

Regulation der Immunantwort durch CREM α

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation vorgelegt

von

Diplom-Biologin Kim Karena Ohl

aus Waldbröl

Berichter: Privatdozent Dr. med. Klaus Tenbrock

Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Rainer Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Publikationen

Während dieser Arbeit wurden die folgenden Publikationen veröffentlicht:

Lippe R.*, Ohl K*, Varga G., Rauen T., Crispin J.C., Juang Y, Kürten S., Tacke F., Wolf M., Roebrock K., Vogl T., Verjans E., Honke N., Ehrchen J., Foell D., Skryabin B., Wagner N., Tsokos G.C., Roth J.; Tenbrock K. (2012) **CREM α overexpression decreases IL-2 production, induces a TH17 phenotype and accelerates autoimmunity**, *J Mol Cell Biol* 4, 121-123

(* gleichberechtigte Erst-Autorenschaft)

Ohl, K., and Tenbrock, K. (2011) **Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus**, *J Biomed Biotechnol* 2011, 432595.

Preise und Auszeichnungen die für die vorliegende Arbeit vergeben wurden:

Posterpreis des IZKF Aachen am Tag der medizinischen Forschung 2009

Wissenschaftspreis der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie 2010

Wissenschaftspreis der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie 2011

Zusammenfassung

SLE (systemischer Lupus erythematoses) ist eine schwere Autoimmunerkrankung, die nahezu alle Organe des menschlichen Körpers befallen kann und deren therapeutische Behandlung nach wie vor problematisch ist. T-Zellen leisten einen entscheidenden Beitrag zur Pathogenese der Erkrankung. Ein Transkriptionsfaktor, der verstärkt in T-Zellen dieser Patienten exprimiert wird und zu einer aberranten Funktion der T-Zellen im Krankheitsbild des SLE beiträgt ist, *cAMP response element modulator* (CREM) α . In der vorliegenden Arbeit konnte die Funktion von CREM α in T-Zellen mittels detaillierter *in vivo* und *in vitro* Studien analysiert werden.

Mit Hilfe eines murinen Lupus Modells (fas $^{-/-}$ Maus) wurden Auswirkungen einer T-Zell spezifischen Überexpression von CREM α auf die Pathogenese einer Autoimmunerkrankung studiert. Hierzu wurde eine fas $^{-/-}$ Maus mit T-Zell spezifischer Überexpression von CREM α erzeugt (fas $^{-/-}$ CREM TG). Überexpression von CREM α in diesem Modell verursachte einen drastischen Phänotyp, der sich in einer verstärkten Lymphadenopathie und Splenomegalie und einer verkürzten Lebenserwartung der fas $^{-/-}$ CREM TG Mäuse im Vergleich zu fas $^{-/-}$ Mäusen ohne CREM α Überexpression äußerte. Auf T-zellulärer Ebene wiesen fas $^{-/-}$ CREM TG Mäuse eine verstärkte Expansion doppelt-negativer T-Zellen (CD3+CD4-CD8-, DNTs) und eine Reduktion der regulatorischen T-Zellen (Tregs) auf, während die Menge IL-17 und IL-21 sezernierender Zellen erhöht war. Somit konnte die funktionelle Bedeutung von CREM α für eine Autoimmunerkrankung erstmalig *in vivo* nachgewiesen werden.

In weiteren Analysen, die unabhängig von fas in Mäusen mit einer T Zell spezifischen Überexpression von CREM α (CREM TG) und CREM defizienten Mäusen (CREM $^{-/-}$) durchgeführt wurden, wurde der Einfluss von CREM α auf Treg und Th17 Zellen untersucht. In *in vitro* Differenzierungs-Experimenten zeigte sich, dass T-Zellen aus CREM TG Mäusen eine verringerte Neigung aufwiesen, in Tregs zu differenzieren im Vergleich zu WT T-Zellen. Im Gegensatz hierzu wiesen CREM defiziente T-Zellen ein gesteigertes Differenzierungspotential zu Tregs auf. CREM defiziente Tregs zeichneten sich außerdem durch eine verstärkte Suppressivität aus, sowohl in *in vitro* Suppressionsassays als auch *in vivo* im Mausmodell einer Transferkolitis. Mittels Koimmunpräzipitation konnte im Verlauf dieser Arbeit eine spezifische Interaktion zwischen CREM und FoxP3 in Tregs identifiziert werden. Außerdem wurden Microarray Analysen durchgeführt, mit deren Hilfe es gelang, mehrere Gene zu identifizieren, die wahrscheinlich in Tregs durch CREM α reguliert werden.

In weiteren *in vitro* Differenzierungs-Experimenten wurde die Bedeutung von CREM α für Th17 Zellen untersucht. Während es bei CREM TG T-Zellen zu einer verstärkten Th17 Induktion kam, war diese in CREM $^{-/-}$ T-Zellen im Vergleich zu WT T-Zellen deutlich vermindert. Die verstärkte Th17 Antwort infolge einer CREM Überexpression wurde *in vivo* in zwei

Kolitis-Modellen funktionell belegt. Mittels CHIP Analysen konnte eine direkte Bindung von CREM α an den IL-17a Promotor als ein bedeutsamer Mechanismus für die IL17 Induktion identifiziert werden. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine Relevanz von CREM α für Tregs und für die IL-17 und IL-21 exprimierenden Th17 Zellen aufgedeckt werden.

Desweiteren wurde der Einfluss von CREM α auf follikuläre T-Helferzellen (Tfhs) und B-Zell Antworten untersucht. Überexpression von CREM α in fas $^{-/-}$ Mäusen verursachte ein verstärktes Auftreten von Tfhs und Keimzentren (germinal center, GC)-B-Zellen sowie erhöhte Spiegel von anti-Doppelstrang-DNA Antikörpern (anti-dsDNA Antikörper) im Serum dieser Tiere. Außerdem zeigten immunisierte CREM TG Tiere im Vergleich zum WT eine höhere Menge von Tfhs, GC-B-Zellen und spezifischen Immunglobulinen (IgGs) im Serum. Dies bedeutet, dass CREM α über die T-Zell Pathophysiologie hinaus, auch von großer Relevanz für die B-Zellaktivität ist.

Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit Evidenzen dafür, dass eine erhöhte Expression von CREM α von pathogener Bedeutung *in vivo* ist und damit die Expression von CREM beim humanen SLE keine Epiphänomen darstellt. Darüber hinaus konnte CREM auf molekularer Ebene als Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der als Regulator von Tregs, Th17 und Tfh Zellen fungiert, womit ein wertvoller Beitrag zum Verständnis der komplexen Regulation dieser T-Zell Subtypen geleistet wurde.

Zusammenfassung (englisch)

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a fatal autoimmune disease which affects nearly all organs in the human body. Despite the severity of disease treatment options are scarce apart from immune suppression. T cells are critical players in SLE. One factor which contributes to T cell pathophysiology in SLE is an enhanced expression of the cAMP response element modulator (CREM) α , a transcription factor, which contributes to several abnormalities in these cells. In my thesis I analyzed the role of CREM α in T cells *in vitro* and *in vivo*.

To explore the relevance of CREM α *in vivo* in a lupus setting we crossed CD95 (fas) knock-out mice into mice which overexpress CREM in T cells (fas $^{-/-}$ CREM TG). The CREM TG fas $^{-/-}$ CREM TG mice suffered from severely accelerated lymphadenopathy and splenomegaly much earlier in life than wildtype fas $^{-/-}$ animals. Lymphadenopathy and splenomegaly was caused by a massively enhanced expansion of double negative T cells (CD3+CD4-CD8-, DNTs), a reduction of regulatory T cells (Tregs), while amounts IL-17 and IL-21 secreting cells were increased compared to fas $^{-/-}$ mice without CREM α overexpression. To our knowledge this is the first report that overexpression of CREM α aggravates autoimmunity *in vivo*.

We further analyzed the role of CREM α in regulatory T cells and Th17 cells in a CREM knock-out mouse model (CREM $^{-/-}$) and in a mouse, which selectively overexpresses CREM α in T cells (CREM TG). When we generated inducible Tregs from naïve CD4 $^{+}$ T cells the overall expression of Foxp3 $^{+}$ T cells was higher in wildtype T cells than in CREM TG T cells. Vice versa the expression of inducible Tregs generated from CREM $^{-/-}$ mice was significantly higher than from wildtype mice. Furthermore, the knock-out of CREM enhanced the suppressive capacity of Tregs in mice *in vitro* in suppression assays and *in vivo* in a mouse model of transfer colitis. Coimmunoprecipitation experiments indicated that CREM α interacts with *FOXP3* in Tregs. Furthermore microarray analyses identified several genes which might be regulated by CREM α in Tregs.

We furthermore analysed the role of CREM α in Th17 cells *in vitro* and noticed enhanced development of Th17 cells in CREM TG mice while the fraction of IL-17 producing T cells was reduced in CREM $^{-/-}$ mice compared to wildtype mice. The functional relevance of the enhanced Th17 response in CREM TG mice was demonstrated by two *in vivo* colitis models. We detected an important mechanism of CREM driven IL-17 expression by mean of chip assays which revealed a CREM binding to the IL17a promotor. Summing up these data indicate a role of CREM α for the functionality of Tregs and Th17 cells *in vitro* and *in vivo*.

We next asked if CREM α also influences follicular helper T cells (T_{fh}s) and B cell responses. CREM α enhanced the expression of T_{fh}s, germinal center (GC) B cells and led to increased serum levels of autoantibodies in fas $^{-/-}$ mice. Moreover CREM TG mice showed enhanced levels of follicular helper T cells, GC B cells and higher specific IgG levels in sera after immunization compared to wildtype mice. These experiments expand the role of CREM α as a transcription factor expressed in T cells, which significantly alters B cell response.

This thesis confirms a pathogenic role of CREM α *in vivo* and provides evidence that the expression of CREM α in T cells of patients with SLE does not represent an epiphenomenon. Moreover CREM α might be a new transcription factor which is crucial for the regulation of Tregs, Th17 and T_{fh} cells. This work therefore contributes to the understanding of the complex transcription factor network in T cell subsets.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Inhaltsverzeichnis	V
Verzeichnis der Abkürzungen	VIII
1 Einleitung.....	- 1 -
1.1 Das Immunsystem.....	- 1 -
1.2 Autoimmunerkrankungen	- 2 -
1.3 Systemischer Lupus erythematosus.....	- 2 -
1.4 Die zelluläre Immunantwort und ihr Beitrag zum Entstehen von Autoimmunität . -	- 2 -
1.4.1 Th1 Zellen	- 3 -
1.4.2 Th2 Zellen	- 4 -
1.4.3 Th17 Zellen	- 4 -
1.4.4 Regulatorische T-Zellen	- 5 -
1.4.5 Follikuläre T-Helferzellen.....	- 7 -
1.4.6 Plastizität und Verwandtschaft der T-Zell Subtypen.....	- 8 -
1.5 cAMP responsive element modulator α (CREMα).....	- 10 -
1.5.1 CREM α als Chromatin-Modellierer	- 10 -
1.5.2 CREM α in T-Zellen	- 11 -
1.6 Zielsetzung	- 12 -
2 Geräte und Chemikalien	- 14 -
2.1 Geräte	- 14 -
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	- 14 -
2.3 Antikörper.....	- 16 -
2.4 Zytokine.....	- 18 -
2.5 Chemikalien und Seren.....	- 18 -
2.6 Kits.....	- 20 -
2.7 Zellmedien, Puffer und Lösungen	- 20 -

2.8	Primer	- 22 -
3	Methoden	- 23 -
3.1	Tierexperimentelle Methodik	- 23 -
3.1.1	DSS-induzierte Kolitis	- 23 -
3.1.2	Kontaktdermatitis	- 23 -
3.1.3	DNFB-induzierte Kolitis	- 24 -
3.1.4	Transferkolitis	- 24 -
3.1.5	Immunisierung	- 24 -
3.1.6	Messung der Lymphadenopathie	- 24 -
3.2	Immunologische Methoden	- 25 -
3.2.1	Isolation von Zellen aus Milzen und Lymphknoten	- 25 -
3.2.2	Isolation von PBMCs aus Vollblut	- 25 -
3.2.3	Magnetische Separation von Lymphozyten	- 25 -
3.2.4	Isolation von BMDCs aus Knochenmark und Generierung dendritischer Zellen	- 25 -
3.2.5	T-Zell Präparation über eine Nylonsäule	- 26 -
3.2.6	CFSE-Färbung	- 26 -
3.2.7	Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie	- 26 -
3.2.8	<i>In vitro</i> Differenzierung muriner T-Zellen	- 27 -
3.2.9	<i>In vitro</i> Differenzierung humaner T-Zellen	- 27 -
3.2.10	<i>In vitro</i> Suppressionsassay	- 28 -
3.2.11	ELISA	- 29 -
3.3	Methoden der Molekularbiologie	- 30 -
3.3.1	RNA Isolation	- 30 -
3.3.2	cDNA-Synthese	- 30 -
3.3.3	RT-PCR	- 30 -
3.3.4	Extraktion von Kernproteinen	- 30 -
3.3.5	SDS Gelelektrophorese	- 31 -
3.3.6	Western Blot	- 31 -
3.3.7	Proteinbestimmung nach Bradford	- 31 -
3.3.8	Koimmunpräzipitation von FoxP3 und CREM	- 32 -
3.3.9	Immundetektion	- 32 -
3.3.10	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	- 33 -
3.3.11	Genexpressionsanalyse mit DNA-Microarrays	- 34 -
4	Ergebnisse	- 35 -
4.1	CREMα verstärkt den Krankheitsprogress in einem murinen Lupus Modell	- 35 -

4.1.1	CREM α induziert eine verstärkte Lymphadenopathie und Splenomegalie und führt zu einer verkürzten Lebenserwartung von Lupus Mäusen	- 35 -
4.1.2	Lymphadenopathie und Splenomegalie werden durch eine Expansion aberranter T-Zellen verursacht.	- 36 -
4.1.3	Es entsteht ein gestörtes Gleichgewicht von Tregs und Th17 Zellen in CREM TG fas-/- Mäusen-	38 -
4.2	Die Rolle von CREMα in regulatorischen T-Zellen.....	- 41 -
4.2.1	Regulatorische T-Zellen exprimieren CREM	- 41 -
4.2.2	Die Expression von CREM α in regulatorischen T-Zellen ist <i>in vitro</i> von funktioneller Relevanz .	- 42 -
4.2.3	Die Expression von CREM α in regulatorischen T-Zellen ist <i>in vivo</i> von funktioneller Relevanz..	- 46 -
4.2.4	CREM α bildet einen Komplex mit FoxP3	- 48 -
4.2.5	CREM α reguliert möglicherweise die Transkription von suppressorisch agierenden Proteinen..	- 50 -
4.3	Die Rolle von CREMα in Th17 Zellen	- 52 -
4.3.1	Th17 Zellen exprimieren CREM.....	- 52 -
4.3.2	CREM α induziert einen Th17 Phänotyp <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	- 53 -
4.3.3	CREM α bindet und aktiviert den IL-17a Promotor	- 57 -
4.4	Die Überexpression von CREMα in T-Zellen induziert eine verstärkte B-Zell Antwort	- 58 -
4.4.1	CREM-Überexpression führt in Lupus Mäusen zu einer verstärkten B-Zell Hyperaktivität	- 58 -
4.4.2	Die hyperaktiven B-Zellen gehen einher mit einem vermehrten Anteil an follikulären T-Helferzellen	- 59 -
4.4.3	Die Rolle von CREM α in follikulären T-Helfer-Zellen.....	- 61 -
4.4.4	CREM α induziert eine verstärkte Immunisierung.....	- 62 -
5	Diskussion	- 64 -
5.1	CREMα führt zu verstärkten Krankheitserscheinungen im murinen Lupus	- 65 -
5.2	CREMα reguliert Auftreten und Funktionalität von regulatorischen T-Zellen	- 66 -
5.3	CREMα induziert Th17 Zellen	- 68 -
5.4	CREMα Überexpression in T-Zellen führt zu verstärkten B-Zell Antworten	- 70 -
5.5	CREMα induziert T-Zell vermittelte Autoimmunität	- 72 -
6	Ausblick	- 74 -
	Literaturverzeichnis	- 77 -
	Danksagung.....	- 88 -
	CURRICULUM VITAE.....	- 90 -

Verzeichnis der Abkürzungen

AICD	aktivierungs-induzierter Zell Tod
anti-dsDNA	anti-Doppelstrang DNA
APC	Allophycocyanin
APCs	<i>antigen-presenting cells</i> , Antigen-präsentierende Zellen
ATF	<i>activating transcription factor</i>
Bcl-6	B-cell lymphoma-6
BMDCs	<i>bone marrow derived cells</i> , Zellen des Knochemarks
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Albumin Fraktion V
bZip	basischer Leucin Zipper
CAMK	<i>calcium/calmodulin dependent kinase</i>
cAMP	<i>cyclic adenosinmonophosphate</i>
CBP	<i>cAMP binding protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>carboxyfluorescein diazetatsuccinimidylester</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CoIP	Koimmunpräzipitation
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREM	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CREM TG	CREM α transgen, T-Zell spezifische CREM α Überexpression
CREM-/-	CREM deletiert
ct	<i>cycle threshold</i> , Schwellenwert-Zyklus
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
CXCL	C-X-C Chemokin Ligand
CXCR	C-X-C Chemokin rezeptor
DC	<i>dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
dd H ₂ O	doppelt destiliertes Wasser
DNFB	2,4-Dinitro-1-Fluorobenzen
DNMT	DNA-Methyltransferase
DSS	Dextran Sodium-Sulfat
DTT	Dithiotreitol
EAE	experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
EGTA	Ethylenglycol-bisaminoethylethertetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , bezeichnet hier: Durchflusszytometrie
fas-/-	fas (CD95) deletiert
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>
GATA	trans-acting T-cell-specific transcription factor
GC	<i>germinal center</i> , Keimzentren
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
Gzm	Granzym
HAT	Histon-Azetylase
HDAC	Histon-Deazetylase
HRP	Horseradish-Peroxidase
i.p.	intraperitoneal
ICER	<i>inducible cAMP early repressor</i>
ICOS	<i>inducible T-cell co-stimulator</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-21R Fc	Fusionsprotein des IL-21 Rezeptor und eines Fc-Fragments
IPEX	<i>immun-dysregulation, polyendokrinopathie - enteropathie , X-chromosomale</i>
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
JIA	juvenile idiopathische Arthritis
JIA	juvenile idiopathische Arthritis
Klri2	killer-cell lectin-like Rezeptor2
LAG3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NIP	Hydroxyiodonitrophenylacetyl
NK	<i>Natural killer</i>
NP-CGG	Hydroxynitrophenylacetyl-Chicken Gamma Globulin
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
OVA	Ovalbumin
PB	<i>Pacific-Blue</i>
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicilin/Streptavidin
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prf	Perforin
RAG-/-	rag deletiert
Rec	Rekombinase
RORg	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFMC	<i>synovial fluid mononuclear cells</i> , Zellen aus Kniepunktat
SLE	systemischer Lupus erythematosus
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TF II D	<i>TATA box binding Factor IID</i>
Tfh	follikuläre T-Helferzelle

TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNBS	<i>trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
TSDR	<i>Treg-specific demethylated region</i>
usw.	und so weiter
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Zellen zusammen, deren Zusammenwirken eine Abwehr gegen eindringende Pathogene, wie Pilze, Viren, Bakterien und tierische Parasiten bewirkt. Gelingt es pathogenen Mikroorganismen über die Schleimhäute oder Epithelien in den Körper einzudringen, werden zuerst Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems aktiviert. Das angeborene Immunsystem setzt sich aus einer Vielzahl von Komponenten zusammen, zu denen anti-mikrobielle Peptide, das Komplementsystem und Mucus gehören. Auf zellulärer Ebene sind Makrophagen, Neutrophile und natürliche Killer (NK)-Zellen von zentraler Bedeutung. Im weiteren Verlauf der Infektion setzen dann auch Mechanismen des adaptiven Immunsystems ein, die durch B- und T-Zellen vermittelt werden. Das angeborene Immunsystem erkennt konservierte chemische Motive, die für Pathogene charakteristisch sind, zum Beispiel Lipopolysaccharid-Bausteine der Bakterienzellwand, die von Toll-like Rezeptoren gebunden werden. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems werden von einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Dadurch ist die angeborene Immunreaktion schnell verfügbar, zeichnet sich allerdings durch eine geringe Spezifität aus. Die adaptive Immunantwort ist dagegen hochspezifisch, da die Erkennung des Fremdmaterials auf somatischen Rearrangements von Gen-Elementen beruht und exakt auf das jeweilige Pathogen zugeschnitten ist. Die längere Anlaufphase für eine effektive Immunantwort ist durch die Proliferation der Zellen bedingt, die spezifisch für das jeweilige Pathogen sind. Man unterteilt die adaptive Immunantwort in eine über Antikörper vermittelte humorale Immunität, die auf den B-Lymphozyten basiert, und eine über T-Lymphozyten vermittelte zelluläre Immunität. B-Lymphozyten, die zu Plasmazellen differenziert sind, sezernieren große Mengen spezifischer Antikörper, die durch Neutralisierung oder Opsonierung des pathogenen Antigens bzw. durch Aktivierung von Komplement wirken können. Die Differenzierung zu Plasmazellen erfordert in den meisten Fällen neben der B-Zell Rezeptor-Aktivierung durch das Antigen ein weiteres Signal von einer für das Antigen spezifischen T-Zelle. Diese erkennt das Antigen auf der B-Zell Oberfläche im *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse II Komplex und induziert durch die Wechselwirkung zwischen *cluster of differentiation* (CD)40 Ligand und CD40 auf der B-Zelle sowie durch die Sekretion stimulierender Zytokine die B-Zell Differenzierung (1).

