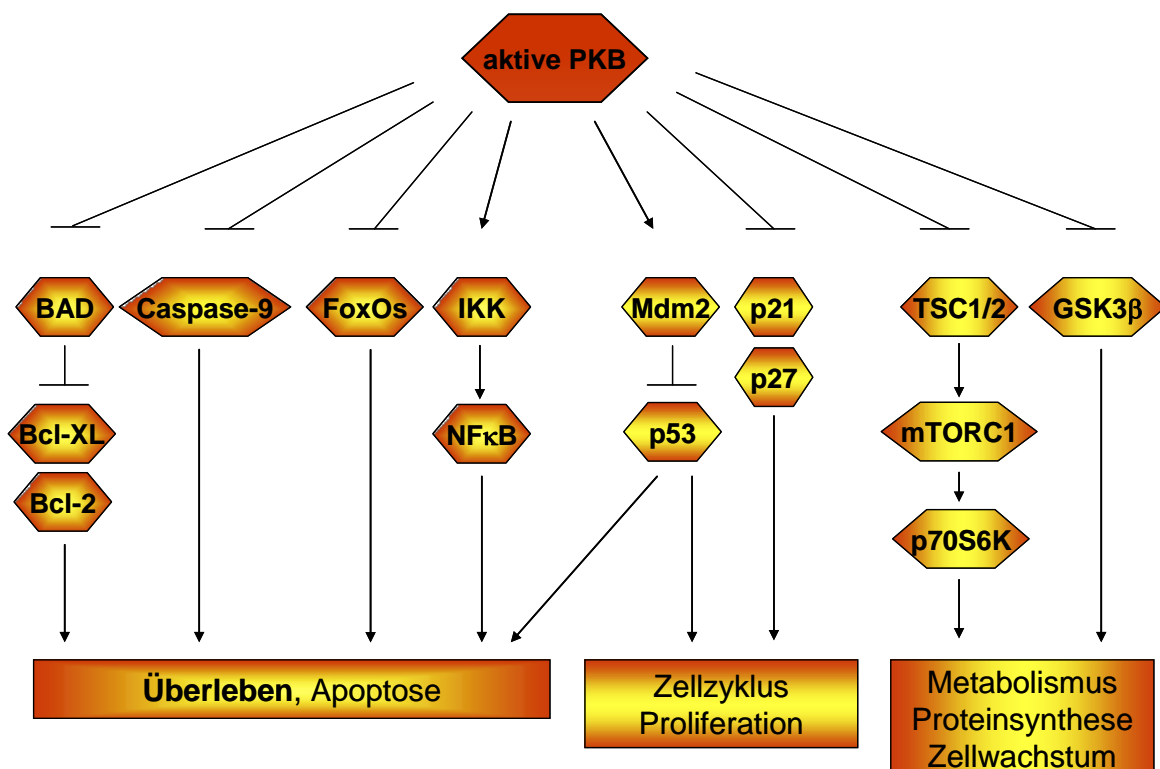


Abb. 8: Substrate der aktiven PKB. PKB spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen, wie Zellüberleben, Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Zellzyklus und Metabolismus. Aktive PKB wirkt antiapoptotisch über die Phosphorylierung und damit verbundene Inaktivierung von BAD, Caspase-9 und FoxO bzw. Aktivierung von IKK und Mdm2. PKB bewirkt eine Steigerung der Zellproliferation über Phosphorylierung und Inaktivierung der CDK-Inhibitoren p21 und p27. Inaktivierende Phosphorylierung von GSK3 β und TSC1/2 durch PKB fördern den Zellmetabolismus und die Proteinsynthese (Abb. verändert nach Liao und Hung, 2010).

PKB reguliert auch den Zellzyklus, z.B. durch Phosphorylierung und Inaktivierung der inhibitorischen Zellzyklusregulatoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1}, die somit ihre anti-proliferativen Effekte nicht ausüben können. PKB spielt zudem eine zentrale Rolle bei der Regulation der Apoptose. PKB-vermittelte Phosphorylierung der E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2 (*murine double minute 2*) führt zur Inaktivierung und dem proteosomalen Abbau des Transkriptionsfaktors p53. PKB inhibiert somit die durch den Tumorsuppressor p53 vermittelte Transkription proapoptotischer Gene (Mayo und Donner, 2001; Gottlieb et al., 2002). PKB nimmt neben der transkriptionellen Kontrolle der Apoptose auch direkten Einfluss auf Regulatoren der Apoptose. So verhindert die PKB-vermittelte Phosphorylierung und Inaktivierung des proapoptotischen Proteins BAD (*Bcl-2 antagonist of cell death*) (Datta et al., 1997) dessen Bindung an und die damit verbundene Inaktivierung der Apoptose-inhibierenden Proteine Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) und Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Hsu et al., 1997).

Caspase-9 agiert als Initiator sowie Effektor der Apoptose (Donepudi und Grutter, 2002) und wird durch Phosphorylierung durch PKB inaktiviert (Cardone et al., 1998). Die Transkriptionsfaktor-Familie der Forkhead-Box-Proteine (FoxO) reguliert das Zellüberleben u.a. durch Transkription des proapoptotischen Moleküls Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*), des Fas-Liganden oder des TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)-Proteins (Burgering und Medema, 2003). Phosphorylierung der FoxO-Proteine durch PKB resultiert in deren nukleärer Exklusion, wodurch sie ihre Zielgene nicht mehr aktivieren können.

PKB beeinflusst auch über den NF κ B-Signalweg die Entwicklung verschiedener Erkrankungen, von Autoimmunerkrankungen und die Kanzerogenese (Li und Verma, 2002). Die Aktivierung von NF κ B ist u.a. von der PKB-vermittelten Phosphorylierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK) und damit verbundener Degradation des NF κ B-Inhibitors I κ B abhängig (Kane et al., 1999). Dies führt zur Aktivierung und nukleären Translokation von NF κ B und einer verstärkten Transkription antiapoptotischer Gene, wie Bcl-XL und Caspase-Inhibitoren (Barkett und Gilmore, 1999).

1.3.3 PKB in Treg-Zellen

Der PI3K/PKB-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Foxp3-Induktion *in vivo* sowie *in vitro* und somit bei der Entwicklung, Homöostase und Funktion von Treg. Die Mechanismen, über die PKB die Generierung und Funktion der Treg beeinflusst, sind jedoch unvollständig verstanden. Inaktive PI3K-exprimierende PI3Kp110^{D910A} Mäuse zeigen eine erhöhte nTreg-Zahl im Thymus, aber eine geringere Zahl von nTreg in der Peripherie. Die nTreg dieser Mäuse zeigen eine verringerte Oberflächenexpression von CD38 und CD73 und sind daher weniger suppressiv (Patton et al., 2006 und 2011). Cbl-b^{-/-} Mäuse mit erhöhter PI3K- und PKB-Aktivität haben eine normale nTreg-Zahl im Thymus (Wohlfert et al., 2006). CD4⁺ T-Zellen dieser Mäuse zeigen nach TGFβ-Gabe *in vitro* eine normale Aktivierung des TGFβ-Signalwegs, eine verstärkte durch PKB-vermittelte FoxO3a- und FoxO1-Phosphorylierung und eine damit verbundene reduzierte Foxp3-Expression (Harada et al., 2010). Mäuse mit FoxO1- und FoxO3a-defizienten T-Zellen zeigen starke Entzündungsreaktionen, sind nicht überlebensfähig und weisen eine eingeschränkte nTreg-Differenzierung auf (Ouyang et al., 2010). Dagegen zeigen PTEN^{-/-} Mäuse, mit erhöhter PI3K/PKB-Aktivität, eine normale Entwicklung und Suppressorfunktion von nTreg (Walsh et al., 2006). CD3+CD28-Ak-vorstimulierte CD4⁺ periphere T-Zellen und Thymozyten exprimieren bei Inhibition der PI3Kp110α und p110δ, der PKB oder des mTOR-Komplexes Foxp3 (Sauer et al., 2008). Dagegen verhindert konstitutive Aktivierung des PI3K/PKB/mTOR-Signalwegs durch retrovirale Transduktion oder Transfektion aktiver PKB die Foxp3-Induktion (Sauer et al., 2008; Haxhinasto et al., 2008). Die Deletion von mTORC1 und mTORC2, letzterer phosphoryliert PKB an Ser473, führt zu einer geringeren PKB-Aktivität und fördert die Foxp3-Expression und damit die iTreg-Differenzierung. Überraschenderweise differenzieren nur mTORC1-defiziente T-Zellen nicht zu iTreg (Delgoffe et al., 2009). Auch der Einsatz pharmakologischer Inhibitoren, die den PI3K/PKB-Signalweg hemmen, erhöht die Foxp3-Expression (Battaglia et al., 2005; Crellin et al., 2007).

In HEK293 T-Zellen und anderen transfizierten Zelllinien wurde für PKB ein *cross-talk* mit dem TGFβ-Signalweg beschrieben. PKB bindet unphosphoryliertes Smad3 und unterbindet dessen Aktivierung und nukleären Transport (Conery et al., 2004; Remy et al., 2004) bzw. PKB verhindert über mTOR die Phosphorylierung von Smad3 (Song et al., 2004). Somit scheint PKB in diesen Zelltypen über die negative

Regulation von Smad3 die TGF β -Signalprozesse zu modulieren. Ob dies allerdings auch für T-Zellen zutrifft und derart PKB die Treg-Differenzierung beeinflussen könnte, ist unbekannt.

1.3.4 PKB-transgene und -defiziente Mäuse

In den letzten Jahren wurden verschiedene PKB-transgene (PKBtg) bzw. PKB-defiziente (PKB^{-/-}) Mäuse generiert, um die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen PKB-Formen in Immunzellen zu analysieren.

PKB α ^{-/-} Mäuse weisen ein reduziertes Körpergewicht und Störungen in der Thymusentwicklung auf (Cho et al., 2001(b); Chen et al., 2001). PKB α ^{-/-} Thymozyten zeigen eine veränderte Expression von Genen, die bei der prä-TCR-Signalgebung und T-Zellaktivierung aktiv sind (Fayard et al., 2007). Für PKB α ^{-/-} Mäuse wurde zudem eine erhöhte neonatale Mortalität festgestellt, verbunden mit Herzfehlern in Embryos und verminderter Kardiomyozyt-Zellproliferation (Chang et al., 2010).

PKB β ^{-/-} Mäuse zeigen einen diabetischen Phänotyp, was auf die essentielle Rolle von PKB im Glukosemetabolismus der Zelle hinweist (Cho et al., 2001(a); Garofalo et al., 2003). PKB hat auch einen zentralen Einfluss auf die Hirnentwicklung, da PKB γ ^{-/-} Mäuse eine um etwa 25% reduzierte Hirngröße aufweisen, die auf eine Reduktion der Zellzahl sowie der Zellgröße von Neuronen zurückzuführen ist (Tschopp et al., 2005). Da Mäuse mit Deletion einer der drei PKB-Gene überleben und keine schwerwiegenden Defekte aufweisen, ist davon auszugehen, dass die jeweils verbleibenden PKB-Formen das Fehlen einer PKB-Form kompensieren können. PKB α/β -doppelt-defiziente (PKB α ^{-/-}/ β ^{-/-}) Mäuse sind nicht überlebensfähig und zeigen schwere Störungen in ihrer Entwicklung, verbunden mit abnormer Knochen- und Epidermisentwicklung sowie Muskelatrophie (Peng et al., 2003). Weiterhin zeigen diese Mäuse eine reduzierte Zellzahl im Thymus, begleitet von einem Block im DN3-Stadium der Thymozyten-Entwicklung, eine gehemmte Proliferation der DN4-Zellen und damit verbunden eine geringe Anzahl von DP-Zellen. Dies weist auf eine wichtige Rolle der PKB in der β -Selektion hin. Einen Block im DN4-Stadium der Thymozytenentwicklung zeigen PKB α ^{-/-}/ γ ^{-/-} Thymozyten. Diese Mäuse sind nicht überlebensfähig und versterben im Embryonalstadium, wie auch Mäuse mit einer dreifach-Deletion für PKB $\alpha/\beta/\gamma$. Die Abwesenheit von PKB $\alpha/\beta/\gamma$

inhibiert das Überleben aller DN-Thymozyten (Yang et al., 2005; Dummler et al., 2006; Mao et al., 2007). Insgesamt zeigen die Publikationen, dass die PKB-Formen eine wichtige Rolle bei der Thymozyten-Entwicklung, insbesondere PKB α , beim Zellwachstum, der Proliferation, Differenzierung sowie dem Glukosemetabolismus spielen und konzentrationsabhängige und gewebespezifische singuläre sowie überlappende Funktionen ausüben.

Mäuse mit konstitutiv aktiver Gag-PKB α zeigen eine verstärkte Bildung von T-Zellen und eine damit verbundene Lymphadenopathie und Splenomegalie (Jones et al., 2000; Rathmell et al., 2003). Periphere T-Zellen und Thymozyten dieser Mäuse überleben in Kultur besser und exprimieren vermehrt das antiapoptotische Protein Bcl-XL sowie NF κ B. Gag-PKB α tg T-Zellen zeigen eine reduzierte Caspase-8-, Caspase-3- sowie BID (*BH3 interacting domain death agonist*)-Aktivität, was zu einer verminderten Fas-induzierten Apoptose führt (Jones et al., 2002).

Für Experimente in dieser Arbeit wurde eine myrPKB-transgene (PKBtg) Mauslinie verwendet, die in PD Dr. U. Bommhardts Labor etabliert wurde (Avota et al., 2001). Die Mauslinie exprimiert humane myristylierte PKB α unter der Kontrolle des humanen CD2-Promotors. Das Lck-Myristylierungs-/Palmitoylierungs-Signal führt zur Membranlokalisation und konstitutiven Aktivierung der PKB. Frühere Studien mit diesen Mäusen zeigten eine verstärkte Aktivierung der Src-Kinase Lck und des Raf-MEK-Erk-Signalwegs in Thymozyten, verbunden mit einer T-Zellhyperproliferation nach TCR-Stimulation. Weiterhin reagieren PKBtg Thymozyten weniger empfindlich auf die Immunsuppressiva Cyclosporin A oder FK506 und proliferieren, im Gegensatz zu wildtypischen T-Zellen, in deren Anwesenheit. PKBtg naive T-Zellen sind hinsichtlich der Proliferation von CD28-Kostimulation unabhängig, sie überleben verstärkt und weisen eine erhöhte Zellgröße auf. In stimulierten PKBtg-Zellen ist die nukleäre Akkumulation von NFATc1, NFATp, NF κ B p65 und RelB interessanterweise reduziert, obwohl die Zellen besser proliferieren und vermehrt Th1- und Th2-Zytokine bilden. Es wurde auch gezeigt, dass PKB und NFATc1 interagieren, was darauf hindeutet, dass PKB die NFATc1-Aktivierung direkt regulieren könnte (Patra et al., 2004). Konstitutive Aktivierung von NFAT in Calcineurin-tg Mäusen blockiert die T-Zellreifung im DN3-Stadium der Thymozytendifferenzierung. Gleichzeitige Expression von tg PKB hemmt die NFAT-Aktivierung, hebt den Reifungsblock auf und lässt die Zellen weiterdifferenzieren. Da NFAT bei der Regulation der Expression der Rag-Gene involviert ist, spielt die Calcineurin-NFAT-PKB-Interaktion bei den

frühen thymischen Differenzierungsprozessen somit eine wichtige Rolle (Patra et al., 2006). PKBtg Mäuse bilden weniger CD8⁺ T-Zellen, aber vermehrt CD4⁺ T-Zellen und ältere Mäuse auf PKB homozygotem Hintergrund neigen zur Entwicklung von Lymphomen. Das veränderte CD4⁺:CD8⁺ Verhältnis in der Peripherie PKBtg Mäuse ist mit einer gesteigerten positiven Selektion CD4⁺ T-Zellen im Thymus gekoppelt. Hinsichtlich der negativen Selektion wurde gezeigt, dass in verschiedenen TCR-tg Mauslinien tg PKB einen steigernden, reduzierenden oder keinen Effekt auf die Negativselektion hat (Na et al., 2003).

1.4 Zielstellung der Arbeit

PKB, aktiviert durch Zytokine, TCR- und CD28-kostimulatorische Signale, fördert das Überleben sowie die Proliferation und Zytokinproduktion naiver T-Zellen. TGF β 1 dagegen ist ein potenter negativer Regulator der Lymphozytenaktivierung und zentral für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase. TGF β 1 spielt zudem bei der Differenzierung und Suppressor-Aktivität von Treg eine bedeutende Rolle, fördert aber in Anwesenheit von IL-6 auch die Differenzierung proinflammatorischer Th17-Zellen. In transfizierten Zelllinien wurde ein *cross-talk* der PKB- und TGF β 1-Signalwege beschrieben. Ob dies auch für T-Zellen zutrifft, ist unbekannt. Es stellte sich daher die interessante Frage und wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob PKB-Signale mit TGF β 1-vermittelten Aktivierungs- und Differenzierungsprozessen naiver Th-Zellen interferieren und durch welche Mechanismen dies erfolgt.

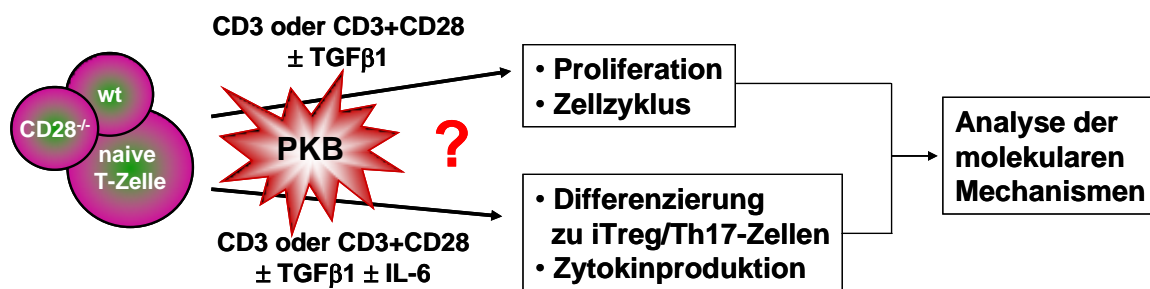


Abb. 9: Zielstellung. Es sollte auf zellulärer und biochemischer Ebene für wt und CD28^{-/-} naive Th-Zellen geklärt werden, wie erhöhte PKB-Signale TGF β 1-vermittelte T-Zellaktivierungs- und Differenzierungsprozesse beeinflussen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mauslinien

Für die Experimente wurden Mäuse auf dem Hintergrund des Inzuchtstammes C57/BL6 verwendet. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen im zentralen Tierlabor Haus 30 auf dem Campus der Medizinischen Fakultät Magdeburg. Es wurden Mäuse im Alter von 6-10 Wochen aus der eigenen Zucht verwendet. Die verwendeten für transgenes myrPKB (PKBtg) heterozygoten Mäuse exprimieren konstitutiv eine aktive Form der humanen PKB α und wurden zuvor von Dr. U. Bommhardt etabliert (Na et al., 2003). Weiterhin wurden Foxp3-GFP knock-in (Foxp3-GFP) Mäuse und CD28-defiziente (CD28^{-/-}) Mäuse eingesetzt. Foxp3-GFP Mäuse wurden von Dr. A. Rudensky (Universität Seattle, USA), CD28^{-/-} Mäuse von Dr. F. Lühder (Universität Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. PKBtg Mäuse wurden mit CD28^{-/-} Mäusen gekreuzt, um tg PKB-Expression auf CD28^{-/-} Hintergrund (PKBtg CD28^{-/-}) zu erhalten. Wildtyp (wt), PKBtg, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäuse wurden mit Foxp3-GFP Mäusen gekreuzt, so dass homozygote Foxp3-GFP Allele auf diesen Hintergründen vorlagen.

2.1.2 Medien und Puffer

2.1.2.1 Zellkulturmedium

RPMI 1640 (+)	5%	FCS (hitzeinaktiviert)
(enthält 10% FCS)	25 ml	SC
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	50 mM	β-Mercaptoethanol
	in 500 ml RPMI 1640	

Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 + Ca²⁺ + Mg²⁺ verwendet. FCS wurde für 50 Minuten bei 56°C im Wasserbad inaktiviert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Ingredienzien, die der Supplementierung des Grundmediums dienen, wurden zuvor sterilfiltriert (0,2 µm). 1 x SC (*supplemental complete*) wurde zum Medium hinzugegeben, um optimale Kulturbedingungen zu erzielen.

20 x SC	500 ml	FCS (hitzeinaktiviert)
	12,2 mM	Na-Pyruvat
	10 mM	Nicht-essentielle Aminosäuren
	1x10 ⁴ U/ml	Penicillin
	10 mg/ml	Streptomycin
	5%	Glutamin-Lösung
	50 mM	β-Mercaptoethanol

2.1.2.2 Puffer für die Maus-Genotypisierung

50 x TAP	242 g	Tris
	57,1 ml	37%ige Essigsäure
	37,2 g	EDTA (Titrierkomplex 3)
	ad 1000 ml ddH ₂ O, pH 8,0	

Schwanz-Lysepuffer	50 mM	Tris, pH 8,0
	100 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	1%	SDS
	in ddH ₂ O	

2.1.2.3 Puffer für die Isolierung von CD4⁺ T-Zellen

10 x PBS	58,44 g	NaCl
	74,56 g	KCL
	142,0 g	Na ₂ HPO ₄
	136,1 g	KH ₂ PO ₄
	ad 1000 ml ddH ₂ O, pH 7,4	

Lauf-Puffer (MACS)	0,5%	BSA
	2 mM	EDTA
	in 1 x PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	

Spül-Puffer (MACS)	2 mM	EDTA
	in 1 x PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	

2.1.2.4 FACS-Analyse

FACS-Puffer	0,5%	BSA
	0,02%	Na-Azid
	in 1 x PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	

2.1.2.5 Puffer für SDS-Page und Western-Blot-Analyse

4 x Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris
	0,4%	SDS (w/v)
	in ddH ₂ O, pH 6,8	

4 x Trenngelpuffer	1,5 M	Tris
	0,4%	SDS (w/v)
	in ddH ₂ O, pH 8,8	

10 x Elektrophoresepuffer	0,25 M	Tris Base
	1,92 M	Glycin
	1%	SDS (w/v)
	in ddH ₂ O	
10 x Blotpuffer	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris
	20%	Methanol
	in ddH ₂ O	
Trenngel (8%)	11 ml	ddH ₂ O
	4 ml	40% Acrylamid-Lösung
	5 ml	4 x Trenngelpuffer
	66 µl	10% APS
	10 µl	TEMED
	Ansatz für zwei Gele	
Trenngel (10%)	10 ml	ddH ₂ O
	5 ml	40% Acrylamid-Lösung
	5 ml	4 x Trenngelpuffer
	66 µl	10% APS
	10 µl	TEMED
	Ansatz für zwei Gele	
Trenngel (12,5%)	8,76 ml	ddH ₂ O
	6,25 ml	40% Acrylamid-Lösung
	5 ml	4 x Trenngelpuffer
	66 µl	10% APS
	10 µl	TEMED
	Ansatz für zwei Gele	

Sammelgel	5,65 ml	ddH ₂ O
	1,15 ml	40% Acrylamid-Lösung
	2,5 ml	4 x Sammelgelpuffer
	700 µl	Glycerol
	33 µl	10% APS
	20 µl	TEMED
	Ansatz für zwei Gele	
10 x TBS	25 mM	Tris
	137 mM	NaCl
	add 1000 ml ddH ₂ O, pH 7,6	
1 x TBST (Waschpuffer)	10%	10 x TBS, pH 7,6
	0,05%	Tween 20
	in ddH ₂ O	
Blockpuffer	1 x	TBST
	5%	Milchpulver (w/v)
Ponceau-Rot-Lösung	0,2%	Ponceau S
	3%	Tri-Chloressigsäure
	in ddH ₂ O	
Antikörper-Lösung	1 x	TBST
	5%	BSA oder Milchpulver (w/v)

2.1.2.6 Puffer für Proteinextrakte

Zelluläre Proteinextrakte (Lysepuffer A)	10 mM	KCL
	10 mM	Hepes, pH 7,9
	0,1 mM	EGTA, pH 7,9
	0,1 mM	EDTA, pH 7,9
	vor Gebrauch frisch dazu geben:	
	1 mM	DTT
	1 mM	Na-Orthovanadat
1 x	Proteinaseinhibitor (25 x)	

Nukleäre Proteinextrakte (Lysepuffer C)	420 mM	NaCl
	20 mM	Hepes, pH 7,9
	1 mM	EGTA, pH 7,9
	1 mM	EDTA, pH 7,9
	vor Gebrauch frisch dazu geben:	
	1 mM	DTT
	1 mM	Na-Orthovanadat
1 x	Proteinaseinhibitor (25 x)	

⇒ Lysepuffer A und C auf Eis lagern

2.1.3 Antikörper (Ak)

2.1.3.1 Antikörper zur Stimulation

	Spezies / Klon	Konzentration	Quelle
CD3	Armenian Hamster IgG1 monoklonaler Ak (145-2C11)	0,5 mg/ml	BD Biosciences
CD28	Syrian Hamster IgG2 monoklonaler Ak (37.51)	0,5 mg/ml	BD Biosciences

2.1.3.2 Antikörper zur Zellisolation mittels MACS

	Spezies / Klon	Konzentration	Quelle
CD11b-Bio	Ratte monoklonaler Ak IgG2 β (M1/70)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Biosciences
CD25-Bio	Ratte monoklonaler Ak IgM (7D4)	0,5 mg/ml 1:2500 in MACS-Puffer	BD Biosciences
CD45R/B220-Bio	Ratte monoklonaler Ak IgG2 α (RA3-6B2)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Biosciences
CD8-Bio	Ratte monoklonaler Ak IgG2 α (53-6.7)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Biosciences
I-A ^d /I-E ^d MHC II-Bio	Ratte monoklonaler Ak IgG2 α (2G9)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Biosciences
NK1.1-Bio	Maus monoklonaler Ak IgG2 α (PK136)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Biosciences
Ter-119-Bio	Ratte monoklonaler Ak IgG2 β (TER-119)	0,5 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	BD Biosciences
α Maus IgG (H+L)	Ziege polyklonaler Ak	1,3 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	Dianova
α Ratte IgG (H+L)	Maus polyklonaler Ak	1,8 mg/ml 1:5000 in MACS-Puffer	Dianova

2.1.3.3 Primär-Antikörper für Western-Blot

	Spezies / Klon	Konzentration	Quelle
c-Jun	Kaninchen monoklonaler Ak (60A8)	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
Foxp3	Maus monoklonaler Ak IgG1 (150D/E4)	1:500 in TBST + 5% BSA	eBioscience
IRF4 (F-4)	Maus monoklonaler Ak IgG2 α	1:200 in TBST + 5% BSA	Santa Cruz
Lamin B	Ziege polyklonaler Ak (M20)	1:600 in TBS	Santa Cruz
NFATc1	Maus monoklonaler Ak IgG1 (7A6)	1:2000 in TBST + 5% BSA	ALEXIS
pCreb (Ser133)	Kaninchen monoklonaler Ak (87G3)	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pFoxo3a (Ser318/321)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pGSK3 β (Ser9)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pmTOR (Ser2448)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling

p-p70S6K (Thr389)	Maus monoklonaler Ak (1A5)	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pPDK1 (Ser241)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pPKB/Akt (Ser473)	Kaninchen monoklonaler Ak IgG (D9E)	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pPKB/Akt (Thr308)	Kaninchen monoklonaler Ak IgG (C31E5)	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pPTEN (Ser380)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pS6 (Ser240/244)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pSAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pSmad2 (Ser245/250/255)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pSmad3(Ser423/425) pSmad1(Ser463/465)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pSTAT1 (Tyr701)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pSTAT3 (Tyr705)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pSTAT5 (Tyr694)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
pSTAT6 (Tyr641)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
PTEN	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
p-Tuberin/TSC2 (Thr1462)	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
ROR γ t	Ratte monoklonaler Ak IgG1, k	1:250 in TBST + 5% BSA	eBioscience
Smad4	Kaninchen polyklonaler Ak	1:1000 in TBST + 5% BSA	Cell Signaling
β -Aktin	Maus monoklonaler Ak (AC-40)	1:2000 in TBST + 5% Milchpulver	Sigma

2.1.3.4 Sekundär-Antikörper für Western-Blot

	Spezies / Klon	Konzentration	Quelle
anti-Kaninchen (H+L)	Ziege polyklonaler Ak	1:2000 in TBST + 5% Milchpulver	Dianova
anti-Maus (H+L)	Ziege polyklonaler Ak	1:2000 in TBST + 5% Milchpulver	Dianova
anti-Ziege (H+L)	Esel polyklonaler Ak	1:2000 in TBST + 5% Milchpulver	Dianova

2.1.3.5 FACS-Antikörper

	Spezies / Klon	Konzentration	Quelle
anti-Kaninchen IgG (H+L)-PE	Esel polyklonaler Ak	0,5 mg/ml 1:100 in FACS-Puffer	Dianova
anti-Maus IgG (H+L)-FITC	Ziege polyklonaler Ak	0,5 mg/ml 1:100 in FACS-Puffer	Dianova
CD25-PE	Ratte monoklonaler Ak IgG1, λ (PC61)	0,2 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Biosciences
CD4-APC	Ratte monoklonaler Ak IgG2a, κ (RM4-5)	0,2 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Biosciences
CD4-PE	Ratte monoklonaler Ak IgG2b, κ (GK1.5)	0,2 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Biosciences
CD62L-Bio	Ratte monoklonaler Ak IgG2a, κ (Mel-14)	0,5 mg/ml 1:200 In FACS-Puffer	BD Biosciences
CD62L-FITC	Ratte monoklonaler Ak IgG2a, κ (Mel-14)	0,5 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Biosciences
CD69-Bio	Armenian Hamster IgG (H1.2F3)	1:100 in FACS-Puffer	eBioscience
CD8-APC	Ratte monoklonaler Ak IgG2a, κ (53-6.7)	0,2 mg/ml 1:200 In FACS-Puffer	BD Biosciences
CD8-FITC	Ratte monoklonaler Ak IgG2a, κ (53-6.7)	0,5 mg/ml 1:200 In FACS-Puffer	BD Biosciences
CD98-FITC	Ratte monoklonaler Ak IgG2a, κ (RL333)	1:200 in FACS-Puffer	eBioscience
Foxp3-FITC	Ratte monoklonaler Ak IgG2a, κ (FJK-16s)	1:80 In FACS-Puffer	eBioscience
IFN γ -FITC	Ratte monoklonaler Ak IgG1, κ (XMG1.2)	1:100 in FACS-Puffer	eBioscience
IFN γ -PE	Ratte monoklonaler Ak IgG1, κ (XMG1.2)	1:160 in FACS-Puffer	eBioscience
IgG2 α -Bio	Ratte monoklonaler Ak (R35-95)	0,5 mg/ml in FACS-Puffer	BD Biosciences
IgG2 α -FITC	Ratte monoklonaler Ak (R35-95)	0,5 mg/ml in FACS-Puffer	BD Biosciences
IgG1-PE	Ratte monoklonaler Ak (R3-34)	0,2 mg/ml in FACS-Puffer	BD Biosciences
IgG2 α -PE	Ratte monoklonaler Ak (R35-95)	0,2 mg/ml in FACS-Puffer	BD Biosciences
IL-10-PE	Ratte monoklonaler Ak IgG2b, κ (JES5-16E3)	1:80 In FACS-Puffer	eBioscience
IL-13-PE	Ratte monoklonaler Ak IgG1, κ (eBio13A)	1:80 in FACS-Puffer	eBioscience
IL-17A-APC	Ratte monoklonaler Ak IgG2a, κ (eBio17B7)	1:160 in FACS-Puffer	eBioscience
IL-17A-PE	Ratte monoklonaler Ak IgG2a, κ (eBio17B7)	1:150 in FACS-Puffer	eBioscience

IL-21-PE	Ratte monoklonaler Ak IgG2a, κ (FFA21)	1:80 in FACS-Puffer	eBioscience
IL-2-PE	Ratte monoklonaler Ak IgG2b, κ (JES6-5H4)	1:40 in FACS-Puffer	eBioscience
IL-4-FITC	Ratte monoklonaler Ak IgG1, κ (BVD6-24G2)	1:100 in FACS-Puffer	eBioscience
IL-4-PE	Ratte monoklonaler Ak IgG1, κ (11B11)	1:160 in FACS-Puffer	eBioscience
Ox40-Bio	Ratte monoklonaler Ak (OX-86)	0,5 mg/ml 1:200 in FACS-Puffer	BD Biosciences
PE-Cy5- Streptavidin		0,2 mg/ml 1:400 in FACS-Puffer	BD Biosciences

2.1.3.6 Sonstige Farbstoffe

	Endkonzentration	Quelle
Ethidiumbromid	0,005%	Roth
Carboxyfluorescein-succinimidyl Ester (CFSE)	2 μ M in RPMI 1640	Invitrogen

2.1.3.7 DNA- und Protein-Marker

	Endkonzentration	Quelle
100 bp DNA-Leiter	3 μ l	Invitrogen
Protein-Standard (Page Ruler 10-170 kDa)	3 μ l	Fermentas

2.1.4 Zytokine und Zellstimulanzen

	Endkonzentration	Quelle
Brefeldin A	2 μ g/ml	Calbiochem
IL-2	20 ng/ml	Biochrom
IL-6	20 ng/ml	eBioscience
Ionomycin	800 ng/ml	Sigma
PMA	100 ng/ml	Sigma
TGF β 1	0,3-50 ng/ml	R&D Systems

2.1.5 Geräte

Autoklav SHP Laboklav	Steriltechnik AG (Magdeburg)
autoMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
β-Counter 1450 Microbeta	Wallac (Turku)
Brutschrank	Binder (Tuttlingen)
Elektrophoresekammer	BIO-RAD (München)
Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR	CAWO GmbH (Schrobenhausen)
Expositionskassetten	Dr. Goos (Heidelberg)
FACS Calibur	BD Biosciences (Heidelberg)
Feinwaage Adventurer™	OHAUS (Nänikon)
Flachbettschüttler Duomax 1030	Heidolph (Kelheim)
Geldokumentationsanlage Win32	Herolab (Wiesloch)
Harvester	Inotech (Nabburg)
IKA® VIBRAX VXR basic	IKA® (Staufen)
Laborwaage 440-47N	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Laminarwerkbank	Heraeus (Hanau)
Lichtmikroskop Axioskop 2 plus	Zeiss (Oberkochen)
Magnetrührer RH basic	IKA® (Staufen)
Mehrkanalpipette	BIOHIT (Rosbach v. d. Höhe)
Multifuge3 S-R	Heraeus (Hanau)
Multistepipette® plus	Eppendorf AG (Hamburg)
Neubauer-Zählkammer	Roth (Karlsruhe)
pH-Meter	inoLab, WTW (Weilheim)
Pipettensatz	Eppendorf AG (Hamburg)
Plattenreader Tecan Safire	Tecan (Crailsheim)
SDS-Page Mini Protean 3 Gel System	BIO-RAD (München)
Stromversorgungsgerät Power Pac 200	BIO-RAD (München)
Thermocycler T3000	Biometra (Göttingen)
Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge Micro 200R	Hettich (Tuttlingen)
Transblotsystem	BIO-RAD (München)
Vortexer VF2	IKA® (Staufen)

Wasserbad

GFL (Burgwedel)

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

6, 24, 96-Lochplatten

TPP (Trasadingen)

Combitips plus (1; 2,5; 5 ml)

Eppendorf AG (Hamburg)

Einmalhandschuhe Peha-Soft

Hartmann (Heidenheim)

Eppendorfreaktionsgefäße (1,5 ml)

Eppendorf AG (Hamburg)

FACS-Röhrchen

BD Biosciences (Heidelberg)

Filterpapier (Whatmann 3mm)

Roth (Karlsruhe)

Glasfiberfilter Filtermate A

Wallac (Turku)

Nitrozellulose Hybond™ C Extra

GE Healthcare (München)

Nylonsieb (70 µm)

BD Biosciences (Heidelberg)

Pasteurpipetten

Roth (Karlsruhe)

PCR-Reaktionsgefäße

Neolab (Heidelberg)

Pipetten (5, 10, 25 ml)

TPP (Trasadingen)

Pipettenspitzen

Eppendorf AG (Hamburg)

Plastikröhrchen (15, 50 ml)

Greiner (Frickenhausen)

Plastikspritzen Omnifix®-F (1 ml)

Braun (Melsungen)

Röntgenfilme Super RX

Fuji (Tokio)

Spritzenfilter 0,2 µm

TPP (Trasadingen)

Sterilfilter 0,2 µm (500 ml)

Corning (Wiesbaden)

Szintillations-Wachsschicht MeltiLex™A

Wallac (Turku)

Zellkulturschalen 60 x 15 mm

TPP (Trasadingen)

2.1.7 Chemikalien und Kits

Acrylamid 40%

Roth (Karlsruhe)

APS

Roth (Karlsruhe)

BCA™ Protein Assay Kit

Pierce, Thermo Scientific (Bonn)

BSA

Roth (Karlsruhe)

CaCl₂

Roth (Karlsruhe)

DTT

Roth (Karlsruhe)

EDTA (Titrierkomplex 3)	Roth (Karlsruhe)
EGTA	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
37% Essigsäure	J.T.Baker (Griesheim)
FCS	Pan Biotec GmbH (Aidenbach)
Glutamin-Lösung	GIBCO, Invitrogen (Darmstadt)
Glycerol	Apotheke OvGU
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hepes	Roth (Karlsruhe)
Inside stain Kit	eBioscience (Frankfurt)
Isopropanol	Apotheke OvGU
KCL	Roth (Karlsruhe)
KH ₂ PO ₄	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Na ₂ HPO ₄	Roth (Karlsruhe)
NaCl	Roth (Karlsruhe)
Natriumazid	Roth (Karlsruhe)
Natrium-Orthovanadat	Sigma (München)
Natriumpyruvat	Roth (Karlsruhe)
Nicht-essentielle Aminosäuren (100 x)	GIBCO, Invitrogen (Darmstadt)
Nonidet P40	Sigma (München)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Darmstadt)
Ponceau-S	Sigma (München)
Proteaseinhibitor (25 x)	Roche (Mannheim)
4 x RotiLoad	Roth (Karlsruhe)
SDS	Sigma (München)
Super Signal [®] West Pico – Chemilumineszenz Substrate	Pierce, Thermo Scientific (Bonn)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
TGFβ1	R&D Systems (Minneapolis)
Trichloressigsäure	Sigma (München)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau	Roth (Karlsruhe)
Tween-20	Roth (Karlsruhe)

β -Mercaptoethanol

Sigma (München)

2.1.8 Radioisotope

^3H -Thymidin

MP Biomedicals (Eschwege)

2.2 Methoden

2.2.1 Maus-Genotypisierung

2.2.1.1 Präparation genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsaten

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte im Alter von 3-4 Wochen. Den Tieren wurde ca. 0,5 cm der Schwanzspitze abgeschnitten, diese in ein Eppendorfgefäß überführt und anschließend mit 400 µl Schwanz-Lysepuffer für mindestens 2 h bei 55°C im Wasserbad oder Heizblock lysiert. Anschließend wurden nicht lysierte Bestandteile der Schwanzbiopsate mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 18620g (14000 upm, Hettich Zentrifuge Mikro 200R) vom Überstand (enthält die genomische DNA) getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Isopropanol vermischt. Mit Hilfe an der Spitze gebogener Pasteurpipetten wurde die ausgefallene DNA geangelt und für 20 min bei 60°C in 200 µl DEPC-H₂O gelöst. Die isolierte DNA wurde zur Genotypisierung mittels PCR eingesetzt.