Die Aktivierung naiver antigenspezifischer T-Zellen erfolgt durch antigenpräsentierende Zellen (APCs). Als APCs können dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen fungieren, die Präsentation erfolgt über MHC Komplexe (2). CD8+ T-Zellen erkennen Peptide, die über MHC-Klasse-I Komplexe präsentiert werden und erfüllen zytotoxische Funktionen, CD4+ T-Zellen erkennen die über MHC-Klasse-II präsentierten Peptide (3). Neben der TCR-

Aktivierung durch die Präsentation des jeweiligen Antigens muss die T-Zelle ein zweites kostimulatorisches Signal durch die Interaktion von CD28 auf der T-Zelle mit einem B7 Molekül auf der Oberfläche der APC erhalten, um Proliferation und Differenzierung zu initiieren. Modulatoren dieses Prozess sind verschiedenste Zytokine, IL-2 ist als autokriner T-Zell Wachstumsfaktor eines der Schlüssel-Zytokine (4).

1.2 Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen entstehen, wenn anhaltende adaptive Immunantworten gegen körpereigene Antigene ausgelöst werden. Vorausgehend ist ein Verlust der Selbst-Toleranz gegenüber Autoantigenen. Je nachdem, ob die Antikörper gegen Gewebe/Organ-spezifische Antigene gerichtet sind oder unspezifisch sind, kommt es zu organspezifischen oder systemischen Erkrankungen. Zu den organspezifischen Autoimmunerkrankungen zählen zum Beispiel Diabetes mellitus Typ 1 und Morbus Crohn, eine systemische Erkrankung entwickelt sich beim Systemischen Lupus erythematosus (SLE) und bei der Rheumatoiden Arthritis.

1.3 Systemischer Lupus erythematosus

Der SLE tritt in Europa mit einer Inzidenz von 25-27 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen auf, dabei sind 9 von 10 Betroffenen weiblich. Die genaue Ursache ist ungeklärt, vermutlich führen multifaktorielle Geschehnisse zu der Erkrankung, darunter genetische Prädispositionen, hormonelle Faktoren und exogene Einflüsse (5). Typisches Kennzeichen der Erkrankung auf zellulärer Ebene ist eine verstärkte Apoptose sowie eine defekte Beseitigung von apoptotischen Zellen (6). Ein darauf folgender Verlust der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen, besonders gegenüber nukleären Komponenten, führt zum Auftreten von autoreaktiven B und T-Zellen und zur Produktion von Auto-Antikörpern (5). Es entstehen zirkulierende Immunkomplexe, die aus Antigen, Antikörper, Komplement und Fibrin zusammengesetzt sind. Ablagerungen von Immunkomplexen und daraus entstehende Entzündungsreaktionen können multiple Organ- und Gewebeschäden verursachen.

1.4 Die zelluläre Immunantwort und ihr Beitrag zum Entstehen von Autoimmunität

Naive T-Zellen differenzieren in verschiedene T-Zell-Subtypen. Die Differenzierung ist abhängig vom Zytokin-Milieu bzw. der Expression der jeweiligen Zytokin-Rezeptoren auf der T-Zell Oberfläche und der Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren (Abbildung 1). Man unterscheidet Th1, Th2, Th17 Zellen, folliculäre T-Helferzellen (Tfh) und regulatorische T-Zellen (Tregs) voneinander. Durch die Differenzierung in unterschiedlich agierende Subtypen erfüllen T-Zellen umfassende Funktionen bei der Abwehr von Pathogenen. Dabei wirken

CD4⁺ T-Zellen durch ihre Zytokinsekretion als zentrale Effektoren und Aktivatoren anderer Immunzellen. Kritisch ist jedoch das Auftreten auto-reaktiver T-Zellen oder das unkontrollierte Expandieren von T-Zellen. Im gesunden Organismus unterliegen autoreaktive T-Zellen einer Eliminierung im Thymus und zu starke T-Zell Antworten werden durch supprimierende T-Zellen (Tregs) unterdrückt. Funktionieren diese Mechanismen nicht, können organspezifische oder systemische Autoimmunerkrankungen die Folge sein. Im Folgenden soll auf die einzelnen T-Zell -Subtypen und ihre Rolle in Autoimmunerkrankungen eingegangen werden.

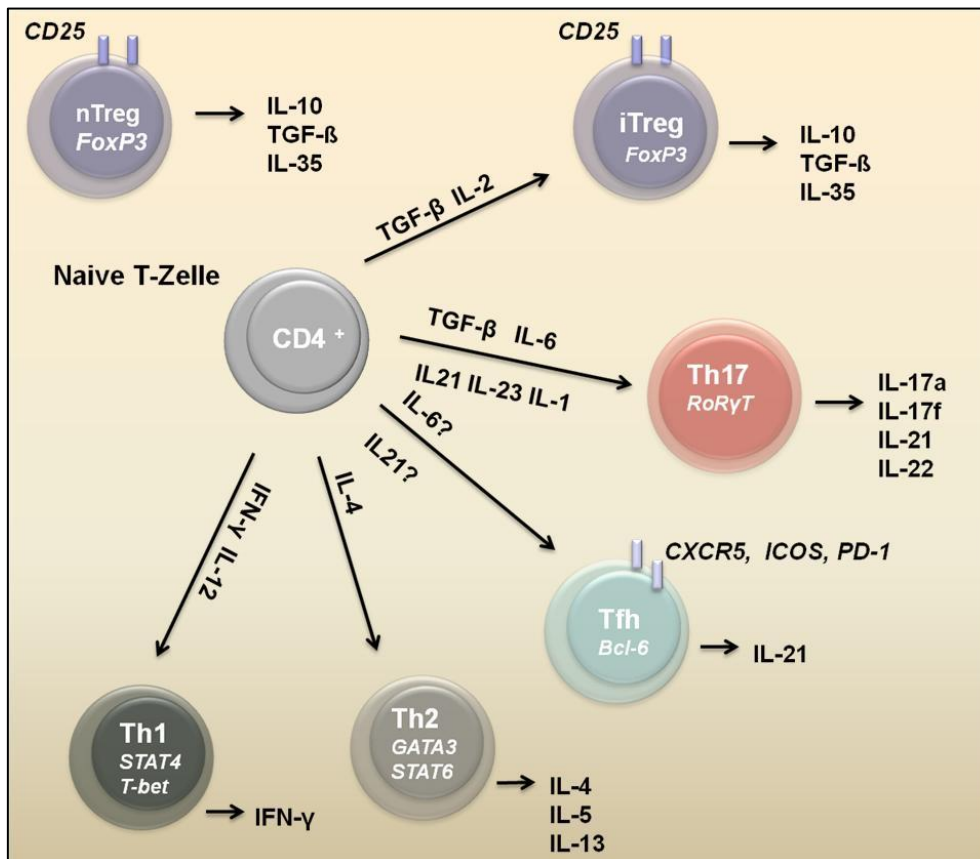


Abbildung 1: T-Zell Differenzierung. Nach Stimulation durch eine antigenpräsentierende Zelle differenzieren naive CD4⁺ T-Zellen in verschiedenen T-Zell Subtypen. Entscheidend ist das Zytokinmilieu (auf den Pfeilen angezeigt) sowie die Expression und Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren (im Inneren der Zellen aufgeführt). Die einzelnen T-Zell Subtypen zeichnen sich aus durch die Expression bestimmter Oberflächenmarker (kursiv) sowie durch die Sekretion verschiedener Zytokine. Dadurch üben sie unterschiedliche Funktionen im Rahmen einer Immunantwort aus.

1.4.1 Th1 Zellen

Interleukin(IL)-12 und die Transkriptionsfaktoren *signal transducer and activator of transcription*(STAT)4 und T-bet fördern die Differenzierung in Interferon(IFN)- γ produzierende Th1 Zellen (7) (Abbildung 1). Th1 Zellen wirken vor allem auf die zelluläre Immunantwort durch die Aktivierung von Makrophagen und cytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Lange Zeit nahm man an, dass Th1 Zellen die größte Rolle in Autoimmunerkrankungen zukommt, da Th1

vermittelte Effekte durch IFN- γ viele Erscheinungen von Autoimmunerkrankungen erklären (8). Dazu gehören die Aktivierung von Makrophagen, sowie Aktivierung von Komplement und die Induktion der Produktion von Immunglobulin(IgG)2a und IgG3. Allerdings zeigen IFN- γ defiziente Mäuse in murinen Autoimmunitäts-Modellen wie experimenteller Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) (9) und Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) (8, 10) eine stärkere Anfälligkeit, und neuere Studien decken mehrere Mechanismen auf, über die IFN- γ inflammatorischen Reaktionen sogar entgegenwirkt (11).

1.4.2 Th2 Zellen

IL-4 mit Hilfe von *trans-acting T-cell-specific transcription factor* (GATA)-3 und STAT6 fördert die Th2 Differenzierung (Abbildung 1). Th2 Zellen sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13 (12). Sie sind an der humoralen Immunantwort beteiligt durch die Stimulation der B-Zell Proliferation und des Antikörper-Klassenwechsels. Darüber hinaus erfüllen sie wichtige Aufgaben bei der Abwehr extrazellulärer Parasiten. Th2 Zellen sind bei den meisten Autoimmunerkrankungen vermutlich nicht in die Pathogenese involviert. Im SLE nimmt man an, dass IL-4 Einfluss auf die Differenzierung autoreaktiver B-Zellen nimmt, allerdings nicht als alleinig treibende Kraft (13).

1.4.3 Th17 Zellen

Bei Th17-Zellen handelt es sich um einen T-Zell Subtyp, der IL-17a und IL-17f sowie IL-22 und IL-21 sezerniert. Die Zytokine *transforming growth factor* (TGF)- β und IL-6, IL-23, IL-1 oder IL-21 und die Transkriptionsfaktoren STAT3 und *RAR-related orphan receptor gamma*(ROR γ)T führen zu einer Th17 Differenzierung (Abbildung 1) (14-22). Neben ROR γ T spielt phosphoryliertes STAT3 eine wichtige Rolle, welches durch IL-6 und IL-23 initiierte Signalwege aktiviert wird (23, 24). Th17 Zellen sind wichtig für die Elimination von einigen Erregern, die weder von Th1 noch Th2 Zellen beseitigt werden können, darunter Bakterien wie *Citrobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Borrelia burgdoerferi* und Pilze, wie *Candida albicans* (8). Neben dieser protektiven Rolle begünstigen Th17 Zellen chronische Entzündungsprozesse durch die Sekretion von IL-17a und stehen daher in engem Zusammenhang mit Gewebeentzündungen und Organschäden im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, beispielsweise im Falle der Rheumatoiden Arthritis, der Multiple Sklerose oder dem SLE (25-27). In zahlreichen Studien konnten erhöhte IL-17a Level im Serum von Patienten mit Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden (27-33). Die Relevanz von IL-17a bei Entstehung und Fortschreiten von verschiedenen Autoimmunerkrankungen zeigt sich auch am Beispiel muriner Krankheitsmodelle. In der murinen EAE und der CIA zeigen IL-17a defiziente Mäuse abgeschwächte Krankheitserscheinungen (34, 35). Die pathogene Rolle von IL-17a

gründet sich auf multiple Effekte, die IL-17a auf verschiedenste Zelltypen ausübt. IL-17-Rezeptoren sind nicht nur auf Immunzellen, sondern auch auf epithelialen und endothelialen Zellen zu finden (22, 36-38). Die IL-17a Bindung an diese Rezeptoren führt zur Expression von Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen und damit zur Rekrutierung von Monozyten, T-Zellen und Neutrophilen in das inflammatorische Gewebe (39-42). Zusätzlich kommt es zur Freisetzung von proinflammatorischen Proteinen (42-44) und Zytokinen, wie Interleukin(IL)-6, IL-1 β und IL-21, die durch eine positive Rückkopplung eine weitere IL-17a Produktion bewirken (45). Nach neuesten Erkenntnissen ist IL-17a alleine oder in Synergie mit weiteren Faktoren außerdem in der Lage, die B-Zell Differenzierung und Autoantikörper-Produktion zu fördern und greift damit auch in die humorale Immunantwort ein (46, 47).

1.4.4 Regulatorische T-Zellen

Neben T-Zellen, die aktivierend auf die Immunantwort wirken und daher auch als Effektor-T-Zellen bezeichnet werden, gibt es ebenfalls T-Zellen die eine Immunantwort unterdrücken, sogenannte Suppressor-T-Zellen. Man kennt mehrere Untergruppen von suppressorisch agierenden T-Zellen. Die größte immunregulatorische Bedeutung kommt, nach derzeitigem Kenntnisstand, Tregs zu. Tregs sind durch die Oberflächenexpression von CD4 und der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25), gekennzeichnet und im gesunden Organismus anhand der CD25 Expression von CD4-Effektorzellen unterscheidbar. *Forkhead box P3* (FoxP3) gilt als spezifischer Transkriptionsfaktor und bislang wichtigster transkriptioneller Regulator von Tregs (48-51). Es gibt zwei Populationen, natürliche Tregs (nTregs) und induzierte Tregs (iTregs), die sich in ihrer Entstehung unterscheiden, funktionell oder phänotypisch allerdings kaum voneinander abweichen. Induzierte Tregs werden in der Peripherie im Rahmen der Immunantwort gebildet. Das Zytokin TGF- β induziert über die Expression von FoxP3 die Differenzierung in sogenannte iTregs (Abbildung 1). Natürliche Tregs sind schon im Thymus generierte und durch eine hohe Expression von CD25 und FoxP3 charakterisierte CD4⁺ T Zellen (52). Tregs kontrollieren in erster Linie die Expansion und Aktivierung von CD4⁺ T Zellen (50, 53). Neben der Suppression der CD4⁺ T Zellen, hemmen Tregs auch die B-Zell-Proliferation und IgG Produktion sowie die Aktivität von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (54, 55).

Die Suppression durch Tregs erfolgt über multiple Mechanismen, die vermutlich redundant wirken (Abbildung 2) (56). Tregs verändern beispielsweise das Zytokin-Milieu, zum einen durch Sekretion von inhibitorischen Zytokinen, wie IL-10, TGF- β und IL-35 (57-60). Zum anderen nehmen sie durch die hohe Expression des IL-2 Rezeptors große Mengen IL-2 auf, das den Effektor-T-Zellen dann nicht mehr zur Verfügung steht (53, 61, 62). Des Weiteren gibt es einen Zellkontakt-abhängigen, zytotoxischen Mechanismus, bei dem Tregs durch die Freisetzung von Granzym (Gzm) den Zelltod von Effektor-T-Zellen einleiten (63). Darüber

hinaus modulieren Tregs die Funktion von APCs, zum Beispiel durch die Interaktion von *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) und *lymphocyte-activation gene 3* (LAG3) auf der Oberfläche von Tregs mit CD80/CD86 Molekülen auf APCs. Diese Interaktion führt zur Expression von Indoleamine 2,3-dioxygenase, was in einer Suppression von Effektor-T-Zellen resultiert (64, 65).

Ein wichtiges Zytokin, das Überleben, Entwicklung im Thymus und die suppressive Funktion von Tregs steuert, ist IL-2 (66, 67). IL-2 defiziente oder IL2R defiziente Mäuse zeigen einen Phänotyp mit einer starken Vergrößerung der peripheren Lymphorgane und entwickeln Autoimmunität, was auf fehlende und defekte Tregs in diesen Mäusen zurück geführt werden konnte (68, 69).

Tregs sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz und Immun-Homöostase. Die *scurfy* Maus, eine FoxP3 Mutante, entwickelt spontan exzessive Th1 Th2 und Th17 Antworten, eine gesteigerte humorale Immunantwort und einen starken Autoimmunitätsphänotyp (70, 71). Auch Menschen, die Träger einer FoxP3 Mutation sind, entwickeln starke Autoimmunerkrankungen, meist tritt schon im Kindesalter ein sogenanntes *immun-dysregulation, polyendokrinopathie – enteropathie - X-chromosomales* (IPEX) Syndrom auf (72, 73).

Man nimmt an, dass im Falle von Autoimmunerkrankungen mit fehlregulierten T-Zell Antworten entweder eine Verringerung der Anzahl der Tregs, ein Defekt ihrer Funktionalität oder eine Resistenz der Effektor T-Zellen gegenüber der Treg vermittelten Suppressivität vorliegt. Bislang kommen Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen darüber, ob es eine Reduktion von Tregs im Rahmen von Autoimmemkrankungen gibt (74). Erschwerend bei der Analyse dieser Fragestellung ist die genaue Charakterisierung von Tregs im humanen System. Dadurch, dass aktivierte Effektor T-Zellen ebenfalls CD25 und Foxp3 exprimieren, ist die exakte Bestimmung der Treg Anzahl in humanen PBMCs bislang schwierig. Dennoch zeigen einige Studien in SLE Patienten eine Reduktion der Tregs, die auch mit einem Anstieg der Krankheitsaktivität korreliert (75, 76). Daneben weisen Tregs von SLE Patienten eine defiziente Funktionalität auf (77).

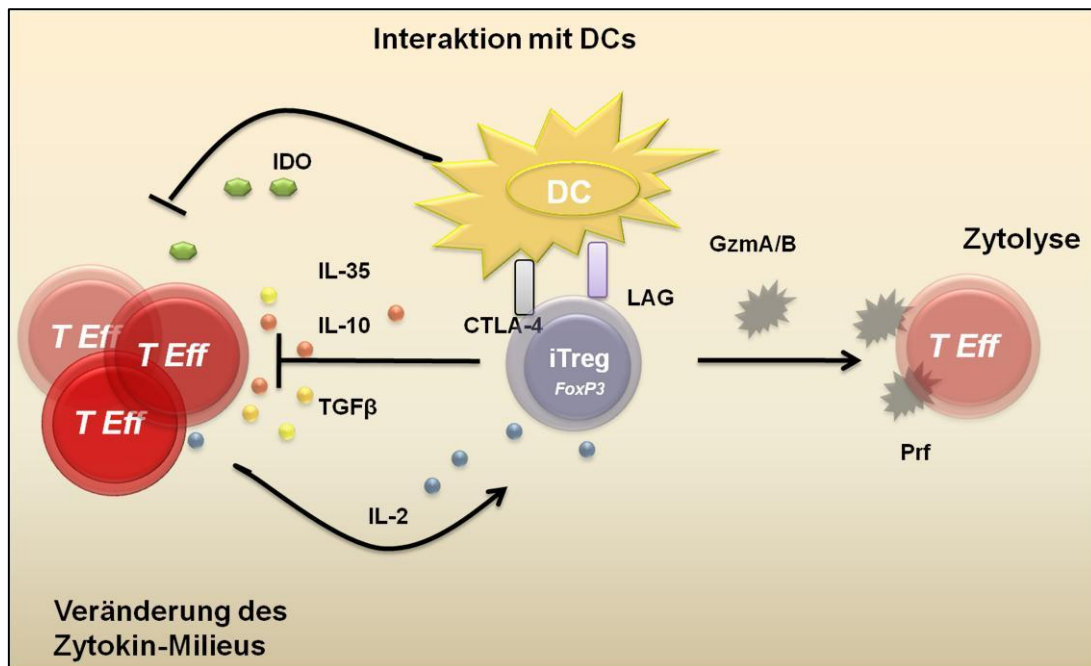


Abbildung 2: Mechanismen, über die Tregs CD4+ Effektorzellen supprimieren. Tregs verändern das Zytokinmilieu durch einen hohen Verbrauch von IL-2 und durch die Sekretion von IL-10, IL-35 und TGF-β. Tregs können ebenfalls Perforin-(Prf) und Gzm-abhängig zytotoxisch auf CD4+ Effektorzellen einwirken oder über eine Interaktion mit APCs die Expansion von CD4+ T-Zellen hemmen.

1.4.5 Follikuläre T-Helferzellen

Follikuläre T-Helferzellen sind nach ihrer Lokalisation in den follikulären Keimzentren (*germinal center*, GC) benannt. GCs sind Strukturen, die sich innerhalb der B-Zellfollikel sekundärer Lymphorgane bilden. Nach einer ersten Interaktion zwischen B-Zellen und T-Zellen an der Grenze zwischen T-Zellzone und Follikel wandern Subtypen der B-Zellen und T-Zellen in den Follikel ein und formen die GCs, aus denen hoch-affine und langlebige Plasma-Zellen und Memory B-Zellen austreten (78). Die B-Zell Hilfe übernehmen die sogenannten Tfh (79-81). Tfh produzieren kaum IFN-γ, IL-4 oder IL-17a, sondern üben ihre Funktion über die Expression von CD40L und IL-21 aus (82-84). IL-21 ist einerseits autokriner Wachstumsfaktor für Tfh, andererseits stimuliert das von den Tfh produzierte IL-21 direkt B-Zellen (Abbildung 1) (85-87).

Tfh zeichnen sich durch eine hohe Expression der zwei kostimulatorischen Moleküle *inducible T-cell co-stimulator* (ICOS) und *programmed death-1* (PD-1) aus (88). Weiterhin exprimieren sie *C-X-C chemokine receptor type* (CXCR)5 auf der Oberfläche. CXCR5 ist ein Chemokinrezeptor, der die Migration entlang von *C-X-C chemokine ligand* (CXCL)13 Gradienten steuert und den Eintritt in die Keimzentren ermöglicht (87, 89).

Der Transkriptionsfaktor *B-cell lymphoma-6* (Bcl-6) reguliert die Tfh Differenzierung und induziert die CXCR5 Expression (90, 91), allerdings gibt es keine uniforme Expression von

Bcl-6 in allen GC T-Zellen, so dass Bcl-6 nicht als spezifischer Transkriptionsfaktor für TfhS gilt (92).