2.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Eine PCR-Reaktion durchläuft multiple Zyklen, die jeweils aus Denaturierung (*denaturation*), Anlagerung (*annealing*) und Verlängerung (*elongation*) bestehen, wodurch gezielt spezifische DNA-Stücke amplifiziert werden. Für die Genotypisierung der Mäuse wurden folgende spezifische Primer verwendet:

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

PCR-Pipettierschemata:

PKB-PCR

PCR Komponente	Konzentration	Menge
Template DNA		2 µl
Primer vorwärts (<i>fwd</i>)	10 µM	1 µl
Primer rückwärts (<i>rev</i>)	10 µM	1 µl
dNTPs	12,5 µM	0,4 µl
MgCl ₂	25 mM	2 µl
5 x Green Go Taq [®] Flexi Puffer	5 x	4 µl
Go Taq [®] Flexi DNA Polymerase	5 U/µl	0,1 µl
DEPC-H ₂ O		9,5 µl

GFP Foxp3- und CD28-PCR

PCR Komponente	Konzentration	Menge
Template DNA		2 µl
Primer vorwärts (<i>fwd</i>)	10 µM	1 µl
Primer rückwärts 1 (<i>rev1</i>)	10 µM	1 µl
Primer rückwärts 2 (<i>rev 2</i>)	10 µM	1 µl
dNTPs	12,5 µM	0,4 µl
MgCl ₂	25 mM	2 µl
5 x Green Go Taq [®] Flexi Puffer	5 x	4 µl
Go Taq [®] Flexi DNA Polymerase	5 U/µl	0,1 µl
DEPC-H ₂ O		8,5 µl

Die PCR wurde in einem Volumen von 20 µl in 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Amplifizierung der Genabschnitte erfolgte unter folgenden PCR-Konditionen:

PKB-PCR-Programm

1. initiale Denaturierung	94°C	5	min	
2. Denaturierung	94°C	1	min	} 32 Zyklen
3. Annealing	56°C	1	min	
4. Elongation	72°C	1	min	
5. Elongation	72°C	5	min	
6. Lagerung	4°C	∞	min	

GFP Foxp3-PCR-Programm

1. initiale Denaturierung	95°C	5	min	
2. Denaturierung	95°C	1	min	} 30 Zyklen
3. Annealing	57°C	1	min	
4. Elongation	72°C	1	min	
5. Elongation	72°C	5	min	
6. Lagerung	4°C	∞	min	

CD28-PCR-Programm

1. initiale Denaturierung	95°C	5	min	
2. Denaturierung	95°C	1	min	} 40 Zyklen
3. Annealing	58°C	1	min	
4. Elongation	72°C	1	min	
5. Elongation	72°C	5	min	
6. Lagerung	4°C	∞	min	

2.2.1.3 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden 10 µl des Reaktionsgemisches auf ein analytisches, 1%-iges mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetztes Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch in 1 x TAP-Puffer aufgetrennt (Abb.10). Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V für 45 min. Die Größe der PCR-Fragmente konnte anhand des mitlaufenden Molekulargewichtsmarkers (100 bp DNA-Leiter, Invitrogen) bestimmt werden, wofür die amplifizierten DNA-

Fragmente unter UV-Licht (254 nm Wellenlänge) sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem von Herolab aufgenommen wurden.

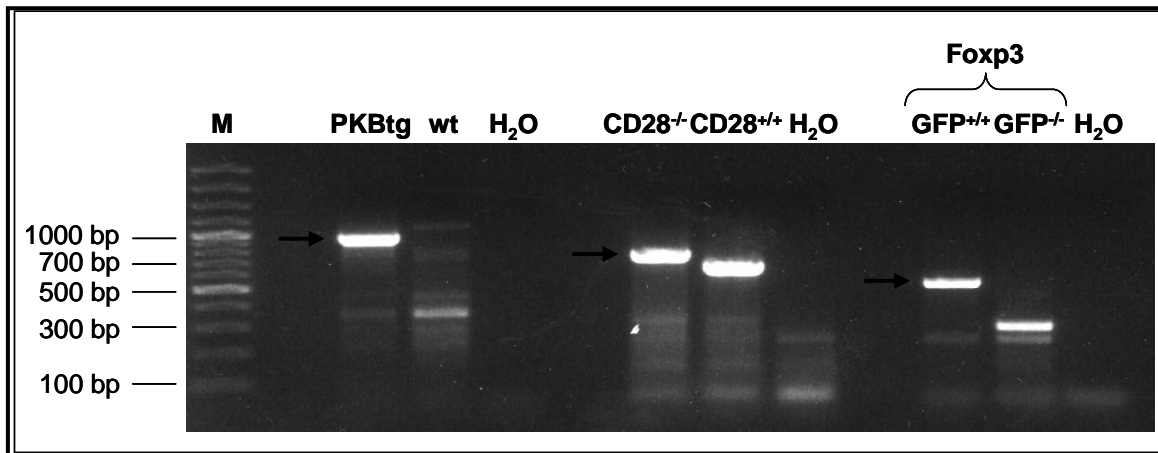


Abb. 10: Genotypisierung der Mauslinien. Agarosegel zur analytischen Auftrennung der PCR-Produkte von wt, PKBtg (900 bp) sowie Foxp3- GFPtg (GFP^{+/+}, 520 bp) Mäusen. Ferner werden PCR-Produkte für wt (CD28^{+/+}, 700 bp) im Vergleich zu CD28^{-/-} (800 bp) Mäusen gezeigt. Als PCR-Kontrolle wurde H₂O anstatt Template-DNA eingesetzt. M: 100 bp-Leiter DNA-Molekulargewichtsmarker.

2.2.2 Organentnahme

Die Versuchstiere wurden mittels CO₂ eingeschläfert und anschließend mit der Bauchseite nach oben an den Gliedmaßen auf einem Styroporbrett fixiert. Mit Schere und Pinzette wurde das Bauchfell vom Schwanz bis zum Kopf geöffnet. Mit spitz zulaufenden Pinzetten wurden die inguinalen, brachialen, axillären, zervikalen und mesenterialen Lymphknoten präpariert. Die Lymphknoten mehrerer Mäuse wurden „gepoolt“, d.h. sie wurden gruppenweise (wt, PKBtg, CD28^{-/-}, PKBtg CD28^{-/-}) in Petrischalen mit RPMI 1640 (+) -Zellkulturmedium überführt.

2.2.3 T-Zellisolation

Die „gepoolten“ Lymphknoten wurden sanft mit Hilfe eines Stempels einer 1 ml Plastikspritze durch ein 70 µm Nyloonsieb in eine kleine Zellkulturschale gerieben. Anschließend wurde das Sieb mit einer Plastik-Pasteurpipette und RPMI 1640 (+) -Medium gespült. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Plastik-Röhrchen überführt und für 5 min bei 300 g (1300 upm, Multifuge3 S-R, Heraeus) zentrifugiert,

der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml RPMI 1640 (+)-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Neubauer Zählkammer. Sie besteht aus einem Objektträger, in den vier Großquadrate eingraviert sind, die jeweils eine Fläche von 1 mm^2 aufweisen. Die Großquadrate sind nochmals in 16 Kleinquadrate unterteilt. Bei Auflegen eines Deckgläschens auf die Zählkammer erhält man Großquadrate mit einem Volumen von $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ ($0,1 \text{ mm}^3$). Zum Auszählen der 1:50 mit Trypanblau verdünnten Zellsuspension wurde die Zählkammer unter ein Lichtmikroskop (Carl Zeiss, Jena) gelegt und das Zählkreuz auf eine 10-20-fache Vergrößerung eingestellt. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt, wobei nur hell leuchtende (lebende) und nicht mit Trypanblau gefärbte (tote) Zellen gezählt wurden.

Berechnung der Zellzahl:

$$\frac{\text{Zellzahl der 4 Großquadrate}}{4 \text{ (Anzahl der Großquadrate)}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.5 Isolierung naiver CD4^+ bzw. $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen

Für die Isolierung von CD4^+ bzw. $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen wurde die Lymphknoten-Zellsuspension für 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit Lauf-Puffer für die MACS-Isolation gewaschen. Die Lymphknoten-Zellen wurden sodann in $100 \text{ }\mu\text{l}$ Lauf-Puffer pro 1×10^7 Zellen aufgenommen und mit dem Antikörpercocktail für die negative Selektion von CD4^+ bzw. $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen (siehe unten) für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 10 ml Lauf-Puffer gewaschen und das Zellpellet in $90 \text{ }\mu\text{l}$ Lauf-Puffer pro 1×10^7 Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von $10 \text{ }\mu\text{l}$ Streptavidin-MicroBeads (Miltenyi Biotec) pro 1×10^7 Zellen erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min bei 4°C . Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und in 1 ml Lauf-Puffer pro 1×10^8 Zellen

aufgenommen. Zum Entfernen von Verklumpungen wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Nygonsieb in ein frisches steriles 15 ml Röhrchen gespült.

Antik rpercocktail für die Isolation von CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

Antik�rper	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁻
CD25-Bio	-	+
CD8-Bio	+	+
CD45R/B220-Bio	+	+
NK1.1-Bio	+	+
I-A ^d /I-E ^d MHC II-Bio	+	+
CD11b-Bio	+	+
Ter-119-Bio	+	+
�Maus IgG (H+L)	+	+
�Ratte IgG (H+L)	+	+

In den Antik rpercocktail wurden jeweils 0,2 µl Antikörper (siehe Tabelle) pro 1x10⁷ Zellen pipettiert. Die Lymphknoten-Zellen wurden in 100 µl Lauf-Puffer (MACS) pro 1x10⁷ Zellen aufgenommen und mit dem Antik rpercocktail für 20 min bei 4 C inkubiert.

Die Isolation der CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen erfolgte durch negative Selektion mit dem Auto-MACS-Gerät von Miltenyi Biotec und dem Programm *DepleteS*. Die Reinheit der erhaltenen CD4⁺ T-Zellpopulation wurde mittels FACS-Analyse bestimmt und lag bei ≥95%. Die isolierten CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden für 7 min bei 374 g (1450 upm, Multifuge3 S-R, Heraeus) zentrifugiert und anschließend in RPMI 1640 (+)-Medium auf die gewünschte Zellzahl/ml eingestellt.

2.2.6 Proliferationstest

Um den Einfluß von TGFβ1 auf das Wachstum stimulierter CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurde die Proliferation der Zellen durch ³[H]-Thymidineinbau oder mittels CFSE-Markierung bestimmt.

2.2.6.1 ³[H]-Thymidineinbau

Die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen lässt sich durch den Einbau von Tritium-markiertem Thymidin in die DNA sich teilender Zellen ermitteln. Dazu wurden flache 96-Loch-Zellkulturplatten mit 50 µl CD3-Ak (2 µg/ml) oder CD3+CD28-Ak (2 und 5 µg/ml) in 1 x PBS über Nacht bei 4 C beschichtet. Am nächsten Tag wurden 2x10⁵

isolierte CD4⁺ T-Zellen von wt, PKBtg, CD28^{-/-} oder PKBtg CD28^{-/-} Mäusen in die zuvor mit RPMI 1640 (+) gewaschenen Löcher ausgesät (in Triplett-Ansätzen pro Stimulationsbedingung) und in An- oder Abwesenheit von TGFβ1 (10 ng/ml) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 24-stündiger Stimulation der CD4⁺ T-Zellen erfolgte die Zugabe von 20 µl ³[H]-Thymidin (0,2 µCi pro Loch). Nach weiteren 16 h Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe eines *Harvesters* (Inotech, Nabburg) auf einen Glasfiberfilter (Filtermat A, Wallac, Turku) gesaugt und dieser in der Mikrowelle mit einer Szintillator-Wachsschicht (MeltiLexTMA, Wallac, Turku) überzogen. Mittels eines β-Counters (1450 Microbeta, Wallac, Turku) wurde sodann der ³[H]-Thymidineinbau in die DNA bestimmt.

2.2.6.2 CFSE-Markierung

Die Markierung von Zellen mit *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) ist eine weitere Methode zur Bestimmung der Zellproliferation. CFSE ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der von der Zelle aufgenommen wird und im Zytoplasma an Proteine bindet. Da bei der Zellteilung jeweils die Hälfte des Farbstoffes auf die Tochterzellen verteilt wird, nimmt die Fluoreszenzintensität mit jeder Zellteilung ab, so dass die Anzahl durchlaufener Zellzyklen bestimmt werden kann. Für Zellzyklusanalysen mittels CFSE wurden die isolierten CD4⁺ T-Zellen der jeweiligen Mauslinien zunächst 3-mal mit 10 ml RPMI 1640-Medium ohne FCS und anderen Zusätzen gewaschen, zentrifugiert (374 g, Multifuge3 S-R, Heraeus) und anschließend auf 1x10⁷ Zellen/ml in FCS-freiem RPMI 1640-Medium eingestellt. Proteine im Medium würden CFSE binden und damit die Aufnahme des Farbstoffes in die Zelle vermindern. Dann erfolgte die Zugabe von CFSE (2 µM) und eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur (RT). Danach wurden die Zellen 2-mal mit RPMI 1640 (+)-Medium gewaschen und die CFSE-markierten Zellen auf 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt. Über Nacht mit CD3-Ak (2 µg/ml) oder CD3+CD28-Ak (2 und 5 µg/ml) beschichtete 24-Loch-Platten wurden mit 1 ml Zellsuspension pro Loch bestückt. Die Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von TGFβ1 (10 oder 50 ng/ml) bzw. IL-2 (20 ng/ml) für 72 h bei 37°C kultiviert. Die Anzahl der erfolgten Zellteilungen wurde durchflußzytometrisch am FACS Calibur (BD Bioscience, Heidelberg, D) bestimmt.

2.2.7 FACS-Analyse

Grundlage der FACS-Analyse ist eine fluoreszenz-markierte Einzelzellsuspension, wobei die Zellen einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren und das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht separat detektiert wird. Mit dieser Methode lassen sich relativ große Zellzahlen in vergleichsweise kurzer Zeit analysieren. Die Zahl der analysierbaren Parameter steigt mit der Zahl der eingesetzten Laser und Fluoreszenzfarbstoffe. Zur Charakterisierung der Zellen werden fluoreszenzfarbstoff-markierte Ak eingesetzt, die spezifische Strukturen auf der Oberfläche oder in der Zelle erkennen und so markieren.

2.2.7.1 Oberflächenfärbung von T-Zellen

Zur Analyse der Oberflächenexpression verschiedener Antigene wurden 1×10^6 CD4⁺ T-Zellen in 2 ml 1 x PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen für 5 min bei 300 g (Multifuge3 S-R, Heraeus) zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden die Zellen entweder im ersten Färbeschritt mit biotinylierten und im zweiten Färbeschritt mit direkt Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern sowie PE-Cy5-Streptavidin gefärbt oder die Zellen wurden nur mit Fluorochrom-gekoppelten Ak in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation bzw. zwischen den Färbeschritten wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Zum Messen der Proben am FACS Calibur wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit dem CellQuest-Programm (BD Biosciences, Heidelberg).

2.2.7.2 Intrazelluläre Messung von Proteinen durch FACS-Analyse

Für die intrazelluläre Färbung von T-Zellen wurden $1-3 \times 10^6$ CD4⁺ T-Zellen pro Ansatz eingesetzt. Nach der Oberflächenfärbung (siehe 2.2.7.1) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und intrazellulär gefärbt. Intrazelluläre Färbungen wurden mit dem „*Inside Stain Kit*“ von eBioscience gemäß der Herstellervorschrift durchgeführt.

2.2.8 Induktion von iTreg-Zellen

Für die iTreg-Induktion wurden 3×10^6 (für FACS-Analysen) bzw. 5×10^6 (für Western-Blot-Analysen) $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus wt, PKBtg, $CD28^{-/-}$ und PKBtg $CD28^{-/-}$ Mäusen mit plattengebundenem CD3-Ak (2 $\mu\text{g/ml}$) oder CD3+CD28-Ak (2 und 5 $\mu\text{g/ml}$) in Ab- oder Anwesenheit von TGF β 1 (10 ng/ml, R&D Systems) für 12 h, 20 h und 40 h (Western-Blot-Analysen) oder für 3 Tage (FACS-Analysen) bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Die Differenzierung der iTreg-Zellen erfolgte in 6-Loch-Zellkulturplatten in einem Gesamtvolumen von 3 ml RPMI 1640 (+)-Zellkulturmedium. Nach 3-tägiger Stimulation wurde die Lebendzellzahl ermittelt sowie die Expression von CD25 und Foxp3 (siehe 2.2.7) und die intrazelluläre Zytokinproduktion (siehe 2.2.10) durchflußzytometrisch bestimmt. Zur Analyse im Western-Blot (siehe 2.2.11) wurden aus den jeweiligen induzierten Zellkulturansätzen zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte hergestellt und bei -20°C gelagert.

2.2.9 Differenzierung von Th17-Zellen

Für die Th17-Induktion wurden 3×10^6 (für FACS-Analysen) bzw. 5×10^6 (für Western-Blot-Analysen) $CD4^+CD25^-$ T-Zellen aus wt, Foxp3 GFP und PKBtg bzw. Foxp3 GFP PKBtg Mäusen mit plattengebundenem CD3+CD28-Ak (2 und 5 $\mu\text{g/ml}$) und TGF β 1 (10 ng/ml) in Ab- oder Anwesenheit von IL-6 (20 ng/ml, eBioscience) für 12 h, 20 h und 40 h (Western-Blot) oder 3 Tage (FACS) bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Die Induktion der Th17-Zellen erfolgte in 6-Loch-Zellkulturplatten in einem Gesamtvolumen von 3 ml RPMI 1640 (+)-Zellkulturmedium. Am 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 $\mu\text{g/ml}$) restimuliert. Danach wurde die Lebendzellzahl ermittelt sowie die Expression von CD25, Foxp3, IL-17 und anderen Zytokinen (siehe 2.2.10) in den verschiedenen Ansätzen durchflußzytometrisch bestimmt. Aus für Western-Blot-Analysen induzierten Th17-Zellen wurden zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte gewonnen.

2.2.10 Zytokinmessung

Die Zytokinproduktion (IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-21, IFN- γ) in wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen unter iTreg- und Th17-induzierenden Stimulationsbedingungen wurde nach 3 Tagen intrazellulär mittels FACS bestimmt. Vor der intrazellulären FACS-Färbung (siehe 2.2.7.2) wurden die entsprechenden Zellkulturen für 4 h mit PMA/Ionomycin (100 und 800 ng/ml) in Anwesenheit von Brefeldin A (2 μ g/ml) restimuliert. Brefeldin A unterbindet den Transport von Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, wodurch es zu einer Akkumulation der zu untersuchenden Zytokine in der Zelle kommt.

2.2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.2.11.1 Herstellung von zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakten

Zur Gewinnung von zytoplasmatischen und nukleären Proteinextrakten wurden unstimulierte und *in vitro* stimulierte (iTreg- und Th17-Induktion) CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus wt, PKBtg, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäusen 2-mal mit kaltem 1 x PBS gewaschen (5 min, 300 g, Multifuge3 S-R, Heraeus; 1 min, 620 g, Tischzentrifuge Mikro 200R, Hettich). Danach wurden die Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 100 μ l eiskaltem Lysepuffer A pro 1×10^7 Zellen resuspendiert und für 2 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 0,5% NP-40 (Endkonzentration), die Zellen wurden kurz gevortext und für 2 min auf Eis inkubiert. Im hypotonischen Lysepuffer schwellen die Zellen an und durch das Detergenz werden die Plasmamembranen zerstört. Die Zelltrümmer wurden durch eine 3-minütige Zentrifugation (18620 g, Mikro 200R, Hettich) bei 4°C im Eppendorfgefäß sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und als zytoplasmatischer Proteinextrakt verwendet. Das durchsichtige Pellet wurde 2-mal mit je 800 μ l Lysepuffer A gewaschen (3 min, 18620 g, Mikro 200R). Nach Abnehmen und Verwerfen des Überstandes wurden 30 μ l des eiskalten Lysepuffers C pro $0,5-1 \times 10^7$ Zellen zu dem Pellet pipettiert und kurz gevortext. Um die nukleären Proteine von der DNA zu lösen, schüttelten die Extrakte (1750 Mot/min, IKA[®] VIBRAX VXR basic, Typ VX2E) im hypertonen Puffer für mindestens 2 h bei 4°C. Die Extrakte wurden für 20 min bei 14000 upm zentrifugiert, der Überstand der

jeweiligen Ansätze wurde abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zytoplasmatische (CE) und nukleäre (NE) Proteinextrakte wurden mit 1 x RotiLoad versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und bei -20°C gelagert.

2.2.11.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde mit dem Biuret-Assay (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce, Thermo Scientific) durchgeführt. Bei dieser Methode bilden Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen einen Komplex mit zweiwertigen Kupferionen (Cu^{2+}) in wässrig alkalischer Lösung. Die Cu^{2+} -Ionen werden reduziert und bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex. Zunächst wurde eine Standardreihe angelegt, wobei als Eichproteinlösung BSA (*bovine serum albumin*) (2 mg/ml Stocklösung) diente. Aus den jeweiligen Eichwerten (500/250/125/62,5/31,25/15,6/7,8 µg/ml) wurde eine Eichgerade erstellt und anhand dieser der Proteingehalt der Proben ermittelt. Zum Vermessen wurden 20 µl Probe (Verdünnung 1:25) bzw. Eichproteinlösung (BSA) in 96-Loch-Platten mit 200 µl BCA-Lösung (mische Lösung A und B im Verhältnis 50 (A) : 1 (B)) gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Ausbildung des Farbstoff-Protein-Kupfer-Komplexes wurde die Proteinkonzentration der Ansätze (jeweils Doppelbestimmung) im Plattenreader (Tecan, Safire; Software: Magellan™) bestimmt.

2.2.11.3 Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Dabei werden die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis in einer porösen Polyacrylamidmatrix nach ihrem Stokes-Radius – und damit nach ihrem Molekulargewicht – aufgetrennt. Verwendet wurde das diskontinuierliche System nach Lämmli (Laemmli, 1970). Das Gel bestand hierbei aus einem Trenngel (pH 8,8), welches von einem Sammelgel (pH 6,8) überschichtet wurde. Durch das Sammelgel werden Protein-Proben vor der eigentlichen Auftrennung in einer schmalen Bande konzentriert und somit eine höhere Trennschärfe im Trenngel erreicht. Das Molekulargewicht der nachzuweisenden Proteine lag bei 35-289 kDa, weshalb 8-12,5%ige Trenngele eingesetzt wurden. Nachdem die Komponenten des

Trenngels pipettiert waren, wobei APS und TEMED zu letzt zugegeben wurden, wurde die Lösung zwischen die Glasplatten (1,5 mm) in der Gelhaltevorrichtung gegossen (BIO-RAD, München). Dabei wurden nach oben ca. 2 cm für das Sammelgel frei gelassen. Dann wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet und für ca. 1 h auspolymerisiert. Nach Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgel über das Trenngel gegossen und der 15-Geltaschen-Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Das Sammelgel benötigte etwa 15-30 min bei RT zum Auspolymerisieren. Zum Auftragen der Proben wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer (Mini Protean 3 Gel System, BIO-RAD) mit 500 ml 1 x Elektrophoresepuffer eingesetzt. Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Gel gezogen und die Geltaschen wurden mit dem Elektrophoresepuffer gespült. Für die Probenauftrennung wurden 20-25 µg zytoplasmatische bzw. 10-15 µg nukleäre Proteinextrakte sowie 3 µl des Protein-Standards (*PageRuler* 10-170 kDa, Fermentas) eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 70 mA konstant, bis die Lauffront des Probenpuffers (1 x RotiLoad) das untere Ende des Trenngels erreichte. Zur weiteren Charakterisierung der Proteine wurden diese vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

2.2.11.4 Western-Blot-Analyse

Um die Expression und Aktivierung verschiedener Proteine in wt, PKBtg, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen zu untersuchen, wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten zytoplasmatischen und nukleären Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (HybondTM-C Extra, Amersham Biosciences) übertragen (geblottet). Danach wurden die Proteinmenge bzw. die Protein-Phosphorylierung mittels spezifischer Antikörper und dem ECL-System auf einem Film detektiert. Für den Proteintransfer wurden die Schwämme, das Whatman-Filterpapier (Roth) und die Nitrozellulose für ca. 15 min in 1 x Blotpuffer getränkt. Der Nass-Transfer erfolgte in 1 x Blotpuffer (1 L) bei 4°C mit dem Mini Protean 3 Western Transblot System (BIO-RAD) bei 75 V konstant für 2 h. Nach dem Blotvorgang wurde die Membran für 5 min mit Ponceau-Rot gefärbt, um den erfolgreichen Proteintransfer zu verifizieren. Entfärbt wurde die Membran mit ddH₂O (5 min) und 1 x TBST (5 min). Zum Blockieren freier Protein-Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockpuffer geschwenkt. Vor der Zugabe der

Primärantikörper-Lösung wurde die Membran nochmals für 20 sek mit 1 x TBST gespült. Die Inkubation der Membran mit 5-10 ml Primärantikörper-Lösung (in 1 x TBST + 5% BSA oder Milchpulver) erfolgte über Nacht bei 4°C oder für 2-4 h bei RT unter leichtem Schwenken (Flachbettschüttler). Am nächsten Tag wurde die Membran 2-mal für 10 min mit 1 x TBST gewaschen, um ungebundene Ak zu entfernen, und anschließend für 1-2 h bei RT mit 10 ml Sekundärantikörper-Lösung inkubiert. Die Sekundärantikörper (Dianova) wurden in 1 x TBST + 5% Milchpulver 1 : 2000 verdünnt. Abschließend wurde 2-mal für 10 min mit 1 x TBST gewaschen. Die Detektion der Antikörper-markierten Proteine erfolgte mit dem *Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* ((ECL-Lösung), Pierce, Thermo Scientific), wobei 0,5-1 ml Lösung auf die Membran gegeben wurden. Das Prinzip der Protein-Detektion mittels ECL-Lösung beruht auf Chemilumineszenz. Die an die Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase und Wasserstoffperoxid katalysieren unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol (zyklisches Diacylhydrazid), wodurch Luminol in einen angeregten energiereichen Zustand versetzt wird. Die frei werdende Energie wird als Lichtemission abgegeben und auf einem Röntgenfilm (Super RX, Fuji) detektiert. Die Exposition der Filme erfolgte, je nach Signalstärke, zwischen 1 sek und 1 h. Durch Belichtung des Röntgenfilms und anschließender Filmentwicklung mit dem Cawomat 2000 IR (CAWO GmbH) wurde letztlich die Quantität oder der Phosphorylierungsstatus der untersuchten Proteine ermittelt.

2.2.12 Statistische Analyse der Daten

Die statistische Signifikanz von Unterschieden in der prozentualen Zellverteilung, Zellzahl und Proliferation wurde mit dem Student t-Test bestimmt. Dabei wurden Werte mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss aktiver PKB auf die T-Zellproliferation

3.1.1 Erhöhte PKB-Signale ermöglichen T-Zellproliferation in Anwesenheit von TGF β 1

TGF β 1 agiert als negativer Regulator der Lymphozytenaktivierung und -proliferation (Sakaguchi et al., 1995) und ist dadurch ein zentraler Regulator inflammatorischer Prozesse. PKB-Signale hingegen fördern die Proliferation und das Überleben von T-Zellen (Bommhardt et al., 2004) und könnten somit als Gegenspieler negativer TGF β 1-Signale bei Immunreaktionen eine wichtige Rolle spielen. Daher wurde zuerst untersucht, ob erhöhte myrPKB-Signale (PKBtg) in T-Zellen die TGF β 1-vermittelten immunsuppressiven Effekte hinsichtlich der Proliferation beeinflussen.

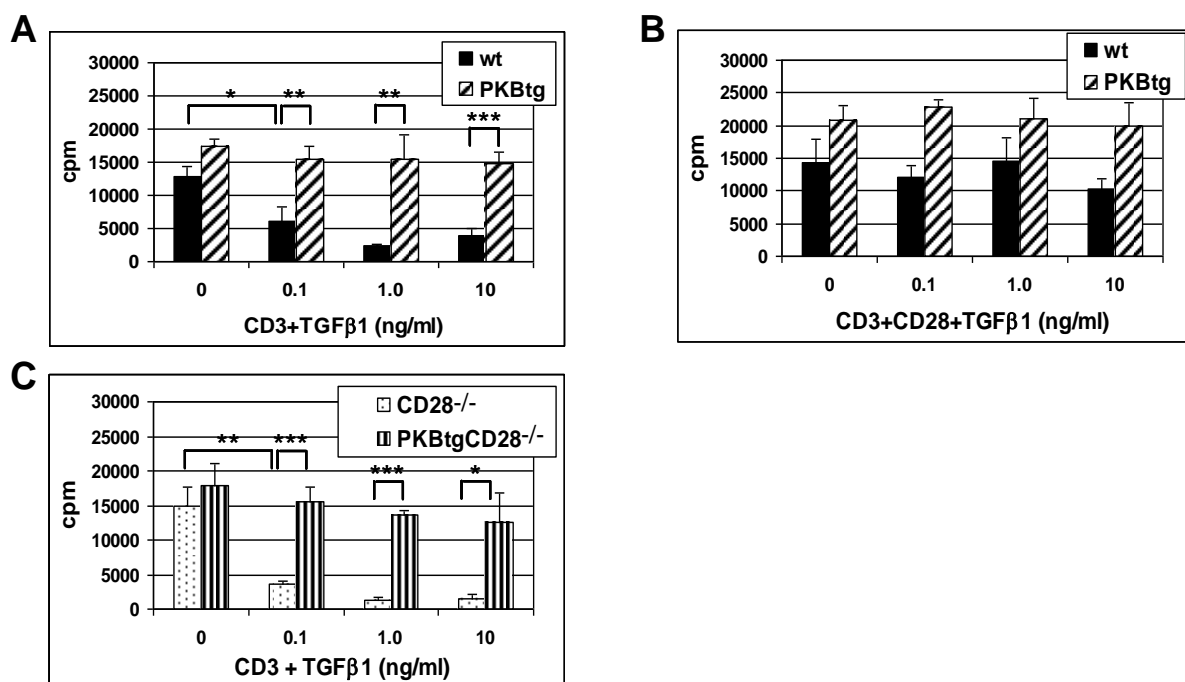


Abb. 11: Erhöhte PKB-Signale in wt und CD28 $^{-/-}$ CD4 $^{+}$ T-Zellen ermöglichen deren Proliferation bei Stimulation mit CD3-Ak und TGF β 1. CD4 $^{+}$ T-Zellen von wt und PKBtg Mäusen (A, B) bzw. CD28 $^{-/-}$ und PKBtg CD28 $^{-/-}$ Mäusen (C) wurden mit CD3-Ak (3 μ g/ml) (A, C) oder CD3+CD28- Ak (3 und 5 μ g/ml) (B) in Ab- oder Anwesenheit von TGF β 1 stimuliert. Die Proliferation der T-Zellen wurde nach 24 h mittels 3 [H]-Thymidineinbau (cpm) bestimmt; * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 (Abb. nach Pierau et al., 2009).

Bei Stimulation mit CD3-Ak proliferierten PKBtg CD4⁺ T-Zellen etwas stärker als wt Zellen, gemessen nach 24 h durch ³[H]-Thymidineinbau (Abb. 11A). TGFβ1 hemmte die Proliferation der wt CD4⁺ T-Zellen drastisch, hatte interessanterweise aber keinen wesentlichen Einfluss auf PKBtg CD4⁺ T-Zellen, da sie so gut wie TGFβ1-unbehandelte CD4⁺ T-Zellen expandierten. Die verschiedenen TGFβ1-Konzentrationen unterschieden sich nur geringfügig in ihrer Wirkung. Auf CD3+CD28-Ak-stimulierte wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen hatte TGFβ1 dagegen nur einen leicht inhibitorischen Einfluss (Abb. 11B). Dies zeigt, dass TGFβ1 im Zusammenspiel mit CD28-kostimulatorischen Signalen auf CD4⁺ T-Zellen nicht immunsupprimierend wirkt und dass erhöhte PKB-Signale eine vergleichbare Wirkung wie CD28-Kostimulation haben.

Da PKB indirekt über CD28 aktiviert wird, wurde auch der Einfluss tg PKB auf die Proliferation CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen in An- und Abwesenheit von TGFβ1 untersucht. CD3-Ak-stimulierte PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen proliferierten wiederum etwas stärker als CD28^{-/-} Zellen. Die Proliferation CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen wurde durch TGFβ1 ebenfalls stark inhibiert (Abb. 11C). Dagegen expandierten PKBtg CD28^{-/-} T-Zellen in Gegenwart von TGFβ1 so gut wie wt CD4⁺ T-Zellen nach alleiniger CD3-Ak-Stimulation und vergleichbar zu PKBtg CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von TGFβ1 (Abb. 11A und 11C). Somit ersetzt tg PKB CD28-Kostimulation und ermöglicht die Proliferation CD3-Ak+TGFβ1-stimulierter PKBtg und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen.

3.1.2 Erhöhte PKB-Signale in stimulierten wt und CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen induzieren mehrfache Zellteilungen in Anwesenheit von TGFβ1

Die Wirkung von TGFβ1 und aktiver PKB auf den Zellzyklusverlauf aktivierter CD4⁺ T-Zellen wurde mittels der CFSE-Methode bestimmt. CD3-Ak- sowie CD3+CD28-Ak-stimulierte wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen durchliefen 3-4 Zellzyklen innerhalb von 3 Tagen (Abb. 12, Zeile 2). Dagegen teilten sich bei CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation nur 23% der wt CD4⁺ T-Zellen 1-2-mal. Markanterweise durchliefen 93% der CD4⁺ PKBtg T-Zellen bei Zugabe von TGFβ1 den Zellzyklus 3-4-mal, vergleichbar zu den ohne TGFβ1 stimulierten T-Zellen (91%) (Abb. 12, Zeile 3). Bei CD3+CD28-Ak-

Stimulation hatte TGF β 1 nur einen geringfügigen Einfluss auf die Zellteilungen der wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen (Abb. 12, Zeile 3 und 4).

Wie zuvor, wurde der Einfluss tg PKB auf den Zellzyklusverlauf CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen in An- und Abwesenheit von TGF β 1 untersucht. CD28-Kostimulation hatte im Vergleich zur CD3-Ak-Stimulation, wie zu erwarten, keinen fördernden Einfluss auf den Zellzyklusverlauf und diente zur Kontrolle der CD28-Defizienz. In beiden Stimulationsansätzen durchliefen ca. 88% der PKBtg CD28^{-/-} T-Zellen, aber nur ca. 55% der CD28^{-/-} T-Zellen drei Zellzyklen. CD28^{-/-} T-Zellen zeigten, ganz im Gegensatz zu den drei durchlaufenen Zellteilungen der PKBtg CD28^{-/-} T-Zellen, keine Zellteilung bei CD3-Ak+TGF β 1-Behandlung. Erhöhte PKB-Signale ermöglichen daher die effiziente mehrmalige Zellzyklusprogression CD3-Ak-aktivierter CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von TGF β 1, vergleichbar zu kostimulatorischen CD28-Signalen.

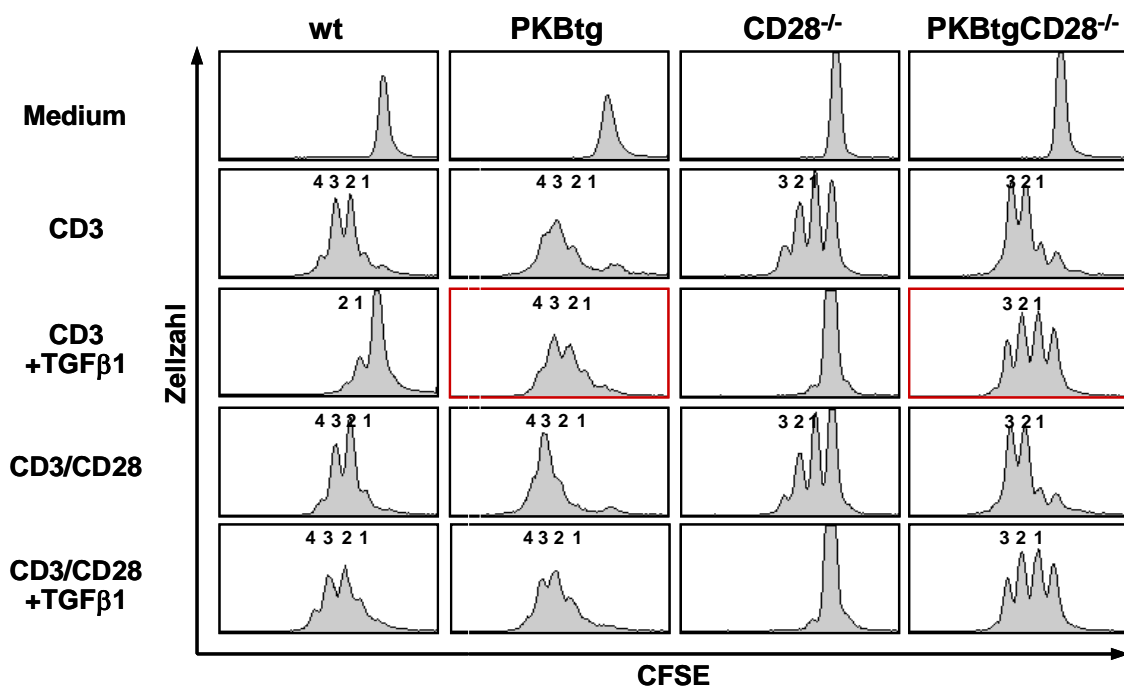


Abb. 12: Zellzyklusprogression aktivierter CD4⁺ T-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von TGF β 1. CFSE-gefärbte wt und PKBtg bzw. CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden nicht (Medium) oder mit CD3-Ak (3 μ g/ml) bzw. CD3+CD28-Ak (3 und 5 μ g/ml) in Ab- oder Anwesenheit von TGF β 1 (10 ng/ml) stimuliert. Nach 72 h wurde der Zellzyklusverlauf (CFSE-Abnahme) der CD4⁺ T-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Zahlen in den jeweiligen Histogrammen geben die Anzahl der Zellteilungen an (Abb. verändert nach Pierau et al., 2009).

3.1.3 PKBtg CD4⁺ T-Zellen proliferieren in Gegenwart hoher TGFβ1-Konzentrationen

Da sich 93% der PKBtg CD4⁺ T-Zellen bei CD3-Ak-Stimulation und Zugabe von 10 ng/ml TGFβ1 teilten, aber nur 23% der wt CD4⁺ T-Zellen (Abb. 12), wurde der Einfluss höherer TGFβ1-Konzentrationen auf den Zellzyklusverlauf PKBtg CD4⁺ T-Zellen untersucht (Prozentangaben wurden mit der Software CellQuest Pro von BD Biosciences ermittelt). In Gegenwart von 50 ng/ml TGFβ1 teilten sich bei CD3-Ak-Stimulation immer noch 70% der PKBtg CD4⁺ T-Zellen, gegenüber nur 23% der wt T-Zellen (Abb. 13). Auch bei CD3+CD28-Ak-Stimulation hatte diese TGFβ1-Konzentration nur einen geringen Einfluss auf PKBtg CD4⁺ T-Zellen, da sich 90% der Zellen teilten, jedoch war der Zellzyklusverlauf im Vergleich zur Stimulation ohne TGFβ1 etwas verlangsamt.

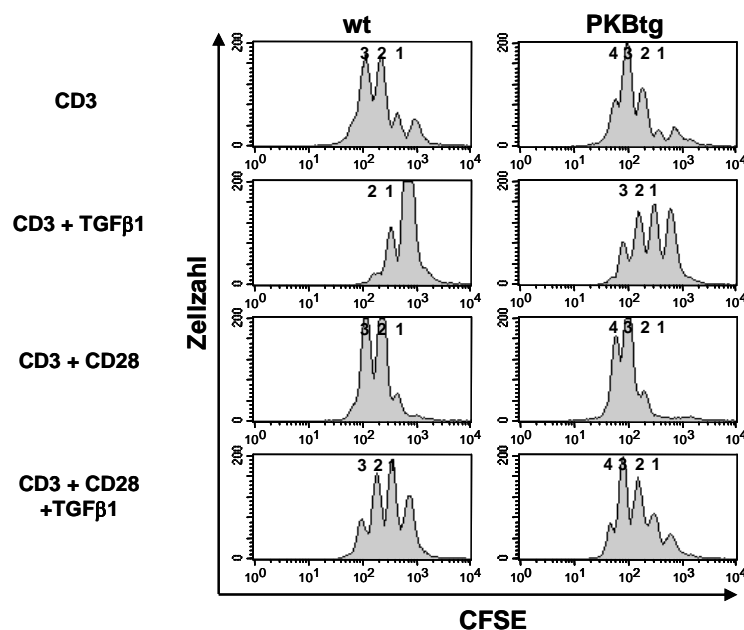


Abb. 13: Erhöhte PKB-Signale ermöglichen die Proliferation CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit hoher TGFβ1-Konzentrationen. CFSE-gefärbte wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen wurden mit CD3-Ak (3 µg/ml) oder CD3+CD28-Ak (3 und 5 µg/ml) in Ab- oder Anwesenheit von TGFβ1 (50 ng/ml) stimuliert. Nach 72 h wurde der Zellzyklusverlauf der CD4⁺ T-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Zahlen in den jeweiligen Histogrammen geben die Anzahl der durchlaufenen Zellzyklen an.

Auffällig war, dass nur 75% der wt CD4⁺ T-Zellen 1-3 Zellzyklen durchliefen und somit etwas stärker als PKBtg Zellen inhibiert wurden. Dies zeigt, dass erhöhte PKB-

Signale bei alleiniger CD3-Ak-Stimulation die Proliferation CD4⁺ T-Zellen auch in Anwesenheit hoher TGFβ1-Konzentrationen ermöglichen bzw. fördern. In weiteren Experimenten wurde daher eine TGFβ1-Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt.

3.1.4 Einfluss von TGFβ1- und PKB-Signalen auf den Phänotyp aktivierter T-Zellen

Die vorherigen Daten zeigten, dass bei alleiniger CD3-Ak-Stimulation TGFβ1 die Proliferation von wt und CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen drastisch hemmte. Dagegen ermöglichten erhöhte PKB-Signale in beiden Zelltypen eine starke Proliferation in Anwesenheit von TGFβ1. Es wurde daher untersucht, welche Auswirkungen TGFβ1- und PKB-Signale auf die Zellgröße und verschiedene Aktivierungsmarker der aktivierten CD4⁺ T-Zellen haben.

TGFβ1 führte in CD3-Ak-stimulierten wt T-Zellen am Tag 3 zu einer starken Abnahme der Zellgröße (FSC = *forward scatter*) (Abb. 14) bzw. erlaubte eine nur begrenzte Zunahme der Zellgröße. Dies erfolgte in deutlich geringerem Maße bei Stimulation mit CD3+CD28-Ak plus TGFβ1. Bemerkenswerterweise zeigten PKBtg im Vergleich zu wt T-Zellen eine deutlich geringere Abnahme der Zellgröße bei CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation. Unter kostimulatorischen Bedingungen (CD3+CD28-Ak) in Anwesenheit von TGFβ1 war die Zellgröße von wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen vergleichbar, jedoch gegenüber alleiniger CD3+CD28-Ak-Stimulation ebenfalls deutlich verringert. Auffällig war, dass CD3-Ak+TGFβ1-stimulierte PKBtg Zellen eine ähnliche Zellgröße aufwiesen wie wt Zellen nach CD3+CD28-Ak+TGFβ1-Stimulation. Da im zeitlichen Verlauf der T-Zellaktivierung verschiedene Antigene auf der Zelloberfläche exprimiert werden, die Aufschluss über den Aktivierungsstatus der Zellen geben, wurde zugleich die Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD98, CD69, CD62L und Ox40 auf wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen in Ab- und Anwesenheit von TGFβ1 untersucht.

TCR/CD28-Ligation führt zur Sekretion von IL-2 und Expression des IL-2R. Dieser besteht aus den α-, β- und γ_c-Untereinheiten, wobei die β- und γ_c-Ketten (CD122 bzw. CD132) konstitutiv auf der Zelloberfläche naiver T-Zellen exprimiert werden. Die Expression der IL-2-Rα-Kette (CD25) wird dagegen erst nach Aktivierung der T-Zelle

induziert. Zusammen bilden die drei Untereinheiten den hochaffinen IL-2-R, der nach IL-2-Bindung eine komplexe Signalkaskade auslöst und die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen fördert.

Das Glykoprotein CD98 (4F2hc) wird auf aktivierten Lymphozyten verstärkt exprimiert und bildet heterodimere Komplexe mit Aminosäuretransportern (Mastroberardino et al., 1998), die Proteinsynthese und Metabolismus fördern. T-Zellaktivierung führt zudem innerhalb weniger Stunden zur Expression von CD69, das für die T-Zellproliferation benötigt wird (Sancho et al., 2005).

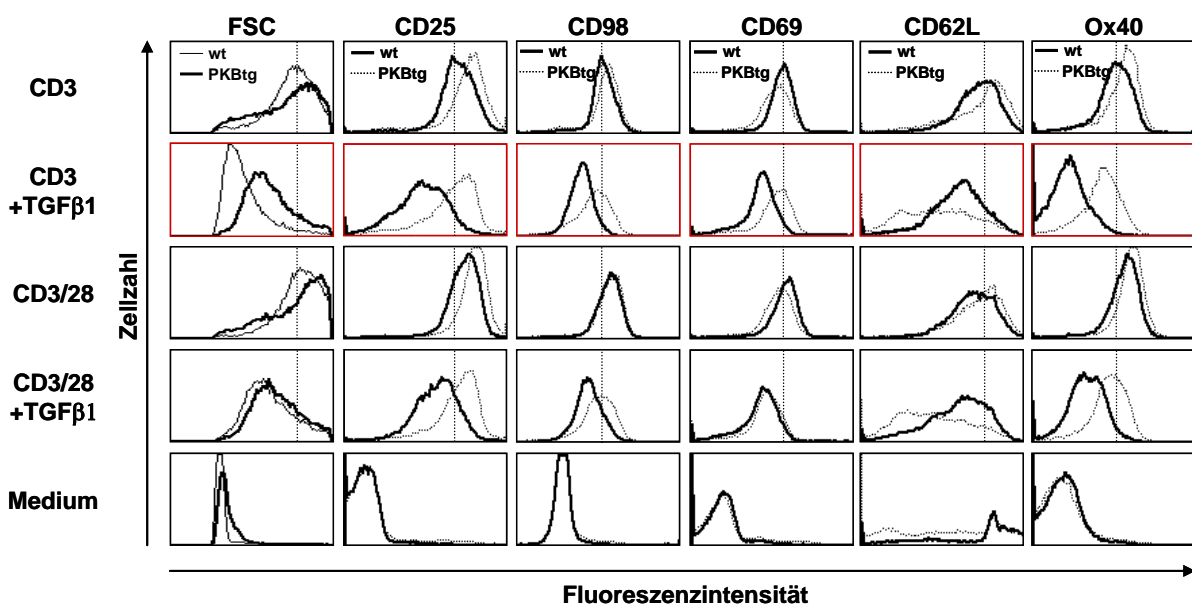


Abb. 14: Zellgröße und Expression verschiedener Oberflächenmarker auf aktivierten wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von TGFβ1. CD4⁺ T-Zellen von wt und PKBtg Mäusen wurden nicht (Medium) oder mit CD3-Ak (3 µg/ml) bzw. CD3+CD28-Ak (3 und 5 µg/ml) in Ab- oder Anwesenheit von TGFβ1 (10 ng/ml) stimuliert. Nach 3 Tagen wurde die Zellgröße (FSC) der jeweiligen CD4⁺ T-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Expressionsanalyse der angegebenen Oberflächenmarker erfolgte am Tag 2 der Kultur ebenfalls mittels Durchflußzytometrie (Abb. verändert nach Pierau et al., 2009).

Die Expression der Aktivierungsmarker wurde am Tag 1, 2 und 3 bestimmt. Da die Unterschiede in der Expressionsstärke der analysierten Marker zwischen wt und PKBtg am Tag 2 am deutlichsten waren, sind diese gezeigt.

Nach 2-tägiger Kultur führte TGFβ1 zu einer deutlich verringerten Expression von CD25, CD98 und CD69 auf CD3-Ak-stimulierten wt CD4⁺ T-Zellen, während PKBtg CD4⁺ Zellen hinsichtlich der Expression dieser Aktivierungsmarker weniger bis gar

nicht durch TGF β 1 beeinflusst wurden. Somit mindert TGF β 1 bei alleiniger CD3-Ak-Stimulation die Zellgröße sowie die CD25-, CD69- und CD98-Expression, ein Hinweis auf eine verringerte IL-2-Produktion und einen niedrigeren Metabolismus, was zur Proliferationsinhibition der wt CD4⁺ T-Zellen beiträgt. Erhöhte PKB-Signale heben dagegen die inhibitorischen TGF β 1-Signale auf bzw. „umgehen“ sie, so dass die T-Zellaktivierung optimal ablaufen kann.

CD28-kostimierte wt und PKBtg T-Zellen zeigten eine vergleichbare CD25-, CD69- und CD98-Expression, die im Vergleich zur CD3-Ak-Stimulation leicht erhöht war. Auch bei CD3+CD28-Ak-Stimulation führte TGF β 1 zu einer verminderten Expression von CD25, CD69 und CD98 auf wt und PKBtg Zellen. Die Expressionsstärke lag aber auch hier deutlich über der Expressionsstärke nach CD3-Ak+TGF β 1-Behandlung.

Das Glykoprotein CD62L spielt eine wichtige Rolle bei der Migration und dem *homing* von T-Lymphozyten in die Lymphknoten und Peyer`sche-Plaques (Ley and Kansas, 2004). CD62L ist ein weiterer Aktivierungsmarker, da nach T-Zellaktivierung CD62L verstärkt proteolytisch von der Zelloberfläche gespalten wird (*shedding*). Nach 2-tägiger CD3-Ak sowie CD3+CD28-Ak Stimulation wurde in TGF β 1-behandelten wt T-Zellen eine reduzierte CD62L-Expression detektiert. In PKBtg Zellen wurde durch TGF β 1 ein stärkeres CD62L-*shedding* induziert, da ein Großteil der Zellen CD62L-negativ war.

Das zur Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie gehörende kostimulatorische Molekül Ox40 wird 24-72 h nach Aktivierung der T-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert (Ishii et al., 2010). Wie aus Abb. 14 hervorgeht, wurde bei CD3-Ak+TGF β 1-Stimulation Ox40 auf wt CD4⁺ T-Zellen kaum, jedoch stark auf PKBtg T-Zellen exprimiert. Bei Aktivierung der wt T-Zellen mit CD3+CD28-Ak war in Anwesenheit von TGF β 1 die Expression von Ox40 schwach vorhanden und deutlich geringer als auf PKBtg CD4⁺ T-Zellen.

Zusammenfassend zeigen diese Analysen, dass erhöhte PKB-Signale die durch TGF β 1 vermittelte Hemmung der T-Zellaktivierung, die sich in einer Reduktion der Zellgröße, der CD98-, CD25-, CD69- und Ox40-Expression widerspiegelt, aufheben. CD28-Kostimulation ermöglichte die Expression der untersuchten Aktivierungsmarker auch in CD3-Ak+TGF β 1-aktivierten wt CD4⁺ T-Zellen, allerdings auf einem niedrigeren Niveau als in Abwesenheit von TGF β 1 (CD3+CD28-Ak). Bemerkenswerterweise hatten PKBtg CD4⁺ T-Zellen auch unter kostimulatorischen Stimulationsbedingungen und TGF β 1-Gabe eine höhere CD25-, CD98- und Ox40-

Expression, was auf eine verstärkte Aktivierung hinweist. Auffallend war, dass PKBtg T-Zellen bei TGF β 1-Gabe eine starke Abnahme der CD62L-Expression aufwiesen. PKBtg CD4⁺ T-Zellen reagierten daher auf inhibitorische TGF β 1-Effekte bei alleiniger TCR-Stimulation weniger sensitiv und wiesen den Phänotyp von CD3+CD28-Ak+TGF β 1-stimulierten wt Zellen auf.

Da PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD28^{-/-} T-Zellen verstärkt auf TCR-Signale reagierten und sogar in Anwesenheit von TGF β 1 proliferierten (Abb. 11 und Abb. 12), wurde auch für diese Zelltypen der Aktivierungsstatus in Ab- und Anwesenheit von TGF β 1 bestimmt (Abb. 15).

Bei alleiniger CD3-Ak-Stimulation zeigten CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen keine gravierenden Unterschiede in der Expression von CD25, CD98, CD69 und CD62L (Abb. 15), PKBtg CD28^{-/-} Zellen wiesen jedoch eine höhere Ox40-Expression auf. Dabei ist zu erwähnen, dass die Expression dieser Oberflächenantigene auf CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen mit der von wt Zellen vergleichbar war.

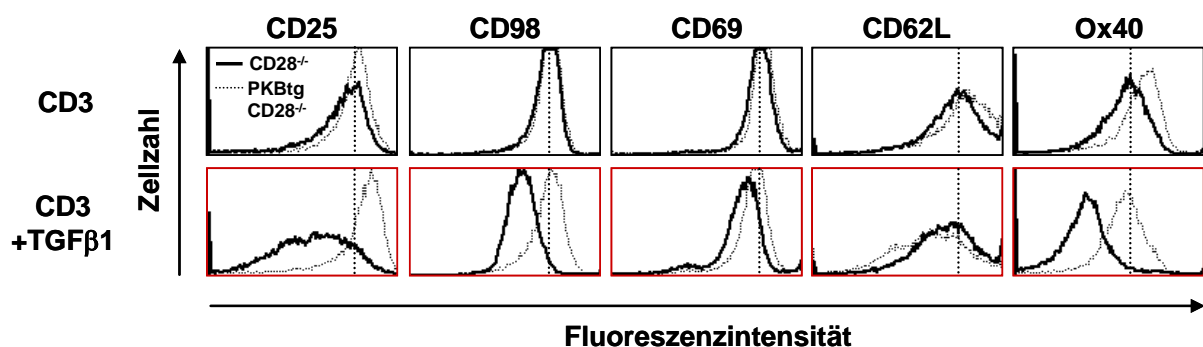


Abb. 15: Expression der angegebenen Oberflächenantigene auf CD3-Ak-stimulierten CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von TGF β 1. CD4⁺ T-Zellen von CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäusen wurden mit CD3-Ak (3 μ g/ml) in Ab- oder Anwesenheit von TGF β 1 (10 ng/ml) stimuliert. Die Expression der angegebenen Oberflächenantigene wurde am Tag 2 der Kultur durch FACS-Analyse ermittelt.

TGF β 1 führte in den stimulierten CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen, wie zuvor in wt T-Zellen, zu einer deutlich geringeren Expression der Oberflächenmarker, abgesehen von CD62L. In PKBtg CD28^{-/-} Zellen hatte TGF β 1 dagegen keine oder nur leichte inhibitorische Effekte. Somit mindern erhöhte PKB-Signale auch in CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen die aktivierungshemmenden Effekte von TGF β 1 und ermöglichen die mit der

Aktivierung von T-Zellen einhergehende optimale Expression verschiedener Antigene.

3.1.5 Exogenes IL-2 ermöglicht die Proliferation CD3-Ak+ TGFβ1-stimulierter CD4⁺ T-Zellen

Da die Proliferation und CD25-Expression von wt CD4⁺ T-Zellen bei CD3-Ak-Stimulation in Gegenwart von TGFβ1 gehemmt wurde - im Gegensatz zu PKBtg T-Zellen - sollte geklärt werden, ob die Zugabe von exogenem rekombinanten IL-2 den inhibitorischen Effekt von TGFβ1 auf wt Zellen aufhebt (Abb. 16).

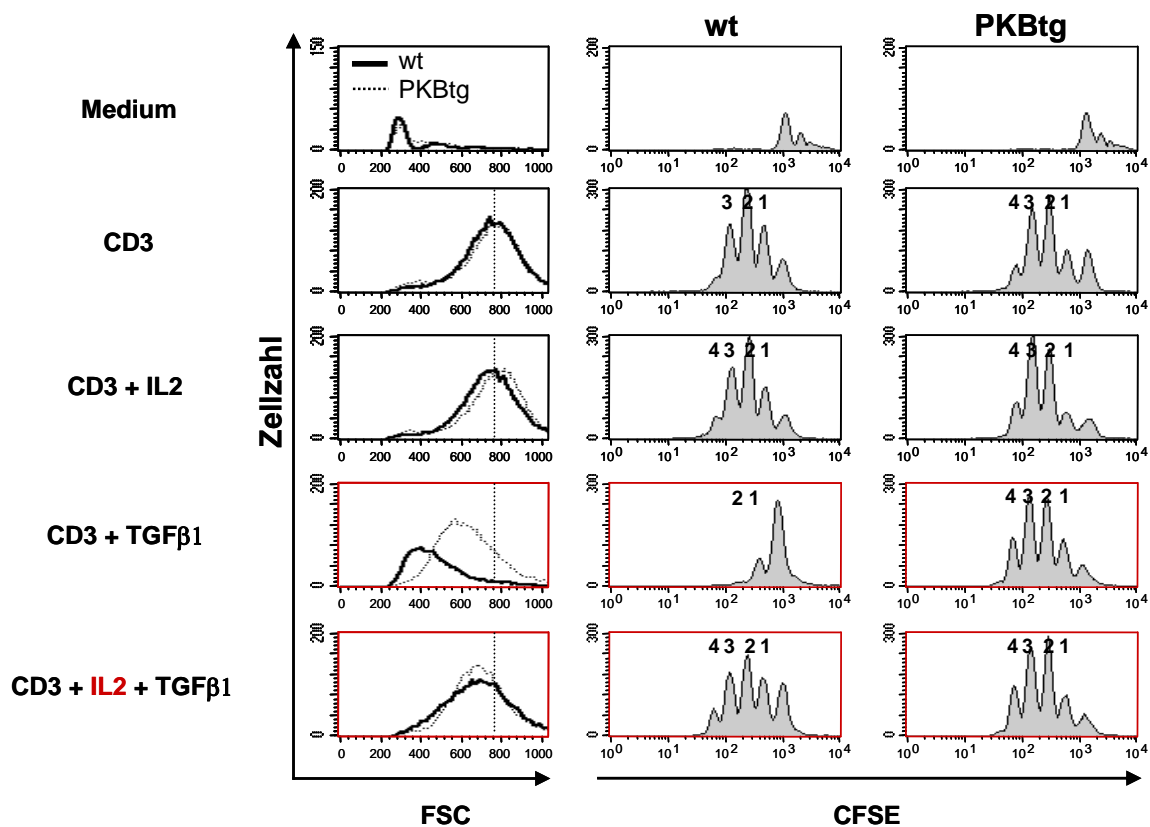


Abb. 16: Zellteilung CD3-Ak-stimulierter CD4⁺ T-Zellen in Ab- oder Anwesenheit von TGFβ1 und IL-2. CFSE-gefärbte wt und PKBtg CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden nicht (Medium) oder mit CD3-Ak (3 µg/ml) in Ab- oder Anwesenheit von TGFβ1 (10 ng/ml) und/oder IL-2 (20 ng/ml) stimuliert. Nach 72 h wurde die Zellgröße (FSC) und der Zellzyklusverlauf (CFSE-Abnahme) der CD4⁺ T-Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Zahlen in den jeweiligen Histogrammen geben die Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen an.

Bezüglich der Zellgröße (FSC) wurde deutlich, dass exogenes IL-2 die Reduktion der Zellgröße von PKBtg und insbesondere wt CD4⁺ T-Zellen bei TGFβ1-Gabe aufhob. Obwohl die Zellgröße der wt T-Zellen durch TGFβ1 drastischer reduziert war als die der PKBtg T-Zellen, zeigten beide Zelltypen nach IL-2-Zusatz gleiche Zellgröße, dennoch war diese leicht geringer als bei CD3-Ak-Stimulation in Abwesenheit von TGFβ1. Auch der Zellzyklusverlauf wurde durch IL-2 positiv beeinflusst. Die Proliferation der wt CD4⁺ T-Zellen wurde durch TGFβ1 gehemmt, im Gegensatz zu PKBtg CD4⁺ T-Zellen (Abb. 12). IL-2 hob diesen inhibitorischen Effekt auf, so dass wt T-Zellen fast so gut wie PKBtg T-Zellen proliferierten, d.h. beide Zelltypen durchliefen bis zu 4 Zellzyklen. Dies zeigt, dass bei alleiniger CD3-Stimulation durch TGFβ1 u.a. die IL-2-Produktion oder die IL-2-R-Signalgebung gehemmt wird und erhöhte PKB-Signale diese Defizite aufheben bzw. ersetzen.

3.1.6 TGFβ1 hemmt die Proliferation „voraktivierter“ CD4⁺ T-Zellen

Da IL-2 die Proliferation von T-Lymphozyten anregt und rekombinantes IL-2 den inhibitorischen Effekt von TGFβ1 auf die Proliferation CD3-Ak-stimulierter wt CD4⁺ T-Zellen aufhob, sollte geklärt werden, ob TGFβ1 auch Einfluss auf „voraktivierte“ T-Zellen hat. Daher wurden wt CD4⁺ T-Zellen mit CD3-Ak für 24 h (Abb. 17A) oder 48 h (Abb. 17B) stimuliert und TGFβ1 nicht (0 h), für den gesamten Zeitraum (24 h bzw. 48 h) oder für die jeweils letzten 6, 8 und 16 h (Abb. 17A) bzw. 24, 32 und 40 h (Abb. 17B) den CD4⁺ T-Zellen zugesetzt. Nach 24 h bzw. 48 h wurde jeweils die Proliferation durch ³[H]-Thymidineinbau bestimmt.

Aus Abb. 17 geht hervor, je früher TGFβ1 zugesetzt wurde, desto stärker war die Hemmung der Proliferation der wt T-Zellen. Interessanterweise zeigten T-Zellen, die für 18 h mit CD3-Ak aktiviert worden waren und nur für die letzten 6 h mit TGFβ1 behandelt wurden, dennoch eine 50%ige Proliferationshemmung gegenüber T-Zellen, die kein TGFβ1 (0 h) erhalten hatten (Abb. 17A). Für 24 h aktivierte und dann für weitere 24 h mit TGFβ1 versetzte T-Zellen wiesen ebenfalls eine 60%ige Hemmung der Proliferation auf (Abb. 17B). Dabei hatten höhere TGFβ1-Konzentrationen keinen fördernden Einfluss auf die Hemmung, da 0,3 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml TGFβ1 die DNA-Synthese in gleichem Maße hemmten. Dies zeigt,

dass bei CD3-Ak-Stimulation TGF β 1 auch auf bereits „aktivierte“ T-Zellen hemmend wirkt, wenn auch weniger effektiv als auf naive T-Zellen, d.h. bei Beginn der TCR-Stimulation. Insbesondere die Inhibition durch späte TGF β 1-Zugabe für nur 6 h (Abb. 17A) bzw. 24 h (Abb. 17B) weist darauf hin, dass TGF β 1-induzierte Inhibition nicht nur auf mangelnde IL-2-Produktion zurückzuführen zu sein scheint, sondern weitere inhibierend wirkende Mechanismen eine wichtige Rolle spielen müssen, die durch aktive PKB oder CD28-Signale auf noch ungeklärte Weise aufgehoben werden.

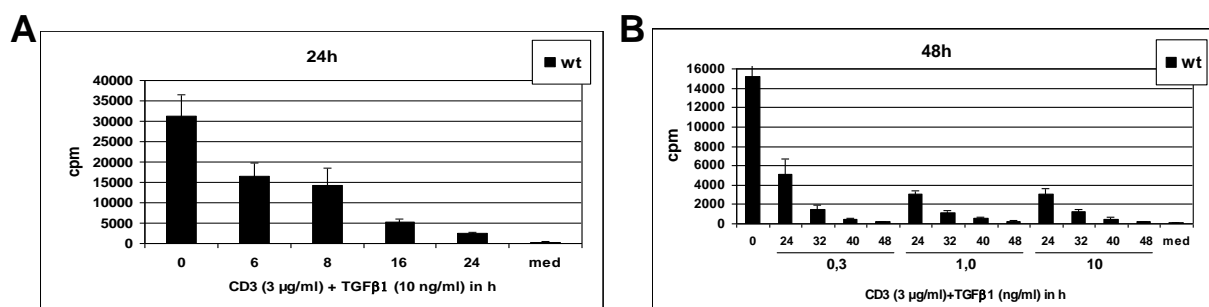


Abb. 17: Proliferation von wt CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit der Einwirkdauer von TGF β 1. CD4⁺ T-Zellen von wt Mäusen wurden mit CD3-Ak (3 μ g/ml) allein (0 h) oder in Anwesenheit von TGF β 1 (0,3-10 ng/ml) stimuliert. TGF β 1 wurde für die letzten 6, 8, 16 h oder für 24 h zugesetzt (A) oder für die letzten 24, 32, 40 h bzw. für 48 h (B). Die Proliferation der T-Zellen wurde nach 24 h (A) und 48 h (B) mittels ³[H]-Thymidineinbau gemessen. Kontroll-CD4⁺ T-Zellen (med) blieben für 24 oder 48 h ohne CD3-Ak- und TGF β 1-Stimulus.

3.2 Einfluss von PKB auf TGF β 1-induzierte Differenzierung zu iTreg

3.2.1 Erhöhte PKB-Signale fördern die Foxp3-Expression und iTreg-Entwicklung von wt und CD28^{-/-} CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

Treg unterdrücken die Aktivierung verschiedener Immunzellen und sind somit bei der Regulation der Selbsttoleranz und Homöostase des Immunsystems entscheidend beteiligt. In peripheren naiven CD4⁺ T-Zellen wird bei TCR- plus CD28-Stimulation in Gegenwart von TGF β 1 der Transkriptionsfaktor Foxp3 induziert und die T-Zellen differenzieren zu CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTreg.

Da PKBtg CD4⁺ T-Zellen bei Stimulation mit CD3-Ak plus TGFβ1 proliferierten und eine verstärkte CD25-Expression aufwiesen - ganz im Gegensatz zu wt T-Zellen - sollte geklärt werden, ob erhöhte PKB-Signale Einfluss auf die iTreg-Differenzierung nehmen. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, ob PKBtg und v.a. PKBtg CD28^{-/-} T-Zellen bei alleiniger Stimulation mit CD3-Ak, d.h. ohne ein CD28-kostimulatorisches Signal, unter TGFβ1-Gabe zu CD4⁺CD25⁺ iTreg differenzieren können. Wt, PKBtg, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden daher mit CD3-Ak allein oder CD3+CD28-Ak in Anwesenheit von TGFβ1 stimuliert. Nach 3 Tagen wurde die Expression von CD25 und Foxp3 in den vier Versuchsansätzen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse zur iTreg-Induktion von wt und PKBtg T-Zellen wurden in der Doktorarbeit von Swen Engelmann aus unserer Arbeitsgruppe weitgehend etabliert und gemeinsam veröffentlicht (Pierau et al., 2009). Für meine weiterführenden Analysen sind zum Verständnis die wt und PKBtg Daten mit aufgeführt.