Eine Dysregulation der T-Zell abhängigen B-Zell Hilfe in den Keimzentren steht in Verbindung mit dem Entstehen von Autoimmunerkrankungen. Da in der GC-Reaktion hoch-affine langlebige Antikörper gebildet werden, müssen Antikörper-bildende Zellen stark kontrolliert werden. Die Auswahl erfolgt durch positive Selektion, das heißt B-Zellen treten in Wettbewerb um die T-Zell Hilfe (92). Autoreaktive B-Zellen erhalten normalerweise keine T-Zell abhängige Hilfe, um in Plasmazellen zu differenzieren, sondern werden apoptotisch und sind daher nicht innerhalb der Plasmazellen oder Memory B-Zell Pools zu finden (93). Kommt es in den GCs zu Anomalitäten, wie zum Beispiel dem Auftreten von autoreaktiven T-Zellen, einer Dysregulation der Tfh Funktion oder einer erhöhten Anzahl von TfhS, kann es zu einer Freisetzung autoreaktiver B-Zellen kommen (94, 95). Eine Freisetzung autoreaktiver B-Zellen kann zur Entstehung von Autoimmunität führen (96). Zahlreiche Lupus Mausmodelle zeigen die Folgen von GC Fehlregulationen auf. Die *sanrouque* Maus ist Träger einer Mutation in einem Gen, das ein negativer Regulator der Tfh Entwicklung ist. Diese Maus weist eine Überproduktion von IL-21 auf sowie erhöhte Level von Tfh Zellen und entwickelt Autoimmunität (95). *Mrl/lpr* Mäuse, Mäuse eines murinen Lupus Modells, entwickeln mit zunehmendem Alter und einhergehender Erkrankung eine erhöhte Anzahl TfhS und extrafollikulärer T Helferzellen (97). Eine Behandlung der Mäuse mit IL-21 Rezeptor Fc, der den IL-21 Signalweg hemmt, führt zu reduzierten Auto-Antikörper-Spiegeln sowie verringerten SLE-ähnlichen Symptomen (98). In einem weiteren Lupus Modell, der sogenannten BXSB.B6-Yaa Maus sind ebenfalls erhöhte IL-21 Level zu finden (99). Die Deletion von IL-21 führt zu einer Verringerung der CXCR5+ICOS+ CD4+ T-Zellen in der Maus und kann den Ausbruch der Erkrankung verhindern (100).

In SLE Patienten überleben autoreaktive B-Zellen in den GCs und differenzieren in Plasmazellen und Memory Zellen (93), so dass man von einer Dysregulation der GC Reaktion sprechen kann. SLE Patienten haben weiterhin erhöhte Level von IL-21 im Serum und einige Patienten weisen verstärkt CD4+CXCR5+ Zellen im Peripherblut auf (101-103).

1.4.6 Plastizität und Verwandtschaft der T-Zell Subtypen

Man nahm ursprünglich an, dass sich T-Zellen im Rahmen der Differenzierung irreversibel zu einer der T-Zell Subtypen entwickeln. Heute weiß man, dass die Subtypen eher plastisch sind und es unter bestimmten Bedingungen zu einer Reprogrammierung der Zellen kommen kann. Da Lymphozyten während der Migration durch verschiedene Organe unterschiedlichsten Bedingungen ausgesetzt sind und nach Antigen-spezifischer Aktivierung vielfache Zellteilungen eingehen, kann eine Reprogrammierung im Rahmen der Immunantwort entscheidende Folgen haben (104). Die engste Verwandtschaft besteht zwischen den zwei antagonis-

tisch agierenden Subtypen Tregs und Th17. Die Entwicklung der beiden Subtypen verläuft reziprok. TGF- β induziert die Differenzierung von naiven T-Zellen in Tregs, die zusätzliche Anwesenheit eines inflammatorischen Zytokins, IL-6 oder IL-21 resultiert jedoch in einer Differenzierung in Th17 Zellen (14, 105, 106). IL-2 ist ein essentieller Wachstumsfaktor für Tregs, aber ein Inhibitor der Th17 Differenzierung (107, 108), IL-21 fördert die Th17 Differenzierung, aber hemmt die Treg Differenzierung (17). Trotz dieser Divergenzen zeigen *in vivo* Experimente, dass Tregs in einem bestimmten Kontext beginnen, IL-17a zu produzieren (109, 110). Diese sogenannten exTregs konvertieren in IL-17a produzierende, inflammatorische Effektor-Zellen und bedingen Autoimmunität (111, 112). Auf Ebene der Transkriptionsfaktoren stellt man fest, dass es im murinen System Zellen gibt, die ROR γ T und FoxP3 koexprimieren, sowie im humanen System eine Subpopulation von Tregs, die ROR γ T exprimieren und IL-17a sekretieren (113-115). Die Konvertierung der Tregs erklärt sich vermutlich daraus, dass ROR γ T und FoxP3 koexprimiert werden, miteinander interagieren und sich gegenseitig in ihrer Funktion hemmen (116, 117). Dabei scheint es so zu sein, dass TGF- β sowohl FoxP3 als auch ROR γ T induziert, aber FoxP3 ROR γ T antagonisiert, bis IL-6 präsent ist (116). Bislang ist nicht bekannt, ob weitere Transkriptionsfaktoren an dieser Komplexbildung beteiligt sind. Diese Konversion eines supprimierenden in einen inflammatorischen T-Zell-Subtyp ist sicherlich von großer Relevanz. Es wird zum einen spekuliert, ob die reduzierte Anzahl Tregs in Patienten mit inflammatorischen Autoimmunerkrankungen sich in einer Konversion dieser Zellen in IL-17a sezernierende Zellen begründet. Zum anderen ist diese Konversion von Bedeutung in Bezug auf eine mögliche therapeutische Verwendung von Tregs.

Th17 Zellen und Tfh_s weisen einige Gemeinsamkeiten auf. Tfh_s teilen mit Th17 Zellen IL-21 als autokrinen Wachstumsfaktor (17-19), und beide leisten B-Zell Hilfe. Allerdings unterscheiden die beiden Subtypen sich in ihrer Lokalisation. Th17 Zellen wandern zu nicht-lymphoiden Geweben in die Entzündungsherde ein. Tfh_s dagegen finden sich in den folliculären Bereichen lymphoider Organe. Jedoch findet man im Falle von Autoimmunerkrankungen auch Tfh_s in Entzündungsherden bzw. eine Entwicklung von ektopen Keimzentren in Nähe von Entzündungsherden (118).

Th17 Konversionen in Th1 Zellen konnten ebenfalls im murinen und humanen System gezeigt werden (119-122).

Die Entdeckung konvertierender T-Zell Subtypen hat die bisherige Vorstellung von der klaren irreversiblen Differenzierung naiver T-Zellen in distinkte T-Zell-Subtypen widerlegt. Trotz der vielen kürzlich entdeckten Transitionen scheinen aber einige Konversionen nicht stattzufinden und zwar von Th2 zu Th17 oder Th2 zu Treg oder von Th1 zu Treg sowie Rekonversion in naive T Zellen (123).

1.5 cAMP responsive element modulator α (CREM α)

CREM α ist ein 35 kDa großes DNA Bindeprotein und gehört zur Familie der basischen Leucin-Zipper Domäne (bZip)-Transkriptionsfaktoren. Proteine dieser Familie weisen einen sogenannten Leucin-Zipper auf, der eine Dimerisierung ermöglicht. CREM α ist eine von vielen Isoformen, für die das *crem* Gen kodiert, es gilt als reprimierender Transkriptionsfaktor und ist die vorherrschende Isoform in T-Zellen. CREM und andere Transkriptionsfaktoren der bZip Proteine wie *cAMP response element-binding protein* (CREB), *inducible cAMP early repressor* (ICER) und *activating transcription factor* (ATF) binden an sogenannte *cAMP response elemente* (CRE), acht Basenpaar große palindromische DNA Sequenzen in den Promotoren ihrer Zielgene (124-126). Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren erfolgt nach Phosphorylierung durch Kinasen, darunter Proteinkinase(PKC) A und C und *calcium dependent kinase* (CAMK) IV und II (125, 127, 128).

1.5.1 CREM α als Chromatin-Modellierer

Chromatin ist ein Komplex aus DNA, Histonen und weiteren Proteinen. Damit Genexpression stattfinden kann, muss eine offene Form der Chromatinstruktur vorliegen. Durch Modifikationen an den Histonen wird die Öffnung der Chromatinstruktur gesteuert. Histon-Azetylasen (HATs) bewirken z.B. eine Azetylierung von Histonen, die DNA wird dadurch zugänglich für Transkriptionsfaktoren. Histon-Deazetylasen (HDACs) deazetylieren die Histone und bewirken eine Verdichtung des Chromatins und bedingen eine Repression der Gen-Aktivität. Eine weitere Modifikation sind Methylierungen, die vor allem in sogenannten CpG Inseln auftreten, das sind Regionen mit erhöhter Cytosin- und Guanin-Dichte in Promotorbereichen. DNA-Methyltransferasen (DNMTs) steuern die Methylierung dieser Bereiche.

Die Rekrutierung der Histon-modifizierenden Enzyme erfolgt durch Transkriptionsfaktoren. CREM α und CREB sind in dem Zusammenhang sowohl an Azetylierungs- als auch an Methylierungsprozessen beteiligt. Bislang am besten untersucht ist die Regulation des IL-2 Promotors durch CREM α , hier agieren CREM α und CREB antagonistisch (Abbildung 3). Sie binden *cAMP binding protein* (CBP) und p300, die HAT-Aktivität aufweisen (127, 129, 130). Allerdings besitzt CREM α die beiden Q-Domänen nicht, die notwendig sind um die HAT-Aktivität von CBP und p300 zu induzieren (125, 131) (Abbildung 3). Weiterhin ist CREM α nicht fähig den *TATA box binding factor IID* (TATIID) zu rekrutieren, der für die Initiation der Transkription essentiell ist (131, 132). Darüber hinaus bindet CREM α HDAC1 und vermittelt dadurch aktiv eine Deazetylierung von Histonen. (133). Als weiterer Mechanismus wurde kürzlich gezeigt, dass CREM α DNMT3 an den IL-2 Promotor heranzuführt und dadurch eine Hypermethylierung des IL-2 Locus initiiert (134).

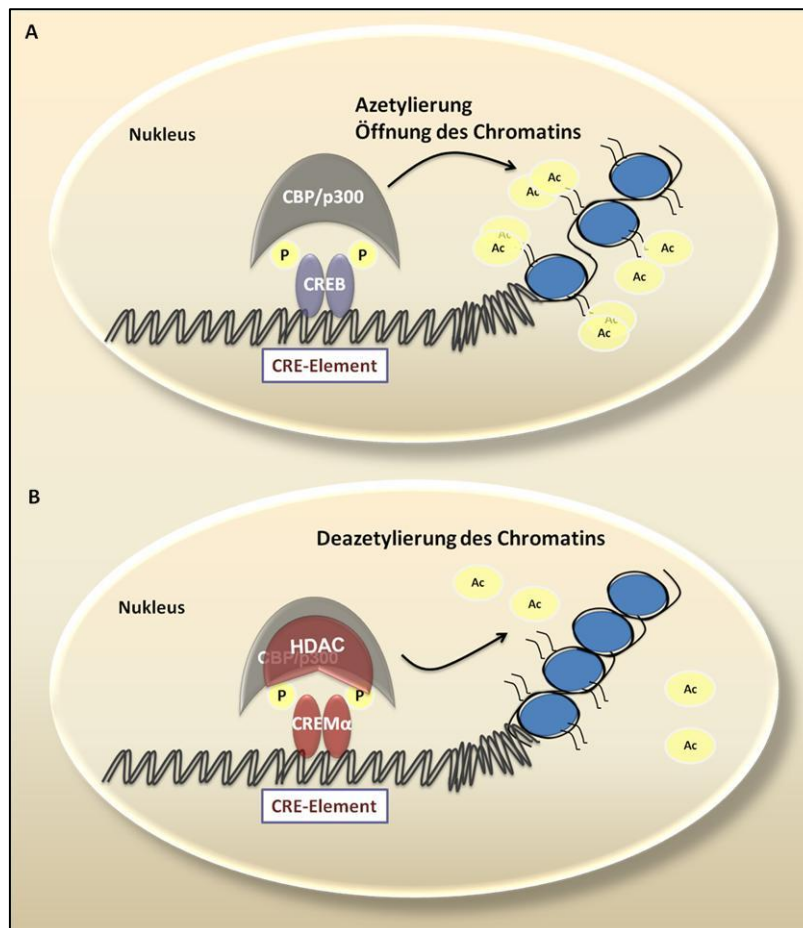


Abbildung 3: Modelle für die Rekrutierung von HATs/HDACs durch CRE bindende Proteine. A) CREB bindet an CRE-Elemente und kann die Histon-azetylierenden Kofaktoren CBP/p300 aktivieren. Die Azetylierung der Histone bewirkt ein Auflockern des Chromatins und ermöglicht die Initiation der Transkription. B) CREM α fehlt die Domäne, die eine Aktivierung von CBP/p300 ermöglicht. Außerdem rekrutiert CREM α HDAC1 und bewirkt somit passiv und aktiv, eine Suppression der Transkription.

1.5.2 CREM α in T-Zellen

CREM α und CREB sind als IL-2 regulierende Transkriptionsfaktoren zentrale Mediatoren der T-Zell Proliferation. Erhält die T-Zelle durch den T-Zell Rezeptor und CD28 Signale von einer Antigen-präsentierenden Zelle, kommt es zur Aktivierung von CREM α und CREB (135, 136). Während CREB die IL-2 Expression initiiert, kommt CREM α eine supprimierende Funktion zu. CREM α verdrängt CREB vom IL-2 Promotor und inhibiert die IL-2 Produktion. CREM α ist also ein wichtiger Faktor für die Termination der IL-2 Produktion.

Es wird vermutet, dass CREM α eine Rolle in Tregs spielt. Im Vergleich zu naiven T-Zellen exprimieren Tregs verstärkt CREM α (Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, (137)), was auf eine Induktion der CREM α Transkription durch FoxP3 zurückzuführen ist (138). Die hohe CREM α Expression in Tregs ist möglicherweise verantwortlich dafür, dass nTregs selber kein IL-2 produzieren. Bodor et al. beschrieben kürzlich ein Modell, in dem nTregs die

nukleäre Akkumulation von ICER, einer CREM-Isoform, in Effektor T-Zellen herbeiführen. Dort soll ICER die IL-2 Synthese hemmen und somit zu einer Suppression der T-Zell Proliferation führen (139).

In SLE T-Zellen wird CREM α verstärkt exprimiert und die CREM α Promotor-Aktivität korreliert mit der Krankheitsaktivität der Patienten (140). CREM α unterdrückt neben IL-2 auch die c-fos und CD3 ζ Expression und trägt damit zu einer aberranten T Zell Funktion bei, wie sie für SLE Patienten charakteristisch sein kann (141-143). Die zentrale Bedeutung von CREM α für die Regulation der IL-2 Transkription in SLE Patienten wurde dadurch belegt, dass die Blockade von CREM in SLE T-Zellen zu einer Wiederherstellung der IL-2 Produktion führt (141).

In Vorarbeiten unserer Gruppe wurde die für SLE Patienten typische CREM α Überexpression in murinen T-Zellen näher analysiert. Dazu wurde eine transgene Maus generiert, die CREM α T-Zell spezifisch überexprimiert (CREM TG Maus). In den T-Zellen dieser Maus wurden im Vergleich zu Wildtyp (WT) Mäusen eine reduzierte IL-2 und CD3 ζ Produktion gemessen. Interessanterweise exprimierten die T-Zellen dieser Maus allerdings mehr IL-17a und IL-21 als WT T-Zellen und zeigten eine verstärkte Entzündungsreaktion im Rahmen einer Kontaktdermatitis (144).

1.6 Zielsetzung

SLE ist eine schwere Autoimmunerkrankung, die nahezu alle Organe des menschlichen Körpers befallen kann. Die therapeutische Behandlung ist problematisch und beinhaltet immunsuppressive Medikation mit potentiell starken Nebenwirkungen. Kennzeichen der Erkrankung ist eine Produktion von pathogenen Autoantikörpern, daher wird SLE in erster Linie als B-Zell vermittelte Erkrankung gesehen. Darüber hinaus leisten T-Zellen aber einen entscheidenden Beitrag zum Fortschreiten der Erkrankung. T-Zellen von SLE Patienten weisen zahlreiche pathophysiologische Veränderungen auf, darunter eine verstärkte Expression von IL-17a und IL-21 und eine reduzierte IL-2 Expression. CREM α ist ein suppressiver Transkriptionsfaktor, der in diesen SLE T-Zellen überexprimiert ist und entscheidend an der defekten IL-2 Produktion in diesen Zellen beteiligt ist. Zusätzlich wurde eine positive Korrelation zwischen der Aktivität des CREM α Promotors und der Krankheitsaktivität von SLE Patienten nachgewiesen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde eine Maus generiert (CREM TG Maus), die eine T-Zell spezifische Überexpression von CREM α aufweist und deren T-Zellen, kongruent zu den T-Zellen von SLE Patienten, eine reduzierte IL-2 und CD3 ζ Expression zeigen, jedoch eine im Vergleich zum WT erhöhte Expression von IL-17a und IL-21.

Die vorliegenden Daten weisen auf eine Schlüssel-Rolle von CREM α für die pathogenen Funktionen von T-Zellen im Krankheitsgeschehen des SLE hin und werfen die Frage auf, ob CREM α oder CREM α regulierte Mechanismen ein mögliches therapeutisches Target darstel-

len könnten. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, detaillierte Erkenntnisse über CREM α und CREM α induzierte Mechanismen in T-Zellen zu erlangen.

Da die CREM TG Maus spontan keine Anzeichen von Autoimmunität entwickelt, sollen die Auswirkungen einer CREM α Überexpression in ein genetisches Lupus Modell (fas-/- Maus) durch Verpaarung von CREM TG mit fas-/- Mäusen analysiert werden. Neben einer phänotypischen Analyse der Krankheitsanzeichen soll anhand dieses Modells untersucht werden, auf welche T-Zell Subtypen CREM α im Rahmen von Autoimmunerkrankungen Einfluss nimmt und welche Zytokine durch eine CREM Überexpression von T-Zellen differentiell sezerniert werden.

In einem zweiten Schritt sollen die so identifizierten T-Zell Subtypen, in denen CREM α möglicherweise von Relevanz ist, unabhängig von dem Lupus Modell, untersucht werden. Dazu sollen mittels durchflusszytometrischer Analysen und durch *in vitro* T-Zell Differenzierungen die T-Zell-Subtypen in CREM defizienten Mäusen (CREM-/-) und CREM TG Mäusen untersucht werden. Dadurch gewonnene Erkenntnisse sollen durch murine Entzündungsmodelle *in vivo* belegt werden.

Weiterhin wird angestrebt, einen tieferen Einblick in die CREM α vermittelte transkriptionelle Regulation zu gewinnen. Dazu sollen DNA-Microarrays mit CREM-/- und WT Zellen durchgeführt werden, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) sollen neue CREM Bindestellen in Promotoren T-Zell relevanter Gene identifiziert werden. Um Interaktionspartner von CREM zu identifizieren sollen Koimmunpräzipitations (KoIP)-Studien durchgeführt werden.