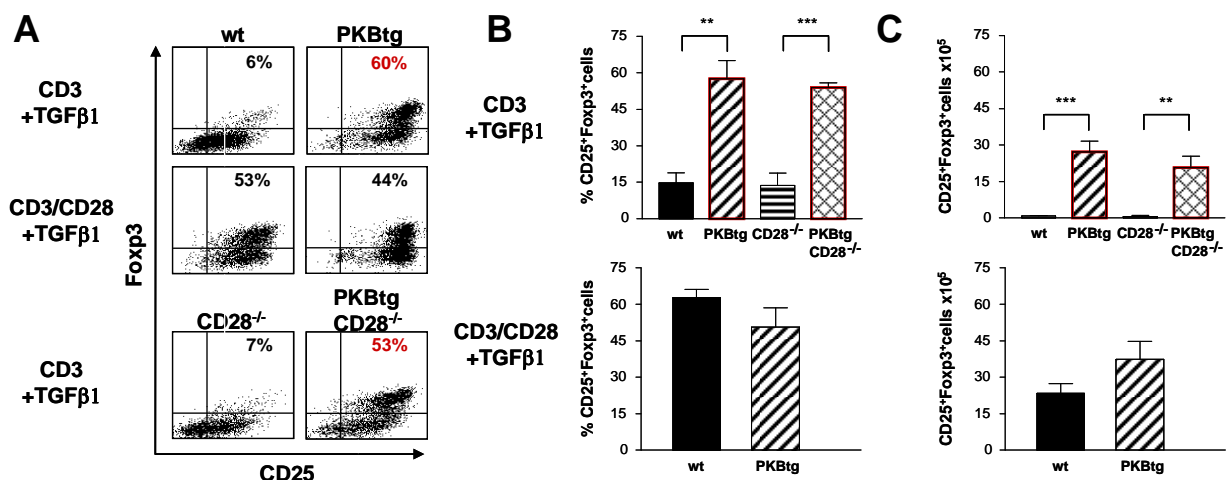


Abb. 18: Differenzierung von wt, PKBtg, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu Foxp3⁺CD25⁺ iTreg. Isolierte wt, PKBtg, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺CD25⁻ Zellen wurden mit CD3-Ak (3 µg/ml) oder CD3+CD28-Ak (3 und 5 µg/ml) in Kombination mit TGFβ1 (10 ng/ml) für 72 h stimuliert. Der prozentuale Anteil (A, B) und die Zellzahl (C) von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in den induzierten Zellpopulationen wurde durch FACS-Analyse ermittelt. In A ist die FACS-Analyse eines Experimentes dargestellt. B und C zeigen die Resultate von 4 unabhängigen Experimenten; ** p<0,01 und *** p<0,001 (Abb. nach Pierau et al., 2009).

Wie in Abb. 18B gezeigt, differenzierten bei CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation etwa 12% der wt Zellen zu CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen, während in der PKBtg Zellkultur bis 60% der Zellen CD25⁺Foxp3⁺ waren (Abb. 18A, B). Bei Stimulation mit CD3+CD28-Ak plus

TGF β 1 war der Anteil der Foxp3⁺ Zellen in den PKBtg Kulturen im Vergleich zu wt Kulturen leicht, aber nicht signifikant reduziert (Abb. 18A, B) und lag in beiden Zelltypen bei ca. 50-60%. Die Zellzahl der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen war in CD3-Ak+TGF β 1-stimulierten PKBtg Kulturen im Vergleich zu wt Kulturen drastisch um das 27-fache erhöht (Abb. 18C). Bei Stimulation mit CD3+CD28-Ak plus TGF β 1 war die Zellzahl induzierter iTreg in wt und PKBtg Kulturen dagegen vergleichbar. Erhöhte PKB-Signale fördern somit die Differenzierung naiver peripherer T-Zellen zu iTreg nach alleiniger TCR/CD3-Stimulation in Anwesenheit von TGF β 1 und können somit benötigte CD28-Signale ersetzen.

Da PKB-Signale CD28-Kostimulation hinsichtlich der Proliferation bei CD3-Ak+TGF β 1-Stimulation ersetzen (Abb. 11 und 12), wurde weiterführend untersucht, ob die Beobachtungen zur iTreg-Differenzierung in wt und PKBtg Zellen auch für CD28^{-/-} bzw. PKBtg CD28^{-/-} Zellen zutreffen (Abb. 18). Bei CD3-Ak+TGF β 1-Stimulation exprimierten nur etwa 10% der CD28^{-/-} Zellen die Treg-Marker CD25 und Foxp3, während rund 50% der PKBtg CD28^{-/-} Zellen dafür positiv waren (Abb. 18A, B). Die Zellzahl der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen war in CD3-Ak+TGF β 1-stimulierten PKBtg CD28^{-/-} Kulturen im Vergleich zu CD28^{-/-} Kulturen drastisch um das 20-fache erhöht (Abb. 18C). Die Ergebnisse zur Differenzierung von CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} T-Zellen zu Foxp3⁺CD25⁺ iTreg entsprechen daher denen von wt und PKBtg Zellen und zeigen eindeutig, dass erhöhte PKB-Signale CD28-Kostimulation bei der iTreg-Differenzierung voll ersetzen.

3.2.2 Verstärkte PKB-Signale fördern die Interleukinbildung in CD4⁺ T-Zellen unter iTreg-induzierenden Bedingungen

Abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu und den Stimulationsbedingungen differenzieren naive CD4⁺ Th-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen, iTreg oder proinflammatorische Th17-Zellen. IL-12 und IFN- γ induzieren eine Th1-, IL-4 eine Th2-Immunantwort und TGF β 1 dirigiert die Differenzierung zu iTreg oder Th17-Zellen. Th1-Zellen produzieren hauptsächlich IL-2 und IFN- γ , Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die antiinflammatorisch wirken. Treg sezernieren die proliferationshemmenden Zytokine IL-10 und IL-35. Th17-Zellen bilden neben IL-17 zusätzlich IL-22 und IL-21, das auch von aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird.

Da PKBtg im Gegensatz zu wt $CD4^+$ T-Zellen bei $CD3$ -Ak+ $TGF\beta 1$ -Stimulation proliferierten und zu iTreg differenzierten, stellte sich die Frage, inwieweit erhöhte PKB-Signale unter diesen Stimulationsbedingungen die Zytokinproduktion beeinflussen. Daher wurden $CD4^+$ T-Zellen von wt und PKBtg Mäusen mit $CD3$ -Ak bzw. $CD3+CD28$ -Ak in Anwesenheit von $TGF\beta 1$ kultiviert. Nach drei Tagen wurden die induzierten Zellpopulationen für 4 h mit PMA/Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert (siehe 2.2.10) und sodann die intrazelluläre Produktion verschiedener Zytokine mittels Durchflußzytometrie bestimmt (Abb. 19).

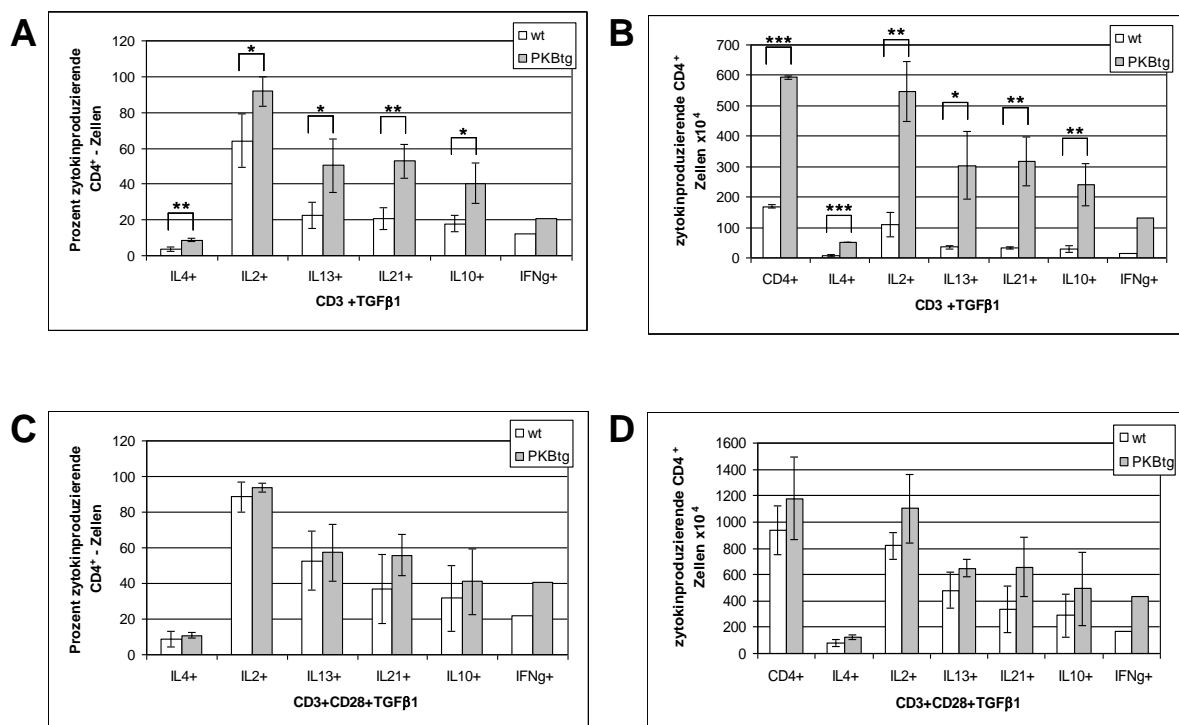


Abb. 19: Einfluss erhöhter PKB-Signale auf die Zytokinproduktion von $CD4^+$ T-Zellen, die unter iTreg-induzierenden Konditionen kultiviert wurden. $CD4^+CD25^-$ T-Zellen von wt und PKBtg Mäusen wurden mit $CD3$ -Ak (3 μ g/ml) (A, B) oder $CD3+CD28$ -Ak (3 und 5 μ g/ml) (C, D) in Anwesenheit von $TGF\beta 1$ (10 ng/ml) stimuliert und nach 3 Tagen für 4 h mit PMA/Ionomycin (100 und 800 ng/ml) in Anwesenheit von Brefeldin A (2 μ g/ml) restimuliert. Der prozentuale Anteil (A, C) und die Zellzahl (B, D) der zytokinproduzierenden $CD4^+$ T-Zellen in den Kulturen wurden durch intrazelluläre FACS-Analyse ermittelt. Dargestellt sind die Resultate von 3 unabhängigen Experimenten, die Messung für IFN- γ wurde nur einmal durchgeführt; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Unter $CD3$ -Ak+ $TGF\beta 1$ -Stimulationsbedingungen wiesen die PKBtg T-Zellkulturen prozentual etwa doppelt so viele IL-4-, IL-13-, IL-21- und IL-10- produzierende $CD4^+$

T-Zellen auf wie die wt Zellkulturen (Abb. 19A). Der prozentuale Anteil IL-2-produzierender PKBtg CD4⁺ T-Zellen war 1,4-fach erhöht. Die IFN- γ -Produktion wurde nur in einem Experiment bestimmt, zeigte aber in den PKBtg Kulturen ebenfalls etwa doppelt so viele IFN- γ produzierende Zellen. Auch die Zellzahl zytokinproduzierender CD4⁺ T-Zellen war in den PKBtg Zellkulturen im Vergleich zu den wt Kulturen signifikant erhöht (Abb. 19B). Die Zellzahl IFN- γ -, IL-4-, IL-13-, IL-21- und IL-10-produzierender PKBtg CD4⁺ T-Zellen war 8-10-fach und die Zellzahl IL-2-produzierender CD4⁺ T-Zellen 5-mal höher als in den wt Zellkulturen. Die höhere Anzahl zytokinproduzierender Zellen nach CD3-Ak+TGF β 1-Stimulation in PKBtg Zellkulturen lässt sich dadurch erklären, dass aktive PKB die proliferationshemmenden Eigenschaften von TGF β 1 aufhebt und die Expansion der sich differenzierenden Zellen erlaubt. Die Daten zeigen ferner, dass erhöhte PKB-Signale bei Stimulation mit CD3-Ak+TGF β 1 sowohl die Th1- als auch Th2- Zytokinproduktion und bezüglich IL-21 auch die Zytokinproduktion von Th17-Zellen fördern.

Aktivierung mit CD3+CD28-Ak in Gegenwart von TGF β 1 führte zur vergleichbaren Proliferation von wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen (siehe Abb. 11B und 12) und dementsprechend zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Prozentsatz (Abb. 19C) und in der Zellzahl (Abb. 19B) zytokinproduzierender CD4⁺ T-Zellen zwischen wt und PKBtg Zellkulturen.

3.2.3 Erhöhte PKB-Signale fördern die Ausbildung zytokinproduzierender iTreg bei CD3-Ak+TGF β 1-Stimulation

Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss erhöhte PKB-Signale auf die Zytokinproduktion der iTreg haben. Wt und PKBtg CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Foxp3-GFP Mäusen wurden mit CD3-Ak allein (Abb. 20A und B) bzw. CD3+CD28-Ak (Abb. 20C und D) in Anwesenheit von TGF β 1 stimuliert. Nach 3 Tagen wurden beide Zellkulturen für 4 h mit PMA/Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert und sodann die Foxp3⁺GFP⁺ T-Zellen hinsichtlich der angegebenen Zytokinproduktion analysiert.

Bei Stimulation mit TGF β 1 und CD3-Ak allein war in der PKBtg Zellkultur der prozentuale Anteil zytokinproduzierender Foxp3⁺ iTreg hinsichtlich aller Zytokine 2-fach höher als in den wt Kulturen (Abb. 20A). Dabei war der Prozentsatz für IL-21-

und IL-10-produzierende PKBtg iTreg signifikant erhöht. Die Zellzahlen IL-4-, IL-13-, IL-21- und IL-10-produzierender PKBtg Foxp3⁺ iTreg war im Vergleich zu den entsprechenden zytokinproduzierenden wt iTreg um das 6-9-fache signifikant erhöht.

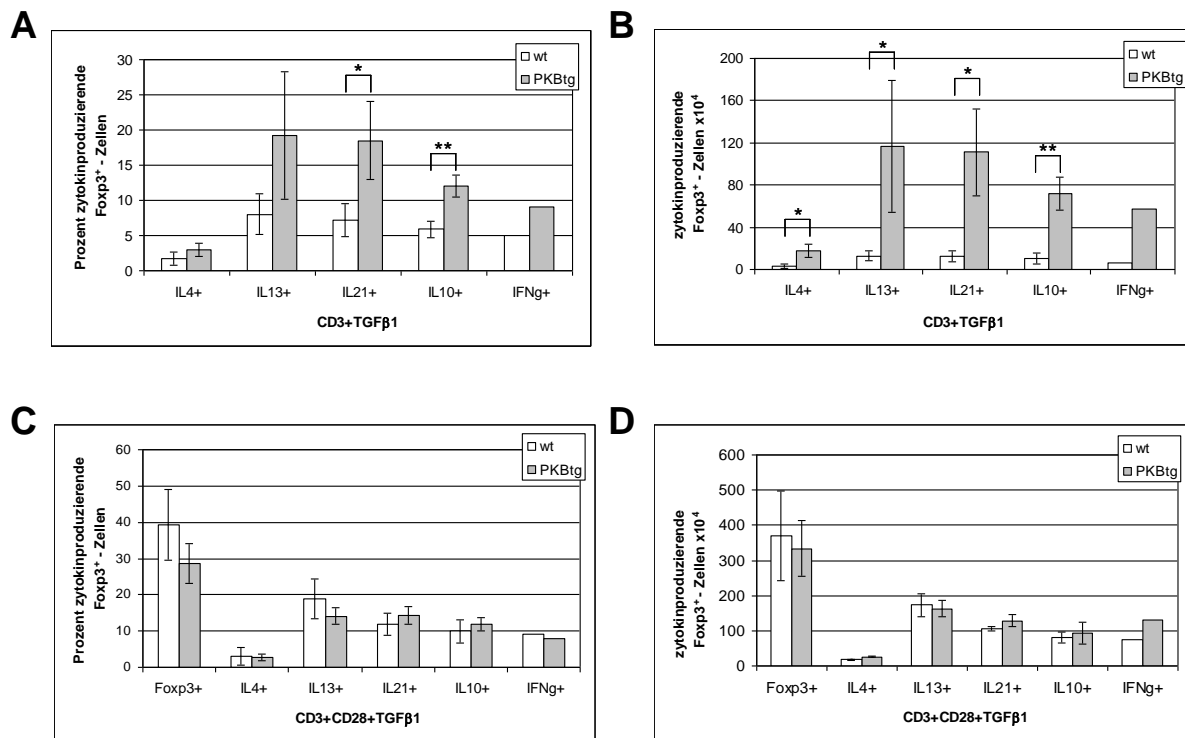


Abb. 20: Einfluss erhöhter PKB-Signale auf die Zytokinproduktion in iTreg. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von wt- und PKBtg-Foxp3-GFP Mäusen wurden mit CD3-Ak (3 µg/ml) (A, B) oder CD3+CD28-Ak (3 und 5 µg/ml) (C, D) in Anwesenheit von TGFβ1 (10 ng/ml) stimuliert und nach 3 Tagen für 4 h mit PMA/Ionomycin (100 und 800 ng/ml) in Anwesenheit von Brefeldin A (2 µg/ml) restimuliert. Der prozentuale Anteil (A, C) und die Zellzahl (B, D) der zytokinproduzierenden Foxp3⁺GFP⁺ iTreg in den jeweiligen Kulturen wurde durch FACS-Analyse ermittelt. Dargestellt sind die Resultate von 3 unabhängigen Experimenten, die Messung für IFN-γ wurde nur einmal durchgeführt; * p<0,05 und ** p<0,01.

Bei CD3+CD28-Ak-Stimulation in Gegenwart von TGFβ1 waren die Zellzahl und der prozentuale Anteil zytokinproduzierender iTreg in wt und PKBtg Zellkulturen vergleichbar. Interessanterweise zeigen die Daten, dass ein hoher Anteil der iTreg zwar IL-10 produzierte, daneben aber auch sehr viele IL-21-, IL-13- und IFN-γ-produzierende iTreg gebildet wurden, wohingegen IL-4-produzierende iTreg kaum vorlagen. Ferner wird deutlich, dass verstärkte PKB-Signale bei CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation die Differenzierung zytokinbildender iTreg „allgemein“ förderten und nicht die Bildung spezifischer Zytokine, vergleichbar zum Zytokinmuster bei Stimulation der wt Zellen mit CD3+CD28-Ak und TGFβ1.

3.2.4 Analyse der Proteinexpression bei Stimulation mit CD3-Ak und TGF β 1

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, durch die erhöhte PKB-Signale die iTreg-Differenzierung fördern, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Da die Transkriptionsfaktoren pSmad3, NFATc1 und pSTAT5 gemeinsam die Foxp3-Transkription regulieren und damit für die Bildung von iTreg notwendig sind (Tone et al., 2008), wurde zunächst die Expression und Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren untersucht.

Die Analysen zur Proteinexpression CD3-Ak+TGF β 1-stimulierter wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen zeigten hinsichtlich der nukleären (NE) und zytoplasmatischen (CE) Expression von pSmad2, pSmad3 und Smad4 erstaunlicherweise keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 21). Interessant ist jedoch, dass aktives pSmad3 nur in Gegenwart von TGF β 1 im Zytoplasma und v.a. im Zellkern vorgefunden wurde, wohingegen pSmad2 und Smad4 bereits durch CD3-Ak-Stimulation induziert und im Zytoplasma und Zellkern detektiert wurden.

CD3-Ak-Stimulation führte in wt T-Zellen zu einer starken nukleären NFATc1-Expression und vergleichsweise schwächeren NFATc1-Expression in PKBtg T-Zellen, wie bereits in früheren Publikationen gezeigt wurde (Patra et al., 2004). TGF β 1 reduzierte die Menge an nukleärem NFATc1 in wt T-Zellen drastisch, aber nur geringfügig in PKBtg Zellen. Dies weist darauf hin, dass für die iTreg-Induktion eine schwache nukleäre NFATc1-Expression ausreichend ist.

Zytoplasmatische und nukleäre pSTAT5-Expression wurden für CD3-Ak-aktivierte wt und PKBtg T-Zellen nachgewiesen. PKBtg T-Zellen zeigten allerdings im Nukleus eine signifikante und höhere pSTAT5-Expression in Anwesenheit von TGF β 1 als die entsprechenden wt T-Zellen.

Da die STAT5-Aktivierung in Gegenwart von TGF β 1 in PKBtg T-Zellen drastisch erhöht war, wurde auch der Einfluss erhöhter PKB-Signale auf andere STAT-Moleküle untersucht. Der Transkriptionsfaktor STAT1 spielt eine wichtige Rolle bei der Th1-Differenzierung. STAT3 reguliert viele zelluläre Prozesse, wie Zellwachstum und Apoptose und Aktivierung von STAT3 über IL-6 führt zur Th17-Differenzierung naiver T-Zellen.

Die Analysen zeigten, dass CD3-Ak-stimulierte wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen phosphoryliertes STAT1 und STAT3 im Zytoplasma und Zellkern exprimieren. TGFβ1 führte in PKBtg T-Zellen zum Zeitpunkt 40 h zu einer stärkeren Akkumulation von nukleärem pSTAT1 und pSTAT3 als in wt Zellen. Zudem war die Menge an zytoplasmatischem pSTAT1 und pSTAT3 nach TGFβ1-Gabe im Vergleich zu wt T-Zellen leicht erhöht. Somit fördern erhöhte PKB-Signale bei CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation nicht nur die STAT5-Aktivierung, sondern auch die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3.

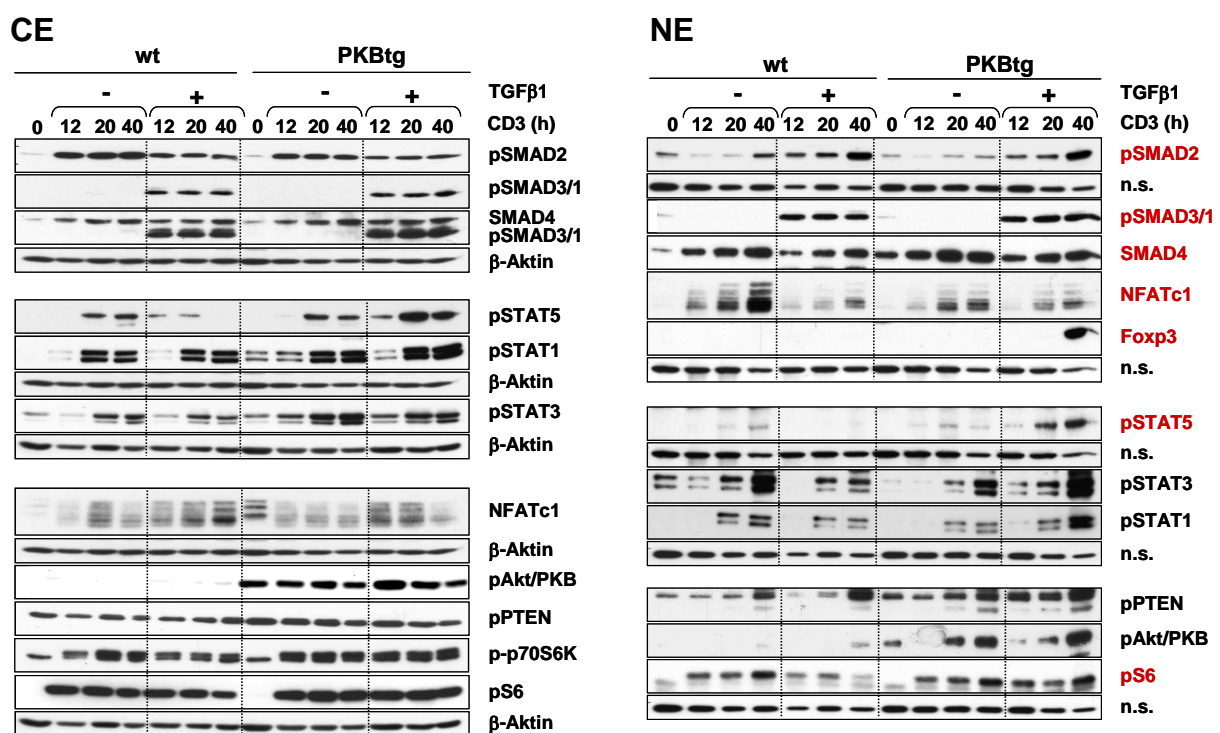


Abb. 21: Analyse zytoplasmatischer und nukleärer Proteine nach Stimulation naiver T-Zellen mit CD3-Ak und TGFβ1. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von wt und PKBtg Mäusen wurden mit CD3-Ak (3 µg/ml) in An- oder Abwesenheit von TGFβ1 (10 ng/ml) für 12, 20 und 40 h stimuliert. Zytoplasmatische (CE) und nukleäre (NE) Proteinlysate wurden im Western-Blot hinsichtlich der Expression/Aktivierung der angegebenen Signalmoleküle untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Expression von β-Aktin wurde in CE als Proteinladungskontrolle verwendet. n.s.: unspezifische Proteinladungskontrolle für NE.

Der für murine Treg spezifische Transkriptionsfaktor Foxp3 wurde bei CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation nur in PKBtg, nicht aber in wt T-Zellen exprimiert. Erhöhte PKB-Signale in Kombination mit CD3+TGFβ1-Signalen verstärken bzw. erhalten somit die Aktivierung von STAT5 im Zytoplasma und dessen Akkumulation im

Nukleus, so dass pSTAT5 zusammen mit pSmad3 und NFATc1 die Foxp3-Expression und damit die Entwicklung von iTreg ermöglichen können.

Wie zuvor gezeigt, differenzierten bei CD3-Ak+TGF β 1-Stimulation nur PKBtg CD4⁺ T-Zellen effizient zu iTreg (Abb. 18) und TGF β 1 führte zu einer geringeren Abnahme der Zellgröße PKBtg Zellen (Abb. 14). Es wurde daher untersucht, ob erhöhte PKB-Signale bei CD3-Ak+TGF β 1-Stimulation die Aktivierung von Proteinen, die den Zellmetabolismus regulieren, beeinflussen. Die Western-Blot Analysen ergaben (Abb. 21), dass CD3-Ak-aktivierte wt und PKBtg T-Zellen p-p70S6K im Zytoplasma und pS6 im Zytoplasma und Zellkern exprimierten. TGF β 1 führte zu einer reduzierten Expression beider phosphorylierter Proteine in wt Zellen, aber nicht in den PKBtg Zellen. Dies weist darauf hin, dass die durch TGF β 1-induzierte Reduktion der Zellgröße der wt Zellen mit verminderter Proteinbiosynthese einhergeht, wohingegen erhöhte PKB-Signale die Proteinsynthese in Anwesenheit von TGF β 1 aufrecht erhalten.

In PKBtg T-Zellen wurde zytoplasmatische und nukleäre tg pPKB nachgewiesen, wobei TGF β 1 keinen Einfluss auf die Aktivierung oder Expression der tg PKB nahm. Der Negativregulator des PI3K/PKB-Signalweges, PTEN, war in CD3-Ak-stimulierten wt und PKBtg Zellen etwa gleich stark phosphoryliert und TGF β 1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf pPTEN in wt und PKBtg T-Zellen. Interessanterweise wurde pPTEN auch im Nukleus vorgefunden und eine Zunahme von nukleärem pPTEN zu späteren Zeitpunkten (40 h) deutlich, was bisher nicht beschrieben wurde. Zusammenfassend zeigen die Analysen, dass in PKBtg CD4⁺ T-Zellen bei TCR- und TGF β 1-Stimulation die Proteinsynthese aufrecht erhalten wird und die für die iTreg-Differenzierung essentiellen Transkriptionsfaktoren, insbesondere pSTAT5, NFATc1, pSmad3 sowie Foxp3 hinreichend induziert werden.

3.2.5 Analyse der Proteinexpression bei Stimulation mit CD3+CD28-Ak und TGF β 1

Da erhöhte PKB-Signale die CD28-Kostimulation ersetzen und die Aktivierung und Expansion CD3-Ak-stimulierter CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von TGF β 1 ermöglichen, sollte auf biochemischer Ebene geklärt werden, welche CD28-vermittelten Signale wt CD4⁺ T-Zellen nur bei CD3+CD28-Ak+TGF β 1-Stimulation zu

iTreg differenzieren lassen. Dazu wurden wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen für 12, 20 und 40 h mit CD3+CD28-Ak in An- oder Abwesenheit von TGFβ1 stimuliert. Nach den entsprechenden Kulturzeiten wurden zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte aus den jeweiligen Zellpopulationen gewonnen und im Western-Blot verglichen.

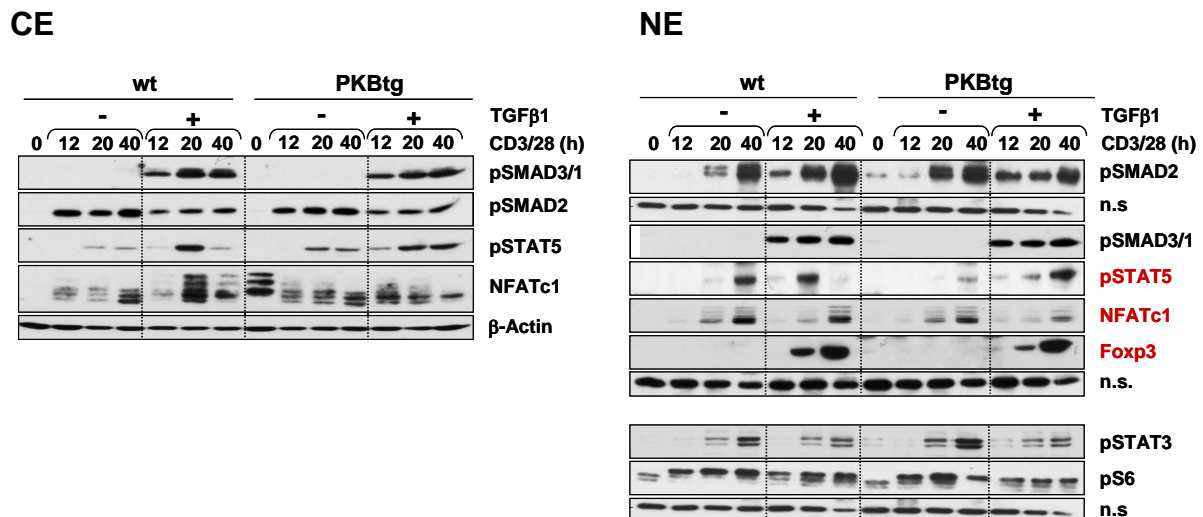


Abb. 22: Analyse zytoplasmatischer und nukleärer Proteinexpression unter iTreg-Differenzierung induzierenden Stimulationsbedingungen. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von wt und PKBtg Mäusen wurden mit CD3+CD28-Ak (3 und 5 µg/ml) in An- oder Abwesenheit von TGFβ1 (10 ng/ml) für 12, 20 und 40 h stimuliert. Zytoplasmatische (CE) und nukleäre (NE) Proteinlysate wurden im Western-Blot hinsichtlich der Expression/Aktivierung der angegebenen Signalmoleküle untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Expression von β-Aktin wurde in CE als Proteinladungskontrolle verwendet. n.s.: unspezifische Proteinladungskontrolle (Abb. verändert nach Pierau et al., 2009).

Zunächst wurde die Expression und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren untersucht, die für die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu iTreg erforderlich sind (Abb. 22). pSMAD3/1 wurde im Zytoplasma und Zellkern von wt und PKBtg Zellen bei CD3+CD28-Ak-Aktivierung nur nach TGFβ1-Gabe nachgewiesen. Dagegen wurde SMAD2 bereits bei CD3+CD28-Ak-Stimulation phosphoryliert und zytoplasmatisch und nukleär in wt und PKBtg Zellen detektiert. Dabei wurden keine Unterschiede in der Expression von pSMAD3/1 und pSMAD2 zwischen wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen festgestellt.

Zytoplasmatisches pSTAT5 wurde nach TGFβ1-Gabe in wt CD4⁺ T-Zellen nach 20 h deutlich detektiert, in PKBtg Zellen war eine starke STAT5-Aktivierung sogar bis 40 h erkennbar. Im Gegensatz zur vorherigen CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation (Abb. 21),

wurde bei CD3+CD28-Ak-Stimulation in Anwesenheit von TGF β 1 nukleäres pSTAT5 auch in wt Zellen vorgefunden. Ähnlich zu den zytoplasmatischen Proteinextrakten, war nukleäres pSTAT5 in wt Zellen nach 20 h und in PKBtg Zellen noch nach 40 h stark exprimiert.

Bei CD3+CD28-Ak-Stimulation wurde keine stärkere nukleäre NFATc1-Expression in wt T-Zellen im Vergleich zu PKBtg Zellen nachgewiesen. Im Gegensatz zur CD3-Ak-Stimulation (Abb. 21 (NE)), war die NFATc1-Expression in wt und PKBtg T-Zellen vergleichbar und TGF β 1 beeinflusste die Menge an nukleärem NFATc1 in wt und PKBtg T-Zellen nicht wesentlich.

Foxp3 wurde in CD3+CD28-Ak+TGF β 1-stimulierten wt und PKBtg Zellen nach 20 und 40 h nukleär in ähnlichen Mengen nachgewiesen. Auch nukleäres pSTAT3 und pS6 wurden nach CD3+CD28-Ak-Stimulation in Anwesenheit von TGF β 1 in wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen gleich stark exprimiert, wiederum im Gegensatz zur CD3-Ak+TGF β 1-Aktivierung (Abb. 21).

Diese Analysen zeigen insgesamt, dass CD3+CD28-Ak-Kostimulation bei TGF β 1-Gabe in wt CD4⁺ T-Zellen dazu führt, dass nicht nur nukleäres pSMAD3 und pSMAD2 vorliegen, sondern auch pSTAT5 und NFATc1 und nukleäre Foxp3-Expression erfolgt. Somit liegen die essentiellen Transkriptionsfaktoren, die die iTreg-Differenzierung steuern, in CD3+CD28-Ak-stimulierten wt Zellen nukleär vor. In PKBtg CD4⁺ T-Zellen (Abb. 21) ist hingegen das TCR/CD3-Signal in Kombination mit TGF β 1 ausreichend, um diese Transkriptionsfaktoren zu induzieren, d.h. erhöhte PKB-Signale ersetzen CD28-kostimulatorische Signale hinsichtlich der Aktivierung/Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren, v.a. von STAT5 und Foxp3.

3.2.6 Expression von Transkriptionsfaktoren in CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen bei iTreg-Differenzierung

CD28 wird konstitutiv auf naiven T-Zellen exprimiert und führt in Kombination mit TCR-Ligation zur optimalen T-Zellaktivierung und verstärkter Interleukinproduktion. Um zu klären, wie erhöhte PKB-Signale die für die iTreg-Bildung notwendigen CD28-kostimulatorische Signale ersetzen, wurden CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-

Zellen unter iTreg-induzierenden Stimulationsbedingungen für 12, 20 und 40 h kultiviert und die Proteinexpression im Western-Blot analysiert.

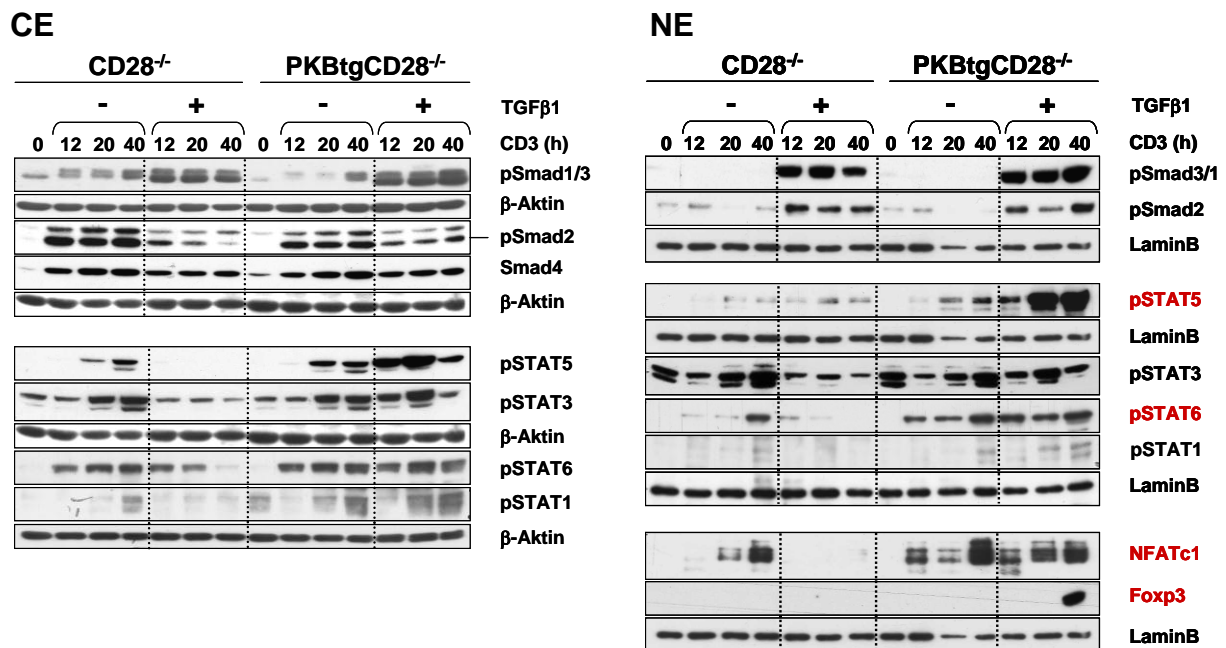


Abb. 23A: Zytoplasmatische und nukleäre Proteinexpression in $CD28^{-/-}$ und $PKBtg CD28^{-/-} CD4^{+}$ T-Zellen unter iTreg-induzierenden Kulturbedingungen. $CD4^{+}CD25^{-}$ T-Zellen von $CD28^{-/-}$ und $PKBtg CD28^{-/-}$ Mäusen wurden mit CD3-Ak (3 μ g/ml) in An- oder Abwesenheit von TGF β 1 (10 ng/ml) für 12, 20 und 40 h stimuliert. Zytoplasmatische (CE) und nukleäre (NE) Proteinextrakte wurden im Western-Blot hinsichtlich der Expression/Aktivierung der angegebenen Transkriptionsfaktoren untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2-3 unabhängige Experimente. Die Expression von β -Aktin (CE) sowie von Lamin B (NE) diente als Proteinladungskontrolle (Abb. verändert nach Pierau et al., 2009).

Die Aktivierung bzw. Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren SMAD3/1, SMAD2 und SMAD4 wurde in zytoplasmatischen Proteinextrakten von $CD28^{-/-}$ und $PKBtg CD28^{-/-} CD4^{+}$ T-Zellen nach CD3-Ak-Stimulation in Abwesenheit von TGF β 1 detektiert (Abb. 23A). TGF β 1 führte zu einer Zunahme von zytoplasmatischem pSMAD3/1 und einer Abnahme der pSMAD2- und SMAD4-Expression in $CD28^{-/-}$ und $PKBtg CD28^{-/-}$ Zellen. Im Nukleus wurde starke pSMAD3/1- und pSMAD2-Expression hingegen nur nach TGF β 1-Gabe detektiert, wobei die Expression beider Transkriptionsfaktoren in $PKBtg CD28^{-/-} CD4^{+}$ T-Zellen bei 40 h leicht erhöht war.

In $CD28^{-/-}$ T-Zellen führte TGF β 1, im Vergleich zur alleinigen CD3-Ak-Stimulation, zu einer starken Abnahme der Expression phosphorylierter zytoplasmatischer und nukleärer STAT-Faktoren. Bemerkenswert war jedoch, dass die zytoplasmatische

und nukleäre Expression von pSTAT5 und auch von pSTAT6, und in etwas geringerem Maße von pSTAT3 und pSTAT1, in PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen nach TGFβ1-Gabe im Vergleich zu CD28^{-/-} Zellen stark erhöht war (Abb. 23A).

Bedeutend ist ferner, dass NFATc1 und Foxp3, zwei weitere für die iTreg-Differenzierung benötigte Transkriptionsfaktoren, bei TGFβ1-Gabe nukleär nur in PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen, aber nicht in CD28^{-/-} Zellen, exprimiert wurden (Abb. 23A), so dass in PKBtg CD28^{-/-} Zellen eine iTreg-Differenzierung induziert werden kann.

In Abb. 23B wurden unter den obigen Stimulationsbedingungen wichtige Signalmoleküle des PI3K/PKB-Signalwegs, wie PDK1, TSC2, mTOR und S6, sowie die nukleäre Expression von cJun untersucht. cJun ist ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1, der eine wesentliche Rolle bei der T-Zellproliferation, Zytokinproduktion und Apoptose spielt. Auffällig war die sehr starke nukleäre cJun-Expression in PKBtg CD28^{-/-} Zellen in Gegenwart von TGFβ1, während TGFβ1 die cJun-Expression in CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen leicht reduzierte (Abb. 23B).

Aktiviert PDK1 ist neben mTORC2 an der Aktivierung der PKB beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zellproliferation und -Differenzierung. Es wurden jedoch keine Unterschiede in der Phosphorylierung von PDK1 in CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Zellen in Ab- oder Anwesenheit von TGFβ1 festgestellt.

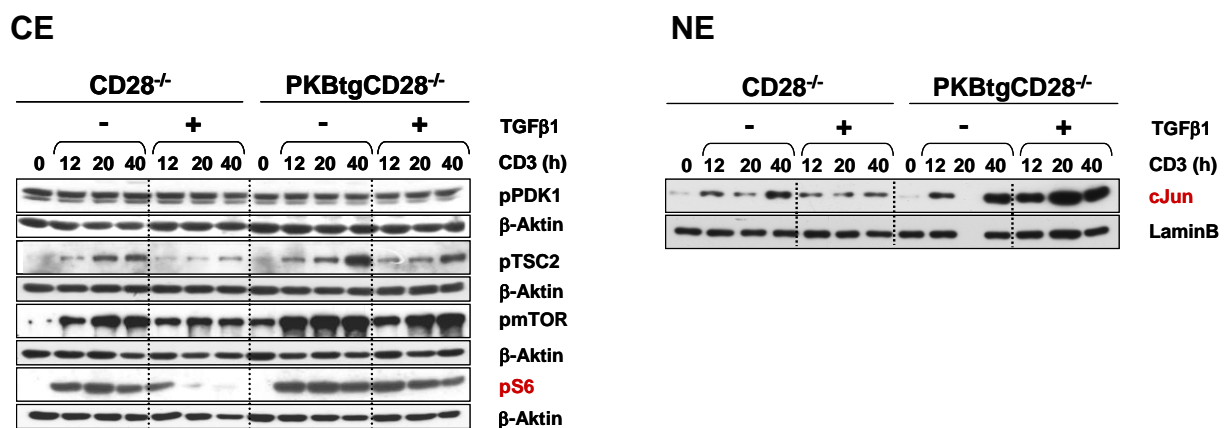


Abb. 23B: Zytoplasmatische und nukleäre Proteinexpression in CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen unter iTreg-induzierenden Kulturbedingungen. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäusen wurden mit CD3-Ak (3 µg/ml) in An- oder Abwesenheit von TGFβ1 (10 ng/ml) für 12, 20 und 40 h stimuliert. Zytoplasmatische (CE) und nukleäre (NE) Proteinextrakte wurden im Western-Blot hinsichtlich der Expression/Aktivierung der angegebenen Signalmoleküle untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2-3 unabhängige Experimente. Die Expression von β-Aktin (CE) sowie von Lamin B (NE) diente als Proteinladungskontrolle.

mTOR reguliert im Zusammenspiel mit PKB und TSC2 das Zellwachstum und Überleben von Zellen, wobei die PKB-vermittelte Inhibition von TSC2 (Manning et.al 2002) zur Aktivierung von mTORC1 und p70S6K führt. In CD3-Ak-stimulierten CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Zellen wurden pTSC2, pmTOR und ribosomales pS6-Protein in etwa gleichen Mengen exprimiert. Allerdings inhibierte TGFβ1 in CD28^{-/-} Zellen die Aktivierung dieser Proteine, insbesondere von S6 deutlich, während in PKBtg CD28^{-/-} Zellen TGFβ1 die Phosphorylierung dieser Proteine weniger beeinflusste. Erhöhte PKB-Signale in stimulierten CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen halten nach TGFβ1-Gabe den TSC2-mTOR-p70S6K-S6-Signalweg somit aufrecht, so dass Zellwachstum und Proliferation möglich wird.

3.3 Einfluss von PKB auf die Differenzierung von Th17-Zellen

Die initialen Ergebnisse zur Th17-Differenzierung wurden in der AG Bommhardt von meinem Kollegen Herrn Swen Engelmann erarbeitet und gemeinsam publiziert (Doktorarbeit S. Engelmann 2011; Pierau et al., 2009). Zum besseren Verständnis meiner biochemischen Untersuchungen zur Th17-Differenzierung sind die Resultate in Abb. 24 zusammengefasst.

3.3.1 Aktive PKB vermindert die Th17-Differenzierung *in vitro*

Da iTreg- und Th17-Differenzierung durch TGFβ1 induziert werden und erhöhte PKB-Signale, wie zuvor gezeigt, die Foxp3-Expression fördern, wurde der Einfluss aktiver PKB auf die Entwicklung von Th17-Zellen untersucht (Abb. 24). Wt und PKBtg CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von entsprechenden Foxp3-GFP Mäusen 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.

Nach 3-tägiger Stimulation mit CD3+CD28-Ak+TGF β 1 in Anwesenheit von IL-6 produzierten nur 3-4% der PKBtg Zellen, aber 13% der wt Zellen IL-17 (Abb. 24). Im Gegensatz dazu exprimierten 30% der PKBtg T-Zellen Foxp3, jedoch nur 12% der wt Zellen. Auch die Zellzahl der IL-17⁺ Zellen war in den wt Kulturen signifikant doppelt so hoch wie in den PKBtg Kulturen. In Übereinstimmung mit den prozentualen Werten war auch die Zellzahl der Foxp3⁺ Zellen in den PKBtg Ansätzen um das 4,5-fache signifikant erhöht. In Abwesenheit von IL-6 differenzierten wt und PKBtg Zellen vergleichbar gut zu iTreg (68% wt versus 74% PKBtg) und es konnte weder in den wt Kulturen noch in den PKBtg Kulturen eine signifikante IL-17-Produktion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt, Pierau et al., 2009). Erhöhte PKB-Signale wirken somit unter Stimulationsbedingungen, die eine Th17-Differenzierung induzieren, hemmend auf die IL-17-Produktion und fördern stattdessen die Differenzierung zu Foxp3⁺ Zellen.

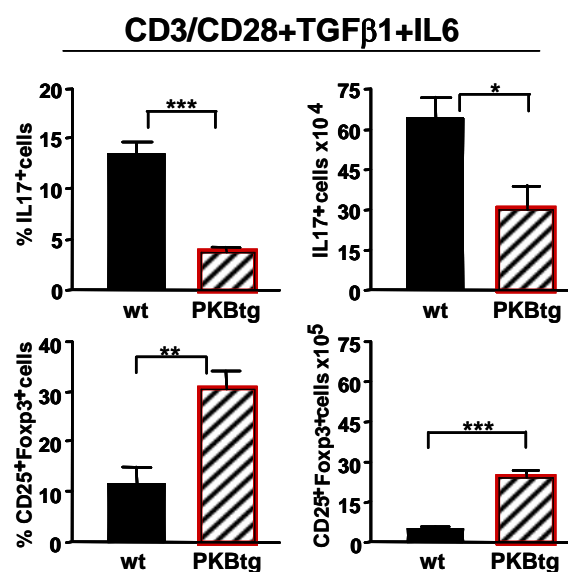


Abb. 24: Analyse der IL-17-Produktion in wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen unter die Th17-Differenzierung fördernden Stimulationsbedingungen. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen wurden mit CD3+CD28-Ak (3 und 5 μ g/ml) plus TGF β 1 (10 ng/ml) in Anwesenheit von IL-6 (20 ng/ml) für 72 h stimuliert. Die intrazelluläre IL-17-Produktion und Foxp3-Expression in den jeweiligen Ansätzen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Graphen zeigen die prozentualen Anteile und Zellzahlen von IL17⁺ und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen in den jeweiligen induzierten Zellpopulationen. Dargestellt sind die Resultate von 3 unabhängigen Experimenten * p<0,05, ** p<0,01 und *** p<0,001 (Abb. Pierau et al., 2009).

3.3.2 Aktive PKB hat keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion in CD4⁺ T-Zellen unter Th17-induzierenden Bedingungen

Die obigen Ergebnisse zeigten, dass erhöhte PKB-Signale die Differenzierung von Th17 Zellen und iTreg reziprok beeinflussen. Da das umgebende Zytokinmilieu die Differenzierung naiver T-Zellen stark beeinflusst und bekannt ist, dass IFN- γ , IL-4 und IL-13 wichtige Negativregulatoren der Th17-Differenzierung sind (Newcomb et al., 2009; Irmeler et al., 2007), war es erforderlich zu klären, ob tg PKB die Zytokinproduktion beeinflusst und darüber indirekt die Th17-Differenzierung mindert. Abb. 25 zeigt, dass bei Stimulation mit CD3+CD28-Ak+TGF β 1+IL-6 keine signifikanten Unterschiede zwischen wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen hinsichtlich der untersuchten Zytokine auftraten, weder im prozentualen Anteil noch in der Anzahl der zytokinproduzierenden CD4⁺ T-Zellen.

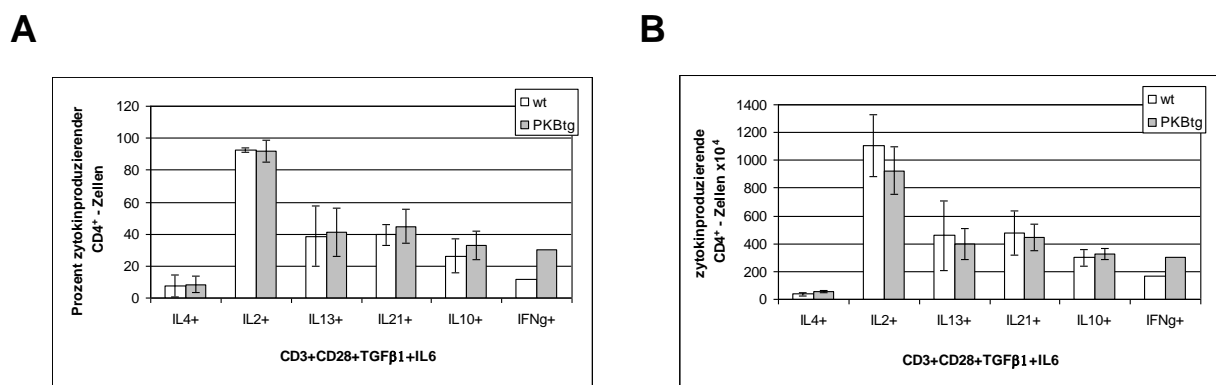


Abb. 25: Einfluss erhöhter PKB-Signale auf die Zytokinproduktion in CD4⁺ T-Zellen unter Th17-induzierenden Stimulationsbedingungen. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen wurden mit CD3+CD28-Ak (3 und 5 μ g/ml) in Anwesenheit von TGF β 1 (10 ng/ml) und IL-6 (20 ng/ml) für 72 h stimuliert und im Anschluss für 4 h mit PMA/Ionomycin (100 und 800 ng/ml) und Brefeldin A (2 μ g/ml) restimuliert. Der prozentuale Anteil (A) und die Zellzahl (B) der zytokinproduzierenden CD4⁺ T-Zellen in den jeweiligen Kulturen wurden mittels FACS-Analyse ermittelt. Dargestellt sind die Resultate von 3 unabhängigen Experimenten, die Messung für IFN- γ wurde nur einmal durchgeführt.

In PKBtg Kulturen wurde zwar prozentual und zahlenmäßig eine Verdopplung IFN- γ -produzierender CD4⁺ T-Zellen vorgefunden, jedoch ist die Signifikanz des Einzelergebnisses derzeit nicht belegt. Da davon ausgegangen werden kann, dass erhöhte PKB-Signale die Produktion von IL-4, IL-2, IL-13, IL-21 und IL-10 unter

Th17-induzierenden Konditionen nicht wesentlich beeinflussen, ist die reduzierte IL-17-Produktion von PKBtg CD4⁺ T-Zellen nicht auf eine indirekte Inhibition durch die Th17-Differenzierung inhibierende Zytokine zurückzuführen.

3.3.3 Verstärkte PKB-Signale reduzieren die Interleukinbildung in Th17-Zellen unter Th17-induzierenden Stimulationsbedingungen

Da in den obigen Versuchen in wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen hinsichtlich der Produktion verschiedener Zytokine keine Unterschiede auftraten, wurde die Zytokinproduktion in Th17-Zellen analysiert (Abb. 26). Wt und PKBtg CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Foxp3-GFP Mäusen wurden mit CD3+CD28-Ak+TGFβ1 in Anwesenheit von IL-6 stimuliert. Nach 3 Tagen wurde die Zytokinproduktion in den induzierten IL-17-produzierenden Th17-Zellen bestimmt (Abb. 26).

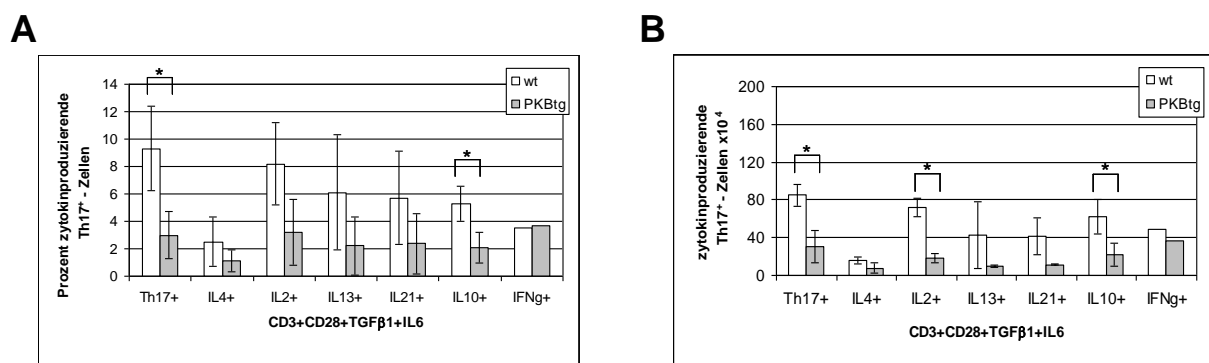


Abb. 26: Effekt erhöhter PKB-Signale auf die Zytokinproduktion in Th17-Zellen unter Th17-induzierenden Stimulationsbedingungen. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von wt und PKBtg Foxp3-GFP Mäusen wurden mit CD3+CD28-Ak (3 und 5 µg/ml) in Anwesenheit von TGFβ1 (10 ng/ml) und IL-6 (20 ng/ml) für 3 Tage stimuliert. Der prozentuale Anteil (A) und die Zellzahl (B) der zytokinproduzierenden IL-17⁺ Th17-Zellen in den jeweiligen Kulturen wurde durch FACS-Analyse ermittelt. Dargestellt sind die Resultate von 3 unabhängigen Experimenten, die Messung für IFN-γ wurde einmal durchgeführt; * p<0,05.

Der prozentuale Anteil zytokinproduzierender wt Th17-Zellen war gegenüber den PKBtg Zellkulturen um das 2-3-fache erhöht (Abb. 26A). Dabei war der Prozentsatz IL-10-produzierender wt Th17-Zellen um das 2,5-fache und die Zellzahl IL-10- oder

IL-2-produzierender wt Th17-Zellen um das 3-4-fache signifikant erhöht. Die Zellzahl IL-4-, IL-13- oder IL-21-produzierender Th17-Zellen war um das 2-4-fache erhöht, aber nicht signifikant. Der prozentuale Anteil und die Zellzahl IFN- γ -produzierender Th17-Zellen waren in wt und PKBtg Kulturen vergleichbar.

Die Daten zeigen, dass wt Th17-Zellen neben IL-17 gleichzeitig auch IL-10, IL-2, IL-13, IL-21 oder IFN- γ produzieren. In den PKBtg Zellkulturen waren deutlich weniger Th17-Zellen differenziert und alle „Th17-Subpopulationen“ waren somit ebenfalls proportional reduziert. Tg PKB führt daher nicht dazu, dass Th17-Zellen ein anderes Zytokinmuster produzieren, das indirekt die Differenzierung der Th-17 Zellen mindern könnte.

3.3.4 Transkriptionsfaktor-Expression in wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen unter Th17-polarisierenden Stimulationsbedingungen

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen, die zur verminderten Th17-Differenzierung PKBtg T-Zellen beitragen könnten, wurden wt und PKBtg CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit CD3+CD28-Ak+TGF β 1 in An- oder Abwesenheit von IL-6 stimuliert. Die gewonnenen zytoplasmatischen und nukleären Proteinlysate wurden im Western-Blot analysiert (Abb. 27).

Zunächst wurde die nukleäre Expression der Transkriptionsfaktoren ROR γ t, IRF4 und pSTAT3, welche die Th17-Differenzierung kontrollieren (Ivanov et al., 2006; Yang et al., 2008; Brustle et al., 2007), untersucht (Abb. 27A). IL-6 erhöhte die nukleäre Expression von ROR γ t und pSTAT3 in wt und PKBtg Zellen deutlich, jedoch nicht bzw. nur mäßig von IRF4. Dabei war die nukleäre Expression von ROR γ t und IRF4 in wt und PKBtg Zellen erstaunlicherweise vergleichbar. Die reduzierte IL-17-Produktion PKBtg T-Zellen unter Th17-induzierenden Stimulationsbedingungen ist daher nicht auf eine verminderte ROR γ t- oder IRF4-Expression zurückzuführen. In IL-6-behandelten Kulturen zeigten wt T-Zellen die stärkste nukleäre Expression von pSTAT3 am Tag eins, die bis zum dritten Tag abnahm (Abb. 27A). In PKBtg T-Zellen wurde die stärkste pSTAT3-Expression am Tag drei detektiert. Eine derart gegenläufige Kinetik in wt und PKBtg T-Zellen wurde auch für pSTAT1 beobachtet (Abb. 27B). Die reduzierte IL-17-Produktion in PKBtg T-Zellen ist daher nicht durch eine verminderte STAT3-Aktivierung bedingt. Die erhöhte pSTAT1-Expression in

PKBtg Zellen zu späteren Zeitpunkten könnte jedoch die Th17-Differenzierung beeinflussen, da STAT1 diese hemmt (Villarino et al., 2010).

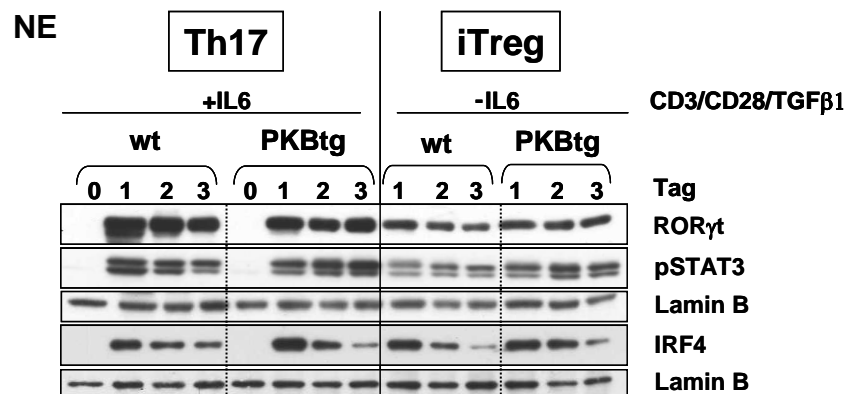


Abb. 27A: Analyse nukleärer Proteinexpression unter iTreg- und Th17-induzierenden Bedingungen. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von wt und PKBtg Mäusen wurden mit CD3+CD28-Ak (3 und 5 µg/ml) plus TGFβ1 (10 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von IL-6 (20 ng/ml) für 1-3 Tage stimuliert. Nukleäre (NE) Proteinextrakte wurden im Western-Blot hinsichtlich der Expression/Aktivierung der angezeigten Transkriptionsfaktoren untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Lamin B-Expression diente als Proteinladungskontrolle (Abb. verändert nach Pierau et al., 2009).

Unter Th17-induzierenden Bedingungen war am Tag 3 die nukleäre Expression von pSTAT5 in PKBtg Zellen stärker als in wt T-Zellen (Abb. 27B). Dies war unter iTreg-induzierenden Konditionen noch drastischer. Eine beachtlich veränderte Expression wurde für pSTAT6 gefunden. Dieser u.a. durch IL-4 aktivierte Transkriptionsfaktor wurde in PKBtg T-Zellen, sowohl bei Zugabe von IL-6 als auch unter iTreg-induzierenden Bedingungen, d.h. ohne IL-6, sehr stark an Tag 2 und Tag 3 nukleär exprimiert.

Die nukleäre pSMAD2- und pSMAD3/1-Expression war in wt und PKBtg Kulturen mit und ohne IL-6-Gabe vergleichbar (Abb. 27B), wobei pSMAD2 in Abwesenheit von IL-6 in wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen am Tag 3 deutlich stärker exprimiert war.

Mehrere individuelle Experimente erlaubten die Schlussfolgerung, dass unter Th17-induzierenden Bedingungen PKBtg T-Zellen am Tag 3 eine verstärkte nukleäre Expression von pSTAT1, pSTAT3, pSTAT5 und pSTAT6 aufweisen (Abb. 27A und B). Hingegen ist die pSmad2- und pSmad3/1- sowie die RORγt- und IRF4-Expression vergleichbar zu wt T-Zellen (Abb. 27A).

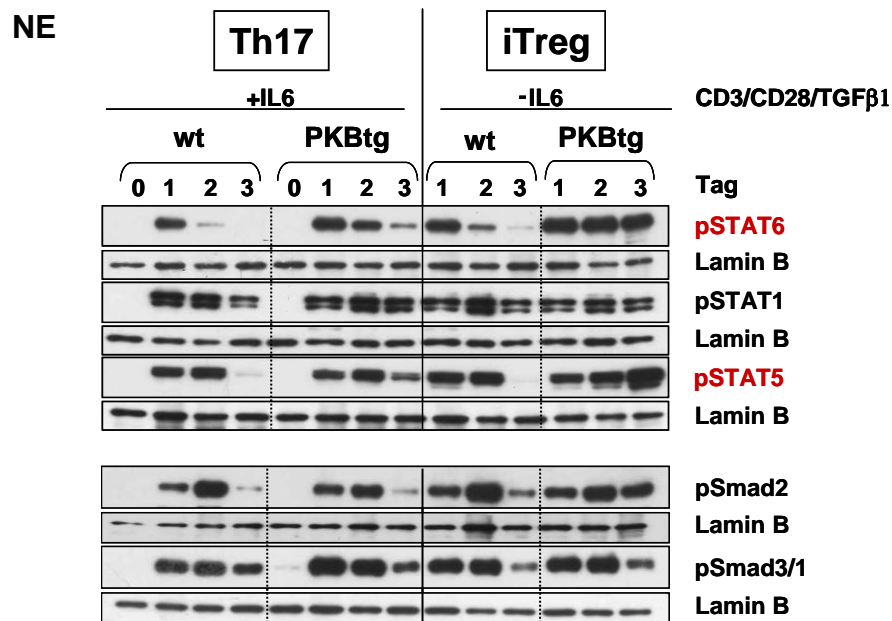


Abb. 27B: Analyse nukleärer Proteinexpression unter iTreg- und Th17-induzierenden Bedingungen. $CD4^+CD25^-$ T-Zellen von wt und PKBtg Mäusen wurden mit CD3+CD28-Ak (3 und 5 $\mu\text{g/ml}$) plus TGF β 1 (10 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von IL-6 (20 ng/ml) für 1-3 Tage stimuliert. Nukleäre (NE) Proteinextrakte wurden im Western-Blot hinsichtlich der Expression/Aktivierung der angezeigten Signalmoleküle untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Lamin B-Expression diente als Proteinladungskontrolle.

In weiteren Experimenten wurde die Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2 und SAPK/JNK sowie von PKB, TSC2 und S6 im Zytoplasma analysiert (Abb. 27C). pERK1/2 und pSAPK/JNK waren unter Th17-induzierenden Stimulationsbedingungen nur in den PKBtg Zellen detektierbar. In Abwesenheit von IL-6, d.h. unter iTreg-fördernden Bedingungen, wurde hinsichtlich der pSAPK/JNK- und ERK1/2-Expression zwischen wt und PKBtg Zellen kein großer Unterschied festgestellt. Dies zeigt, dass aktive PKB den MAPK-Signalweg in Anwesenheit von IL-6 verstärkt bzw. MAPK-Aktivierung ermöglicht.

Da aktive PKB die Differenzierung der Th17-Zellen minderte, wurden auch Signalmoleküle des PKB-Signalwegs untersucht. In PKBtg T-Zellen war unter beiden Stimulationsbedingungen tg pPKB nachweisbar, wobei IL-6 keinen Einfluss auf die pPKB-Expression hatte. Endogene pPKB war weder in wt noch in PKBtg Zellen unter den verschiedenen Bedingungen detektierbar.

Hinsichtlich pPTEN, der inaktiven Form von PTEN, gab es zwischen wt und PKBtg Populationen in An- und Abwesenheit von IL-6 keine Unterschiede, wobei pPTEN ab Tag 2 weniger stark exprimiert wurde. Weiterhin zeigten wt und PKBtg $CD4^+$ T-Zellen in An- oder Abwesenheit von IL-6 eine gleiche pTSC2-Expression. Auffällig war

jedoch, dass unter iTreg- gegenüber Th17-induzierenden Konditionen eine stärkere pTSC2-Expression vorlag. Hinsichtlich pS6 wurde in PKBtg Zellen, vor allem unter iTreg-induzierenden Bedingungen, eine stärkere bzw. verlängerte Expression beobachtet.

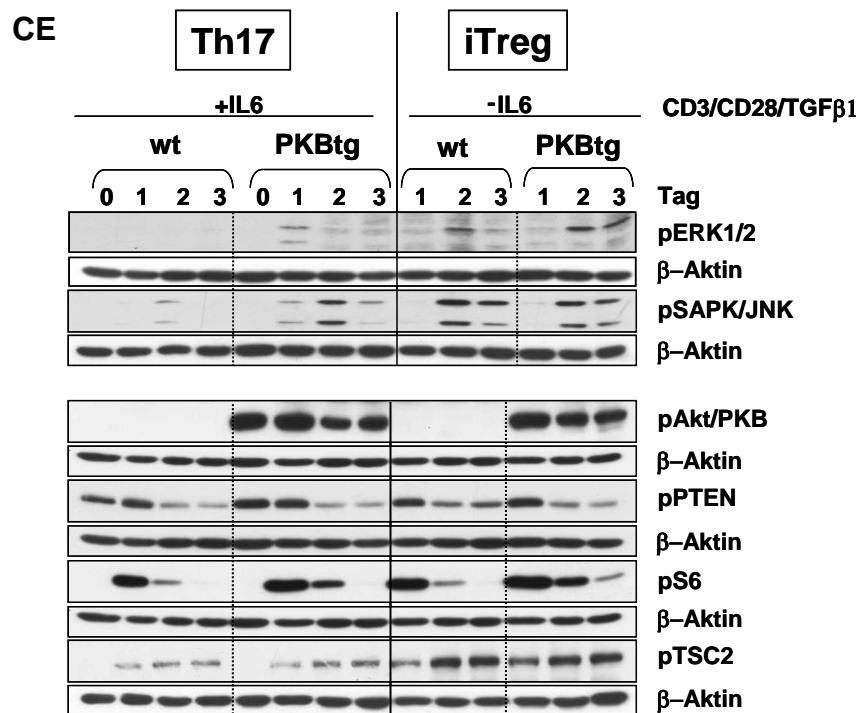


Abb. 27C: Analyse zytoplasmatischer Proteinexpression unter iTreg- und Th17-induzierenden Bedingungen. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von wt und PKBtg Mäusen wurden mit CD3+CD28-Ak (3 und 5 µg/ml) plus TGFβ1 (10 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von IL-6 (20 ng/ml) für 1-3 Tage stimuliert. Zytoplasmatische (CE) Proteinextrakte wurden im Western-Blot hinsichtlich der Expression/Aktivierung der angegebenen Signalmoleküle untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. β-Aktin-Expression diente als Proteinladungskontrolle.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass unter Th17-induzierenden Kulturbedingungen PKBtg Zellen ein vergleichbares, wenn auch abgeschwächtes Expressionsmuster der untersuchten Signalmoleküle aufweisen, wie unter iTreg-induzierenden Bedingungen. Dies könnte dazu beitragen, dass erhöhte PKB-Signale die Th17-Differenzierung mindern und stattdessen fördernd auf die iTreg-Differenzierung wirken. Insgesamt wird deutlich, dass verstärkte PKB-Signale einen zentralen Einfluss auf TGFβ1-vermittelte Differenzierungsprozesse naiver T-Zellen nehmen und somit die Aufrechterhaltung peripherer T-Zelltoleranz maßgeblich mitregulieren.

4 Diskussion

TGF β 1 gehört zu den potentesten Immunsuppressoren und ist ein wichtiger Regulator der Apoptose und Differenzierung immunsuppressiver Treg und inflammatorischer Th17-Zellen. Signale der PKB dagegen fördern die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben von T-Zellen. Die Rolle der PKB in TGF β -vermittelten Signalprozessen bzw. die Wechselwirkungen der TGF β 1- und PKB-Signalwege in T-Zellen sind weitgehend unverstanden. Daher sollte in dieser Dissertation aufgeklärt werden, ob und wie erhöhte PKB-Signale TGF β 1-vermittelte Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse naiver Th-Zellen beeinflussen. Dafür wurden wt und PKBtg Mäuse, die eine konstitutiv aktive Form humaner PKB α exprimieren, Foxp3-GFP Mäuse, CD28^{-/-} und PKBtg CD28^{-/-} Mäuse eingesetzt.

Zunächst wurde untersucht, ob erhöhte PKB-Signale in T-Zellen die TGF β 1-vermittelten immunsuppressiven Effekte hinsichtlich der Proliferation beeinflussen können. TGF β 1 hemmte die Proliferation CD3-Ak-stimulierter wt CD4⁺ T-Zellen drastisch, hatte interessanterweise aber keinen wesentlichen Einfluss auf PKBtg CD4⁺ T-Zellen. Bei CD3+CD28-Ak-Stimulation der wt und PKBtg CD4⁺ T-Zellen hatte TGF β 1 dagegen nur einen leicht inhibitorischen Einfluss, d.h. die T-Zellen proliferierten annähernd so gut wie ohne TGF β 1-Gabe, in Einklang mit früheren Ergebnissen (Song et al., 2003). Dies zeigt, dass TGF β 1 im Zusammenspiel mit CD28-kostimulatorischen Signalen auf CD4⁺ T-Zellen nicht immunsupprimierend wirkt und erhöhte PKB-Signale eine vergleichbare Wirkung wie CD28-Kostimulation haben. Da PKB bei CD28-Ligation aktiviert wird, wurde weiterführend der Einfluss tg PKB auf die Proliferation von CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen in An- und Abwesenheit von TGF β 1 untersucht. Die Proliferation der CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen wurde durch TGF β 1 ebenfalls stark inhibiert, dagegen expandierten PKBtg CD28^{-/-} T-Zellen in Gegenwart von TGF β 1 so gut wie PKBtg CD4⁺ T-Zellen oder wt Zellen nach CD3+CD28-Ak-Stimulation. Dies bestätigt, dass tg PKB CD28-Kostimulation voll ersetzt und die Aktivierung und Expansion naiver CD4⁺ T-Zellen bei Stimulation mit CD3-Ak+TGF β 1 unabhängig von CD28-Signalen gewährleistet.