2 Geräte und Chemikalien

2.1 Geräte

Tabelle 1: Liste in dieser Arbeit verwendeter Geräte und Ihrer Hersteller

Geräte	Hersteller
7300 Real Time PCR System	Applied Biosciences, Darmstadt
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling
FACS CANTOII / FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Gewebemühle: gentleMACS® Dissociater	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
HeraCell Inkubator	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Mikrozentrifuge	
Lapdancer digital	VWR international GmbH, Darmstadt
LAS 3000, Image Reader	Fujifilm, Düsseldorf
Mikrometer	Hogetex, Nieder-Olm
Mikroskop Zeiss Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen
NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Reinraum-Werkbank	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SDS Gelkammer	BIO-RAD, München
SemiDRy Transfer Cell	BIO-RAD, München
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Transferpipetten S	Brand, Wertheim
Ultraschall Sonifizierer	Hielscher, Teltow
Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste in dieser Arbeit verwendeter Verbrauchsmaterialien und ihrer Hersteller

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6-Well Platten	Becton Dickinson, Frankreich

Eppendorfgefäße 1,5 ml und 2 ml

Eppendorf, Hamburg

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
gentleMACS [®] M-Tubes	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glaspipetten	Becton Dickinson, Frankreich;
Insulinspritzen 1ml	Becton Dickinson, Frankreich;
Kanülen 23 G, 27 G, 30 G	BD Microlance, Irland
LS/LD/MS Columns zur magnetischen Zellisolation	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS [®] Cell Separators	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Multiwell 96 Platten	Becton Dickinson, Frankreich
Multiwell 96 Platten U Form	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitex Nylon-Siebgewebe (Maschenweite 60 µm)	Sefar AG, Heiden, Schweiz
Nylon-Wolle	Kisker, Steinfurt
Petrischale TC 100/20	Greiner Bio-One, Frickenhausen
QPCR Platte 96 well + Seal	Peglab, Erlangen
Rundboden-(FACS-) Röhrchen 5 ml	BD Biosciences Europe, Belgien
Spritzen 5 ml, 10 ml, 20 ml	Terumo Europe N.V., Belgien
Tip One Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg
Zellsiebe 100 µm / 50 µm Nylon	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.3 Antikörper

Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper und ihrer Hersteller

Antikörper	Klon	Hersteller
anti-human CREM gekoppelt mit Alexa 488		abcam, Cambridge, UK, Invitrogen, Karlsruhe
anti-human CD25 (Phycoerythrin) PE	BC96	eBioscience, Frankfurt
anti-human CD3 Pacific-Blue (PB)		BD Biosciences, Heidelberg
anti-human CD4 PE	OKT4	eBioscience, Frankfurt
anti-human Foxp3 APC	PCH101	eBioscience, Frankfurt
anti-human IL-17a PE	64DEC17	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse CD11c Fluorescein (FITC)	N418	eBioscience, Frankfurt

Antikörper	Klon	Hersteller
anti-mouse CD14 PE	Sa2-8	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse CD19 FITC	eBio1D3	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse CD3 APC /PE	145-2C11	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse CD4 PE/FITC	RM4-5	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse CD45R Alexa 488	RA3-6B2	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse CD8a PB	53-6.7	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse CTLA-4 PE	UC10-4B9	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse CXCR5	2G.8	BD Biosciences, Heidelberg
Allophycocyanin (APC)		
anti-mouse FoxP3 Alexa 647	FJK-16s	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse GL-7 Alexa Fluor 647	GL-7	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse ICOS PE	C398.4A	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse IFN- γ APC	XMG1.2	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse IL-17Aa Alexa 488	TC11-18H10	BD Biosciences, Heidelberg
anti-mouse IL-2	JES6-5H4	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse IL-21 eFluor 660	FFA21	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse MHC II FITC	14-4-4S	eBioscience, Frankfurt
anti-mouse Perforin FITC	OMAK-D	eBioscience, Frankfurt

Tabelle 4: Liste der in dieser Arbeit zur Immunpräzipitation und für *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISAs) verwendeten Antikörper und ihrer Hersteller

Antikörper	Klon	Hersteller
anti-mouse IgG-Horseradish Peroxidase (HRP)		Jackson ImmunoResearch, USA
CREM-1	X12	abcam, UK
mouse IgG κ	MG1-45	abcam, UK
Mouse monoclonal FoxP3		abcam, UK
Rabbit polyclonal FoxP3		abcam, UK

Tabelle 5: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zur *in vitro* Stimulierung und ihrer Hersteller

Antikörper	Klon	Hersteller
monoclonal anti-mouse CD28	61109	RnD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
monoclonal anti-human CD28	37407	RnD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Antikörper	Klon	Hersteller
monoclonal anti-human CD3ε	UCHT1	RnD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
monoclonal anti-mouse CD3	17A2	RnD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

2.4 Zytokine

Tabelle 6: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Zytokine und ihrer Hersteller

Zytokin	Hersteller
human IL-21	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
human IL-6	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
human TGF-β1	Peprtech, Hamburg
murine Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	Immunotools, Friesoythe
murine IL-12	Peprtech, Hamburg
murine IL-1β	Peprtech, Hamburg
murine IL-2	Peprtech, Hamburg
murine IL-4	Immunotools, Friesoythe
murine IL-6	Peprtech, Hamburg

2.5 Chemikalien und Seren

Tabelle 7: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und ihrer Hersteller

Chemikalie	Hersteller
2,4-Dinitro-1-Fluorobenzene (DNFB)	Sigma, Steinheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bis-Lösung 37, 5:1	Applichem, Darmstadt
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bradford Reagenz	BIO-RAD, München
Carboxyfluorescein diazetatsuccinimidylester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Sigma, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
RNase freies-H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Dextran Sodium-Sulfat (DSS)	MP Biomedicals, USA

Chemikalie	Hersteller
Dithiotreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dynabeads	Invitrogen, Karlsruhe
Erythrozyten Lysis Puffer	eBioscience, Frankfurt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bisaminoethylethertetraessigsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hepes	Merck, Darmstadt
Hydroxy-iodo-nitrophenylacetyl (NIP)-BSA	Biosearch Technologies, USA
Hydroxy--Nitrophenylacetyl -Chicken Gamma Globulin (NP-CGG)	Biosearch Technologies, USA
Imject Alum	Thermo Scientific, USA
Ionomycin	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Laemmli Proben Puffer	BIO-RAD, München
Mecaptoethanol	Sigma, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt,
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ot II	Anaspec, Belgien
Paraformaldehyd (PFA)	MP Biomedicals, USA
Percoll (40% und 70%)	GE Healthcare, München
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
PMA	Sigma, Steinheim
RNAlater	Qiagen, Hilden
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma, Steinheim
Tris	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Tween	Sigma, Steinheim

2.6 Kits

Tabelle 8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Kits und ihrer Hersteller

Kit	Hersteller
Cytofix/Cytoperm™ Kit	BD Biosciences, Heidelberg
ECL Kit	Amersham Bioscience
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Roth
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt
MACS® CD4+/CD4+CD25+ Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
qPCR Master Mix for SYBR Green I	Eurogentec GmbH, Köln
RNAse free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy® Protect Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim

2.7 Zellmedien, Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
T-Zell Medium	IMDM	Invitrogen, Darmstadt
	5% Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein
	1% Penicillin/Streptavidin (Pen/Strep)	Invitrogen, Darmstadt
DC Medium	RPMI	Invitrogen, Darmstadt
	10% FCS	Gibco, Eggenstein
	1% Pen/Strep	Invitrogen, Darmstadt

Tabelle 10: Zusammensetzung allgemeiner Puffer die in dieser Arbeit verwendet wurden

Bezeichnung	Zusammensetzung
TE Puffer	Tris-HCl pH 8
	0,5 M EDTA
TBST Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8
	0,1% Tween-20
	140 mM NaCl
FACS Puffer	PBS
	0,5 % BSA

Tabelle 11: Zusammensetzung der Puffer für die Nuklearextraktion

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysepuffer A	10 mM HEPES pH 7,9 0,1 mM EDTA 10 mM Kaliumchlorid 0,1 mM EGTA
Lysepuffer B	20 mM EDTA 10 mM Tris pH 7,5 7 M Urea 1%SDS 0,3 M Natriumacetat
Lysepuffer C	1 mM PMSF 20 mM HEPES pH 7,9 0.4 M Natriumchlorid 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT

Tabelle 12: Zusammensetzung der Puffer für die SDS-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung
SDS-Laufpuffer (5-fach)	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 2% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer	1 x Laemmli Proben-Puffer 100 mM DTT
12 %iges Trenngel	15% (v/v) Acrylamid/Bis-Lösung 37, 5:1 560 mM Tris pH 8,8 0,1% (v/v) TEMED 0,1% (v/v) SDS 0,5% (v/v) APS
5% iges Sammelgel	7,5% (v/v) Acrylamid/Bis-Lösung 37, 5:1 125 mM Tris pH 8,8 0,1% (v/v) TEMED 0,1% (v/v) SDS 0,5% (v/v) APS

Tabelle 13: Zusammensetzung der für ChIP verwendeten Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysis Puffer 1	50 mM Hepes-Kaliumhydroxid pH 7,5 140 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA pH 8 10% (v/v) Glycerol 0,5% (v/v) NP-40
Lysis Puffer 2	10 mM Tris-HCl pH 8 100 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA pH 8 0,5 mM EGTA
Lysis Puffer 3	10 mM Tris-HCl pH 8 100 mM Natriumchlorid 0,5 % (v/v) N-Lauroylsarcosine 10% (v/v) Glycerol 0,1% Natriumdeoxycholat
RIPA Puffer	50 mM Tris-HCl 150 mM Natriumchlorid 0,5% Natriumdeoxycholat 1 % NP-40 1 mM PMSF

2.8 Primer

Tabelle 14: Liste der verwendeten Primer und ihrer Sequenzen

Gen	Sequenz 5' - 3'
GAPDH	for AGATGGTGATGGGCTTCCC rev GGCAAATTCAACGGCACAGT
RORyT	for CTC TGC AAG ACT CAC GAC AAG G rev GTG CTG GAA GAT CTG CAG CTT T
FoxP3	for GGCAAATGGAGTCTGCAAGTG rev CAGGAGATGATCTGCTTGGCA
IL-17a	for TGCAACCGTAATGACTTCACTAGTAA rev TTAAGTGAAGTACCGCAACTGTTTTTC
IL-17a Promotor	for TGCAACCGTAATGACTTCACTAGTAA rev TTAAGTGAAGTACCGCAACTGTTTTTC

Die Primer wurden bezogen von VBC Biotech, Schweiz.

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methodik

Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 8-16 Wochen alte CREM α -transgene FVB/N- und Wildtyp FVB/N-Mäuse verwendet (CREM TG). CREM TG Mäuse weisen eine T-Zell spezifische Überexpression von CREM α unter der Kontrolle des CD2 Promotors auf. Weiterhin verwendet wurden CREM defiziente und WT DO11.10 Mäuse sowie CREM defiziente und WT B6.129 Mäuse (CREM $^{-/-}$ s). Die CREM $^{-/-}$ Mäuse tragen eine Deletion der DNA-Bindedomäne von CREM und produzieren nur inaktives CREM Protein. Als murines Lupus Modell wurden CREM α -transgene und Wildtyp Mrl.FVB-tg(Fas-lpr) (fas $^{-/-}$ bzw. fas $^{-/-}$ CREM TG) Mäuse eingesetzt. Die Versuchstiere wurden im Zentraltierstall des Instituts für Versuchstierkunde bei einer Raumtemperatur von +20 °C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Std. durch Kunstlicht bei 300 Lux gehalten. Entkeimtes Trinkwasser aus Flaschen, sowie pelletiertes Futter stand den Mäusen ad libitum zur Verfügung.

Organentnahme und Verwendung der Tiere für Tierexperimente wurden entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen von der Bezirksregierung Münster genehmigt.

3.1.1 DSS-induzierte Kolitis

Durch die orale Gabe von DSS, einem sulfatierten Polysacharid, ist es möglich, innerhalb von 6-10 Tagen eine akute Entzündung des Dickdarms (Kolitis) in der Maus auszulösen (145), die klinisch durch Gewichtsverlust, Diarrhoe und Blut im Stuhl gekennzeichnet ist. Die Mäuse erhielten über einen Zeitraum von sieben bis zehn Tagen freien Zugang zu Trinkwasser, das mit 5% w/v DSS versetzt war. Das Gewicht der Mäuse wurde täglich kontrolliert. Kontrolltiere erhielten Trinkwasser ohne DSS. Nach den 6-10 Tagen wurden die Tiere getötet und Milzen und mesenteriale Lymphknoten zur durchflusszytometrischen Analyse entnommen.

3.1.2 Kontaktdermatitis

Zur Induktion einer Kontaktdermatitis erfolgte zunächst eine Sensibilisierung der Mäuse. Dazu wurden auf die rasierte Bauchdecke der Mäuse 50 μ l einer 0,3 % DNFB Lösung in einem Aceton/Olivenöl (4:1) Gemisch gegeben. 6 Tage später wurde durch Einpinseln der ventralen und dorsalen Seite des linken Mäuseohres mit 10 μ l einer 0,3% DNFB-Lösung die Kontaktallergie ausgelöst. Über die nächsten 3 Tage wurde in regelmäßigen Abständen mittels eines Mikrometers die Ohrdicke der beiden Ohren gemessen.

3.1.3 DNFB-induzierte Kolitis

Für die DNFB-Kolitis wurde zuerst die Bauchdecke der Mäuse rasiert. Einen Tag später wurden die Mäuse durch das Einpinseln des rasierten Bauches mit 50 µl einer 0,3% 2,4-Dinitro-1-Fluorobenzene (DNFB) Lösung in einem Aceton/Olivenöl (4:1) Gemisch sensibilisiert. Nach 6 Tagen wurde den Mäusen bis zur DNFB Gabe das Futter entzogen. 24 Stunden später erfolgte eine Betäubung mit 120 mg/kg Ketanest intraperitoneal (i.p.) und eine rektale Gabe von 0,1 % DNFB in Aceton/Olivenöl (4:1) in einem Volumen von 100 µl mit Hilfe eines 3 cm 20 G Plastik-Katheters, der mit einer 1 ml Spritze verbunden war. Anschließend bekamen die Tiere wieder Futter. Das Gewicht wurde täglich kontrolliert, die Tiere wurden nach 3-4 Tagen getötet und periphere Lymphorgane sowie Därme zur weiteren Analyse entnommen.

3.1.4 Transferkolitis

Zur Induktion einer Transferkolitis wurden aus einem Spendertier CD4⁺ Zellen bzw. CD4⁺ CD25⁺ positive Zellen entnommen und i. p. in RAG^{-/-} Mäuse gespritzt. RAG^{-/-} Mäuse sind T- und B-Zell defizient. Durch die Gabe von CD4⁺ T-Zellen kommt es zu einer Rekonstruktion des Immunsystems. Die CD4⁺ T-Zellen proliferieren und führen zu einer Kolon-Entzündung. Dazu wurden aus den Milzen der Spendertiere mittels magnetischer Zellseparation die CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ Zellen isoliert. Kontrolltiere erhielten nur 200 µl PBS i.p. Eine Gruppe erhielt nur 0,5 x 10⁶ CD4⁺CD25⁻ WT Zellen, eine 0,5 x 10⁶ CD4⁺CD25⁻ WT Zellen und CD4⁺CD25⁺ WT Zellen, eine dritte Gruppe 0,5 x 10⁶ CD4⁺CD25⁺ WT Zellen und 5 x 10⁴ CD4⁺CD25⁺ Zellen von CREM^{-/-} Spendern.

3.1.5 Immunisierung

Zur Immunisierung wurde NP-CGG verwendet. 100 µg NP-CGG in einem Volumen von 100 µl wurden mit 100 µl Alum versetzt und i.p. gegeben. Nach sieben Tagen erfolgten die Entnahme der Milz und eine durchflusszytometrische Analyse, sowie eine Kryokonservierung zur weiteren histologischen Untersuchung. Zur Analyse von NP-spezifischen IgGs im Blut wurden Seren entnommen.

3.1.6 Messung der Lymphadenopathie

Das Ausmaß der Lymphadenopathie wurde anhand der Einteilung in einen Lymphadenopathie Score von 0 bis 4+, wie in (146) beschrieben, bestimmt. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Einteilung des Ausmaßes der Lymphknotenschwellung.

Tabelle 15: Lymphadenopathie-Score:

Score	Anzeichen
0	Keine Lymphknotenschwellung erkennbar
1+	Milde submandibuläre Lymphadenopathie
2 +	Moderate Lymphadenopathie
3 +	Submandibuläre Lymphadenopathie und Schwellung peripherer/axillärer Lymphknoten
4 +	Diffuse Lymphadenopathie

3.2 Immunologische Methoden

3.2.1 Isolation von Zellen aus Milzen und Lymphknoten

Die Mäuse wurden mittels CO₂ Inhalation und cervikaler Dislokation getötet und Milz und periphere Lymphknoten entnommen. Die Organe wurden in T-Zell Medium aufgenommen und mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch 50 µm Zellsiebe gesiebt, so dass Einzelzell-suspensionen vorlagen. Mit Erythrozytenlyse Puffer wurde eine Erythrozytenlyse nach Herstellerangaben durchgeführt, anschließend erfolgte die mikroskopische Bestimmung der Lebendzellzahl durch Trypanblau-Färbung mit Hilfe einer Neubauer-Kammer.

3.2.2 Isolation von PBMCs aus Vollblut

Das heparinisierte Blut wurde mit 1 Volumen PBS verdünnt und anschließend auf 1 Volumen Ficoll aufgeschichtet. Durch Zentrifugation bei 300 x g ohne Bremse wurde eine Auftrennung in Serum, Plasma und mononukleäre periphere Blutzellen (PBMCs) erzielt. Die PBMCs wurden mit einer Glaspipette entnommen und konnten nach einem Waschschrift mit PBS zur weiteren Analyse verwendet werden.

3.2.3 Magnetische Separation von Lymphozyten

Zur Isolierung von CD4+CD8+ T-Zellen, CD4+ T-Zellen sowie CD4+CD25+ Zellen aus Milzen oder Lymphknoten fand die MACS[®] Technologie (magnetische Zellseparation) von Miltenyi nach Herstellerangaben Anwendung.

3.2.4 Isolation von BMDCs aus Knochenmark und Generierung dendritischer Zellen

Zur Isolation von BMDCs aus Knochenmark wurden die Tiere getötet, Femur und Tibia entnommen, vom Muskelgewebe getrennt und gesäubert. Die Knochen wurden an beiden Seiten aufgeschnitten und mit PBS mit Hilfe einer 23G Kanüle ausgespült. Nach einem Wasch-

schrift wurden die Zellen in einer Konzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ in DC Medium aufgenommen. Dem Medium wurden GM-CSF (300 U/ml) und IL-4 (50 ng/ml) zugegeben. Nach drei Tagen wurde die nicht adhärenzte Zellfraktion entnommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde durch Zugabe von frischem Medium erneut auf $2 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt, und die Zytokine wurden neu zugegeben. Nach drei weiteren Tagen wurden die Zellen auf Ausreifung durch Analyse der MHC-Klasse-II und CD11c Expression am FACS Canto II getestet.

3.2.5 T-Zell Präparation über eine Nytonsäule

Aus einer 10 ml Spritze, einem Drei-Wege-Hahn, einer 19G Kanüle und 1 g Nylonwolle wurde eine Säule hergestellt. Die Säule wurde zunächst mit 25 ml T-Zell Medium äquilibriert und mit 3 ml Medium bei geschlossenem Drei-Wege-Hahn aufrecht bei 37 °C und 5% CO₂ für 45 min inkubiert. Nach Öffnung des Drei-Wege-Hahnes und Entlassen des Mediums wurde die Zellsuspension (siehe Abschnitt 3.2.1) auf die Säule gegeben. Anschließend wurde der Drei-Wege-Hahn wieder verschlossen, 2 ml Medium zugegeben und 45 min. bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde die Säule mit 25 ml T-Zell Medium in einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. gespült und das Eluat aufgefangen. Das Eluat enthielt laut durchflusszytometrischer Kontrolle der Aufreinigung 80-90 % T-Zellen.

3.2.6 CFSE-Färbung

CFSE bindet an intra-zytoplasmatische Proteine. Bei Zellteilungen wird nur die Hälfte des Farbstoffes an die Tochterzelle weitergeben, so dass die Intensität der Färbung mit der Anzahl der Zellteilungen abnimmt. CFSE hat ein Absorptionsmaximum von 492 nm und ein Emissionsmaximum von 520-530 nm, kann im FITC Kanal eines Durchflusszytometers gemessen werden und wird daher als Proliferationsmarker verwendet. Einzelzellsuspensionen von 1×10^6 - 1×10^7 Zellen werden einer Erythrozyten-Lyse unterzogen und zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in 1 ml PBS resuspendiert. Eine 5 mM CFSE Stocklösung wurde 1:20 000 fach verdünnt (0,25 µM Endkonzentration) zu den Zellen gegeben. Nach 4 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde mit PBS + 1% FCS aufgefüllt und die Zellen bei 300 x G zentrifugiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift und die Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung in der Neubauerkammer.

3.2.7 Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Zellpopulationen im Durchflusszytometer wurden die Durchflusszytometer BD FACS („fluorescence activated cell sorter“) Canto II oder BD FACS Calibur verwendet.

Neben der Messung von Größe und Granularität (FSC, SSC) wurden weitere Parameter durch Antikörper-gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt.

Zur durchflusszytometrischen Analyse von Oberflächenmarkern (CD3, CD4, CD8, CD19, CXCR5, GL-7, ICOS, PD-1) wurden Einzelzellsuspensionen der primären Zellen zunächst für 20 Minuten in FACS-Puffer geblockt, anschließend wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in 50 µl mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Nach einem Waschschritt mit FACS-Buffer wurden die Zellen in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACS Canto II oder FACS Calibur analysiert. Zur intrazellulären Färbung (CREM, FoxP3, CD3 ζ) wurden das ebioscience FoxP3 staining Buffer Kit oder das BD Biosciences Perm/Wash Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zytokine (IL-17A, IL-2, IL-21) wurden gemessen nach 4-6 stündiger *in vitro* Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ in T-Zell Medium mit PMA (20 nM) und Ionomycin (2 µM), und Golgi Plug. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit WinMDI oder FCS Express. Dazu wurden in Dot Plots oder Dichtediagrammen in Anlehnung an nicht gefärbte Zellen oder Isotypkontrollen Quadranten gelegt und deren Prozentzahlen betrachtet. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde mit Histogrammen dargestellt.

3.2.8 *In vitro* Differenzierung muriner T-Zellen

Aus Einzelzellsuspensionen der sekundären Lymphorgane (Milz und Lymphknoten) wurden durch Aufreinigung mit dem Miltenyi CD4+CD25+ MACS® Kit nach Herstellerangaben CD4+CD25- Zellen isoliert. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ / ml in T-Zell Medium aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte in 96 Well Rundebodenplatten, die zuvor mit 3 µg/ml anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper beschichtet wurden. Es erfolgte die Zugabe a) keiner Zytokine (Th0), b) die Gabe von 10 ng/ml IL-12 (Th1), 50 ng/ml IL-4 (Th2), c) 5 ng/ml TGF- β (Tregs), oder d) 1 ng/ml TGF- β , 40 ng/ml IL-6, 10 ng/ml IL-1 (Th17).

Nach 48 Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums und eine erneute Zugabe der Zytokine. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen zur Analyse am Durchflusszytometer oder zur Isolation der RNA verwendet. Die Überstände wurden zur Zytokin-Bestimmung mittels ELISA verwendet.

3.2.9 *In vitro* Differenzierung humaner T-Zellen

Aus mononukleären peripheren Blutzellen (PBMCs) wurde mittels Miltenyi CD4+ Isolation Kit human nach Herstellerangaben die CD4 positive Zellpopulation isoliert. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ /ml in T-Zell Medium aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte in 96 Well Rundbodenplatten, die zuvor mit 1,5 µg/ml humanem anti-CD3 und humanem anti-CD28 beschichtet wurden. Es erfolgte a) keine weitere Zugabe der Zytokine (Th0) oder b)

die Gabe von 5 ng/ml TGF- β (Tregs) oder c) eine Gabe von 1 ng/ml TGF- β , 40 ng/ml IL-6 und 10 ng/ml IL-1 (Th17).

Nach 48 Stunden erfolgten ein Wechsel des Mediums und eine erneute Zugabe der Zytokine, nach weiteren 48 Stunden wurden die Zelle zur Analyse am FACS Canto II oder zur Isolation der RNA verwendet.