Bei der Proliferationshemmung durch TGF β 1 sind mehrere Mechanismen involviert. TGF β 1 blockiert die IL-2-Transkription durch Inaktivierung der IL-2 Promotor/*Enhancer*-Aktivität (Brabletz et al., 1993). Da TGF β 1-behandelte Smad3^{-/-} murine T-Zellen allerdings IL-2 produzieren, scheint Smad3 in die TGF β 1-vermittelte Hemmung der IL-2-Transkription involviert zu sein (Li et al., 2006). Die konzentrationsabhängige Zugabe von IL-2 zu TGF β 1-behandelten Zellen hebt den inhibitorischen Effekt teilweise auf, so dass die T-Zellen proliferieren. Unsere eigenen Daten bestätigen dies, da exogenes IL-2 die TGF β 1-vermittelte Inhibition der wt T-Zellen aufhob, so dass CD3-Ak-stimulierte wt T-Zellen so gut wie PKBtg T-Zellen proliferierten. Bei alleiniger CD3-Stimulation durch TGF β 1 wird somit u.a. die IL-2-Produktion oder die IL-2-R-Signalgebung gehemmt und erhöhte PKB-Signale heben diese Defizite auf bzw. ersetzen sie.

TGF β 1 hemmt die Zellproliferation zudem durch die Steuerung der Zellzyklusregulatoren. Durch TGF β 1-Signale werden in verschiedenen Zelltypen die CDK-Inhibitoren (CKI) p15^{Ink4B}, p21^{Cip1} und p27^{Kip1} vermehrt exprimiert und die c-myc-Expression verringert. Die gesteigerte Expression der CKI unterbindet die Aktivität der CDKs und somit die Progression des Zellzyklus. Dabei akkumuliert hypophosphoryliertes und damit aktives Retinoblastom (Rb) im Zellkern, wodurch die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie inhibiert und somit der Eintritt der Zellen in die S-Phase verhindert wird (Hanahan und Weinberg, 2000; Das et al., 2005; Moustakas et al., 2002). Der Rb/E2F-Komplex vermittelt zugleich die Bindung von Histon-Deacetylasen (HDAC) an das Chromatin und unterdrückt somit die DNA-Synthese.

Erhöhte PKB-Signale in T-Zellen „umgehen“ die TGF β 1-vermittelten inhibitorischen Signale, so dass die Zellen resistent gegenüber dem TGF β 1-vermittelten Zellzyklusarrest sind. Es ist bekannt, dass PKB p27^{Kip1} an Thr157 phosphoryliert, wodurch das Bindeprotein 14-3-3 assoziiert und p27^{Kip1} im Zytoplasma gehalten wird und daher den Zellzyklusverlauf nicht inhibieren kann (Manning und Cantley, 2007). PKB inhibiert zudem die p27^{Kip1}-Transkription durch Phosphorylierung und Inaktivierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren. PKB phosphoryliert und inaktiviert auch p21^{Cip1} bzw. inhibiert die p21^{Cip1}-Expression durch Phosphorylierung und Aktivierung von MDM2 und damit verbundener reduzierter p53-vermittelter p21^{Cip1}-Transkription. Andererseits fördert PKB die Phosphorylierung von GSK3 β , TSC2 und PRAS40 und

dadurch die Zellproliferation, da diese PKB-Zielproteine die Stabilität und Synthese von Proteinen regulieren, die für den Zellzykluseintritt notwendig sind (Carnero, 2010). Somit könnte in Anwesenheit von TGF β 1 auch eine verstärkte Aktivierung verschiedener Signalmoleküle *downstream* von PKB die Proliferation der PKBtg CD4⁺ T-Zellen ermöglichen.

Die Ergebnisse zur Resistenz PKBtg CD4⁺ T-Zellen gegenüber TGF β 1-vermittelter Suppression legen nahe, dass dies bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen könnte. Hinzu kommt, dass konventionelle PKBtg T-Zellen sowohl durch wt als auch PKBtg nTreg weniger supprimierbar sind als konventionelle wt Zellen (Pierau et al., 2009). Mäuse defizient für die E3-Ubiquitin-Ligase Cbl-b oder TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*) entwickeln Autoimmunerkrankungen. T-Zellen dieser Mäuse sind unabhängig von CD28-Kostimulation und weisen eine verstärkte PI3K/PKB-Aktivität auf (Wohlfert und Clark, 2007; King et al., 2006). Ruhende und aktivierte Cbl-b^{-/-} T-Zellen weisen eine erhöhte Expression von pPKB auf (Fang und Liu, 2001), allerdings konnten Jeon et al. diesen Phänotyp in Cbl-b^{-/-} T-Zellen nicht nachweisen (Jeon et al., 2004). Ebenso wie PKBtg T-Zellen sind konventionelle Cbl-b^{-/-} oder TRAF6^{-/-} T-Zellen *in vitro* gegenüber Treg-vermittelter Suppression resistent und die Treg-Anzahl und Treg-Funktion ist trotz erhöhter PKB-Aktivität in diesen Mäusen normal (Wohlfert et al., 2004; King et al., 2006). Konventionelle T-Zellen aus NFATc2/c3 doppelt-defizienten Mäusen sowie SHIP-defiziente T-Zellen werden ebenfalls schlechter durch eigene oder wt Tregs inhibiert, wobei letztere ebenfalls eine Hyperaktivität des PI3K/PKB-Signalwegs aufweisen. Unsere Ergebnisse belegen eindeutig, dass hyperaktive PKB in T-Effektorzellen ausreichend ist, Resistenz gegenüber Treg- oder TGF β 1-vermittelter Suppression zu etablieren und PKB-Signale derart zur Autoreaktivität und pathologischen T-Zellprozessen beitragen könnten.

Hinsichtlich der Zellgröße zeigten PKBtg T-Zellen im Vergleich zu wt T-Zellen eine deutlich geringere Abnahme der Zellgröße bei CD3-Ak+TGF β 1-Stimulation. Auch hier konnte die Zugabe von exogenem IL-2 den inhibitorischen Effekt von TGF β 1 auf die Zellgröße, v.a. der wt T-Zellen aufheben. Dies weist darauf hin, dass TGF β 1-Signale das Wachstum von Zellen abschalten, aktive PKB diesen wachstumshemmenden Signalen aber entgegenwirkt. PKB reguliert im

Zusammenspiel mit TSC2 und mTOR das Zellwachstum und Überleben von Zellen, wobei die PKB-vermittelte Inhibition von TSC2 zur Aktivierung von mTORC1, p70S6K und S6 führt (Manning et.al 2002). In CD3-Ak+TGFβ1-stimulierten PKBtg sowie PKBtg CD28^{-/-} T-Zellen war dahingehend eine verstärkte und anhaltende S6-, p70S6K-, mTOR- und TSC2-Aktivierung im Vergleich zu den wt T-Zellen vorhanden. Dies zeigt, dass bei CD3-Ak-Stimulation in Anwesenheit von TGFβ1 aktive PKB den mTOR-Signalweg und somit die Proteinbiosynthese und das Zellwachstum aufrecht erhält, so dass Proliferation ermöglicht wird.

Hinsichtlich der Aktivierungsmarker minderte TGFβ1 bei alleiniger CD3-Ak-Stimulation die CD25-, CD69- und CD98-Expression auf wt und CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen, ein Hinweis auf eine verringerte IL-2/IL-2-R-Signalgebung und einen niedrigeren Metabolismus, was in Einklang mit der Proliferationsinhibition der CD4⁺ T-Zellen steht. Auch hinsichtlich der Expression dieser Aktivierungsmarker hoben PKB-Signale die inhibitorischen TGFβ1-Effekte auf bzw. „umgingen“ sie. CD3-Ak+TGFβ1-stimulierte PKBtg T-Zellen zeigten in diesem Zusammenhang eine verstärkte STAT5-Aktivierung und produzierten im Vergleich zu wt Zellen vermehrt IL-2. CD25 bildet zusammen mit CD122 und CD132 den hochaffinen IL-2-R, der Signale primär über den JAK/STAT5-Signalweg, aber auch über MAPK- und PI3K/PKB/mTOR-Signalwege vermittelt (Cheng et al., 2011). Die STAT5-Aktivierung ist abhängig von der Phosphorylierung dreier Tyrosinreste innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von CD122, der JAK1- und JAK3-Aktivierung sowie den negativen Regulatoren des IL-2-R-Signalwegs, den SOCS (*suppressors of cytokine signaling*)-Proteinen. SOCS1, SOCS3 und CIS (*cytokine induced SH2 protein*) verhindern, dass STAT5 zum IL-2-R rekrutiert wird. Sie vermitteln die Ubiquitinierung und proteosomale Degradation des IL-2-R oder der JAKs bzw. sie assoziieren mit den JAKs und inhibieren deren Kinaseaktivität. Erhöhte PKB-Signale könnten daher auch diese Proteine beeinflussen und derart zur verstärkten STAT5-Aktivierung beitragen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass aktive PKB indirekt die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet- und Blimp-1 unterdrückt, die die IL-2-Transkription verhindern (Cheng et al., 2011).

T-Zellaktivierung führt innerhalb weniger Stunden zur Expression von CD69, das für die T-Zellproliferation benötigt wird (Sancho et al., 2005). Andererseits regt CD69-Aktivierung die TGFβ1-Produktion in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen sowie

Makrophagen an (Sancho et al., 2003 und 2005; Esplugues et al., 2003). CD69^{-/-} Mäuse entwickeln eine schwere Kollagen-induzierte Arthritis (CIA; *collagen induced arthritis*) und weisen reduzierte TGFβ1-Mengen in den entzündeten Gelenken auf. Die erhöhte CD69-Expression auf CD3-Ak+TGFβ1-stimulierten PKBtg CD4⁺ T-Zellen zeigt, dass diese Zellen stärker aktiviert sind, was im Einklang mit der Proliferation in Gegenwart von TGFβ1 steht. Es wäre zu vermuten, dass eine vermehrte CD69-abhängige TGFβ1-Produktion in PKBtg T-Zellen die TGFβ1-vermittelten Differenzierungsprozesse beeinflussen könnte.

Der Oberflächenrezeptor CD62L auf T-Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von T-Zellen vom Blut über HEVs (*high endothelial venules*) in sekundäre Lymphorgane. Bei 2-tägiger Stimulation mit CD3-Ak oder CD3+CD28-Ak verminderte TGFβ1 die CD62L-Expression auf wt T-Zellen in geringem Maße. In PKBtg Zellen war die Reduktion der CD62L-Expression durch TGFβ1 dagegen sehr viel stärker ausgeprägt, da ein Großteil der Zellen CD62L-negativ war. Erhöhte PKB-Signale fördern daher insbesondere in Anwesenheit von TGFβ1 die Herunterregulation bzw. hemmen die Expression von CD62L auf der T-Zelloberfläche. Entsprechend wurde für periphere PTEN^{-/-} T-Zellen eine reduzierte CD62L-Expression nachgewiesen. Dies beruht auf PKB-vermittelter Phosphorylierung und Inaktivierung von FoxO und daraus resultierender verminderter Expression des Transkriptionsfaktors KLF2 (*Krüppel-like factor 2*), der die CD62L-Transkription induziert (Finlay et al., 2009).

In CD3-Ak+TGFβ1-stimulierten PKBtg und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen wurde gegenüber wt und CD28^{-/-} Zellen weiterhin eine stärkere CD98-Expression nachgewiesen, d.h. erhöhte PKB-Signale erhalten die CD98-Expression in Gegenwart von TGFβ1 und fördern somit Metabolismus und Zellwachstum. Dies korreliert mit Daten von PTEN^{-/-} Thymozyten, die im Vergleich zu wt Thymozyten ebenfalls eine erhöhte CD98-Expression aufweisen (Finlay et al., 2009).

Ein weiteres Ergebnis ist, dass bei CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation Ox40 auf wt CD4⁺ T-Zellen kaum, jedoch sehr stark auf PKBtg T-Zellen exprimiert war. Das kostimulatorische Molekül Ox40 wird 24-72 h nach Aktivierung der T-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert und reguliert die Zellteilung und das Überleben (Ishii et al., 2010; Croft, 2010). Ox40-Aktivierung durch Bindung des Liganden Ox40L führt zur Rekrutierung von TRAF2, 3 und 5 an den Rezeptor. IKKα/β/γ sowie PI3K p85 und PKB assoziieren mit den TRAF-Adaptormolekülen und dieser Komplex führt zur

Phosphorylierung und Degradation von $I\kappa B\alpha$, Aktivierung von $NF\kappa B$ und Transkription antiapoptotischer Gene. In $Ox40^{-/-}$ $CD4^{+}$ T-Zellen ist $NF\kappa B$ dementsprechend weniger aktiv und die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl sind kaum exprimiert. In Kombination mit TCR-Signalen unterstützt Ox40 die PDK1-vermittelte PKB-Phosphorylierung, den intrazellulären Ca^{2+} -Influx und die nukleäre Akkumulation von NFAT, verbunden mit verstärkter Zytokinproduktion und Zellteilung und einem erhöhten Überleben der T-Zellen (Croft, 2010). Die Tatsache, dass in CD3-Ak-stimulierten PKBtg T-Zellen trotz $TGF\beta 1$ eine starke Ox40-Expression vorgefunden wurde, zeigt dass PKB-Signale die Ox40-Expression entweder direkt regulieren bzw. $TGF\beta 1$ -induzierte Regulatoren, die die Ox40-Expression hemmen.

Eine weiteres Ziel dieser Arbeit war, auf molekularer Ebene aufzuklären, wie erhöhte PKB-Signale die iTreg- und Th17-Differenzierung von wt und $CD28^{-/-}$ T-Zellen beeinflussen, insbesondere bei alleiniger CD3-Ak-Stimulation, d.h. ohne CD28-kostimulatorische Signale, die für die Induktion von Foxp3 in naiven T-Zellen sowie für die Homöostase von Treg erforderlich sind. Eine effiziente Foxp3-Induktion setzt das Zusammenspiel der TCR-, CD28-, IL-2-R- und $TGF\beta 1R$ -Signale voraus (Huehn et al., 2009). Diese Ereignisse münden in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, AP1, STAT5, Smad2, 3 und 4, die zusammen die Foxp3-Transkription regulieren. Ob diese Signalwege einen negativen oder positiven Einfluss auf die Foxp3-Induktion haben, ist für *in vitro* oder *in vivo* generierte iTreg bzw. nTreg unterschiedlich. CD28-kostimulatorische Signale sind für die Entwicklung von nTreg im Thymus erforderlich, da $CD28^{-/-}$ Mäuse nur wenige nTreg bilden (Tai et al., 2005; Pierau et al., 2009). Die Aktivierung des PI3K/PKB/mTOR-Signalwegs in peripheren naiven T-Zellen scheint dagegen für die Foxp3-Expression hinderlich zu sein.

Interessanterweise und in Übereinstimmung mit der erhöhten CD25- sowie pSTAT5-Expression und ermöglichter Proliferation sind verstärkte PKB-Signale ausreichend, um in $TGF\beta 1$ -stimulierten $CD4^{+}$ naiven T-Zellen bei alleiniger TCR-Stimulation die Foxp3-Induktion und eine effiziente iTreg-Entwicklung zu induzieren. Es ist zudem hervorzuheben, dass auch in $CD28^{-/-}CD4^{+}CD25^{-}$ T-Zellen erhöhte PKB-Signale effizient die Foxp3-Expression induzieren. Erhöhte PKB-Aktivität in Kombination mit TCR- und $TGF\beta 1$ -Signalen ist daher ausreichend, iTreg zu induzieren, ohne weitere CD28-vermittelte Signale. Hinsichtlich der iTreg-Induktion wurde in unserer

Arbeitsgruppe zudem gezeigt, dass CD3-Ak+TGF β 1-induzierte PKBtg iTreg eine vergleichbare Suppressoraktivität wie durch CD3+CD28-Ak+TGF β 1-generierte wt und PKBtg iTreg aufweisen (Pierau et al., 2009).

Bei Stimulation CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit CD3+CD28-Ak plus TGF β 1 für 3 Tage waren der prozentuale Anteil und die Zellzahl Foxp3⁺ Zellen sowie die Stärke der Foxp3-Expression in wt und PKBtg Kulturen vergleichbar. Verstärkte PKB-Signale, wie sie in unserem PKBtg System vorliegen, hemmen daher die iTreg-Differenzierung bei CD3+CD28-Ak+TGF β 1-Stimulation nicht. Allerdings ist bis dato nicht endgültig geklärt, ob CD28-Kostimulation für die iTreg-Induktion *in vivo* notwendig ist, obwohl CD28-Kostimulation für den Erhalt des iTreg-Phänotyps in der Peripherie essentiell ist (Gabrysova et al., 2011). Eine zu starke Antigen-Stimulation scheint die Differenzierung naiver T-Zellen zu iTreg zu verhindern, was mit einer starken Aktivierung des PI3K/PKB/mTOR-Signalweges korreliert (Haxhinasto et al., 2008). Gabrysova et al. zeigten, dass die Stimulation naiver muriner CD4⁺ T-Zellen mit optimalen CD3+CD28-Ak-Konzentrationen (2,5 und 10 μ g/ml) in Abhängigkeit von TGF β 1 zu einer vermehrten Bildung von Foxp3⁺ T-Zellen führte. Bei hohen CD3+CD28-Ak-Konzentrationen (10 und 10 μ g/ml) in Anwesenheit von TGF β 1 wurde die Foxp3-Induktion dagegen gehemmt (Gabrysova et al., 2011). Behandlung der CD4⁺ T-Zellen mit Inhibitoren des mTOR- oder MEK/ERK-Signalwegs reduzierte die Stärke der TCR- und CD28-Signale und verstärkte die Foxp3-Expression in Abhängigkeit von TGF β 1 (Gabrysova et al., 2011). TGF β 1 ist auch notwendig, um in *ex vivo* sortierten CD4⁺Foxp3⁺ iTreg bei CD3+CD28-Ak-Stimulation die Foxp3-Expression zu erhalten. Die TGF β 1-vermittelte Induktion und Aufrechterhaltung der Foxp3-Expression scheint daher durch die Dauerhaftigkeit oder Stärke der TCR/CD28-Signale reguliert zu werden.

Da erhöhte PKB-Signale die iTreg-Differenzierung und die damit verbundene Foxp3-Expression nach CD3-Ak+TGF β 1-Stimulation förderten, wurden die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen untersucht. Hinsichtlich der nukleären Expression von pSmad2, pSmad3, Smad4 und NFATc1 bei CD3-Ak+TGF β 1-Stimulation wurden in wt und PKBtg Zellen keine wesentlichen Unterschiede festgestellt. Bemerkenswert war, dass die NFATc1-Expression in Anwesenheit von TGF β 1 in beiden Zelltypen geringer war als nach TCR-Stimulation allein. Dies weist darauf hin, dass für die iTreg-Differenzierung eine geringe NFAT-Aktivität erforderlich

oder ausreichend ist. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass CD28^{-/-} T-Zellen im Gegensatz zu PKBtg CD28^{-/-} Zellen bei CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation keine nukleäre NFATc1-Expression aufwiesen. CD28-Expression in wt Zellen bzw. PKB-Signale in CD28^{-/-} Zellen sind demnach für die NFAT-Aktivierung erforderlich, die durch TGFβ1 vermindert wird und in reduzierter IL-2-Synthese und Foxp3-Induktion resultiert.

Im Nukleus PKBtg T-Zellen wurde im Vergleich zu wt Zellen eine signifikant höhere pSTAT5- und Foxp3-Expression bei CD3-Ak+TGFβ1-Aktivierung nachgewiesen. Bei CD3+CD28-Ak-Stimulation in Anwesenheit von TGFβ1 wurde dagegen nukleäre pSTAT5- und Foxp3-Expression auch in wt Zellen vorgefunden. Insgesamt ermöglichten erhöhte PKB-Signale im Zusammenspiel mit CD3-Ak+TGFβ1-Stimulation eine „adäquate“ länger anhaltende und starke nukleäre Expression der pSmad2, pSmad3 und Smad4 Faktoren, von NFATc1 und pSTAT5, d.h. von Faktoren, welche die Foxp3-Expression und iTreg-Differenzierung steuern.

Die Ergebnisse zeigen ferner, dass eine verstärkt anhaltende pSTAT1-, pSTAT3- und insbesondere pSTAT6-Expression in CD3-Ak+TGFβ1-stimulierten PKBtg T-Zellen die Foxp3-Induktion nicht inhibiert. STAT3 und STAT6 sind wichtige Negativregulatoren der Foxp3-Expression (Adamson et al., 2009), allerdings ist bisher unklar, ob diese STAT-vermittelte Hemmung direkt oder indirekt erfolgt. STAT6 kann allerdings an den Foxp3-Promoter binden und somit die TGFβ1-vermittelte Foxp3-Aktivierung verhindern (Takaki et al., 2008). Hingegen zeigten andere Gruppen, dass IL-4- und STAT6-Signale für die Foxp3-Transkription und den Erhalt der Foxp3-Expression in nTreg notwendig sind (Maerten et al., 2005; Pillemer et al., 2009). Der IL-4-Signalweg fördert auch die Proliferation sowie das Überleben von Treg, und Stimulation naiver CD4⁺ T-Zellen mit IL-4 induzierte iTreg-Differenzierung (Skapenko et al., 2005; Chapoval et al., 2010).

Übereinstimmend mit den Western-Blot-Analysen wurde in CD3-Ak+TGFβ1-stimulierten PKBtg CD4⁺ T-Zellen eine verstärkte IL-2-, IL-4-, IL-10-, IL-13-, IL-21- und IFN-γ-Produktion im Vergleich zu wt Zellen vorgefunden. Die Transkription dieser Zytokine wird durch STAT1, 3, 5 und STAT6 reguliert, die wiederum über die Zytokinbindung an die jeweiligen spezifischen Rezeptoren aktiviert werden. Für die verstärkte STAT-Aktivierung durch erhöhte PKB-Signale gibt es mehrere potentielle Mechanismen. Da CD3-Ak+TGFβ1-stimulierte PKBtg T-Zellen vermehrt CD25 auf

der Oberfläche exprimieren, könnte durch erhöhte IL-2-Produktion und IL-2-Bindung STAT5 verstärkt durch JAKs phosphoryliert und aktiviert werden. Ob aktive PKB die CD122- und CD132-Expression oder die JAK- und STAT5-Transkription beeinflusst, wäre künftig zu klären. Es ist auch möglich, dass PKB die Negativregulatoren des JAK/STAT-Signalwegs direkt oder indirekt beeinflusst. Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) SHP1, SHP2 (*SH2-domain-containing PTP 1 und 2*) und CD45 sind in der Lage, JAK- und STAT-Moleküle zu dephosphorylieren und damit den Signalweg negativ zu beeinflussen (Hebenstreit et al., 2005). Weiterhin könnte PKB indirekt die Phosphorylierung des Serin-Restes in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne der STAT-Moleküle fördern und dadurch deren transkriptionelle Aktivität steigern. PKB könnte auch die Funktion der SOCS-Proteine beeinflussen. SOCS1 und SOCS3 inhibieren die JAK1-Kinaseaktivität, CIS-Proteine dagegen binden an den Zytokinrezeptor und verhindern dadurch die STAT-Aktivierung, insbesondere von STAT5. Foxp3-induzierte Expression der mikroRNA Mir-155 unterdrückt die SOCS1-Transkription und verstärkt den IL-2/STAT5-Signalweg, wodurch die Anzahl Foxp3⁺ Tregs erhöht wird (Lu et al., 2009; Palmer und Restifo et al., 2009). Eine erhöhte Anzahl von nTreg wurde dahingehend auch in PKBtg Mäusen beobachtet (Pierau et al., 2009). SOCS3 wird konstitutiv schwach in Tregs exprimiert und eine SOCS3-Überexpression inhibiert die Proliferation sowie Suppressorfunktion der Tregs (Pillemer et al., 2007). SOCS3-Deletion in CD4⁺ T-Zellen führt zudem zur verstärkten Aktivierung und Produktion von IL-10 und TGFβ (Kinjyo et al., 2006).

Die Daten zur Förderung der iTreg-Differenzierung durch erhöhte PKB-Signale erscheinen widersprüchlich zu Publikationen, in denen die Aktivierung des PI3K/PKB/mTOR-Signalwegs zur Hemmung der Foxp3-Expression und Treg-Differenzierung führte (Haxhinasto et al., 2008; Sauer et al., 2008). Andererseits sind unsere Daten im Einklang mit Publikationen, in denen erhöhte PKB/mTOR-Aktivität keinen negativen Einfluss auf Treg hat, z.B. in PTEN^{-/-} Mäusen (Walsh et al., 2006). Es ist daher davon auszugehen, dass die Auswirkungen aktiver PKB auf die Treg-Entwicklung und -Funktion vom verwendeten experimentellen System und dem Zelltyp, murine oder humane T-Zellen, abhängig ist. Dabei scheint entscheidend zu sein, zu welchem Zeitpunkt der T-Zellaktivierung PKB aktiv ist und wie stark die PKB-vermittelten Signale sind, wobei sehr starke PKB-Signale der Treg-Entwicklung und -

Funktion entgegenzuwirken scheinen. Zusätzlich beeinflussen die Stärke und Dauer der TCR- und CD28-vermittelten Signale die iTreg-Entwicklung. In unserem Modellsystem ist die Expression tg aktiver PKB im Vergleich zu transfizierter oder transduzierter PKB wahrscheinlich moderater und entspricht der Expression endogener aktiver PKB (Na et al., 2003). Tg PKB ist für die nTreg-Entwicklung im Thymus nicht hinderlich, führt zu einer Zunahme peripherer nTreg und einer erhöhten nTreg-Suppressorkapazität (Pierau et al., 2009). Die tg PKB-Signale scheinen daher innerhalb einer bestimmten „Signalbreite“ zu operieren und toleriert zu werden und sogar förderlich zu sein, während PKB-Signale oberhalb bestimmter Schwellenwerte die Treg-Bildung und deren Funktion wahrscheinlich hemmen und die Treg in Richtung Effektorzellen treiben.

Ein weiteres zentrales Ergebnis der Untersuchungen ist, dass unter Th17-polarisierenden Bedingungen tg PKB die Differenzierung zu Th17-Zellen minderte und stattdessen die Foxp3-Expression förderte. Die Transkriptionsfaktoren ROR γ t, IRF4 und STAT3 kontrollieren die Th17-Differenzierung (Ivanov et al., 2006; Yang et al., 2008; Brustle et al., 2007). Interessanterweise war die IRF4- und ROR γ t-Expression in wt und PKBtg Kulturen vergleichbar, so dass eine reduzierte Expression dieser Faktoren für die verminderte Th17-Entwicklung nicht verantwortlich sein sollte. Auch ROR α wird durch TGF β 1, IL-6 und STAT3 induziert und wurde als neuer Th17-spezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben (Hwang, 2010). Mäuse doppelt-defizient für ROR γ t und ROR α zeigen keine IL-17-Produktion und dementsprechend lässt sich keine EAE in diesen Mäusen induzieren. Trotz der Bedeutung von IRF4 für die Th17-Entwicklung, sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ungeklärt. Da tg PKB auch die IRF4-Expression nicht direkt beeinflusste, könnte weiterhin untersucht werden, ob erhöhte PKB-Signale die Expression von ROR α oder die Aktivität von ROR α , ROR γ t und IRF4 bzw. deren Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren moduliert und darüber eventuell die IL-17-Produktion reduziert.

Unter Th17-induzierenden Bedingungen wiesen PKBtg T-Zellen am Tag 3 eine verstärkte nukleäre Expression von pSTAT1, pSTAT3, pSTAT5 und pSTAT6 auf. Diese Faktoren könnten an der reduzierten IL-17-Produktion und verstärkten Foxp3-Expression unter Th17-polarisierenden Bedingungen in den PKBtg T-Zellen beteiligt sein. STAT1, STAT5 und STAT6 beeinflussen die IL-17-Produktion auf negative

Weise (Adamson et al., 2009). STAT5- und IL-2-defiziente Mäuse zeigen dementsprechend erhöhte IL-17-Mengen im Serum (Laurence et al., 2007). Wie die IL-17-Produktion unterdrückt wird, ist weitgehend unbekannt, es wird aber vermutet, dass die STAT5-vermittelte Foxp3-Expression die ROR γ t-Aktivität unterbindet (Adamson et al., 2009). Andererseits könnte STAT5 direkt mit STAT3 um die Bindungsstelle am IL-17-Promotor konkurrieren und somit die Transaktivierung des IL-17-Gens verhindern. Eine weitere Variante ist, dass STAT5 die SOCS3-Expression verstärkt, wodurch STAT3 und somit der IL-6-Signalweg und die Th17-Differenzierung inhibiert wird (Adamson et al., 2009; Palmer und Restifo, 2009). SOCS1-Deletion reduziert ebenfalls die Th17-Differenzierung und entsprechende Mäuse weisen eine verminderte, durch Th17-Zellen vermittelte Autoimmunität auf (Tanaka et al., 2008).

Im Zusammenhang mit STAT1 wurde gezeigt, dass T-bet die Th17-Differenzierung beeinflusst. So produzieren STAT1- und T-bet-defiziente T-Zellen größere Mengen an IL-17 als vergleichbare wt T-Zellen (Villarino et al., 2010). Allerdings ist ungeklärt, ob T-bet direkt oder indirekt die IL-17-Produktion mindert und der ROR γ t-Funktion entgegenwirkt. Der mit T-bet interagierende Transkriptionsfaktor Ets-1 hemmt ebenfalls die Th17-Differenzierung. Ets-1^{-/-} T-Zellen differenzieren vorzugsweise in Th17-Zellen und weisen eine erhöhte IL-22-R- und IL-23-R-Expression auf (Moisan et al., 2007). Eine direkte Bindung von Ets-1 an den IL-17-Promotor konnte bisher allerdings nicht gezeigt werden.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass BATF (*B-cell activating transcription factor*) die Th17-Differenzierung fördert. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von BATF-defizienten Mäusen produzieren kein IL-17, weder *in vivo* noch *in vitro*, die Treg-Entwicklung in den Mäusen ist erhöht und sie entwickeln dementsprechend keine EAE (Schraml et al., 2009). Eine erhöhte ROR γ t-Expression konnte die verminderte IL-17-Produktion in BATF-defizienten Th-Zellen allerdings nicht aufheben.

Trotz erhöhter pSTAT-Expression in PKBtg Zellen beeinflussten erhöhte PKB-Signale unter Th17-induzierenden Konditionen die Produktion von IL-4, IL-2, IL-13, IL-21 und IL-10 nicht wesentlich. Es ist daher anzunehmen, dass die reduzierte IL-17-Produktion in PKBtg CD4⁺ T-Zellen nicht auf eine indirekte Inhibition durch die Th17-Differenzierung hemmende Zytokine zurückzuführen ist. Dennoch wäre es

interessant zu klären, ob PKB-Signale die BATF-, T-bet- und Ets-1-Expression beeinflussen.

Neben erhöhter STAT-Aktivierung war auch eine verstärkte Expression von pERK1/2 und pSAPK/JNK unter Th17-induzierenden Stimulationsbedingungen in den PKBtg, nicht aber in wt Zellen detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass PKB-Signale die ERK1/2- und SAPK/JNK-Aktivierung fördern und diese auf die Th-17-Differenzierung hemmend wirken könnten. Eine TGF β 1-JNK-c-Jun-vermittelte Inhibition der Eomesodermin-Expression ist allerdings für die Induktion der Th17-Differenzierung muriner CD4⁺ T-Zellen notwendig (Ichiyama et al., 2011). Eomesodermin bindet direkt an den IL-17- und RORc-Promotor und unterbindet deren Transkription. Ob PKB die JNK-vermittelte Eomesodermin-Repression verhindert, bliebe daher zu klären.

Zusammenfassend zeigen die gewonnenen Daten, dass erhöhte PKB-Signale die Differenzierung von iTreg- und Th17-Zellen reziprok beeinflussen. PKB spielt somit eine zentrale Rolle bei der Steuerung entzündlicher und autoimmuner versus immunsuppressiver Prozesse. Bei der Hemmung der Th17-Differenzierung durch erhöhte PKB-Signale ist die Aktivierung der Smad2, 3, 4-Faktoren und Expression von IRF4 und ROR γ t markanterweise nicht verändert. Vielmehr scheint PKB durch Beeinflussung des „STAT-Cocktails“, v.a. durch verstärkte STAT5- und STAT6-Aktivierung sowie durch verstärkte ERK/JNK-Aktivierung, die Differenzierung naiver T-Zellen bevorzugt in die iTreg-Richtung zu dirigieren. Die „Resistenz“ TCR-stimulierter PKBtg T-Zellen gegenüber TGF β 1 könnte zur Aktivierung naiver T-Zellen trotz fehlender CD28-Kostimulation beitragen und derart zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen führen. Diese PKB-vermittelte „TGF β 1-Resistenz“ könnte zugleich die Transformation von T-Zellen oder deren Tumorprogression fördern und bei der vielfach beobachteten Resistenz von Tumorzellen gegenüber TGF β 1 von zentraler Bedeutung sein.

5 Zusammenfassung

Proteinkinase B (PKB/Akt) wird durch TCR- und CD28-Signale sowie Zytokine aktiviert und fördert die Proliferation und das Überleben von T-Zellen. Verstärkte PKB-Signale sind daher mit der Tumorprogression assoziiert. *Transforming growth factor β 1* (TGF β 1) degegen gehört zu den potentesten Immunsuppressoren und ist für die Differenzierung peripherer T-Zellen in immunsuppressive regulatorische T-Zellen (iTreg) oder pro-inflammatorische Th17-Zellen essentiell. Es sollte daher in der vorliegenden Dissertation geklärt werden, wie konstitutiv-aktive myrPKB (PKB tg) TGF β 1-vermittelte Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse naiver T-Zellen beeinflusst. Wildtyp und CD28^{-/-} naive T-Zellen wurden bei TCR/CD3-Stimulation durch TGF β 1 in der Proliferation gehemmt. Hingegen wirkte TGF β 1 auf PKB tg wt und CD28^{-/-} T-Zellen nicht hemmend, da sie so gut expandierten wie wt Zellen nach CD3+CD28-Ak-Stimulation. Insgesamt zeigte die höhere CD25-, CD69- und CD98-Expression und Zellgröße sowie die geringere Hemmung von mTOR und pS6, dass PKB-Signale die inhibitorische Wirkung von TGF β 1 aufheben (bei CD3-Stimulation) bzw. abmindern (bei CD3+CD28-Stimulation). PKBtg und PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T-Zellen differenzierten bei alleiniger CD3-Stimulation in Anwesenheit von TGF β 1 effizient zu iTreg, im Gegensatz zu wt T-Zellen, die auch hier auf CD28-Kostimulation angewiesen waren. Auf molekularer Ebene induzierten erhöhte PKB-Signale eine verstärkte und anhaltende Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5, eine verminderte NFATc1-Aktivierung und die Expression von Foxp3, des „master“ Regulators für die iTreg-Differenzierung. TGF β 1-induzierte Smad-Proteine wurden in wt und PKB tg Zellen dagegen gleich gut aktiviert. Hinsichtlich der Th17-Polarisierung wirkten erhöhte PKB-Signale dagegen inhibierend, obwohl die Expression der Transkriptionsfaktoren ROR γ t und IRF4, welche die Th17-Differenzierung kontrollieren, vergleichbar war. Jedoch wurden in PKB tg T-Zellen STAT3, STAT1 und v.a. STAT5 und pSTAT6 verstärkt aktiviert, d.h. Transkriptionsfaktoren, die die Th17-Differenzierung hemmen bzw. die iTreg-Differenzierung fördern. Ein verändertes Zytokinprofil wurde dabei nicht festgestellt, so dass eine indirekte Hemmung der Th17-Differenzierung in PKB tg Zellen durch inhibitorische Zytokine eher nicht zutrifft. Somit reguliert PKB durch Beeinflussung des „STAT-Cocktails“ sowie der mTOR-S6-Signalachse TGF β 1-induzierte Differenzierungsprozesse und derart die Plastizität von Th-Zellen und die Immunbalance. Erhöhte PKB-Signale machen zudem CD28-Kostimulation abdingbar, so dass TCR-Aktivierung trotz TGF β 1 und fehlender CD28-Kostimulation zu einer Aktivierung naiver T-Zellen führen kann. Diese „Resistenz“ gegenüber TGF β könnte in speziellen Situationen zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen beitragen oder die Transformation von T-Zellen und deren Tumorprogression fördern.