3.2.10 *In vitro* Suppressionsassay

In vitro Suppressionsassays ermöglichen es, die suppressiven Fähigkeiten von regulatorischen T-Zellen zu testen (Abbildung 4). Um eine antigenspezifische T-Zell-Stimulation zu erzielen, wurden die Suppressionsassays mit DO11.10 Mäusen durchgeführt. Dieser Mausstamm trägt einen transgenen Hintergrund für einen Ovalbumin(OVA)-spezifischen T-Zell Rezeptor. Aus einer WT Maus wurden BMDCs isoliert, und eine *in vitro* DC-Reifung wurde induziert (beschrieben unter 3.2.4.). Durch durchflusszytometrische Analyse der MHC-Klasse-II und CD11c Expression wurde der Zeitpunkt der Ausreifung bestimmt. Lag eine Population mit hoher CD11c und MHC-Klasse-II Expression vor, wurde den DCs Ot II, ein Teil des Ovalbumin-Proteins, im Medium für 2 Stunden zugesetzt, so dass eine Aufnahme und eine Präsentation der Peptidfragmente über MHC-Klasse-II-Komplexe vorlag. Anschließend erfolgten 2 Waschschrte und eine Bestimmung der Zellzahl der DCs. Parallel dazu wurden aus WT Mäusen mittels MACS® Technologie CD4⁺ CD25⁻ Zellen isoliert und mit CFSE gefärbt. Weiterhin wurden aus WT und CREM^{-/-} Mäusen CD4⁺ CD25⁺ Zellen isoliert. Pro Well einer 96-Well Rundbodenplatte wurden 1×10^5 CD4⁺ Zellen ausgebracht und mit 1×10^4 DCs versetzt. Die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden im Verhältnis von 1:1, 1:0,75, 1:0,5, 1:0 zu den CD4⁺ Zellen zugegeben. Nach drei bis fünf Tagen erfolge die Analyse der Proliferation durch die Messung der CFSE Färbung im FITC-Kanal am FACS Calibur.

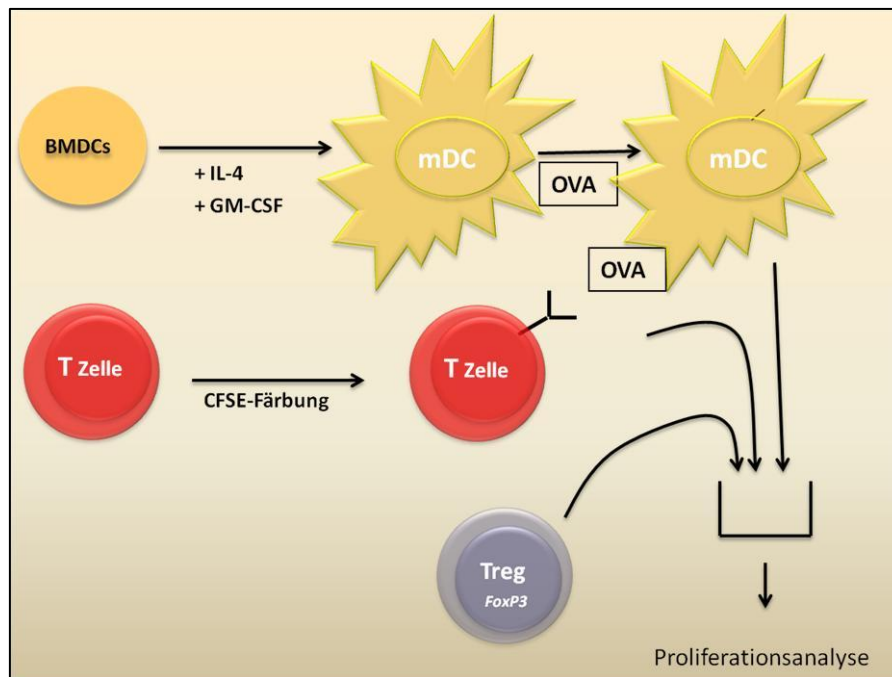


Abbildung 4: Funktionsweise des *in vitro* Suppressionsassays. In sogenannten Suppressionsassays werden CD4⁺ T-Zellen (rote Symbole) antigenspezifisch durch OVA präsentierende DCs (gelbe Symbole) stimuliert. Durch CFSE Färbung lässt sich die dadurch initiierte Proliferation der CD4 T-Zellen messen. Gibt man zusätzlich Tregs hinzu, ist es möglich, die Suppressivität der Tregs durch die veränderte Proliferation der CD4 T-Zellen zu ermitteln.

3.2.11 ELISA

NP-spezifischer IgG ELISA

ELISA Platten wurden mit 100 µl einer 10 µg/ml NIP-BSA (4-Hydroxy-3-iodo-5-nitrophenylacetyl-BSA) Carbonatpuffer-Lösung beschichtet und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde 6 x mit PBS-T gewaschen und mit 200 µl 10 % FCS in PBS bei 37 °C geblockt. Die Seren wurden in 2% FCS in PBS-T verdünnt. Beginnend mit einer 1:50 Verdünnung wurde eine 8-fache Verdünnungsreihe mit einer finalen Verdünnung von 1:32 000 hergestellt. 200 µl der Verdünnungen wurden in die Wells einer 96 Well Platte gegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 6-maligem Waschen mit PBS-T wurde der Detektionsantikörper (anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase 1:4000) in 2 % FCS in PBS-T zugegeben. Die Entwicklung erfolgte mit 50 µl OPD Lösung, das Abstoppen der Reaktion mit 50 µl 1 N Salzsäure. Dann wurde die optische Dichte am Lumineszenz Reader gemessen.

Anti-dsDNA ELISA

Zur Bestimmung von anti-dsDNA IgGs (G, A und M) im Serum der Mäuse wurde mouse Anti-dsDNA Total Ig Kit von ALPHA DIAGNOSTIC International nach Herstellerangaben verwendet.

3.3 Methoden der Molekularbiologie

3.3.1 RNA Isolation

$1-5 \times 10^6$ Zellen wurden pelletiert und in RNA Protect aufgenommen. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben und schloss einen DNase Verdau ein, um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden. Mit Hilfe des Nano Drop-Analysegeräts wurde die Qualität der RNA überprüft und die Ausbeute bestimmt.

3.3.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA Synthese wurden jeweils 0,5 µg RNA eingesetzt und mit einem Oligo-dT Primer und den weiteren Komponenten des Fermentas *First Strand cDNA Synthesis Kit* nach Herstellerangaben in cDNA umgesetzt.

3.3.3 RT-PCR

Zur quantitativen RNA Bestimmung wurde das qPCR Master Mix for SYBR Green I Kit von Eurogentec verwendet. Die cDNA wurde 1:5 mit RNase freiem Wasser verdünnt und ein Volumen von 4 µl pro 20 µl Gesamt-Reaktionsgemisch eingesetzt. Primer wurden in einer Endkonzentration von 100 µM verwendet. Die PCR wurde mit einem TaqMan Gerät 7900 von Applied Biosystems durchgeführt. Dabei erfolgte die Amplifizierung der PCR Produkte über insgesamt 40 Zyklen einer *two-step* Reaktion, d.h. die Proben wurden 40 mal auf 92° C (Denaturierung) erhitzt und anschließend auf 60° C (Annealing) abgekühlt. Die spätere Auswertung der PCR erfolgte mittels ABI PRISM anhand des *cycle threshold (Ct)*-Wertes. Die relative Expression wurde nach einer Normalisierung auf endogene *House-keeping*-Gene berechnet.

3.3.4 Extraktion von Kernproteinen

Über eine Nylonsäulenaufreinigung wurden Lymphozyten aus der Milz angereichert (siehe Abschnitt 3.2.5). 40×10^6 Zellen wurden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper für 24 Stunden stimuliert, weitere 40×10^6 wurden direkt pelletiert und dann bei -80 °C eingefroren. Das Pellet wurde am Folgetag in 400 µl Puffer A (siehe Abschnitt 2.7) resuspendiert. Nach 15

Minuten Inkubation bei 4 °C erfolgte die Zugabe von 25 µl 10% Nonidet NP-40 und sofortiges Vortexen für 10 Sekunden. Das Homogenat wurde bei 300 x g für 30 Sekunden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 400 µl Puffer B (siehe Abschnitt 2.7) und 600 µl Phenol/Chloroform (1/1) gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde mit 40 µl kaltem Puffer resuspendiert und 15 min bei 4 °C auf dem Schüttler geschüttelt. Dann wurde das Nuklearextrakt erneut 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

3.3.5 SDS Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach Molekülmasse erfolgte mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese. Proteinlysate wurden mit SDS Probenpuffer versetzt, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, bei 95°C für 5 Minuten hitzedenaturiert und für 2 Minuten bei 0,5 Pulsen /min sonifiziert. Die Lysate wurden sofort verwendet oder bei -20°C gelagert. Jeweils 25 µl wurden in die Geltaschen gefüllt. Zur Größenbestimmung wurden ebenfalls 5 µl Proteinmarker in einer Spur mitgeführt. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 150 V.

3.3.6 Western Blot

Mittels Western Blot wurden die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf einen Trägerfilter, z.B. Nitrocellulose übertragen. Nach dem Transfer liegt das Proteinbandenmuster als exakte Replik des Gels immobilisiert auf der Membran vor und erlaubt so einen quantitativen und qualitativen Nachweis einzelner Proteine per Immundetektion. Der Western-Transfer erfolgte mittels einer elektrophoretischen *Semi Dry* Blotapparatur. Blot pads, Filterpapier und Polyacrylamidgel wurden zunächst in Tank Puffer getränkt, die PVDF Membran wurde zuvor durch Einlegen in Methanol aktiviert. Der Proteintransfer erfolgte bei einer mA-Zahl, die sich aus dem Produkt der Fläche der Membran und dem Faktor 1,8 bildet, für 70 Minuten.

3.3.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Als Standard wurde BSA in einer Konzentration von 2 µg/µl angesetzt und eine Eichkurve mit 2, 4, 6, 8 und 10 µg erstellt und gegen Aqua injecta gemessen (2 µg = 1 µl + 799 µl dd H₂O (doppelt destilliertes Wasser), 4 µg = 2µl+ 798 µl dd H₂O usw.). Der Probenansatz erfolgte mit 2 µl Proben und 798 µl dd H₂O. Um die Reaktion zu starten wurden 200 µl BioRad Reagenz auf Proben und Standard gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die Messung

erfolgte bei 595 nm am Photometer gegen einen Probenleerwert. Zur Auswertung wurde im Koordinatenkreuz die Masse in µg gegen die Extinktion aufgetragen.

3.3.8 Koimmunpräzipitation von FoxP3 und CREM

Koimmunpräzipitation (KoIP) ist ein Verfahren zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen in Zellextrakten. Ein Protein wird durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers aus dem Extrakt isoliert. Liegt das Protein in einem Komplex mit weiteren Proteinen vor, werden diese koimmunpräzipitiert und per Western Blot nachgewiesen. Zur Immunpräzipitation des Zielproteins wird das Zelllysate mit dem entsprechenden Antikörper versetzt. Dann erfolgt eine Isolation des Protein-Antikörper Komplexes durch ein an Agarose-Beads gekoppeltes Antikörperbindeprotein (Protein A oder Protein G). Nach einigen Waschschritten werden die in dem Komplex erhaltenen Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot nachgewiesen. Zum Nachweis einer Komplexbildung zwischen FoxP3 und CREM wurden über Nylonsäulen aufgereinigte Lymphozyten von CREM TG Mäusen für 5 Tage *in vitro* in Tregs differenziert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab eine FoxP3 Expression bei mindestens 30 % der Zellen. Die Zellen wurden pelletiert und 30×10^6 Zellen bei -80°C eingefroren. Die KoIP wurde mit Nuklearextrakten (siehe 3.3.4) durchgeführt, 25 µl des Extraktes wurden für den Input aufgehoben und direkt mit SDS-Probenpuffer versetzt. Der restliche Extrakt wurde aufgeteilt in Kontrolle und Pull Down (je 30×10^6). Für die Antikörper/Dynabeads Protein G Bindung wurden für den Pull Down 30 µl Dynabeads und 3 µg Antikörper verwendet. Die Bindung erfolgt in 600 µl PBS + 0,002 % Tween 20 für 4 Stunden bei 4°C rotierend. Die Proteinextraktion erfolgte wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben.

3.3.9 Immundetektion

Als Immundetektion bezeichnet man eine Reaktion der auf der Membran fixierten Proteine mit spezifischen Antikörpern und den Nachweis der Bindung durch direkte oder indirekte Verfahren. Beim direkten Nachweis werden Antikörper eingesetzt, die direkt markiert sind oder mit einem Enzym konjugiert vorliegen. Die indirekte Detektion bezieht einen Sekundär-Antikörper ein, der den bereits gebundenen Antikörper nachweist und geeignet markiert ist.

Bei dem hier angewandten Verfahren handelte es sich um das indirekte Verfahren. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, welches die Chemilumineszenz-Reaktion des Luminols katalysiert. Die Detektion erfolgte über ein computergestütztes Kamerasystem (LAS 3000, Image Reader). Im Anschluss an das Blotting-Verfahren wurde die Nitrocellulosemembran zur Absättigung unspezifischer Bindungen 20 min. bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in 10 % BSA in TBST Puffer schüttelnd inkubiert. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung wurde

bei Raumtemperatur für 90 min oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST Puffer für je 10 min, folgte die Sekundärantikörper-Inkubation für die Dauer einer Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde erneut dreimal für 10 min gewaschen und detektiert. Dazu wurde eine 1:1 Mischung der beiden Komponenten des SuperSignalWestDura-Substats (Pierce Biotechnology) hergestellt und gleichmäßig auf der Membran verteilt, um Proteinbanden zu visualisieren.

3.3.10 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Mittels Chip ist es möglich, die Bindung von Proteinen an spezifische Abschnitte genomischer DNA zu analysieren. Dazu werden die Protein-DNA Bindungen durch eine Formaldehyd-Behandlung fixiert und die DNA wird durch Ultraschallbehandlung in Fragmente zerlegt. Durch Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Protein wird das mögliche DNA-Protein-Fragment isoliert. In einem zweiten Schritt wird der DNA Abschnitt von dem Protein getrennt und mit Hilfe sequenzspezifischer Primer und RT-PCR auf die Identität hin untersucht.

3 x 10⁶ Zellen wurden in T-Zell Medium ohne Pen/Strep in einer Endkonzentration von 1 % Formaldehyd für 10 min. fixiert, dann wurde die Reaktion durch die Zugabe von Glycin in einer Endkonzentration von 0,125 M abgestoppt. Nach weiteren 10 Minuten wurde mit PBS aufgefüllt und für 10 min. bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -80°C eingefroren. Am Folgetag wurde das Pellet aufgetaut und in 100 ml LB 1 Puffer resuspendiert. Bei 1300 x g und 4 °C wurde für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl LB 2 Puffer aufgenommen und daraufhin erneut bei 1300 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde das Pellet in 600 µl LB 3 Puffer resuspendiert und es folgte die Sonifizierung zur Fragmentierung der DNA. Dazu wurde viermal für 20 Sekunden auf Eis mit 100% Amplitude und 0,5 Zyklen sonifiziert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 8000 x g und 4 °C. 50 µl wurden für die spätere Input-Kontrolle abgenommen, der restliche Überstand wurde zur Dynabead- und Antikörperbindung eingesetzt. Die Dynabeads wurden zunächst zweimal mit PBS + BSA 0,5% gewaschen. Jeweils 2 µg Antikörper pro Probe wurden mit 200 µl PBS + 0,5% BSA verdünnt. Zu jedem Ansatz wurden dann 200 µl Antikörperlösung und 20 µl Dynabeads gegeben und 100 µl der sonifizierten Probe. Die Bindung erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Überkopf-Rotierer. Zur Elution wurden die Probenansätze viermal mit RIPA Puffer und zweimal mit TE Puffer gewaschen. Dann wurden 100 µl 0,1 M Natriumcarbonatlösung zugegeben und für 20 Minuten schüttelnd inkubiert. Das „Reverse Crosslinking“ erfolgte über Nacht bei 65 °C nach Zugabe von 8 µl 5 M Natriumchlorid, 8 µl 1 M TrisHCl, 4 µl 0,5 M EDTA und 0,1 µg RNase. Am nächsten Tag erfolgte der Proteinase K Verdau für 1-2 Stunden bei 54 °C und eine Aufreinigung mit dem Wizard® SV Gel and PCR

Clean-Up System von Promega. Eluiert wurde mit 30 µl H₂O. Zum RT-PCR Nachweis wurden 4 µl des Eluats verwendet.

3.3.11 Genexpressionsanalyse mit DNA-Microarrays

CD4+CD25⁻ und CD4+CD25⁺ Zellen von WT Mäusen und CREM^{-/-} Mäusen wurden durch das MACS® Verfahren aus der Milz isoliert und durchflusszytometrisch auf Reinheit überprüft. Anschließend wurde RNA aus den Zellen isoliert. Die Proben wurden zur Qualitätskontrolle und cRNA Synthese in die Chip Facility des Universitätsklinikums Aachen gegeben. Die weitere Durchführung und Auswertung der Microarrays (Affymetrix 3' gene expression array) erfolgte in der Chip Facility des Universitätsklinikums Aachen.

4 Ergebnisse

4.1 CREM α verstärkt den Krankheitsprogress in einem murinen Lupus Modell

Kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe eine Maus mit T-Zell spezifischer CREM α Überexpression generiert (144). Die CREM TG Maus entwickelte spontan keine Anzeichen von Autoimmunität. Um die Bedeutung von CREM für das Fortschreiten von Autoimmunitätskrankungen zu ermitteln, wurde die CREM TG Maus in einen fas $^{-/-}$ Hintergrund eingekreuzt (fas $^{-/-}$ CREM TG Maus). Fas $^{-/-}$ Mäuse entwickeln mit fortschreitendem Alter SLE ähnliche Symptome und eine starke Lymphoproliferation und gelten daher als etabliertes murines Lupus Modell.

4.1.1 CREM α induziert eine verstärkte Lymphadenopathie und Splenomegalie und führt zu einer verkürzten Lebenserwartung von Lupus Mäusen

Die phänotypische Analyse der fas $^{-/-}$ CREM TG Maus erfolgte zunächst anhand der makroskopischen Beurteilung der Organe, insbesondere der peripheren Lymphorgane. Die Splenomegalie und Lymphadenopathie zeigte beim Vergleich gleichaltriger Mäuse eine Zunahme der Ausprägung bei der fas $^{-/-}$ CREM TG gegenüber der fas $^{-/-}$ Maus (Abbildung 5 B und D). Die Schwellung der Lymphknoten wurde daraufhin bei Mäusen verschiedenen Alters untersucht. Nach Ausmaß und Anzahl der betroffenen Lymphknoten erfolgte die Einordnung in einen Lymphadenopathie-Score (siehe Abschnitt 3.1.6). Bei fas $^{-/-}$ CREM TG konnte ein verfrühtes Einsetzen der Lymphadenopathie gegenüber den fas $^{-/-}$ Tieren beobachtet werden (Abbildung 5 A). Schon im Alter von 9 Wochen ließ sich bei fas $^{-/-}$ CREM TG Mäusen ein Score von 3 feststellen. Mit 15 Wochen lag bei fas $^{-/-}$ CREM TG Tieren eine diffuse Lymphadenopathie vor, das heißt neben den Halslymphknoten und axillären Lymphknoten waren ebenfalls periphere und mesenteriale Lymphknoten betroffen. Die fas $^{-/-}$ Tiere ohne CREM α Überexpression erkrankten erst später und erreichten auch mit 20 Wochen nur einen Score von 3. Ebenfalls wurde beobachtet, in welchem Alter die beiden Maus-Gruppen einem physiologischen Tod erlagen. Die fas $^{-/-}$ -CREM TG Mäuse wiesen eine niedrigere Überlebensrate als die fas $^{-/-}$ Mäuse auf (Abbildung 5 C). So erreichten 96% der fas $^{-/-}$ Tiere und nur 83% der fas $^{-/-}$ CREM TG Tiere ein Alter von 42 Wochen. Insgesamt ergab sich also ein verfrühtes Auftreten von Krankheitsanzeichen bei den fas $^{-/-}$ Mäusen mit CREM α Überexpression.

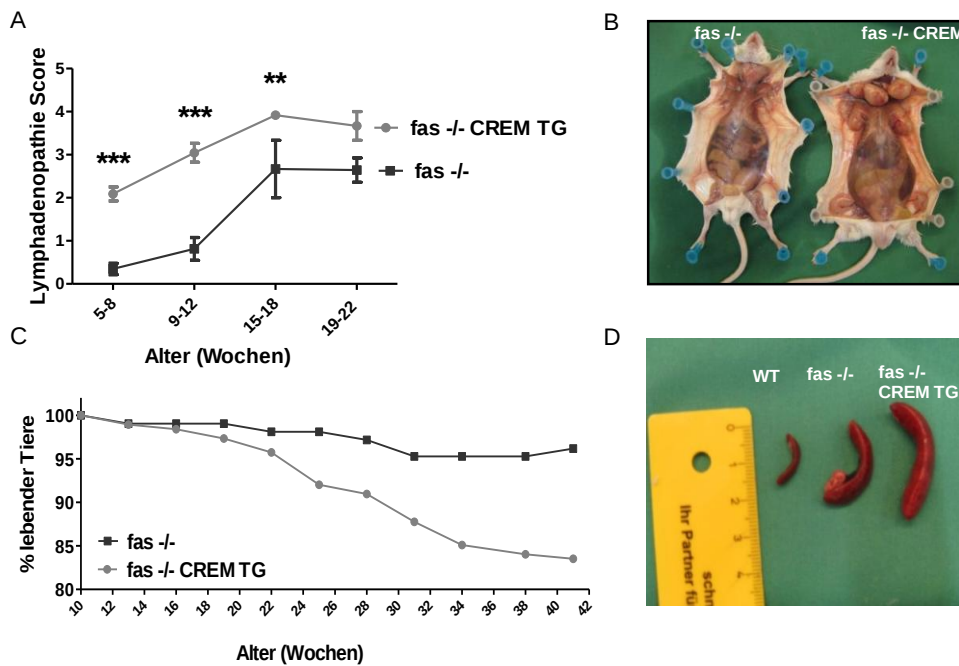


Abbildung 5: Phänotypische Analyse der fas-/- CREM TG Maus. A) Lymphadenopathie-Score. Das Ausmaß der Lymphadenopathie wurde in verschiedenen Altersgruppe von fas-/- (schwarze Symbole) und fas -/- CREM TG Mäusen (graue Symbole) verglichen wie in Tabelle 15 beschrieben. Die Daten entsprechen Mittelwerten von mindestens 3 Tieren $\pm$ SEM (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, two-way Anova) B) Vergleich der Lymphadenopathie einer 16 Wochen alten fas-/- (links) und einer fas -/- CREM TG Maus (rechts). C) Überlebenskurve von fas-/- (schwarze Symbole) und fas -/- CREM TG (graue Symbole) Mäusen D) Repräsentatives Bild von Milzen einer 16 Wochen alten WT Maus (links) einer fas -/- Maus (Mitte) und einer fas-/- CREM TG Maus (rechts).

4.1.2 Lymphadenopathie und Splenomegalie werden durch eine Expansion aberranter T-Zellen verursacht.

Um die Ursache für die massive Vergrößerung der Milzen und Lymphknoten zu finden, wurde eine Analyse der Zellzusammensetzung der peripheren Lymphorgane durchgeführt. Dazu wurden die Splenozyten und Lymphozyten isoliert, mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Oberflächenmarkern gefärbt und durchflusszytometrischen Analysen unterzogen. Die Analyse der Milzen und Lymphknoten von fas-/- und fas-/- Mäusen mit CREM α Überexpression ergab in den relativen Zellzahlen der CD11b⁺ CD14⁺ Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen sowie der CD19⁺ B-Zellen keine prozentualen Unterschiede (Abbildung 6). Relativ zur Milz- oder Lymphknotengröße ist also keine verstärkte Expansion oder Einwanderung von Monozyten oder B-Zellen festzustellen.

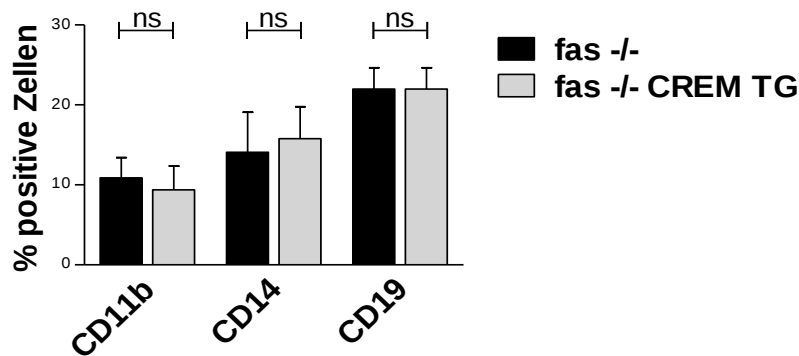


Abbildung 6: Relativer Anteil von Monozyten und B-Zellen in den Milzen von fas^{-/-} und fas^{-/-} CREM TG Mäusen. Links der prozentuale Anteil an CD11b⁺ Zellen in der Milz von fas^{-/-} Mäusen (schwarz) und fas^{-/-} CREM TG Mäusen (grau). In der Mitte der prozentuale Anteil an CD14⁺ Zellen in der Milz von fas^{-/-} Mäusen (schwarz) und fas^{-/-} CREM TG Mäusen (grau). Rechts der prozentuale Anteil an CD19⁺ Zellen in der Milz von fas^{-/-} Mäusen (schwarz) und fas^{-/-} CREM TG Mäusen (grau). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von 3-5 Tieren $\pm$ SEM.

Hingegen ergab sich bei der Analyse der T-Zellen eine starke Expansion doppelt-negativer T-Zellen (DNTs) (Abbildung 7). Dabei handelt es sich um eine in WT Mäusen und gesunden Menschen seltene T-Zell-Population, die dadurch gekennzeichnet ist, dass zwar CD3, aber weder CD4 noch CD8 auf der Oberfläche exprimiert werden. In SLE Patienten und fas^{-/-} Mäusen treten diese DNTs verstärkt auf und weisen einen inflammatorischen Phänotyp auf (147). Bei fas^{-/-} Mäusen mit CREM α Überexpression war der relative Anteil (Abbildung 7 A und B) der DNTs gegenüber fas^{-/-} Mäusen verdoppelt und absolut besaßen sie im Vergleich sogar eine 5-fache Erhöhung gegenüber den fas^{-/-} Mäusen (Abbildung 7 C).

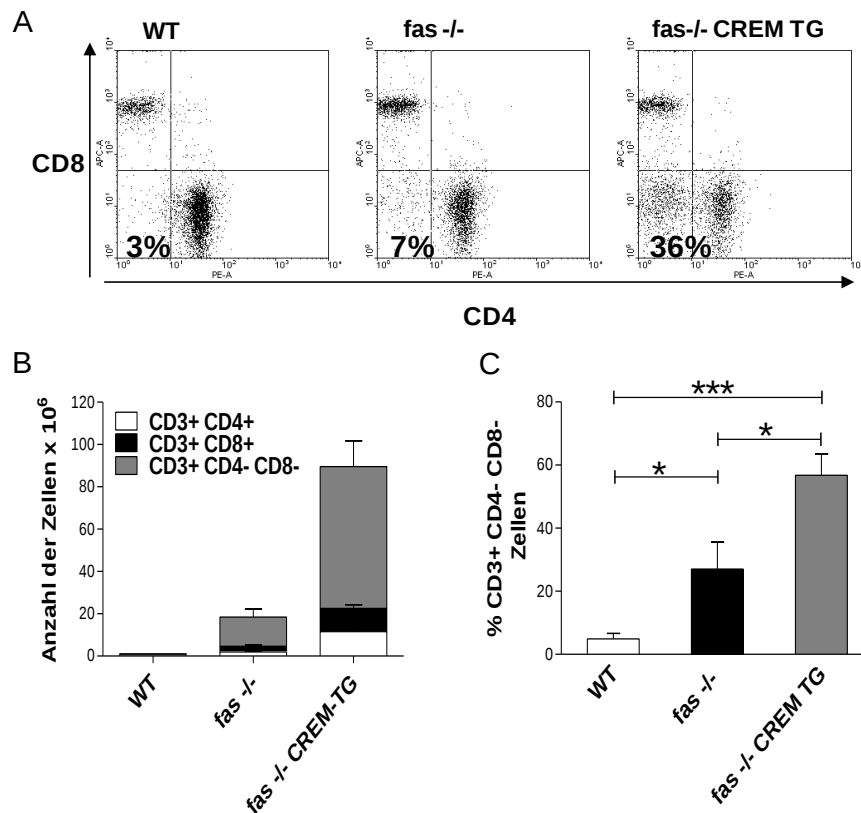


Abbildung 7: Doppelt-negative T-Zellen in *fas*^{-/-} und *fas*^{-/-} CREM TG Mäusen. A) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen von WT Mäusen (links), *fas*^{-/-} Mäusen (Mitte) und *fas*^{-/-} CREM TG Mäusen (rechts), gegatet wurde auf die CD3⁺ Zellfraktion. B) Absolute Zahlen der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in den Halslymphknoten von WT Mäusen (links), *fas*^{-/-} Mäusen (Mitte) und *fas*^{-/-} CREM TG Mäusen (rechts). Gezeigt sind CD3⁺ CD4⁺ Zellen (weiß), CD3⁺ CD8⁺ Zellen (schwarz) und CD3⁺ aber CD8⁻ und CD4⁻ Zellen (grau). C) Prozentualer Anteil der CD3⁺ CD8⁻ CD4⁻ Zellen der Milzzellen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier bis sechs Tieren ± SEM (*** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05, einseitig, ungepaarter t-Test).

4.1.3 Es entsteht ein gestörtes Gleichgewicht von Tregs und Th17 Zellen in CREM TG *fas*^{-/-} Mäusen

Im nächsten Schritt wurden die T-Zell Populationen im Hinblick auf T-Zell-Subtypen und Zytokin-Expression analysiert. Es erfolgte eine intrazelluläre Färbung mit fluoreszenzmarkiertem FoxP3 Antikörper als Marker für regulatorische T-Zellen. Zur Analyse der Zytokin-Sekretion wurden die Zellen nach der Isolierung mit PMA und Ionomycin restimuliert. Die gleichzeitige Behandlung mit dem Proteintransport-Inhibitor Golgi Plug verhinderte die Ausschleusung der Zytokine, so dass mit fluoreszenzmarkierten IL-17a, IFN-γ und IL-21 Antikörpern ein Nachweis der Zytokin-sekretierenden Zellen erfolgen konnte. Die genauere Analyse der T-Zell Populationen ergab, dass in *fas*^{-/-} CREM TG im Vergleich zu *fas*^{-/-} Mäusen der Anteil der Tregs in der Milz verringert war (Abbildung 8). *Fas*^{-/-} Mäuse wiesen mit 2%

FoxP3⁺ T-Zellen ohnehin einen geringeren Anteil regulatorischer T-Zellen auf als WT Mäuse, bei denen gewöhnlich 3-4 % der CD4⁺ Population FoxP3⁺ ist. In den fas^{-/-} CREM TG verringerte sich der Anteil weiter auf unter 1%. Im Gegensatz dazu zeigten die fas^{-/-} CREM TG Mäuse in ihrer T-Zell Population einen erhöhten Anteil an T-Zellen, die IL-17a und IL-21 sezernierten (Abbildung 9 A und B), die charakteristische Zytokine für Th17 Zellen sind. Hin- gegen blieb der Anteil an IFN- γ sezernierenden Zellen in fas^{-/-} und fas^{-/-} CREM TG Tieren gleich (Abbildung 9 A).

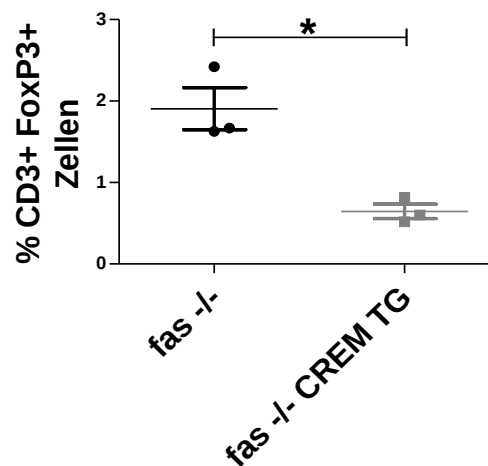


Abbildung 8: Regulatorische T-Zellen in fas^{-/-} und fas^{-/-} CREM TG Mäusen. Prozentuale Anteile der FoxP3⁺ CD3⁺-Zellen aller Lymphknotenzellen von fas^{-/-} (schwarz) und fas^{-/-} CREM TG Mäusen (grau). Die Querbalken entsprechen den Mittelwerten von 3 Tieren ± SEM (* p < 0,05, Mann-Whitney Test).

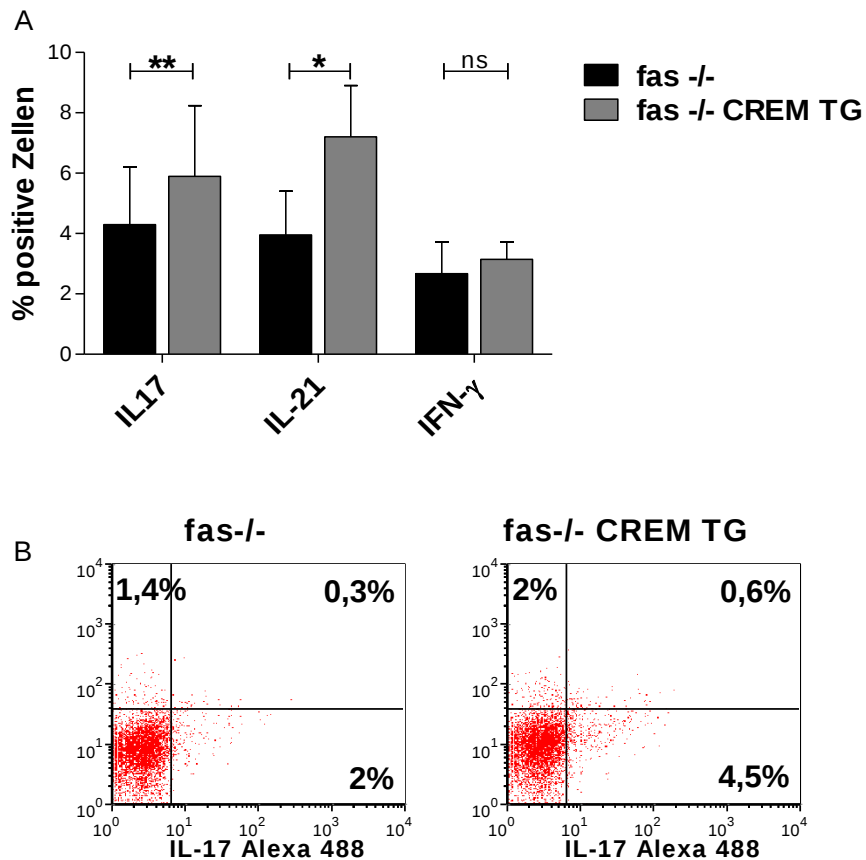


Abbildung 9: Zytokin-Expression in fas-/- und fas-/- CREM TG T-Zellen. A) Prozentuale Anteile von IL-17a+ (links), IL-21+ (Mitte) und IFN-γ+ (rechts) Milzzellen von fas-/- (schwarz) und fas-/- CREM TG (grau) Mäusen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier bis sechs Tieren ± SEM (** p< 0,01, * p< 0,05, einseitig gepaarter t-Test). B) Repräsentative Durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen von fas-/- (links) und fas-/- CREM TG Mäusen (rechts).

4.2 Die Rolle von CREM α in regulatorischen T-Zellen

Im nachfolgenden wurde der Einfluss von CREM α auf Tregs in fas unabhängigen Mausmodellen näher untersucht.

4.2.1 Regulatorische T-Zellen exprimieren CREM

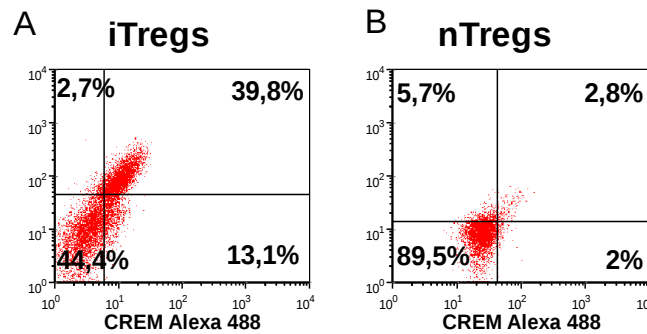


Abbildung 10: Expression von CREM in humanen regulatorischen T-Zellen. A) *In vitro* mit TGF- β differenzierte (siehe 3.2.9 b) CD4⁺ T-Zellen (repräsentative durchflusszytometrische Analyse von 4 voneinander unabhängigen Experimenten). B) Durchflusszytometrische Analyse von direkt isolierten PBMCs, gegatet wurde auf CD4⁺ Zellen, der Quadrant wurde in Anlehnung an die jeweilige Isotypkontrolle gesetzt (repräsentative FACS Analyse von 5 voneinander unabhängigen Experimenten).

Zunächst wurde überprüft, ob CREM Protein in regulatorischen T-Zellen exprimiert wird. Dazu wurden iTregs und nTregs auf FoxP3-CREM-doppelt-positive Zellpopulationen hin untersucht. Zur Generierung von iTregs wurden zunächst PBMCs aus Vollblut isoliert. Aus den PBMCs wurde die CD4⁺ Zellfraktion separiert und mit anti-CD3/CD28 Antikörpern und 10 ng/ml TGF- β für drei bis fünf Tage stimuliert. Nach diesem Zeitraum exprimierten über 40% aller Zellen FoxP3 und der überwiegende Teil der FoxP3⁺ Zellen zeigte eine hohe CREM Expression (Abbildung 10 A). Zur Analyse der CREM Expression in nTregs wurden direkt aus Vollblut isolierte PBMCs mit fluoreszenzmarkierten anti-CD3, -FoxP3 und -CREM Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Auch hier zeigte sich eine FoxP3⁺CREM⁺ Population (Abbildung 10 B), allerdings nicht in allen nTregs. Um die CREM Expression in nTregs im Falle einer Autoimmunerkrankung zu analysieren, wurden die nTregs im Kniepunktat von Patienten mit Juveniler idiopathischer Arthritis (JIA) auf CREM Expression getestet. Es war auffällig, dass Tregs im Kniepunktat von JIA Patienten (*synovial fluid mononuclear cells*, SFMCs) einen erhöhten Anteil von CREM⁺ unter den FoxP3⁺ Zellen aufwiesen (Abbildung 11 A und B). Während nTregs eine schwächere CREM Expression zeigten, wiesen die Daten aus der *in vitro* Differenzierung und die Resultate aus den SFMCs darauf hin, dass die CREM Expression in Tregs im Rahmen einer Immunantwort erhöht ist.

Ob die Höhe der CREM Expression bei Tregs von Relevanz für ihre Funktion ist, wurde anhand der CREM^{-/-} und CREM TG Maus Modelle untersucht.

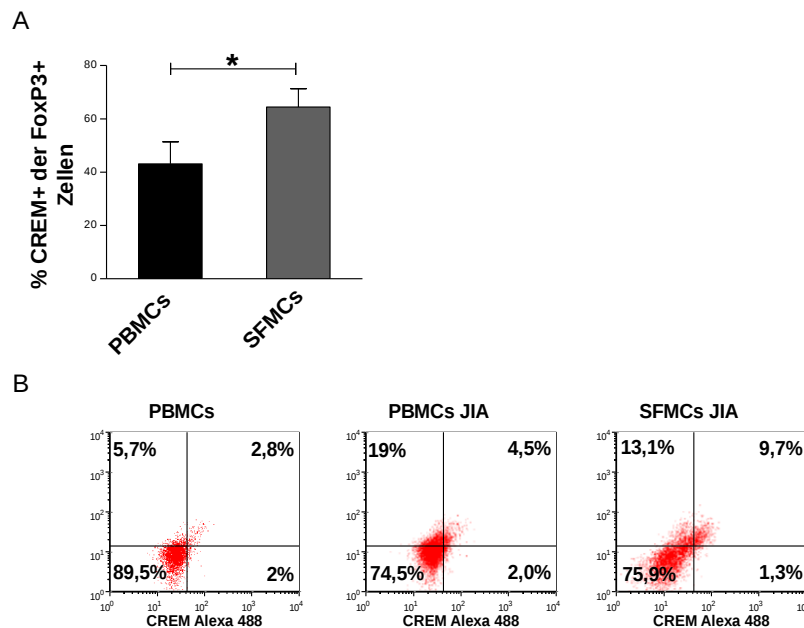


Abbildung 11: Expression von CREM in regulatorischen T-Zellen von JIA Patienten. A) Prozentzahlen der FoxP3+ T-Zellen mit CREM Expression (%CREM+/FoxP3+) in SFMCs von JIA Patienten (grauer Balken) und PBMCs von gesunden Kontrollen (schwarzer Balken). Die Daten entsprechen dem Mittelwerten von 11-13 Proben $\pm$ SEM (* $p < 0,05$, einseitig gepaarter t-Test). B) Gezeigt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen von PBMCs gesunder Kontrollen (links), PBMCs von JIA Patienten (Mitte) und SFMCs von JIA Patienten (rechts), das Gate wurde in Anlehnung an eine Isotypkontrolle gesetzt.

4.2.2 Die Expression von CREM α in regulatorischen T-Zellen ist *in vitro* von funktioneller Relevanz

Zur quantitativen Analyse der nTregs wurden die Milzzellen von CREM TG und WT Mäusen isoliert und per durchflusszytometrischer Analyse der Anteil der CD4⁺FoxP3⁺ Zellen festgestellt. Zur Messung der FoxP3 mRNA Expression wurde aus den Milzzellen zunächst mittels magnetischer Zellseparation die CD4⁺ Fraktion isoliert und aus den CD4⁺ Zellen RNA gewonnen. Um induzierte Tregs *in vitro* zu analysieren, wurde ebenfalls die CD4⁺ Zellfraktion isoliert und für drei bis fünf Tage mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern sowie TGF- β stimuliert. Die Anzahl der nTregs unterschied sich in der CREM TG Maus nicht von der WT Maus (Abbildung 12 B), jedoch zeigte die mRNA Expression von FoxP3 in CD4⁺ Zellen CREM TG Zellen gegenüber der Expression in WT Zellen eine Verminderung um ca. 80% (Abbildung 12 A). Die CREM^{-/-} Mäuse zeigten eine leicht, jedoch signifikant erhöhte Anzahl an nTregs in der Milz von durchschnittlich 5% im WT auf 6.5% in CREM^{-/-}-Mäusen (Abbildung 13 A). Die *in vitro* differenzierten Tregs zeigten eine Reduktion in der CREM TG

Maus von durchschnittlich 32% im WT auf 22% (Abbildung 12 C). Im Gegensatz dazu führte die Deletion von CREM zu einem Anstieg der differenzierten Tregs von 21% bei den WT T-Zellen auf 28% bei CREM^{-/-} Zellen (Abbildung 13 B). Die schwankenden Werte der induzierten Tregs bei den WT Tieren sind vermutlich auf den gemischten genetischen Hintergrund der Mausstämme zurückzuführen.