6 Summary

Protein kinase B (PKB/Akt) is activated by TCR and CD28 signals as well as cytokines and promotes the proliferation and survival of T cells. Increased PKB signals are often associated with tumor progression. In contrast, transforming growth factor β 1 (TGF β 1) is one of the most potent immunosuppressants. It is also essential for the differentiation of immunosuppressive regulatory T cells (Treg) as well as proinflammatory Th17 cells. Here, we analyzed the effects of a constitutively active form of PKB α (PKBtg) on TGF β 1-mediated activation and differentiation processes of naive CD4⁺ T cells.

TCR/CD3-induced proliferation of wild-type (wt) and CD28^{-/-} naive T cells was strongly inhibited in the presence of TGF β 1. Intriguingly, TGF β 1 had no effect on the proliferation of PKBtg and PKBtg CD28^{-/-} T cells, since both cell types expanded as well as wt T cells stimulated with CD3+CD28-Ab. Higher expression of CD25, CD69 and CD98, increased cell size and sustained mTOR and S6 activation showed that PKB signals abrogate (for CD3-Ab stimulation) or reduce (for CD3+CD28-Ab stimulation) the inhibitory effect of TGF β 1. PKBtg and PKBtg CD28^{-/-} CD4⁺ T cells efficiently differentiated into iTreg upon CD3-Ab stimulation in the presence of TGF β 1, in contrast to wt T cells which required CD28 costimulation. On the molecular level, elevated PKB signals in CD3-Ab +TGF β 1 stimulated T cells enhanced and sustained the activation of the transcription factor STAT5, reduced nuclear NFATc1 levels and induced the expression of Foxp3, the "master" regulator for iTreg differentiation. Surprisingly, TGF β 1-induced activation of Smad proteins was similar in wt and PKBtg T cells. On the other hand, elevated PKB signals strongly impaired the differentiation of naïve CD4⁺ T cells into Th17 cells, despite similar expression of the transcription factors ROR γ t and IRF4, which normally control the differentiation of Th17 cells. Notably, in PKBtg T cells the expression of pSTAT3, pSTAT1 and even more so of pSTAT5 and pSTAT6 was found to be increased, i.e. of transcription factors known to inhibit Th17 differentiation and to promote iTreg formation. PKBtg CD4⁺ T cells showed the same cytokine profile as wt T cells under Th17 polarizing conditions, indicating that inhibition of Th17 differentiation does not result from secretion of inhibitory cytokines. Altogether, the data show that PKB strongly affects TGF β 1-induced differentiation processes and, thereby, the plasticity of Th cell differentiation via enhancing mTOR-S6 signalling and altering the available cocktail of STAT factors. In addition, elevated PKB signals make CD28 costimulation dispensable, enabling naïve T cells to proliferate upon TCR ligation in the presence of TGF β 1. This resistance to inhibitory TGF β 1 signals may enhance T cell autoreactivity and promote T cell transformation and tumor progression.

7 Literatur

- Adamson, A.S., Collins, K., Laurence, A. and O'Shea, J.J.** (2009), 'The Current STATUS of lymphocyte signaling: new roles for old players', *Curr Opin Immunol*, 21, 2, 161-6.
- Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L. and Murphy, K.M.** (2002), 'T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells', *Nat Immunol*, 3, 6, 549-57.
- Agnello, D., Lankford, C.S., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J.J. and Frucht, D.M.** (2003), 'Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights', *J Clin Immunol*, 23, 3, 147-61.
- Ahmed, N.N., Franke, T.F., Bellacosa, A., Datta, K., Gonzalez-Portal, M.E., Taguchi, T., Testa, J.R. and Tschlis, P.N.** (1993), 'The proteins encoded by c-akt and v-akt differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential', *Oncogene*, 8, 7, 1957-63.
- Akbari, O., Stock, P., DeKruyff, R.H. and Umetsu, D.T.** (2003), 'Role of regulatory T cells in allergy and asthma', *Curr Opin Immunol*, 15, 6, 627-33.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. and Hemmings, B.A.** (1996), 'Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1', *Embo J*, 15, 23, 6541-51.
- Altomare, D.A., Lyons, G.E., Mitsuuchi, Y., Cheng, J.Q. and Testa, J.R.** (1998), 'Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin', *Oncogene*, 16, 18, 2407-11.
- Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R. and Hawkins, P.T.** (1998), 'Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B', *Curr Biol*, 8, 12, 684-91.
- Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M. and Hemmings, B.A.** (1997), 'Role of translocation in the activation and function of protein kinase B', *J Biol Chem*, 272, 50, 31515-24.
- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T.C., Cumano, A. and Bandeira, A.** (2001), 'CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10', *J Immunol*, 166, 5, 3008-18.
- Annes, J.P., Munger, J.S. and Rifkin, D.B.** (2003), 'Making sense of latent TGFbeta activation', *J Cell Sci*, 116, Pt 2, 217-24.
- Aoki, M., Batista, O., Bellacosa, A., Tschlis, P. and Vogt, P.K.** (1998), 'The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 25, 14950-5.
- Arora, K. and Warrior, R.** (2001), 'A new Smurf in the village', *Dev Cell*, 1, 4, 441-2.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P.** (1999), 'A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity', *Science*, 286, 5441, 958-61.

- Avota, E., Avots, A., Niewiesk, S., Kane, L.P., Bommhardt, U., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S.** (2001), 'Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus', *Nat Med*, 7, 6, 725-31.
- Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T. and Hirai, H.** (2003), 'Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions', *Cancer Res*, 63, 15, 4516-20.
- Bacon, C.M., McVicar, D.W., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., O'Shea, J.J. and Johnston, J.A.** (1995), 'Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12', *J Exp Med*, 181, 1, 399-404.
- Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L. and Arteaga, C.L.** (2000), 'Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration', *J Biol Chem*, 275, 47, 36803-10.
- Barkett, M. and Gilmore, T.D.** (1999), 'Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors', *Oncogene*, 18, 49, 6910-24.
- Battaglia, M. and Roncarolo, M.G.** (2009), 'The Tregs' world according to GARP', *Eur J Immunol*, 39, 12, 3296-300.
- Battaglia, M., Stabilini, A. and Roncarolo, M.G.** (2005), 'Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells', *Blood*, 105, 12, 4743-8.
- Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N.M., Danilenko, D.M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F.J. and Ghilardi, N.** (2006), 'Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells', *Nat Immunol*, 7, 9, 929-36.
- Bayer, A.L., Lee, J.Y., de la Barrera, A., Surh, C.D. and Malek, T.R.** (2008), 'A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells', *J Immunol*, 181, 1, 225-34.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P. and Tsichlis, P.N.** (1991), 'A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region', *Science*, 254, 5029, 274-7.
- Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M. and Noelle, R.J.** (2007), 'All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation', *J Exp Med*, 204, 8, 1765-74.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L. and Kuchroo, V.K.** (2006), 'Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells', *Nature*, 441, 7090, 235-8.
- Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L. and Moses, H.L.** (2001), 'Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism', *Mol Biol Cell*, 12, 1, 27-36.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P. and Lodish, H.F.** (2000), 'Role of transforming growth factor beta in human disease', *N Engl J Med*, 342, 18, 1350-8.
- Bommhardt, U., Beyer, M., Hunig, T. and Reichardt, H.M.** (2004), 'Molecular and cellular mechanisms of T cell development', *Cell Mol Life Sci*, 61, 3, 263-80.

- Bomhardt, U., Chang, K.C., Swanson, P.E., Wagner, T.H., Tinsley, K.W., Karl, I.E. and Hotchkiss, R.S.** (2004), 'Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis', *J Immunol*, 172, 12, 7583-91.
- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., Stoll, S., Schild, H., Staeger, M.S., Stassen, M., Jonuleit, H. and Schmitt, E.** (2007), 'Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression', *J Exp Med*, 204, 6, 1303-10.
- Boulay, J.L., O'Shea, J.J. and Paul, W.E.** (2003), 'Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors', *Immunity*, 19, 2, 159-63.
- Brabletz, T., Pfeuffer, I., Schorr, E., Siebelt, F., Wirth, T. and Serfling, E.** (1993), 'Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site', *Mol Cell Biol*, 13, 2, 1155-62.
- Brown, T.L., Patil, S. and Howe, P.H.** (2000), 'Analysis of TGF-beta-inducible apoptosis', *Methods Mol Biol*, 142, 149-67.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F. and Ramsdell, F.** (2001), 'Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse', *Nat Genet*, 27, 1, 68-73.
- Brustle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplanter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T.W., Kamradt, T. and Lohoff, M.** (2007), 'The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4', *Nat Immunol*, 8, 9, 958-66.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B. and Farrar, M.A.** (2007), 'Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis', *Immunol Lett*, 114, 1, 1-8.
- Burgering, B.M. and Medema, R.H.** (2003), 'Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty', *J Leukoc Biol*, 73, 6, 689-701.
- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R. and Ley, T.J.** (2007), 'Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance', *Immunity*, 27, 4, 635-46.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J.C.** (1998), 'Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation', *Science*, 282, 5392, 1318-21.
- Carnero, A.** (2010), 'The PKB/AKT pathway in cancer', *Curr Pharm Des*, 16, 1, 34-44.
- Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y.W., Zeckner, D.J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M.H., Blanchard, K.L. and Thomas, J.E.** (2007), 'A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer', *Nature*, 448, 7152, 439-44.
- Chai, J.G., Xue, S.A., Coe, D., Addey, C., Bartok, I., Scott, D., Simpson, E., Stauss, H.J., Hori, S., Sakaguchi, S. and Dyson, J.** (2005), 'Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance', *Transplantation*, 79, 10, 1310-6.

- Chang, H., Brown, C.W. and Matzuk, M.M.** (2002), 'Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily', *Endocr Rev*, 23, 6, 787-823.
- Chang, Z., Zhang, Q., Feng, Q., Xu, J., Teng, T., Luan, Q., Shan, C., Hu, Y., Hemmings, B.A., Gao, X. and Yang, Z.** (2010), 'Deletion of Akt1 causes heart defects and abnormal cardiomyocyte proliferation', *Dev Biol*, 347, 2, 384-91.
- Chapoval, S., Dasgupta, P., Dorsey, N.J. and Keegan, A.D.** (2010), 'Regulation of the T helper cell type 2 (Th2)/T regulatory cell (Treg) balance by IL-4 and STAT6', *J Leukoc Biol*, 87, 6, 1011-8.
- Chen, C.R., Kang, Y. and Massague, J.** (2001), 'Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3, 992-9.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. and Wahl, S.M.** (2003), 'Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3', *J Exp Med*, 198, 12, 1875-86.
- Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T. and Hay, N.** (2001), 'Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene', *Genes Dev*, 15, 17, 2203-8.
- Chen, X.G., Liu, F., Song, X.F., Wang, Z.H., Dong, Z.Q., Hu, Z.Q., Lan, R.Z., Guan, W., Zhou, T.G., Xu, X.M., Lei, H., Ye, Z.Q., Peng, E.J., Du, L.H. and Zhuang, Q.Y.** (2010), 'Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways', *Mol Carcinog*, 49, 6, 603-10.
- Cheng, G., Yu, A. and Malek, T.R.** (2011), 'T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells', *Immunol Rev*, 241, 1, 63-76.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I. and Birnbaum, M.J.** (2001(a)), 'Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)', *Science*, 292, 5522, 1728-31.
- Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F. and Birnbaum, M.J.** (2001(b)), 'Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice', *J Biol Chem*, 276, 42, 38349-52.
- Coffer, P.J. and Woodgett, J.R.** (1991), 'Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families', *Eur J Biochem*, 201, 2, 475-81.
- Conery, A.R., Cao, Y., Thompson, E.A., Townsend, C.M., Jr., Ko, T.C. and Luo, K.** (2004), 'Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis', *Nat Cell Biol*, 6, 4, 366-72.
- Crellin, N.K., Garcia, R.V. and Levings, M.K.** (2007), 'Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4+CD25+ T regulatory cells', *Blood*, 109, 5, 2014-22.
- Croft, M.** (2010), 'Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134)', *Annu Rev Immunol*, 28, 57-78.
- Croft, M., So, T., Duan, W. and Soroosh, P.** (2009), 'The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease', *Immunol Rev*, 229, 1, 173-91.

- Cruz, A., Khader, S.A., Torrado, E., Fraga, A., Pearl, J.E., Pedrosa, J., Cooper, A.M. and Castro, A.G.** (2006), 'Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection', *J Immunol*, 177, 3, 1416-20.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson, K.L., Chen, L. and Zou, W.** (2004), 'Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival', *Nat Med*, 10, 9, 942-9.
- Dang, C.V.** (1999), 'c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism', *Mol Cell Biol*, 19, 1, 1-11.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., Khoury, S., Oukka, M. and Kuchroo, V.K.** (2008), 'IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells', *Nat Immunol*, 9, 12, 1347-55.
- Das, S.K., Hashimoto, T., Shimizu, K., Yoshida, T., Sakai, T., Sowa, Y., Komoto, A. and Kanazawa, K.** (2005), 'Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1', *Biochim Biophys Acta*, 1726, 3, 328-35.
- Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E.** (1999), 'Cellular survival: a play in three Acts', *Genes Dev*, 13, 22, 2905-27.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E.** (1997), 'Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery', *Cell*, 91, 2, 231-41.
- Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y. and Wang, X.F.** (1995), 'Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 12, 5545-9.
- De Benedetti, A., Joshi-Barve, S., Rinker-Schaeffer, C. and Rhoads, R.E.** (1991), 'Expression of antisense RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLa cells results in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of both eIF-4E and the p220 component of eIF-4F', *Mol Cell Biol*, 11, 11, 5435-45.
- de Caestecker, M.P., Parks, W.T., Frank, C.J., Castagnino, P., Bottaro, D.P., Roberts, A.B. and Lechleider, R.J.** (1998), 'Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases', *Genes Dev*, 12, 11, 1587-92.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H. and Scheffold, A.** (2004), 'Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function', *Eur J Immunol*, 34, 9, 2480-8.
- Delgoffe, G.M., Kole, T.P., Zheng, Y., Zarek, P.E., Matthews, K.L., Xiao, B., Worley, P.F., Kozma, S.C. and Powell, J.D.** (2009), 'The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment', *Immunity*, 30, 6, 832-44.
- Derynck, R. and Zhang, Y.E.** (2003), 'Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling', *Nature*, 425, 6958, 577-84.

- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T. and Schuler, G.** (2001), 'Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood', *J Exp Med*, 193, 11, 1303-10.
- Donepudi, M. and Grutter, M.G.** (2002), 'Structure and zymogen activation of caspases', *Biophys Chem*, 101-102, 145-53.
- Dummler, B., Tschopp, O., Hynx, D., Yang, Z.Z., Dirnhofer, S. and Hemmings, B.A.** (2006), 'Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies', *Mol Cell Biol*, 26, 21, 8042-51.
- Earle, K.E., Tang, Q., Zhou, X., Liu, W., Zhu, S., Bonyhadi, M.L. and Bluestone, J.A.** (2005), 'In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation', *Clin Immunol*, 115, 1, 3-9.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T. and Miyazono, K.** (2001), 'Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation', *J Biol Chem*, 276, 16, 12477-80.
- Edlund, S., Landstrom, M., Heldin, C.H. and Aspenstrom, P.** (2002), 'Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA', *Mol Biol Cell*, 13, 3, 902-14.
- Engel, M.E., McDonnell, M.A., Law, B.K. and Moses, H.L.** (1999), 'Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription', *J Biol Chem*, 274, 52, 37413-20.
- Engelmann, S.** (2011), 'Der Einfluss der Proteinkinase B (PKB/Akt) auf Differenzierungsprozesse von T-Helferzellen und den Verlauf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE).' *Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg*, Doktorarbeit.
- Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F.G., Higgins, J.P., Negrin, R.S., Fathman, C.G. and Strober, S.** (2005), 'Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD', *Blood*, 105, 5, 2220-6.
- Esplugues, E., Sancho, D., Vega-Ramos, J., Martinez, C., Syrbe, U., Hamann, A., Engel, P., Sanchez-Madrid, F. and Lauzurica, P.** (2003), 'Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69', *J Exp Med*, 197, 9, 1093-106.
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C., Santamaria, P., Fioretti, M.C. and Puccetti, P.** (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', *J Immunol*, 176, 11, 6752-61.
- Fang, D. and Liu, Y.C.** (2001), 'Proteolysis-independent regulation of PI3K by Cbl-b-mediated ubiquitination in T cells', *Nat Immunol*, 2, 9, 870-5.
- Fayard, E., Gill, J., Paolino, M., Hynx, D., Hollander, G.A. and Hemmings, B.A.** (2007), 'Deletion of PKBalpha/Akt1 affects thymic development', *PLoS One*, 2, 10, e992.
- Feng, X.H., Lin, X. and Derynck, R.** (2000), 'Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta', *Embo J*, 19, 19, 5178-93.

- Ferber, I.A., Lee, H.J., Zonin, F., Heath, V., Mui, A., Arai, N. and O'Garra, A.** (1999), 'GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels', *Clin Immunol*, 91, 2, 134-44.
- Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G.R., Jones, C.E. and Trifilieff, A.** (2003), 'IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger', *J Immunol*, 170, 4, 2106-12.
- Finlay, D.K., Sinclair, L.V., Feijoo, C., Waugh, C.M., Hagenbeek, T.J., Spits, H. and Cantrell, D.A.** (2009), 'Phosphoinositide-dependent kinase 1 controls migration and malignant transformation but not cell growth and proliferation in PTEN-null lymphocytes', *J Exp Med*, 206, 11, 2441-54.
- Flajnik, M.F. and Du Pasquier, L.** (2004), 'Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?' *Trends Immunol*, 25, 12, 640-4.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A. and Huehn, J.** (2007), 'Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells', *PLoS Biol*, 5, 2, e38.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A. and Rudensky, A.Y.** (2003), 'Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells', *Nat Immunol*, 4, 4, 330-6.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A. and Rudensky, A.Y.** (2005), 'A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells', *Nat Immunol*, 6, 11, 1142-51.
- Foster, K.G. and Fingar, D.C.** (2010), 'Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony', *J Biol Chem*, 285, 19, 14071-7.
- Foxwell, B.M., Beadling, C., Guschin, D., Kerr, I. and Cantrell, D.** (1995), 'Interleukin-7 can induce the activation of Jak 1, Jak 3 and STAT 5 proteins in murine T cells', *Eur J Immunol*, 25, 11, 3041-6.
- Fragale, A., Gabriele, L., Stellacci, E., Borghi, P., Perrotti, E., Ilari, R., Lanciotti, A., Remoli, A.L., Venditti, M., Belardelli, F. and Battistini, A.** (2008), 'IFN regulatory factor-1 negatively regulates CD4+ CD25+ regulatory T cell differentiation by repressing Foxp3 expression', *J Immunol*, 181, 3, 1673-82.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C. and Toker, A.** (1997), 'Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate', *Science*, 275, 5300, 665-8.
- Frias, M.A., Thoreen, C.C., Jaffe, J.D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S.A. and Sabatini, D.M.** (2006), 'mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s', *Curr Biol*, 16, 18, 1865-70.
- Funaba, M., Zimmerman, C.M. and Mathews, L.S.** (2002), 'Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase', *J Biol Chem*, 277, 44, 41361-8.
- Gabrysova, L., Christensen, J.R., Wu, X., Kissenpfennig, A., Malissen, B. and O'Garra, A.** (2011), 'Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF-beta-dependent differentiation and maintenance of Foxp3+ regulatory T cells', *Eur J Immunol*, 41, 5, 1242-8.
- Galderisi, U., Jori, F.P. and Giordano, A.** (2003), 'Cell cycle regulation and neural differentiation', *Oncogene*, 22, 33, 5208-19.
- Gao, T., Furnari, F. and Newton, A.C.** (2005), 'PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth', *Mol Cell*, 18, 1, 13-24.

- Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., McNeish, J.D. and Coleman, K.G.** (2003), 'Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta', *J Clin Invest*, 112, 2, 197-208.
- Gentry, L.E., Liubin, M.N., Purchio, A.F. and Marquardt, H.** (1988), 'Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide', *Mol Cell Biol*, 8, 10, 4162-8.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Martin, F. and Zitvogel, L.** (2006), 'The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression', *Immunol Rev*, 214, 229-38.
- Gorsch, S.M., Memoli, V.A., Stukel, T.A., Gold, L.I. and Arrick, B.A.** (1992), 'Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer', *Cancer Res*, 52, 24, 6949-52.
- Gottlieb, T.M., Leal, J.F., Seger, R., Taya, Y. and Oren, M.** (2002), 'Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis', *Oncogene*, 21, 8, 1299-303.
- Griswold-Prenner, I., Kamibayashi, C., Maruoka, E.M., Mumby, M.C. and Derynck, R.** (1998), 'Physical and functional interactions between type I transforming growth factor beta receptors and Balph, a WD-40 repeat subunit of phosphatase 2A', *Mol Cell Biol*, 18, 11, 6595-604.
- Groettrup, M. and von Boehmer, H.** (1993), 'A role for a pre-T-cell receptor in T-cell development', *Immunol Today*, 14, 12, 610-4.
- Gronroos, E., Hellman, U., Heldin, C.H. and Ericsson, J.** (2002), 'Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination', *Mol Cell*, 10, 3, 483-93.
- Gupta, S., Manicassamy, S., Vasu, C., Kumar, A., Shang, W. and Sun, Z.** (2008), 'Differential requirement of PKC-theta in the development and function of natural regulatory T cells', *Mol Immunol*, 46, 2, 213-24.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A.** (2000), 'The hallmarks of cancer', *Cell*, 100, 1, 57-70.
- Hannon, G.J. and Beach, D.** (1994), 'p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest', *Nature*, 371, 6494, 257-61.
- Harada, Y., Harada, Y., Elly, C., Ying, G., Paik, J.H., DePinho, R.A. and Liu, Y.C.** (2010), 'Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells', *J Exp Med*, 207, 7, 1381-91.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. and Weaver, C.T.** (2005), 'Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages', *Nat Immunol*, 6, 11, 1123-32.
- Harris, T.J., Grosso, J.F., Yen, H.R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E.L., Getnet, D., Goldberg, M.V., Maris, C.H., Housseau, F., Yu, H., Pardoll, D.M. and Drake, C.G.** (2007), 'Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity', *J Immunol*, 179, 7, 4313-7.
- Hawrylowicz, C.M. and O'Garra, A.** (2005), 'Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma', *Nat Rev Immunol*, 5, 4, 271-83.
- Haxhinasto, S., Mathis, D. and Benoist, C.** (2008), 'The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells', *J Exp Med*, 205, 3, 565-74.

- Hay, N. and Sonenberg, N.** (2004), 'Upstream and downstream of mTOR', *Genes Dev*, 18, 16, 1926-45.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L. and Falb, D.** (1997), 'The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling', *Cell*, 89, 7, 1165-73.
- Hebenstreit, D., Horejs-Hoeck, J. and Duschl, A.** (2005), 'JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines', *Drug News Perspect*, 18, 4, 243-9.
- Ho, L. and Crabtree, G.** (2006), 'A Foxy tango with NFAT', *Nat Immunol*, 7, 9, 906-8.
- Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S.** (2003), 'Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3', *Science*, 299, 5609, 1057-61.
- Hresko, R.C. and Mueckler, M.** (2005), 'mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes', *J Biol Chem*, 280, 49, 40406-16.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A. and Murphy, K.M.** (1993), 'Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages', *Science*, 260, 5107, 547-9.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., Zhu, L. and Hsueh, A.J.** (1997), 'Interference of BAD (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and P11', *Mol Endocrinol*, 11, 12, 1858-67.
- Huang, J. and Manning, B.D.** (2009), 'A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes', *Biochem Soc Trans*, 37, Pt 1, 217-22.
- Huber, S., Schramm, C., Lehr, H.A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P.R., Neurath, M.F. and Blessing, M.** (2004), 'Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells', *J Immunol*, 173, 11, 6526-31.
- Huehn, J., Polansky, J.K. and Hamann, A.** (2009), 'Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?' *Nat Rev Immunol*, 9, 2, 83-9.
- Hunter, T. and Pines, J.** (1994), 'Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age', *Cell*, 79, 4, 573-82.
- Hwang, E.S.** (2010), 'Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation', *Yonsei Med J*, 51, 4, 484-91.
- Ichiyama, K., Sekiya, T., Inoue, N., Tamiya, T., Kashiwagi, I., Kimura, A., Morita, R., Muto, G., Shichita, T., Takahashi, R. and Yoshimura, A.** (2011), 'Transcription factor Smad-independent T helper 17 cell induction by transforming-growth factor-beta is mediated by suppression of eomesodermin', *Immunity*, 34, 5, 741-54.
- Ihle, J.N.** (1995), 'Cytokine receptor signalling', *Nature*, 377, 6550, 591-4.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. and Miyazono, K.** (1997), 'Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily', *Nature*, 389, 6651, 622-6.
- Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C. and Kamradt, T.** (2000), 'Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells', *J Immunol*, 165, 11, 6107-15.

- Irmiler, I.M., Gajda, M. and Brauer, R.** (2007), 'Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response', *J Immunol*, 179, 9, 6228-36.
- Ishii, N., Takahashi, T., Soroosh, P. and Sugamura, K.** (2010), 'OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology', *Adv Immunol*, 105, 63-98.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. and Sakaguchi, S.** (1999), 'Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance', *J Immunol*, 162, 9, 5317-26.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M.J. and Ten Dijke, P.** (2000), 'Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins', *Eur J Biochem*, 267, 24, 6954-67.
- Itoh, S., Landstrom, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C.H., Heldin, N.E. and ten Dijke, P.** (1998), 'Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7', *J Biol Chem*, 273, 44, 29195-201.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J. and Littman, D.R.** (2006), 'The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells', *Cell*, 126, 6, 1121-33.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J. and Su, B.** (2006), 'SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity', *Cell*, 127, 1, 125-37.
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J., Holmes, A.B. and Alessi, D.R.** (1996), 'Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation', *Biochem J*, 315 (Pt 3), 709-13.
- Jeon, M.S., Atfield, A., Venuprasad, K., Krawczyk, C., Sarao, R., Elly, C., Yang, C., Arya, S., Bachmaier, K., Su, L., Bouchard, D., Jones, R., Gronski, M., Ohashi, P., Wada, T., Bloom, D., Fathman, C.G., Liu, Y.C. and Penninger, J.M.** (2004), 'Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction', *Immunity*, 21, 2, 167-77.
- Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.H., Dakhama, A. and Gelfand, E.W.** (2007), 'Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta', *J Immunol*, 178, 3, 1433-42.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F. and Hemmings, B.A.** (1991), 'Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 10, 4171-5.
- Jones, R.G., Elford, A.R., Parsons, M.J., Wu, L., Krawczyk, C.M., Yeh, W.C., Hakem, R., Rottapel, R., Woodgett, J.R. and Ohashi, P.S.** (2002), 'CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly', *J Exp Med*, 196, 3, 335-48.
- Jones, R.G., Parsons, M., Bonnard, M., Chan, V.S., Yeh, W.C., Woodgett, J.R. and Ohashi, P.S.** (2000), 'Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo', *J Exp Med*, 191, 10, 1721-34.

- Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D. and Weiss, A.** (1999), 'Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase', *Curr Biol*, 9, 11, 601-4.
- Kappler, J.W., Roehm, N. and Marrack, P.** (1987), 'T cell tolerance by clonal elimination in the thymus', *Cell*, 49, 2, 273-80.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H. and Wrana, J.L.** (2000), 'Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation', *Mol Cell*, 6, 6, 1365-75.
- Kim, H.P. and Leonard, W.J.** (2007), 'CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation', *J Exp Med*, 204, 7, 1543-51.
- Kim, J.M. and Rudensky, A.** (2006), 'The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells', *Immunol Rev*, 212, 86-98.
- Kimura, A., Naka, T. and Kishimoto, T.** (2007), 'IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 29, 12099-104.
- Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K. and Taga, T.** (2000), 'BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6', *J Biol Chem*, 275, 23, 17647-52.
- King, C.G., Kobayashi, T., Cejas, P.J., Kim, T., Yoon, K., Kim, G.K., Chiffoleau, E., Hickman, S.P., Walsh, P.T., Turka, L.A. and Choi, Y.** (2006), 'TRAF6 is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis', *Nat Med*, 12, 9, 1088-92.
- Kinjo, I., Inoue, H., Hamano, S., Fukuyama, S., Yoshimura, T., Koga, K., Takaki, H., Himeno, K., Takaesu, G., Kobayashi, T. and Yoshimura, A.** (2006), 'Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1', *J Exp Med*, 203, 4, 1021-31.
- Kolls, J.K. and Linden, A.** (2004), 'Interleukin-17 family members and inflammation', *Immunity*, 21, 4, 467-76.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M. and Kuchroo, V.K.** (2007), 'IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells', *Nature*, 448, 7152, 484-7.
- Kowanetz, M., Lonn, P., Vanlandewijck, M., Kowanetz, K., Heldin, C.H. and Moustakas, A.** (2008), 'TGFbeta induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling', *J Cell Biol*, 182, 4, 655-62.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C. and von Boehmer, H.** (2005), 'Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen', *Nat Immunol*, 6, 12, 1219-27.
- Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. and Massague, J.** (1999), 'A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras', *Genes Dev*, 13, 7, 804-16.
- Kuo, Y.C., Huang, K.Y., Yang, C.H., Yang, Y.S., Lee, W.Y. and Chiang, C.W.** (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', *J Biol Chem*, 283, 4, 1882-92.

- Kurata, H., Lee, H.J., O'Garra, A. and Arai, N.** (1999), 'Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells', *Immunity*, 11, 6, 677-88.
- Kuruwilla, A.P., Shah, R., Hochwald, G.M., Liggitt, H.D., Palladino, M.A. and Thorbecke, G.J.** (1991), 'Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7, 2918-21.
- Laemmli, U.K.** (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227, 5259, 680-5.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A. and Cua, D.J.** (2005), 'IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation', *J Exp Med*, 201, 2, 233-40.
- Laplante, M. and Sabatini, D.M.** (2009), 'mTOR signaling at a glance', *J Cell Sci*, 122, Pt 20, 3589-94.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E.M. and O'Shea J, J.** (2007), 'Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation', *Immunity*, 26, 3, 371-81.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D. and Paul, W.E.** (1990), 'Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells', *J Exp Med*, 172, 3, 921-9.
- Lee, P.S., Chang, C., Liu, D. and Derynck, R.** (2003), 'Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling', *J Biol Chem*, 278, 30, 27853-63.
- Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyrna, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A. and Hamann, A.** (2002), 'Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 20, 13031-6.
- Levy, D.E. and Darnell, J.E., Jr.** (2002), 'Stats: transcriptional control and biological impact', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 9, 651-62.
- Ley, K. and Kansas, G.S.** (2004), 'Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation', *Nat Rev Immunol*, 4, 5, 325-35.
- Li, J.M., Nichols, M.A., Chandrasekharan, S., Xiong, Y. and Wang, X.F.** (1995), 'Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site', *J Biol Chem*, 270, 45, 26750-3.
- Li, M.O., Sanjabi, S. and Flavell, R.A.** (2006), 'Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms', *Immunity*, 25, 3, 455-71.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K. and Flavell, R.A.** (2006), 'Transforming growth factor-beta regulation of immune responses', *Annu Rev Immunol*, 24, 99-146.
- Li, Q. and Verma, I.M.** (2002), 'NF-kappaB regulation in the immune system', *Nat Rev Immunol*, 2, 10, 725-34.

- Liang, S., Alard, P., Zhao, Y., Parnell, S., Clark, S.L. and Kosiewicz, M.M.** (2005), 'Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus', *J Exp Med*, 201, 1, 127-37.
- Liao, Y. and Hung, M.C.** (2010), 'Physiological regulation of Akt activity and stability', *Am J Transl Res*, 2, 1, 19-42.
- Liaw, D., Marsh, D.J., Li, J., Dahia, P.L., Wang, S.I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K.M., Tsou, H.C., Peacocke, M., Eng, C. and Parsons, R.** (1997), 'Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome', *Nat Genet*, 16, 1, 64-7.
- Lim, H.W., Hillsamer, P., Banham, A.H. and Kim, C.H.** (2005), 'Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells', *J Immunol*, 175, 7, 4180-3.
- Lin, X., Liang, M., Liang, Y.Y., Brunicardi, F.C., Melchior, F. and Feng, X.H.** (2003), 'Activation of transforming growth factor-beta signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4', *J Biol Chem*, 278, 21, 18714-9.
- Lo, R.S. and Massague, J.** (1999), 'Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2', *Nat Cell Biol*, 1, 8, 472-8.
- Lockhart, E., Green, A.M. and Flynn, J.L.** (2006), 'IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection', *J Immunol*, 177, 7, 4662-9.
- Lohoff, M., Mittrucker, H.W., Prechtl, S., Bischof, S., Sommer, F., Kock, S., Ferrick, D.A., Duncan, G.S., Gessner, A. and Mak, T.W.** (2002), 'Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 18, 11808-12.
- Loser, K., Apelt, J., Voskort, M., Mohaupt, M., Balkow, S., Schwarz, T., Grabbe, S. and Beissert, S.** (2007), 'IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice', *J Immunol*, 179, 1, 365-71.
- Lu, L.F., Thai, T.H., Calado, D.P., Chaudhry, A., Kubo, M., Tanaka, K., Loeb, G.B., Lee, H., Yoshimura, A., Rajewsky, K. and Rudensky, A.Y.** (2009), 'Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein', *Immunity*, 30, 1, 80-91.
- Maehama, T. and Dixon, J.E.** (1998), 'The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate', *J Biol Chem*, 273, 22, 13375-8.
- Maerten, P., Shen, C., Bullens, D.M., Van Assche, G., Van Gool, S., Geboes, K., Rutgeerts, P. and Ceuppens, J.L.** (2005), 'Effects of interleukin 4 on CD25+CD4+ regulatory T cell function', *J Autoimmun*, 25, 2, 112-20.
- Malek, T.R.** (2008), 'The biology of interleukin-2', *Annu Rev Immunol*, 26, 453-79.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R. and Weaver, C.T.** (2006), 'Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage', *Nature*, 441, 7090, 231-4.
- Manning, B.D. and Cantley, L.C.** (2007), 'AKT/PKB signaling: navigating downstream', *Cell*, 129, 7, 1261-74.

- Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J. and Cantley, L.C.** (2002), 'Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway', *Mol Cell*, 10, 1, 151-62.
- Mantel, P.Y., Kuipers, H., Boyman, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Lambrecht, B.N., Hendriks, R.W., Cramer, R., Akdis, C.A., Blaser, K. and Schmidt-Weber, C.B.** (2007), 'GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells', *PLoS Biol*, 5, 12, e329.
- Mantel, P.Y., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K. and Schmidt-Weber, C.B.** (2006), 'Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells', *J Immunol*, 176, 6, 3593-602.
- Mao, C., Tili, E.G., Dose, M., Haks, M.C., Bear, S.E., Maroulakou, I., Horie, K., Gaitanaris, G.A., Fidanza, V., Ludwig, T., Wiest, D.L., Gounari, F. and Tsichlis, P.N.** (2007), 'Unequal contribution of Akt isoforms in the double-negative to double-positive thymocyte transition', *J Immunol*, 178, 9, 5443-53.
- Massague, J.** (2000), 'How cells read TGF-beta signals', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 3, 169-78.
- Massague, J., Blain, S.W. and Lo, R.S.** (2000), 'TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders', *Cell*, 103, 2, 295-309.
- Massague, J. and Gomis, R.R.** (2006), 'The logic of TGFbeta signaling', *FEBS Lett*, 580, 12, 2811-20.
- Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P.J., Loffing, J., Shoemaker, C.B. and Verrey, F.** (1998), 'Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family', *Nature*, 395, 6699, 288-91.
- Mayack, S.R. and Berg, L.J.** (2006), 'Cutting edge: an alternative pathway of CD4+ T cell differentiation is induced following activation in the absence of gamma-chain-dependent cytokine signals', *J Immunol*, 176, 4, 2059-63.
- Mayo, L.D. and Donner, D.B.** (2001), 'A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 20, 11598-603.
- Mazars, A., Lallemand, F., Prunier, C., Marais, J., Ferrand, N., Pessah, M., Cherqui, G. and Atfi, A.** (2001), 'Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis', *J Biol Chem*, 276, 39, 36797-803.
- McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M. and Byrne, M.C.** (2002), 'CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor', *Immunity*, 16, 2, 311-23.
- Mendez, S., Reckling, S.K., Piccirillo, C.A., Sacks, D. and Belkaid, Y.** (2004), 'Role for CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity', *J Exp Med*, 200, 2, 201-10.
- Min, B., Prout, M., Hu-Li, J., Zhu, J., Jankovic, D., Morgan, E.S., Urban, J.F., Jr., Dvorak, A.M., Finkelman, F.D., LeGros, G. and Paul, W.E.** (2004), 'Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite', *J Exp Med*, 200, 4, 507-17.

- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D. and Kaveri, S.V.** (2004), 'Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells', *J Immunol*, 172, 8, 4676-80.
- Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P. and Heldin, C.H.** (1991), 'A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1', *Embo J*, 10, 5, 1091-101.
- Moisan, J., Grenningloh, R., Bettelli, E., Oukka, M. and Ho, I.C.** (2007), 'Ets-1 is a negative regulator of Th17 differentiation', *J Exp Med*, 204, 12, 2825-35.
- Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., Page, N., Olivenstein, R., Elias, J. and Chakir, J.** (2001), 'IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines', *J Allergy Clin Immunol*, 108, 3, 430-8.
- Moseley, T.A., Haudenschild, D.R., Rose, L. and Reddi, A.H.** (2003), 'Interleukin-17 family and IL-17 receptors', *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 2, 155-74.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L.** (1986), 'Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins', *J Immunol*, 136, 7, 2348-57.
- Moustakas, A. and Heldin, C.H.** (2009), 'The regulation of TGFbeta signal transduction', *Development*, 136, 22, 3699-714.
- Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A. and Heldin, C.H.** (2002), 'Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation', *Immunol Lett*, 82, 1-2, 85-91.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. and Heldin, C.H.** (2001), 'Smad regulation in TGF-beta signal transduction', *J Cell Sci*, 114, Pt 24, 4359-69.
- Na, S.Y., Patra, A., Scheuring, Y., Marx, A., Tolaini, M., Kioussis, D., Hemmings, B.A., Hunig, T. and Bommhardt, U.** (2003), 'Constitutively active protein kinase B enhances Lck and Erk activities and influences thymocyte selection and activation', *J Immunol*, 171, 3, 1285-96.
- Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H. and Strober, W.** (2004), 'TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice', *J Immunol*, 172, 2, 834-42.
- Nakamura, K., Kitani, A. and Strober, W.** (2001), 'Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta', *J Exp Med*, 194, 5, 629-44.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H. and ten Dijke, P.** (1997), 'Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling', *Nature*, 389, 6651, 631-5.
- Newcomb, D.C., Zhou, W., Moore, M.L., Goleniewska, K., Hershey, G.K., Kolls, J.K. and Peebles, R.S., Jr.** (2009), 'A functional IL-13 receptor is expressed on polarized murine CD4+ Th17 cells and IL-13 signaling attenuates Th17 cytokine production', *J Immunol*, 182, 9, 5317-21.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J.H., DePinho, R.A. and Li, M.O.** (2010), 'Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells', *Nat Immunol*, 11, 7, 618-27.

- Ouyang, W., Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A. and Murphy, K.M. (2000), 'Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment', *Immunity*, 12, 1, 27-37.
- Ouyang, W., Ranganath, S.H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., Sha, W.C. and Murphy, K.M. (1998), 'Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism', *Immunity*, 9, 5, 745-55.
- Palmer, D.C. and Restifo, N.P. (2009), 'Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function', *Trends Immunol*, 30, 12, 592-602.
- Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D. and Moustakas, A. (2000), 'Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta', *J Biol Chem*, 275, 38, 29244-56.
- Pardo-Govea, T., Callejas, D., Nunez-Troconis, J., Araujo, M., Costa, L., Pons, H., Delgado, M. and Monsalve, F. (2005), '[Gamma interferon (IFN-gamma), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukins 2, 4 and 6 (IL-2, IL-4, IL-6) in cervical-uterine cells of intraepithelial neoplasia: a preliminary report]', *Invest Clin*, 46, 1, 5-13.
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K.P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A.M., McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D.M., Kastelein, R.A., de Waal Malefyt, R. and Moore, K.W. (2002), 'A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R', *J Immunol*, 168, 11, 5699-708.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. and Dong, C. (2005), 'A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17', *Nat Immunol*, 6, 11, 1133-41.
- Patra, A.K., Drewes, T., Engelmann, S., Chuvpilo, S., Kishi, H., Hunig, T., Serfling, E. and Bommhardt, U.H. (2006), 'PKB rescues calcineurin/NFAT-induced arrest of Rag expression and pre-T cell differentiation', *J Immunol*, 177, 7, 4567-76.
- Patra, A.K., Na, S.Y. and Bommhardt, U. (2004), 'Active protein kinase B regulates TCR responsiveness by modulating cytoplasmic-nuclear localization of NFAT and NF-kappa B proteins', *J Immunol*, 172, 8, 4812-20.
- Patton, D.T., Garden, O.A., Pearce, W.P., Clough, L.E., Monk, C.R., Leung, E., Rowan, W.C., Sancho, S., Walker, L.S., Vanhaesebroeck, B. and Okkenhaug, K. (2006), 'Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 delta is critical for the function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells', *J Immunol*, 177, 10, 6598-602.
- Patton, D.T., Wilson, M.D., Rowan, W.C., Soond, D.R. and Okkenhaug, K. (2011), 'The PI3K p110delta regulates expression of CD38 on regulatory T cells', *PLoS One*, 6, 3, e17359.
- Peng, X.D., Xu, P.Z., Chen, M.L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W.S., Crawford, S.E., Coleman, K.G. and Hay, N. (2003), 'Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2', *Genes Dev*, 17, 11, 1352-65.

- Pessah, M., Marais, J., Prunier, C., Ferrand, N., Lallemand, F., Mauviel, A. and Atfi, A.** (2002), 'c-Jun associates with the oncoprotein Ski and suppresses Smad2 transcriptional activity', *J Biol Chem*, 277, 32, 29094-100.
- Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S. and Sabatini, D.M.** (2009), 'DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival', *Cell*, 137, 5, 873-86.
- Petritsch, C., Beug, H., Balmain, A. and Oft, M.** (2000), 'TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest', *Genes Dev*, 14, 24, 3093-101.
- Pierau, M., Engelmann, S., Reinhold, D., Lapp, T., Schraven, B. and Bommhardt, U.H.** (2009), 'Protein kinase B/Akt signals impair Th17 differentiation and support natural regulatory T cell function and induced regulatory T cell formation', *J Immunol*, 183, 10, 6124-34.
- Pillemer, B.B., Qi, Z., Melgert, B., Oriss, T.B., Ray, P. and Ray, A.** (2009), 'STAT6 activation confers upon T helper cells resistance to suppression by regulatory T cells', *J Immunol*, 183, 1, 155-63.
- Pillemer, B.B., Xu, H., Oriss, T.B., Qi, Z. and Ray, A.** (2007), 'Deficient SOCS3 expression in CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and SOCS3-mediated suppression of Treg function', *Eur J Immunol*, 37, 8, 2082-9.
- Pollard, J.W.** (2004), 'Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis', *Nat Rev Cancer*, 4, 1, 71-8.
- Racke, M.K., Dhib-Jalbut, S., Cannella, B., Albert, P.S., Raine, C.S. and McFarlin, D.E.** (1991), 'Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta 1', *J Immunol*, 146, 9, 3012-7.
- Radvanyi, L.G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G.B. and Miller, R.G.** (1996), 'CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response', *J Immunol*, 156, 5, 1788-98.
- Rathmell, J.C., Elstrom, R.L., Cinalli, R.M. and Thompson, C.B.** (2003), 'Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma', *Eur J Immunol*, 33, 8, 2223-32.
- Remy, I., Montmarquette, A. and Michnick, S.W.** (2004), 'PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3', *Nat Cell Biol*, 6, 4, 358-65.
- Rengarajan, J., Mowen, K.A., McBride, K.D., Smith, E.D., Singh, H. and Glimcher, L.H.** (2002), 'Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression', *J Exp Med*, 195, 8, 1003-12.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A. and Massague, J.** (1995), 'Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta', *Genes Dev*, 9, 15, 1831-45.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M. and Sporn, M.B.** (1981), 'New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 9, 5339-43.
- Sakaguchi, S.** (2004), 'Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses', *Annu Rev Immunol*, 22, 531-62.

- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M.** (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', *J Immunol*, 155, 3, 1151-64.
- Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P. and Yamaguchi, T.** (2009), 'Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?' *Int Immunol*, 21, 10, 1105-11.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. and Ono, M.** (2008), 'Regulatory T cells and immune tolerance', *Cell*, 133, 5, 775-87.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A. and Bluestone, J.A.** (2000), 'B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes', *Immunity*, 12, 4, 431-40.
- Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A. and Sabatini, D.M.** (2007), 'PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase', *Mol Cell*, 25, 6, 903-15.
- Sancho, D., Gomez, M. and Sanchez-Madrid, F.** (2005), 'CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation', *Trends Immunol*, 26, 3, 136-40.
- Sancho, D., Gomez, M., Viedma, F., Esplugues, E., Gordon-Alonso, M., Garcia-Lopez, M.A., de la Fuente, H., Martinez, A.C., Lauzurica, P. and Sanchez-Madrid, F.** (2003), 'CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis', *J Clin Invest*, 112, 6, 872-82.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M.** (2005), 'Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex', *Science*, 307, 5712, 1098-101.
- Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., Shokat, K.M., Fisher, A.G. and Merckenschlager, M.** (2008), 'T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 22, 7797-802.
- Scharton, T.M. and Scott, P.** (1993), 'Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice', *J Exp Med*, 178, 2, 567-77.
- Schmierer, B. and Hill, C.S.** (2007), 'TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 12, 970-82.
- Schneider, H., Valk, E., da Rocha Dias, S., Wei, B. and Rudd, C.E.** (2005), 'CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 36, 12861-6.
- Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.L., Smith, W.A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemurski, S., Hatton, R.D., Stormo, G.D., Weaver, C.T., Russell, J.H., Murphy, T.L. and Murphy, K.M.** (2009), 'The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation', *Nature*, 460, 7253, 405-9.
- Seddon, B. and Mason, D.** (2000), 'The third function of the thymus', *Immunol Today*, 21, 2, 95-9.
- Seder, R.A., Plaut, M., Barbieri, S., Urban, J., Jr., Finkelman, F.D. and Paul, W.E.** (1991), 'Purified Fc epsilon R+ bone marrow and splenic non-B, non-T cells are highly enriched in the capacity

- to produce IL-4 in response to immobilized IgE, IgG2a, or ionomycin', *J Immunol*, 147, 3, 903-9.
- Selvaraj, R.K. and Geiger, T.L.** (2007), 'A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta', *J Immunol*, 178, 12, 7667-77.
- Sharma, R., Sung, S.S., Abaya, C.E., Ju, A.C., Fu, S.M. and Ju, S.T.** (2009), 'IL-2 regulates CD103 expression on CD4+ T cells in Scurfy mice that display both CD103-dependent and independent inflammation', *J Immunol*, 183, 2, 1065-73.
- Sherr, C.J.** (1994), 'G1 phase progression: cycling on cue', *Cell*, 79, 4, 551-5.
- Shevach, E.M.** (2002), 'CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers', *Nat Rev Immunol*, 2, 6, 389-400.
- Shevach, E.M., DiPaolo, R.A., Andersson, J., Zhao, D.M., Stephens, G.L. and Thornton, A.M.** (2006), 'The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells', *Immunol Rev*, 212, 60-73.
- Shevach, E.M., McHugh, R.S., Piccirillo, C.A. and Thornton, A.M.** (2001), 'Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells', *Immunol Rev*, 182, 58-67.
- Shi, Y. and Massague, J.** (2003), 'Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus', *Cell*, 113, 6, 685-700.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. and Sakaguchi, S.** (2002), 'Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance', *Nat Immunol*, 3, 2, 135-42.
- Shin, H.C., Benbernou, N., Esnault, S. and Guenounou, M.** (1999), 'Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway', *Cytokine*, 11, 4, 257-66.
- Shinkai, K., Mohrs, M. and Locksley, R.M.** (2002), 'Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo', *Nature*, 420, 6917, 825-9.
- Singh, S.P., Zhang, H.H., Foley, J.F., Hedrick, M.N. and Farber, J.M.** (2008), 'Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6', *J Immunol*, 180, 1, 214-21.
- Skapenko, A., Kalden, J.R., Lipsky, P.E. and Schulze-Koops, H.** (2005), 'The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors', *J Immunol*, 175, 9, 6107-16.
- Snapper, C.M. and Paul, W.E.** (1987), 'Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production', *Science*, 236, 4804, 944-7.
- Song, K., Wang, H., Krebs, T.L. and Danielpour, D.** (2006), 'Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF-beta/ALK5-mediated Smad3 activation', *Embo J*, 25, 1, 58-69.
- Stenger, S., Thuring, H., Rollinghoff, M. and Bogdan, C.** (1994), 'Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*', *J Exp Med*, 180, 3, 783-93.
- Stroschein, S.L., Bonni, S., Wrana, J.L. and Luo, K.** (2001), 'Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN', *Genes Dev*, 15, 21, 2822-36.
- Stumhofer, J.S., Laurence, A., Wilson, E.H., Huang, E., Tato, C.M., Johnson, L.M., Villarino, A.V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., Saris, C.J., O'Shea, J.J., Hennighausen, L., Ernst, M.**

- and Hunter, C.A.** (2006), 'Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system', *Nat Immunol*, 7, 9, 937-45.
- Sung, J.L., Lin, J.T. and Gorham, J.D.** (2003), 'CD28 co-stimulation regulates the effect of transforming growth factor-beta1 on the proliferation of naive CD4+ T cells', *Int Immunopharmacol*, 3, 2, 233-45.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M. and Huston, G.** (1990), 'IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors', *J Immunol*, 145, 11, 3796-806.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G. and Glimcher, L.H.** (2000), 'A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment', *Cell*, 100, 6, 655-69.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Stemmann, C., Satoskar, A.R., Sleckman, B.P. and Glimcher, L.H.** (2002), 'Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells', *Science*, 295, 5553, 338-42.
- Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L. and Singer, A.** (2005), 'CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2', *Nat Immunol*, 6, 2, 152-62.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J. and Sakaguchi, S.** (1998), 'Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state', *Int Immunol*, 10, 12, 1969-80.
- Takaki, H., Ichiyama, K., Koga, K., Chinen, T., Takaesu, G., Sugiyama, Y., Kato, S., Yoshimura, A. and Kobayashi, T.** (2008), 'STAT6 inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor', *J Biol Chem*, 283, 22, 14955-62.
- Takeda, I., Ine, S., Killeen, N., Ndhlovu, L.C., Murata, K., Satomi, S., Sugamura, K. and Ishii, N.** (2004), 'Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells', *J Immunol*, 172, 6, 3580-9.
- Tanaka, K., Ichiyama, K., Hashimoto, M., Yoshida, H., Takimoto, T., Takaesu, G., Torisu, T., Hanada, T., Yasukawa, H., Fukuyama, S., Inoue, H., Nakanishi, Y., Kobayashi, T. and Yoshimura, A.** (2008), 'Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN-gamma on STAT3 and Smads', *J Immunol*, 180, 6, 3746-56.
- Taylor, A.W.** (2009), 'Review of the activation of TGF-beta in immunity', *J Leukoc Biol*, 85, 1, 29-33.
- Teicher, B.A.** (2007), 'Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease', *Clin Cancer Res*, 13, 21, 6247-51.
- Thomas, D.A. and Massague, J.** (2005), 'TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance', *Cancer Cell*, 8, 5, 369-80.
- Thornton, A.M. and Shevach, E.M.** (1998), 'CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production', *J Exp Med*, 188, 2, 287-96.

- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I. and Tone, M.** (2008), 'Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer', *Nat Immunol*, 9, 2, 194-202.
- Tran, D.Q., Andersson, J., Wang, R., Ramsey, H., Unutmaz, D. and Shevach, E.M.** (2009), 'GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 32, 13445-50.
- Tremblay, M.L. and Giguere, V.** (2008), 'Phosphatases at the heart of FoxO metabolic control', *Cell Metab*, 7, 2, 101-3.
- Tschopp, O., Yang, Z.Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J. and Hemmings, B.A.** (2005), 'Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis', *Development*, 132, 13, 2943-54.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L. and Wrana, J.L.** (1998), 'SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor', *Cell*, 95, 6, 779-91.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M. and Fugger, L.** (2008), 'Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis', *Am J Pathol*, 172, 1, 146-55.
- Vander Haar, E., Lee, S.I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J. and Kim, D.H.** (2007), 'Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40', *Nat Cell Biol*, 9, 3, 316-23.
- Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L. and Farrar, M.A.** (2008), 'IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development', *J Immunol*, 181, 5, 3285-90.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M. and Stockinger, B.** (2006), 'TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells', *Immunity*, 24, 2, 179-89.
- Veldhoen, M. and Stockinger, B.** (2006), 'TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells', *Trends Immunol*, 27, 8, 358-61.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C. and Stockinger, B.** (2008), 'Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset', *Nat Immunol*, 9, 12, 1341-6.
- Venuprasad, K., Huang, H., Harada, Y., Elly, C., Subramaniam, M., Spelsberg, T., Su, J. and Liu, Y.C.** (2008), 'The E3 ubiquitin ligase Itch regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1', *Nat Immunol*, 9, 3, 245-53.
- Villarino, A.V., Gallo, E. and Abbas, A.K.** (2010), 'STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms', *J Immunol*, 185, 11, 6461-71.
- Vinals, F. and Pouyssegur, J.** (2001), 'Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling', *Mol Cell Biol*, 21, 21, 7218-30.

- von Boehmer, H. and Melchers, F. (2010), 'Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease', *Nat Immunol*, 11, 1, 14-20.
- Walker, M.R., Kaspirowicz, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J.H. and Ziegler, S.F. (2003), 'Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells', *J Clin Invest*, 112, 9, 1437-43.
- Walsh, P.T., Buckler, J.L., Zhang, J., Gelman, A.E., Dalton, N.M., Taylor, D.K., Bensinger, S.J., Hancock, W.W. and Turka, L.A. (2006), 'PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+ CD25+ Tregs', *J Clin Invest*, 116, 9, 2521-31.
- Wan, Y., Liu, X. and Kirschner, M.W. (2001), 'The anaphase-promoting complex mediates TGF-beta signaling by targeting SnoN for destruction', *Mol Cell*, 8, 5, 1027-39.
- Wang, C., Kang, S.G., Lee, J., Sun, Z. and Kim, C.H. (2009), 'The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut', *Mucosal Immunol*, 2, 2, 173-83.
- Wang, R., Kozhaya, L., Mercer, F., Khaitan, A., Fujii, H. and Unutmaz, D. (2009), 'Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 32, 13439-44.
- Wang, X. and Proud, C.G. (2006), 'The mTOR pathway in the control of protein synthesis', *Physiology (Bethesda)*, 21, 362-9.
- Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M. and Murphy, K.M. (2006), 'Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties', *Immunity*, 24, 6, 677-88.
- Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R. and Harrington, L.E. (2007), 'IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages', *Annu Rev Immunol*, 25, 821-52.
- Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli, F.D., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M. and Brunkow, M.E. (2001), 'X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy', *Nat Genet*, 27, 1, 18-20.
- Wohlfert, E.A., Callahan, M.K. and Clark, R.B. (2004), 'Resistance to CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in Cbl-b-/- mice', *J Immunol*, 173, 2, 1059-65.
- Wohlfert, E.A. and Clark, R.B. (2007), '"Vive la Resistance!"--the PI3K-Akt pathway can determine target sensitivity to regulatory T cell suppression', *Trends Immunol*, 28, 4, 154-60.
- Wohlfert, E.A., Gorelik, L., Mittler, R., Flavell, R.A. and Clark, R.B. (2006), 'Cutting edge: deficiency in the E3 ubiquitin ligase Cbl-b results in a multifunctional defect in T cell TGF-beta sensitivity in vitro and in vivo', *J Immunol*, 176, 3, 1316-20.
- Wong, C.K., Ho, C.Y., Li, E.K. and Lam, C.W. (2000), 'Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus', *Lupus*, 9, 8, 589-93.
- Wurster, A.L., Tanaka, T. and Grusby, M.J. (2000), 'The biology of Stat4 and Stat6', *Oncogene*, 19, 21, 2577-84.
- Wymann, M.P., Zvelebil, M. and Laffargue, M. (2003), 'Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target?' *Trends Pharmacol Sci*, 24, 7, 366-76.

- Xiao, S., Jin, H., Korn, T., Liu, S.M., Oukka, M., Lim, B. and Kuchroo, V.K.** (2008), 'Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression', *J Immunol*, 181, 4, 2277-84.
- Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H. and Matsumoto, K.** (1999), 'XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway', *Embo J*, 18, 1, 179-87.
- Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Miyamoto, T., Sugaya, K., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Kimura, M., Taniguchi, M., DeGregori, J. and Nakayama, T.** (2004), 'Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci', *J Biol Chem*, 279, 26, 26983-90.
- Yamazaki, T., Yang, X.O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, H.S., Ma, L., Panopoulos, A.D., Craig, S., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q. and Dong, C.** (2008), 'CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells', *J Immunol*, 181, 12, 8391-401.
- Yang, J., Murphy, T.L., Ouyang, W. and Murphy, K.M.** (1999), 'Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation', *Eur J Immunol*, 29, 2, 548-55.
- Yang, L., Pang, Y. and Moses, H.L.** (2010), 'TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression', *Trends Immunol*, 31, 6, 220-7.
- Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., Watowich, S.S., Tian, Q., Jetten, A.M. and Dong, C.** (2008), 'T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma', *Immunity*, 28, 1, 29-39.
- Yang, Z.Z., Tschopp, O., Di-Poi, N., Bruder, E., Baudry, A., Dummler, B., Wahli, W. and Hemmings, B.A.** (2005), 'Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice', *Mol Cell Biol*, 25, 23, 10407-18.
- Yao, Z., Kanno, Y., Kerenyi, M., Stephens, G., Durant, L., Watford, W.T., Laurence, A., Robinson, G.W., Shevach, E.M., Moriggi, R., Hennighausen, L., Wu, C. and O'Shea, J.J.** (2007), 'Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3', *Blood*, 109, 10, 4368-75.
- Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J.E., Bagby, G.J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J.J. and Kolls, J.K.** (2001), 'Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense', *J Exp Med*, 194, 4, 519-27.
- Yoshimoto, T. and Paul, W.E.** (1994), 'CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3', *J Exp Med*, 179, 4, 1285-95.
- Yu, L., Hebert, M.C. and Zhang, Y.E.** (2002), 'TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses', *Embo J*, 21, 14, 3749-59.

- Yue, J. and Mulder, K.M.** (2000), 'Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta', *Methods Mol Biol*, 142, 125-31.
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y.C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E. and Bottinger, E.P.** (2001), 'Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12, 6686-91.
- Zenclussen, A.C.** (2006), 'Regulatory T cells in pregnancy', *Springer Semin Immunopathol*, 28, 1, 31-9.
- Zhang, F., Meng, G. and Strober, W.** (2008), 'Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells', *Nat Immunol*, 9, 11, 1297-306.
- Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X.H., Meng, A. and Chen, Y.G.** (2007), 'Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation', *Mol Cell Biol*, 27, 12, 4488-99.
- Zhang, Y., Feng, X., We, R. and Derynck, R.** (1996), 'Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response', *Nature*, 383, 6596, 168-72.
- Zheng, W. and Flavell, R.A.** (1997), 'The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells', *Cell*, 89, 4, 587-96.
- Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J. and Littman, D.R.** (2007), 'IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways', *Nat Immunol*, 8, 9, 967-74.
- Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M., Ivanov, I., Min, R., Victora, G.D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., Ziegler, S.F. and Littman, D.R.** (2008), 'TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function', *Nature*, 453, 7192, 236-40.
- Zhou, Q., Desta, T., Fenton, M., Graves, D.T. and Amar, S.** (2005), 'Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its FimA protein', *Infect Immun*, 73, 2, 935-43.
- Zhu, J. and Paul, W.E.** (2010), 'Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors', *Immunol Rev*, 238, 1, 247-62.
- Ziegler, S.F.** (2006), 'FOXP3: of mice and men', *Annu Rev Immunol*, 24, 209-26.
- Ziegler, S.F.** (2007), 'FOXP3: not just for regulatory T cells anymore', *Eur J Immunol*, 37, 1, 21-3.

8 Abkürzungen

AP-1	<i>activator protein 1</i>
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BAD	<i>Bcl-2 associated agonist of cell death</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>Bcl-2 like protein</i>
Bio	Biotin bzw. biotinyliert
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD28 ^{-/-}	CD28-defizient
CFSE	<i>carboxyfluoresceinsuccinimidylester</i>
c-myc	<i>cellular myelocytomatosis oncogene</i>
Co-Smad	<i>common mediator-Smad</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
Deptor	<i>DEP-domain containing mTOR-interacting protein</i>
DN	doppelt-negativ
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DP	doppelt-positiv
DZ	dendritische Zelle
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
Erk	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box P3 protein</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
fwd	<i>forward</i>
GARP	<i>glycoprotein-A repetitions predominant</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNF-receptor-related protein</i>
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase 3-beta

h	<i>hour</i>
H+L	<i>heavy and light chain specific</i>
IDO	<i>Indolamin-2,3-Dioxygenase</i>
IFN- γ	<i>Interferon-gamma</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ILK	<i>integrin-linked-kinase</i>
IRF-4	<i>interferon regulatory factor-4</i>
iTreg	<i>induzierte regulatorische T-Zelle</i>
JAK	<i>Janus-Kinase</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKKK	<i>MAPK kinase kinase</i>
Mdm2	<i>murine double minute 2</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mLST8/G β L	<i>mammalian lethal with sec 13 protein 8/G-protein β-subunit-like protein</i>
MS	<i>Multiple Sklerose</i>
mSIN1	<i>mammalian stress-activated-protein-kinase-interacting protein 1</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin complex</i>
myr	<i>myristoyliert</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
nTreg	<i>natürliche regulatorische T-Zelle</i>
p	<i>phosphoryliert</i>
pp70S6K	<i>phosphorylierte p70S6-Kinase</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK1	<i>phosphoinositide dependent kinase 1</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PI3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat</i>
PKB	<i>Proteinkinase B</i>
PP2A	<i>Protein-Phosphatase 2A</i>
PRAS40	<i>proline-rich Akt substrate 40kDa</i>
pS6	<i>phosphoryliertes ribosomales Protein S6</i>

PH	<i>pleckstrin homology</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue localized on chromosome ten</i>
RAG	Rekombination-aktivierendes Gen
Raptor	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
rev	<i>reverse</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
ROR γ t	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t</i>
R-Smad	<i>receptor-regulated Smad</i>
RT	Raumtemperatur
SARA	<i>smad anchor for receptor activation</i>
SC	<i>supplemental complete</i>
Ser (S)	Serin
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SP	einfach-positiv
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAK1	<i>TGFβ-activated kinase 1</i>
tg	transgen
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
Th	T-Helfer-Zelle
Thr (T)	Threonin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Treg	regulatorische T-Zellen
TSC	<i>tuberous sclerosis protein</i>
TYK	<i>tyrosine kinase</i>
Tyr (Y)	Tyrosin
TCR	T-Zell-Rezeptor
wt	Wildtyp, wildtypisch

9 Curriculum vitae

Name: Mandy Pierau
Geburtstag: 03.08.1978
E-Mail: mandy.pierau@med.ovgu.de
Tel.: +49 172 1782003
Anschrift: Heidestrasse 25, 39112 Magdeburg
Geschlecht: weiblich
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Beruflicher Hintergrund

ab 01.09.2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Postdoc) in der Forschungsgruppe von Frau Prof. M. Brunner-Weinzierl in der Experimentellen Pädiatrie der Universitätskinderklinik Magdeburg.

04/2006 – 08/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe PD Dr. U. Bommhardt im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg,
Titel der Dissertation: „Proteinkinase B- und TGF β 1-Signalwege: Untersuchungen zu ihrer Interaktion bei der Th-Zelldifferenzierung.“

02/2006 - 03/2006 Praktikum in der Forschungsgruppe Prof. M. Groettrup/Dr. P. Öhlschläger am Institut für Immunologie an der Universität Konstanz, Projekt: „Entwicklung einer multivalent therapeutischen HPV-16- und HPV-18-spezifischen DNA-Vakzine gegen Gebärmutterhalskrebs.“

- 10/2005 - 01/2006 Praktikum in der Forschungsgruppe Dr. A.M. Kaufmann/Dr. P. Öhlschläger in der gynäkologischen Tumorimmunologie, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin, Projekt: „Entwicklung einer multivalent therapeutischen HPV-16- und HPV-18-spezifischen DNA-Vakzine gegen Gebärmutterhalskrebs.“
- 03/2004 - 09/2005 Diplomarbeit in der Forschungsgruppe Prof. M. Dürst/Dr. P. Öhlschläger in der gynäkologischen Tumorimmunologie, Frauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Projekt: „Etablierung eines Tumormodells in der C57/BL6-Maus zur Untersuchung der zellulären *in vivo* Immunantwort nach HPV-18E6 und E7 DNA-Vakzinierung.“

Hochschulausbildung

- 04/2006 – 08/2011 Anfertigung der Dissertation zum Thema: „Proteinkinase B- und TGF β 1-Signalwege: Untersuchungen zu ihrer Interaktion bei der Th-Zelldifferenzierung“, bei PD Dr. Ursula Bommhardt im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg.
- 09/1998 – 02/2006 Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
Abschluss: Diplom, Note: gut (1,6)
Diplomarbeit in der Forschungsgruppe M. Dürst/P. Öhlschläger in der gynäkologischen Tumorimmunologie, Frauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Titel: „Etablierung eines Tumormodells in der C57/BL6-Maus Untersuchung der zellulären *in vivo* Immunantwort nach HPV-18E6 und E7 DNA-Vakzinierung.“

Veröffentlichungen

1. Publikationen

- 01/2012 Wienecke J, Hebel K, Hegel KJ, Pierau M, Brune T, Reinhold D, Pethe A, Brunner-Weinzierl MC, "Pro-inflammatory effector Th cells transmigrate through anti-inflammatory environments into the murine fetus." *Placenta* 2012, 33(1); 39-46.
- 02/2012 Pierau M, Na SY, Marx A, Schraven B, Bommhardt U, "Constitutive Akt1 signals attenuate B cell receptor signaling and proliferation, but enhance B cell migration and effector function." *European J Immunol.* (reviewed, now in revision)
- 10/2009 Mandy Pierau*, Swen Engelmann*, Dirk Reinhold, Thabo Lapp, Burkhardt Schraven und Ursula H. Bommhardt. Protein Kinase B/Akt Signals Impair Th17 Differentiation and Support nTreg Function and iTreg Formation. *J Immunol.* 2009, 183; 6124-6134.
*Erstkoautorenschaft

2. Poster

- 09/2010 Mandy Pierau, Swen Engelmann, Thomas Drewes, Thabo Lapp, Burkhardt Schraven und Ursula H. Bommhardt. 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) in Leipzig, Deutschland 2010.
- 09/2009 Mandy Pierau, Swen Engelmann, Dirk Reinhold, Burkhardt Schraven und Ursula H. Bommhardt. PKB/Akt signals support Treg differentiation and function but oppose Th17 generation.
Posterpräsentation auf dem 2. Europäischen Immunologie Kongress (ECI) in Berlin, Deutschland 2009.

- 09/2007 Mandy Pierau, Swen Engelmann, Thomas Drewes, Dirk Reinhold, Thabo Lapp, Burkhard Schraven und Ursula H. Bommhardt. Cross-talk of PKB/Akt with TGF β 1 signaling in T cell activation.
Posterpräsentation auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Heidelberg, Deutschland 2007.

10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. B. Schraven für die Möglichkeit, dieses interessante Thema am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie bearbeiten zu können, für seine Diskussionsbereitschaft in den Seminaren und bei der Fertigstellung der Dissertation.

Den internen und externen Gutachtern/innen danke ich an dieser Stelle für die Übernahme der Gutachten und für Ihr Interesse an diesem Thema.

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. U. Bommhardt, die mir im Rahmen ihres Forschungsprojektes die Bearbeitung dieses spannenden Themas ermöglicht hat und mir mit wissenschaftlichem Rat und unermüdlicher Hilfsbereitschaft zur Seite stand. Vor allem danke ich Ihr für die professionelle Unterstützung bei der Vorbereitung vieler Seminare, für viele kreative Forschungsansätze und Ideen sowie für die Korrektur meiner Dissertation.

Ein ganz großes Dankeschön geht an ehemalige und gegenwärtige Kollegen der AG Bommhardt, vor allem Gabi, Swen, Thomas, Thabo, Anna und Sascha, für den Spaß bei der Arbeit, das tolle Arbeitsklima, die gemeinsame Kaffeezeit und das ein oder andere Bier nach getaner Arbeit. Vielen Dank Gabi für die vielen Genotypisierungen und ganz speziellen Dank für Deine lustige, unterhaltsame und immer wieder aufbauende Art. Swen möchte ich im Speziellen danken für seine Diskussionsbereitschaft und Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen, aber vor allem für viele aufmunternde Gespräche und viel Freude im und ausserhalb des Labors.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern/innen des Instituts für Molekulare und Klinische Immunologie für die freundliche Aufnahme, die Hilfsbereitschaft, die Unterstützung bei vielen Fragestellungen und das Ausleihen von Antikörpern bedanken. Anja und Mike danke ich für die regelmäßigen sportlichen Aktivitäten. Diese förderten den Zusammenhalt der IMKIs und waren ein willkommender Ausgleich zum Laboralltag.

Meinen Freunden, Mitbewohnerinnen und Marcus sage ich Danke für die schöne gemeinsame Zeit, die Dinge die wir zusammen erlebten und die vielen aufmunternden und motivierenden Worte, vor allem während meiner Schreibphase. Vielen Dank, dass ich Euch kennenlernen durfte und dass es Euch in meinem Leben gibt. Besonderer Dank gilt dabei Ali und Dario, die in einer schweren Zeit in meinem Leben immer für mich da waren und deren Tür immer offen stand. Das werde ich Euch nie vergessen!

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder Jörn, meinen Großeltern und Bernd für die Ermöglichung meines Studiums und der Promotion durch die finanzielle, moralische sowie liebevolle Unterstützung während der gesamten Zeit. Ihr habt maßgeblich zu den Erfolgen auf meinem bisherigen Lebensweg beigetragen.

11 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Naturwissenschaftlichen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Magdeburg, 22.09.11

Mandy Pierau