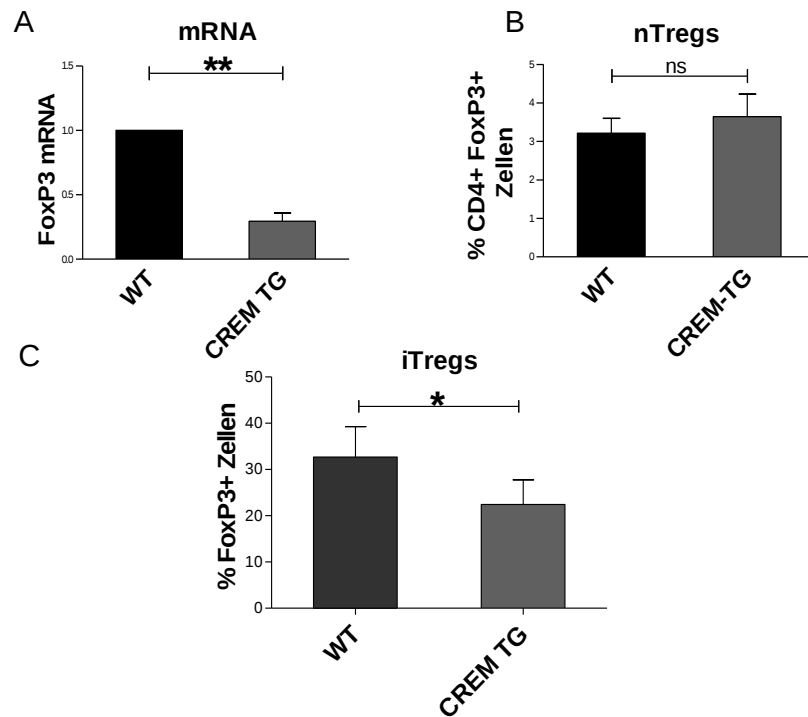


Abbildung 12: Einfluss einer CREM α Überexpression auf Tregs. A) Relatives Verhältnis der FoxP3 mRNA in CD4⁺ Milzzellen von WT (schwarzer Balken) im Vergleich zu CREM TG (grauer Balken). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM (** $p < 0,01$, t-Test gegen 1). B) Anteil CD4⁺ FoxP3⁺ Zellen in der Milz von CREM TG Tieren (grauer Balken) im Vergleich zum Anteil in WT (schwarzer Balken), Die Daten entsprechen den Mittelwerten von sieben Tieren $\pm$ SEM. C) CD4⁺ Zellen wurden *in vitro* mit TGF- β differenziert wie unter 3.2.8 c beschrieben. Gezeigt ist der Anteil FoxP3⁺ Zellen aus CREM TG (grauer Balken) und WT Mäusen (schwarzer Balken). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier Tieren $\pm$ SEM (* $p < 0,05$, einseitig gepaarter t-Test).

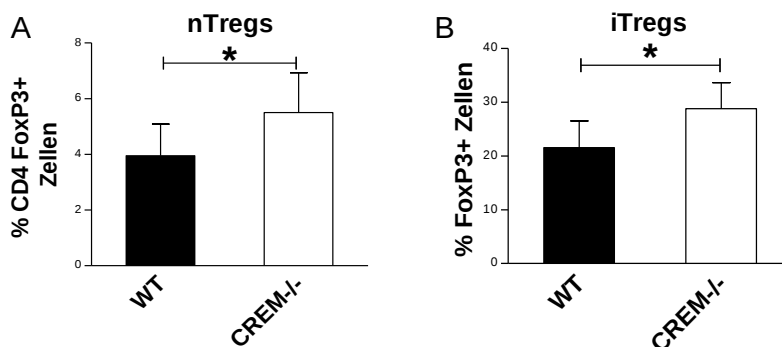


Abbildung 13: Einfluss einer CREM α Deletion auf Tregs. A) Anteil CD4⁺ FoxP3⁺ Zellen in der Milz von WT (schwarzer Balken) und CREM^{-/-} (weißer Balken) Mäusen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier Tieren $\pm$ SEM. B) Anteil FoxP3⁺ Zellen nach *in vitro* Differenzierung mit TGF- β wie unter 3.2.8 c beschrieben. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM (* $p < 0,05$, einseitig gepaarter t-Test).

Ob CREM α die Funktionalität von Tregs beeinflusst, wurde *in vitro* mit Hilfe von Suppressionsassays getestet (siehe Abschnitt 3.2.10). Die Analysen erfolgten mit DO11.10 Mäusen. Dieser Stamm trägt einen transgenen Hintergrund für den OVA-abhängigen T-Zell Rezeptor, was eine antigenspezifische Stimulation der T-Zellen mit OVA-Peptid ermöglicht. Dazu wurden zunächst BMDCs aus DO11.10 Mäusen isoliert und mit GM-CSF und IL-4 zu DCs ausgereift. Den ausgereiften (CD86/80+, MHCII+, CD11c+) DCs wurde für zwei Stunden OVA-Peptid gegeben, so dass die Präsentation des Antigens auf der Zelloberfläche erfolgte. Parallel dazu wurden CD4+ CD25- Effektor-T-Zellen isoliert und mit CFSE, einem Farbstoff, der als Proliferationsmarker dient, gefärbt. Die OVA-Peptid präsentierenden DCs wurden den CD4+ T-Zellen zugesetzt und induzierten die Expansion der CD4+ T-Zellen. Um die Funktionalität der Tregs zu testen, wurden diesem Ansatz entweder WT Tregs (CD4+CD25+) oder CREM $^{-/-}$ Tregs (CD4+CD25+) zugegeben, und mittels Durchflusszytometrie wurde die Proliferation der Effektor-T-Zellen (als Verlust der CFSE-Färbung) gemessen (Abbildung 14 A). Es zeigte sich, dass die CD4+ Effektorzellen, die in Kokultur mit CD4+CD25+ CREM $^{-/-}$ Zellen gehalten wurden, schlechter proliferierten als die CD4+ Effektorzellen, denen CD4+CD25+ WT Zellen zugesetzt wurden. Die CREM $^{-/-}$ Tregs zeigten eine etwa um den Faktor 1,5 stärkere Suppression der CD4+ Effektorzellen (Abbildung 14 B).

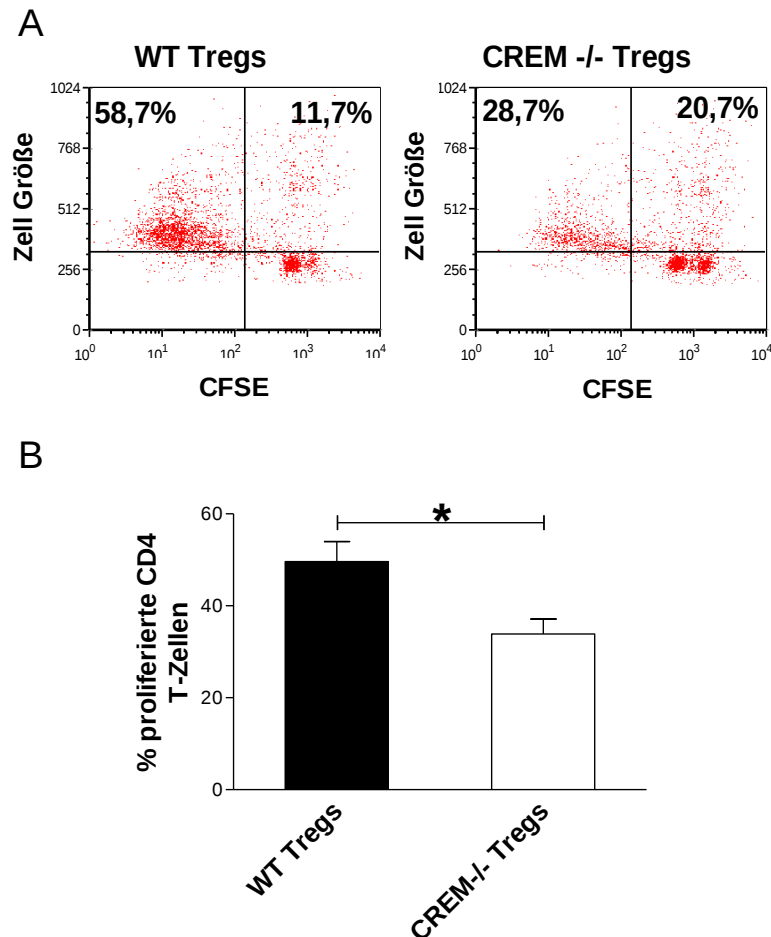


Abbildung 14: Einfluss einer CREM Deletion auf die Suppressivität von Tregs *in vitro*. *In vitro* Suppressionsassays wurden wie unter 3.2.10 beschrieben durchgeführt. A) Repräsentative Analyse eines Suppressionsassays mit WT Tregs (links) und CREM-/- Tregs (rechts), gezeigt ist die Proliferation der Effektor-T-Zellen (linker oberer Quadrant). B) Vergleich des prozentualen Anteils proliferierter T-Zellen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von 3 voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM (* $p < 0,05$, einseitig ungepaarter t-Test).

4.2.3 Die Expression von CREM α in regulatorischen T-Zellen ist *in vivo* von funktioneller Relevanz

Um die funktionelle Relevanz von CREM *in vivo* zu testen, wurde das Entzündungsmodell der Transferkolitis verwendet. Dazu wurden RAG-/- Mäusen, einem Mausstamm der eine Lymphozyten-Defizienz aufweist, Effektor-T-Zellen (CD4+CD25-) gespritzt. Zusätzlich zu den CD4+CD25- Zellen erhielt jeweils eine Gruppe Tregs (CD4+CD25+), die aus WT Tieren isoliert wurden und eine Gruppe Tregs (CD4+CD25+) aus CREM-/- Tieren, während die dritte Gruppe nur Effektor-T-Zellen (CD4+ CD25-) erhielt. Die Mäuse entwickelten einige Wochen nach der Gabe von T-Zellen eine Kolitis, die bei zusätzlicher Gabe von regulatorischen T-Zellen aus WT oder CREM-/- Mäusen milder verlief. Durch die Gabe von WT und CREM-/- Tregs konnte mit diesem Modellsystem die Suppressivität der Tregs *in vivo* getestet werden.

Die mesenterialen Lymphknoten der transferierten Rag-/- Mäuse wurden entnommen und durch intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse auf Zytokin-Expression hin getestet. Hierbei ergaben sich Unterschiede bei der Anzahl der IL-17a+ Zellen (Abbildung 15 B), während die IFN- γ sezernierenden Zellen nicht verändert waren (Abbildung 15 B). Mit CD4+ Effektor-Zellen alleine transferierte Tiere zeigten im Schnitt 10% IL-17a+ Zellen in der CD3+ Fraktion. Mäuse die zusätzlich mit CD4+CD25+ Zellen aus WT Tieren transferiert wurden, hatten ca. 7% IL-17a+ CD3 Zellen in den mesenterialen Lymphknoten vorliegen. Diese Anzahl verringerte sich im Vergleich dazu signifikant bei Tieren die stattdessen CD4+CD25+ Zellen von CREM-/- Tieren erhielten, auf 3,6% IL-17a+ T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten.

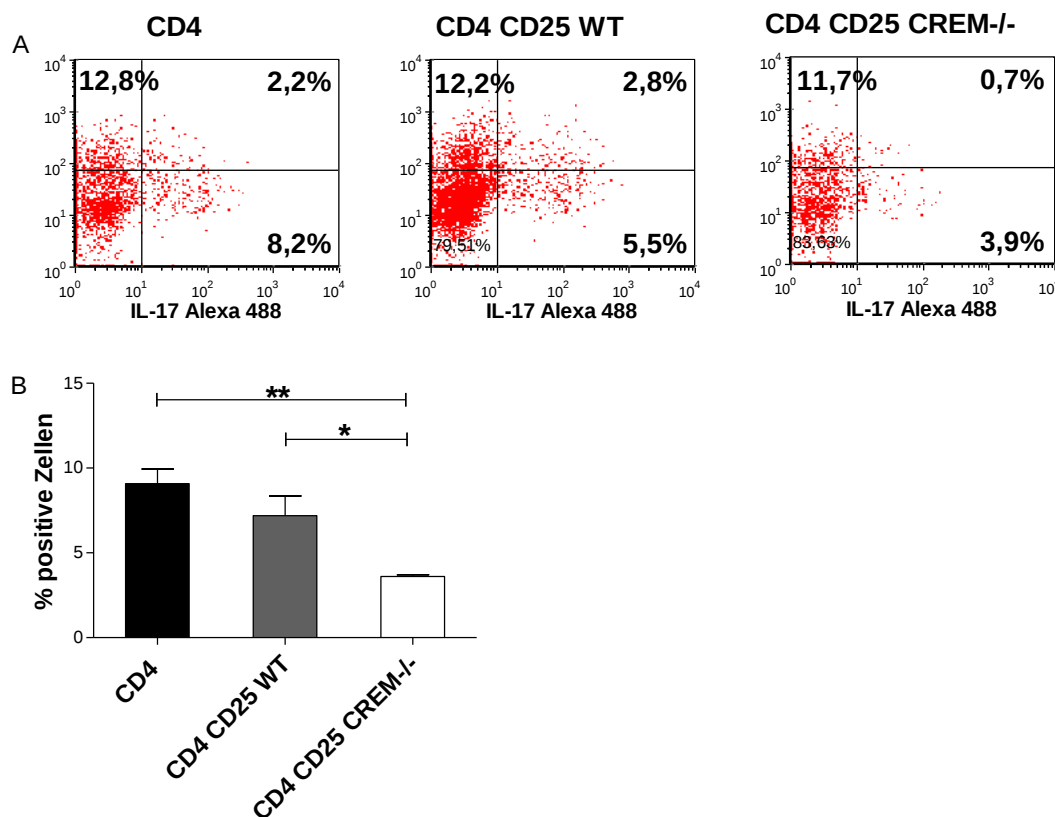


Abbildung 15: IL-17a und IFN- γ sezernierende Zellen in der Transferkolitis. Die Transferkolitis wurde wie unter 3.1.4 beschrieben induziert. A) Repräsentativer Dot Plot der T-Zellen der mesenterialen Lymphknoten von Mäusen die nur CD4+ Zellen erhalten haben (links), Mäusen die zusätzlich CD4+CD25+ Zellen von WT Tieren erhalten haben (Mitte) und Mäusen denen zusätzlich CD4+CD25+ Zellen von CREM-/- Tieren injiziert wurden (rechts). Gezeigt sind die IFN- γ und IL-17a sezernierenden T-Zellen. B) Anteil IL-17a+ T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von 3 bis 5 Tieren $\pm$ SEM (** p < 0,01*, * p < 0,05, zweiseitig ungepaarter t-Test).

4.2.4 CREM α bildet einen Komplex mit FoxP3

Ein möglicher Mechanismus der funktionellen Treg-Regulation durch CREM α wäre eine Interaktion mit FoxP3. Um zu ermitteln, ob eine Komplexbildung von CREM α und FoxP3 vorliegt, wurden T-Zellen von CREM TG Mäusen *in vitro* mit TGF- β differenziert und mittels Koimmunpräzipitation (KoIP) auf eine CREM α -FoxP3-Komplexbildung in der nukleären Fraktion getestet. Sowohl eine Protein-Bindung mit anti-CREM Antikörper und Detektion mit anti-FoxP3 Antikörper, als auch die Protein-Bindung mit anti-FoxP3 Antikörper und die Detektion mit einem anti-CREM Antikörper deuteten auf eine Komplexbildung der beiden Proteine im Nukleus hin (Abbildung 16 A-C). Lysate der nukleären und zytosolischen Fraktion zeigten, dass CREM vornehmlich im Nukleus vorlag und FoxP3 ebenfalls zu einem großen Teil im Nukleus vertreten war. Zur Kontrolle wurde ebenfalls nur mit Sekundär-Antikörper und Detektionsantikörper detektiert. Hier zeigte sich kein Protein-Nachweis und eine Protein-Bindung mit einer Isotyp-Kontrolle führte zu keiner Präzipitation von CREM Protein. Die Daten weisen daher auf eine Komplexbildung zwischen CREM α und FoxP3 hin.

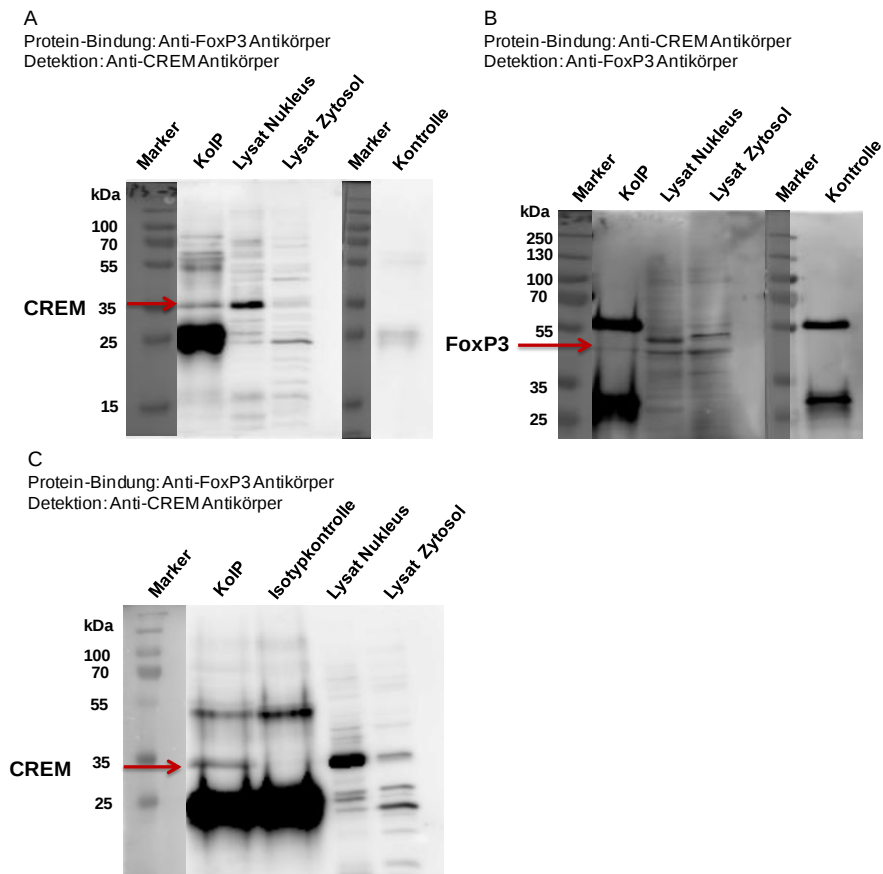


Abbildung 16. Nachweis einer Komplexbildung von CREM α mit FoxP3. T-Zellen von CREM TG Tieren wurden isoliert und für 5 Tage mit TGF- β stimuliert wie unter 3.2.8 c beschrieben. A) KoIP von FoxP3 und CREM. Aus den differenzierten Zellen wurden nukleäre und zytosolische Extrakte hergestellt wie unter 3.3.4 beschrieben. Die Lysate wurden direkt für den Nachweis mittels Western Blot verwendet (Lysat Nukleus bzw. Lysat Zytosol), oder nukleäre Lysate einer KoIP unterzogen wie in 3.3.8 beschrieben (KoIP). Dabei wurde anti-FoxP3 Antikörper zur Proteinbindung eingesetzt und anschließend anti-CREMAntikörper zur Detektion. Zur Kontrolle wurde eine KoIP ohne Proteinbindungs-Antikörper durchgeführt (Kontrolle). Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines Proteinmarkers (Marker) B) KoIP von CREM und FoxP3. Aus den differenzierten Zellen wurden nukleäre und zytosolische Extrakte hergestellt wie unter 3.3.4 beschrieben. Die Lysate wurden direkt verwendet (Lysat Nukleus bzw. Lysat Zytosol), oder nukleäre Lysate einer KoIP unterzogen wie in 3.3.8 beschrieben (KoIP). Dabei wurde anti-CREMAntikörper zur Proteinbindung eingesetzt und anschließend anti-FoxP3 Antikörper zur Detektion. Zur Kontrolle wurde eine KoIP ohne Proteinbindungs-Antikörper durchgeführt (Kontrolle). Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines Proteinmarkers (Marker). C) KoIP von FoxP3 und CREM. Aus den differenzierten Zellen wurden nukleäre und zytosolische Extrakte hergestellt wie unter 3.3.4 beschrieben. Die Lysate wurden mittels Western Blot analysiert (Lysat Nukleus bzw. Lysat Zytosol) oder nukleäre Lysate einer KoIP unterzogen wie in 3.3.8 beschrieben (KoIP). Dabei wurde anti-FoxP3 Antikörper zur Proteinbindung eingesetzt und anschließend anti-CREMAntikörper zur Detektion. Zur Kontrolle wurde eine KoIP mit Isotypkontroll-Antikörper (Isotypkontrolle) durchgeführt. Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines Proteinmarkers (Marker).

4.2.5 CREM α reguliert möglicherweise die Transkription von suppressorisch agierenden Proteinen

Zur Identifikation von Genen, die durch CREM α transkriptionell gesteuert werden und die veränderte Suppressivität der CREM $^{-/-}$ Tregs bedingen könnten, wurden mit Effektor-T-Zellen (CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$) und Tregs (CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$) von WT und CREM $^{-/-}$ Tieren Microarray Analysen durchgeführt. Dazu wurden aus CD4 $^{+}$ und CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Splenozyten von 6 bis 16 Wochen alten Tieren RNA Isolate hergestellt. Die weitere Durchführung und Auswertung der Microarrays (Affymetrix 3' gene expression array) erfolgte in der Chip Facility des Uniklinikums Aachen. Es ergaben sich Hinweise auf die differentielle Expression einiger für die Funktionalität von Tregs relevanten Gene, die allerdings aufgrund der geringen Anzahl der getesteten Tiere (N=2) durch weitere Verfahren oder eine Wiederholung des Arrays verifiziert werden müssen (Tabelle 16). Zu den Genen, die schwächer in CREM $^{-/-}$ Tregs exprimiert wurden, gehören *TNF-receptor-superfamily member 9* (Tnfrsf9), *Suppressor of cytokine signaling 2* (Socs2) und IL23-Rezeptor (IL23R). Zu den stärker in CREM $^{-/-}$ Tregs exprimierten Genen gehörten TGF- β , Perforin (Prf), GranzymeA (Gzma) und Killer-cell lectin-like Rezeptor2 (Klri2). TGF- β ist sowohl als autokrines Zytokin für Tregs wichtig, sowie auch als Zytokin, dessen Sekretion suppressiv auf die CD4 $^{+}$ Effektorzellen einwirkt. Interessanterweise findet sich auch in den CD4 $^{+}$ Effektorzellen eine stärkere Expression von TGF- β im CREM $^{-/-}$ Hintergrund (Tabelle 17). Eine stärkere Expression von Perforin (Prf), GranzymeA (Gzma) und *killer-cell lectin-like receptor 2* (Klri2) könnte einen verstärkten zytotoxischen Mechanismus der CD4 Suppression erklären.

Tabelle 16: Auswahl differentiell exprimierter Gene in WT und CREM-/- CD4+CD25+ Tregs. CD4+CD25+ Zellen wurden mittels magnetischer Separation aus WT und CREM-/- Tieren isoliert. Die RNA aus diesen Zellen wurde für nachfolgende Microarray-Analysen verwendet (siehe Abschnitt 3.3.11) verwendet. Gezeigt ist für das jeweilige Gen (Gen-Symbol) der log FC (*logarithmischer full change*) Wert, als Maß für die differentielle Expression. Der Mittelwert gesamt gibt den Mittelwert der Expression dieses Gens aller 4 Tiere an. Der P-Wert und der. adj. P-Wert geben die Signifikanzwerte für die differentielle Expression des Gens in WT und CREM-/- Tieren an. In den rechten Spalten ist die Expression des Gens für 2 CREM-/- Mäuse (CREM-/- 1 und CREM-/- 2) und Wildtyp Mäuse (WT1 und WT2) gezeigt.

CD4+CD25+

Gene Symbol	logFC (KO/WT)	Mittelwert gesamt	P-Wert	adj.P.Wert (CREM-/-/WT)	CREM -/- 1	CREM -/- 2	WT1	WT2
Tnfrsf9	-0,63	10,86	0,14	0,68	9,96	11,11	11,15	11,19
Socs2	-0,59	10,41	0,09	0,68	9,70	10,54	10,62	10,80
Il23R	-0,58	8,75	0,22	0,68	7,82	9,10	8,85	9,24
CREM	-0,55	7,19	0,01	0,68	6,94	6,89	7,28	7,63
TGF-β	0,59	8,58	0,16	0,68	9,42	8,34	8,15	8,42
Klri	0,89	8,20	0,21	0,68	9,65	7,65	7,85	7,66
Prf	0,96	9,00	0,14	0,68	10,35	8,61	8,56	8,49
GzmA	1,29	8,92	0,14	0,68	10,76	8,37	8,31	8,25

Tabelle 17: Auswahl Differentiell exprimierte Gene in WT und CREM KO CD4+ Effektorzellen. CD4+ Zellen wurden mittels magnetischer Separation aus WT und CREM-/- Tieren isoliert. Die RNA aus diesen Zellen wurde für nachfolgende Microarray-Analysen verwendet (siehe Abschnitt 3.3.11) verwendet. Gezeigt ist für das jeweilige Gen (Gen-Symbol) der log FC (*logarithmischer full change*) Wert, als Maß für die differentielle Expression. Der Mittelwert gesamt gibt den Mittelwert der Expression dieses Gens aller 4 Tiere an. Der P-Wert gibt den Signifikanzwert für die differentielle Expression des Gens in WT und CREM-/- Tieren an. In den rechten Spalten ist die Expression des Gens für 2 CREM-/- Mäuse (CREM-/- 1 und CREM-/- 2) und Wildtyp Mäuse (WT1 und WT2) gezeigt.

CD4+

Gene Symbol	logFC (KO/WT)	Mittelwert gesamt	P-Wert	adj.P.Wert (CREM-/-/WT)	KO1	KO2	WT1	WT2
CREM	-0,59	7,12	0,03	1,00	6,54	7,10	7,48	7,35
TGFβ	0,57	8,88	0,28	1,00	9,94	8,39	8,46	8,74

4.3 Die Rolle von CREM α in Th17 Zellen

Vorhergehende Studien unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die CREM TG Maus nach T-Zell Stimulation und im Rahmen einer induzierten Kontaktdermatitis mehr IL-17a mRNA exprimiert (144). Zusätzlich zeigte die fas-/- CREM TG Maus eine erhöhte Anzahl von IL-17a sezernierenden T-Zellen (Abbildung 9). Im Folgenden sollte nun geklärt werden, ob die Überexpression von CREM α zu einem stabilen Th17 Phänotyp *in vitro* und *in vivo* führt. In einem weiteren Schritt sollte der zugrunde liegende Mechanismus aufgedeckt werden.

4.3.1 Th17 Zellen exprimieren CREM

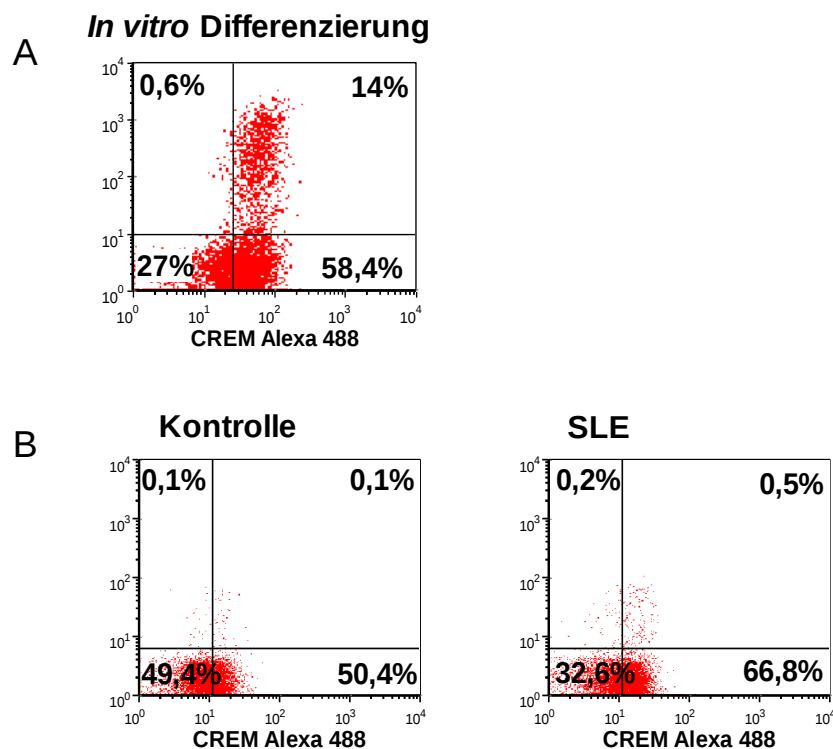


Abbildung 17: Expression von CREM in IL-17a+ Zellen. A) CREM Expression in induzierten Th17 Zellen. CD4+ Zellen wurden aus PBMCs isoliert und mit anti-CD3/CD28 Antikörpern, TGF- β , IL-6 und IL-1 β *in vitro* stimuliert wie in 3.2.9 c beschrieben. Dargestellt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse von vier unabhängigen Experimenten. B) CREM Expression in direkt isolierten PBMCs. PBMCs aus Vollblut von gesunden Kontrollen (links) und SLE Patienten (rechts) wurden für 6 h mit PMA und Ionomycin stimuliert und auf IL-17a und CREM Expression untersucht. Gekgattet wurde auf CD3+ Zellen. Dargestellt ist eine repräsentative Analyse von vier verschiedenen SLE Patienten und gesunden Kontrollen.

Zunächst wurde überprüft, ob CREM von CD4+ IL-17a+ Zellen (Th17 Zellen) exprimiert wird. Dazu wurden sowohl CD4 + Zellen *in vitro* mit IL-6, IL-1 β und TGF- β zu Th17 Zellen differenziert (Abbildung 17 A) und die CREM-Expressionsraten durchflusszytometrisch bestimmt

als auch direkt aus Vollblut isolierte PBMCs von gesunden Kontrollen und SLE-Patienten auf CREM⁺ und IL-17a⁺ T-Zellen hin untersucht (Abbildung 17 B). Es konnte gezeigt werden, dass der Großteil IL-17a exprimierender Zellen (bis zu 96%) nach der Differenzierung auch eine hohe CREM Expression aufweist. Die Relevanz der CREM α Expression in Th17 Zellen wurde daraufhin mit Hilfe der CREM^{-/-} und CREM-TG Mausmodelle analysiert.

4.3.2 CREM α induziert einen Th17 Phänotyp *in vitro* und *in vivo*

Zur Analyse eines direkten Effektes von CREM α auf die Entwicklung von Th17 Zellen wurden T-Zellen von CREM TG Mäusen mit anti-CD3/CD28 Antikörpern stimuliert und die mRNA Expression von IL-17a und dem Th17 spezifischen Transkriptionsfaktor RoR γ T untersucht. Betrachtet wurde die Hochregulation der Expression im Vergleich zu nicht stimulierten T-Lymphozyten. Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression beider Marker in CREM TG Tieren im Vergleich zu entsprechenden WT Tieren. In den Th17-Zellen der CREM TG Mäuse wurde eine 2,7-fach erhöhte relative Expression von IL-17a und eine 2,4-fach erhöhte relative Expression von ROR γ T gemessen (Abbildung 18). Interessanterweise zeigte sich im Rahmen der Th17-Differenzierung von T-Zellen aus CREM^{-/-} Tieren eine deutlich verminderte Anzahl von Th17 Zellen verglichen mit T-Zellen aus WT Tieren (Abbildung 19 C). Bei der Th1 Differenzierung dagegen ergaben sich keine Unterschiede zwischen CREM^{-/-} und WT-Tieren (Abbildung 19 B).

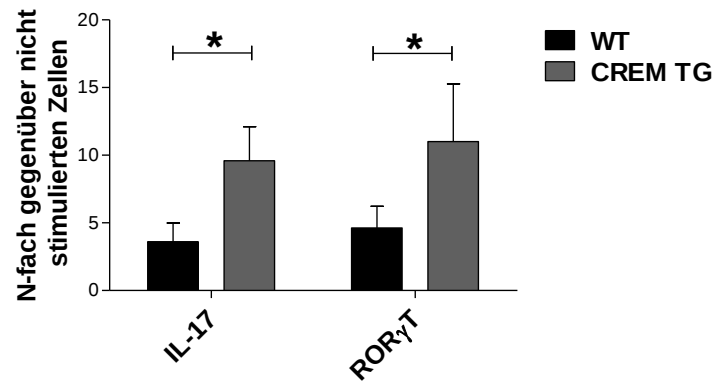


Abbildung 18: *In vitro* T-Zell Differenzierung von CREM TG T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen von WT Mäusen (schwarzer Balken) und CREM TG Mäusen (grauer Balken) wurden isoliert und für drei bis fünf Tage mit anti-CD3/CD28 Antikörpern stimuliert. Aus den Zellen wurde die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und auf A) IL-17a Expression und B) RoRγT Expression im Vergleich zu nicht stimulierten CD4⁺ T-Zellen getestet. Die Daten entsprechen den statistischen Mittelwerten von vier voneinander unabhängigen Experimenten ± SEM (* p < 0,05, einseitig gepaarter t-Test).

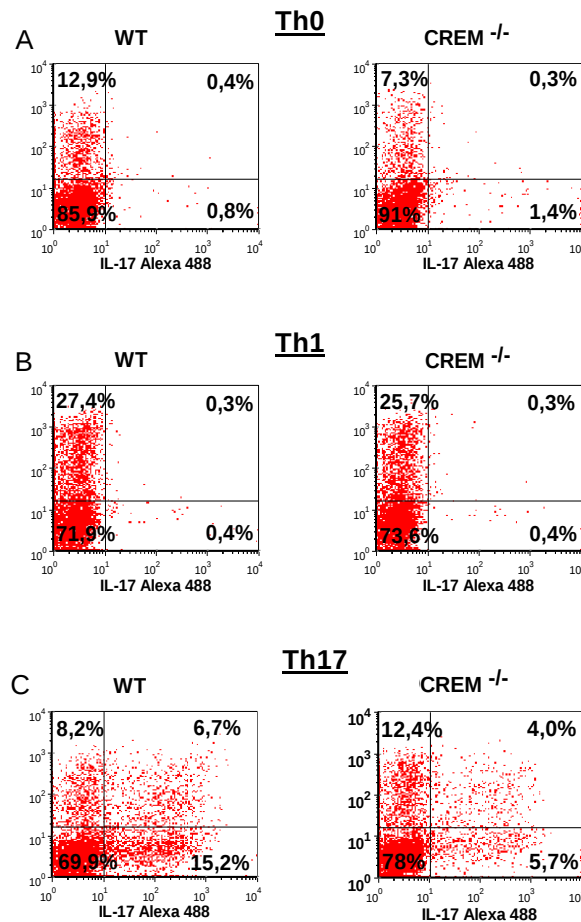


Abbildung 19: *In vitro* T-Zell Differenzierung von CREM^{-/-} T-Zellen. CD4⁺ Zellen von WT (links) und CREM^{-/-} Mäusen (rechts) wurden mittels magnetischer Zellseparation aus Milzen isoliert. Die Zellen wurden einer Differenzierung in Th0, Th1 und Th17 Zellen unterzogen wie unter 3.2.8 beschrieben. A) Th0 Differenzierung durch Stimulation mit anti-CD3/CD28 Antikörpern. B) Th1 Differenzierung durch Stimulation mit anti-CD3/CD28 Antikörpern und IL-12. C) Th17 Differenzierung durch Stimulation mit anti-CD3/CD28 Antikörpern, TGF- β und IL-6.

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob CREM α auch *in vivo* zu einer verstärkten IL-17a Expression führt und welche Relevanz diese hat. Dies wurde anhand von zwei murinen Kolitis-Modellen analysiert. Sowohl in einer DSS-induzierten Kolitis als auch in einem DNFB-Kolitis-Modell zeigten Mäuse, die CREM in T Lymphozyten überexprimieren, erhöhte Level von IL-17a (Abbildung 20 A und B) und IL-21 (Abbildung 21 A und B) exprimierenden Zellen in den mesenterialen Lymphknoten.

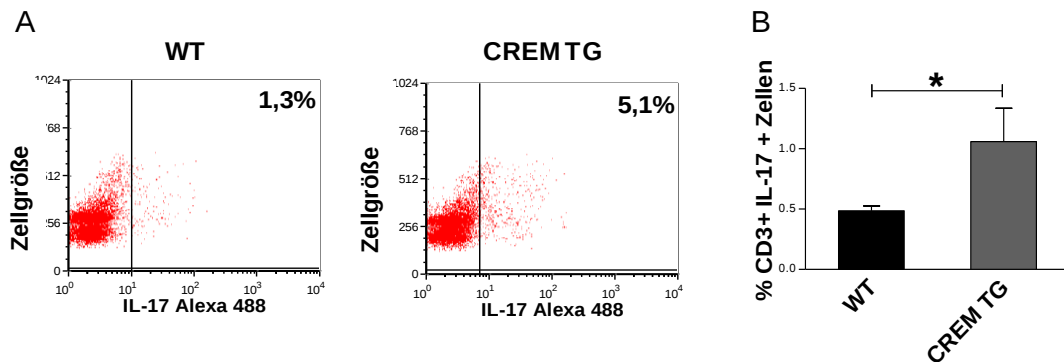


Abbildung 20 Verstärkte IL-17a Expression von CREM TG Tieren in Kolitis-Modellen. A) Durchflusszytometrische Analysen von T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten nach Induktion einer DSS Kolitis. In WT und CREM TG Tieren wurde eine DSS-Kolitis induziert wie in Absatz 3.1.1 beschrieben. B) Prozentualer Anteil der IL-17a+ T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten nach Induktion einer DNFB-Kolitis. Die DNFB-Kolitis wurde in WT und CREM TG Tieren induziert wie in 3.1.3 beschrieben. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei Tieren $\pm$ SEM (* $p < 0,05$, ungepaarter, einseitiger t-Test).

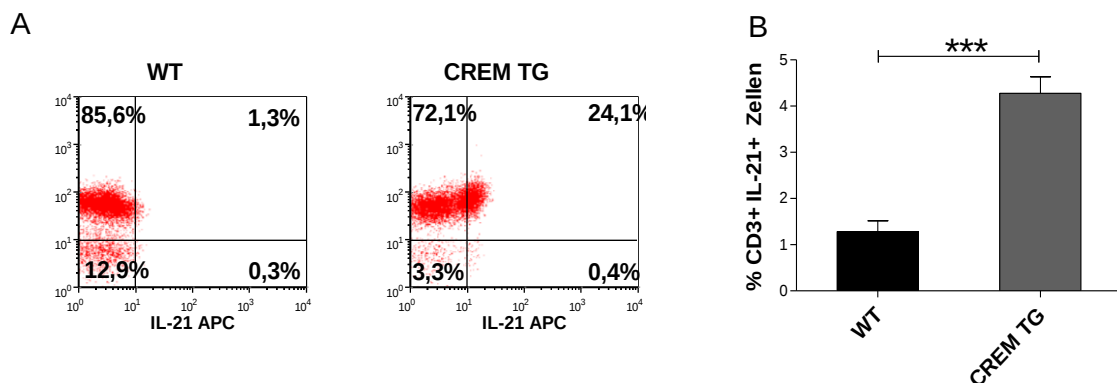


Abbildung 21: Verstärkte IL-21 Expression von CREM TG Tieren in Kolitis-Modellen. A) Durchflusszytometrische Analysen von T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten nach Induktion einer DSS Kolitis. In WT und CREM TG Tieren wurde eine DSS-Kolitis induziert wie in Absatz 3.1.1 beschrieben. B) Prozentualer Anteil der IL-21+ T-Zellen in mesenterialen Lymphknoten nach Induktion einer DNFB-Kolitis. Die DNFB-Kolitis wurde in WT und CREM TG Tieren induziert wie in 3.1.3 beschrieben. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei Tieren $\pm$ SEM (* $p < 0,05$, ungepaarter, einseitiger t-Test).

Die verstärkte Expression von IL-17a und IL-21 ging einher mit verstärkten Krankheitserscheinungen der Tiere in der DNFB-Kolitis, gemessen an der Gewichtsabnahme der Tiere (Abbildung 22). In der DSS-Kolitis zeigten sich keine Unterschiede der Gewichte (ohne Abbildung).

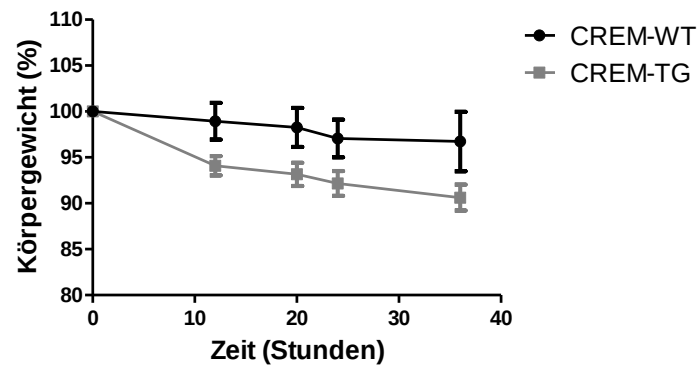


Abbildung 22: Erhöhte Krankheitsaktivität von CREM TG Tieren in der DNFB induzierten Kolitis. Dargestellt ist die Gewichtsabnahme von CREM TG Tieren (graue Symbole) im Vergleich mit WT Tieren (schwarze Symbole). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit drei Tieren $\pm$ SEM.

4.3.3 CREM α bindet und aktiviert den IL-17a Promotor

Als Mechanismus, durch den CREM α verstärkend auf eine Th17 Differenzierung einwirkt, wurde eine Bindung von CREM α an den IL-17a Promotor vermutet. Der IL-17a Promotor weist zwei CRE-ähnliche Sequenzen auf (Abbildung 23). Beide beinhalten die Basenpaare der sogenannten CRE 5' half-site (TGAC), die als minimales Bindungsmotiv für eine CREM α -Bindung in anderen Zielpromotoren von CREM α identifiziert werden konnte (148, 149). CREM α -DNA-Komplexe wurden mittels ChIP präzipitiert, und ein Nachweis wurde mittels RT-PCR mit spezifischen Primern, die die beiden CRE-ähnlichen Stellen einschließen, durchgeführt. Für die nahe des Startcodons liegende Sequenz konnte keine Bindung gezeigt werden. Allerdings konnte eine Bindung nachgewiesen werden für die weiter *upstream* liegende CRE-Region und eine ca. 3,5 fache Verstärkung der Bindung von CREM α in CREM TG T-Zellen gegenüber WT T-Zellen an den IL-17a Promotor.



Abbildung 23: Bindung von CREM α an den IL-17a Promotor. A) Der IL-17a Promotor enthält zwei CRE-ähnliche Elemente (schwarze Boxen, rot sind die mit der CRE-Site übereinstimmenden Basen gekennzeichnet). An der weiter *upstream* vom Startcodon (ATG, hellrot) gelegenen Sequenz konnte eine Bindung von CREM im ChIP nachgewiesen werden. Dick und kursiv gedruckte Sequenzen zeigen die Lage der verwendeten Primer an. B) Murine Milzzellen wurden isoliert, und ein ChIP-Assay mit anti-CREM Antikörper wurde durchgeführt wie unter 3.3.10 beschrieben. Mit IL-17a Promotor spezifischen Primern erfolgte die Detektion in einer RT-PCR Reaktion. Die Balken zeigen 4-fache Level der CREM α Bindung in transgenen T-Zellen verglichen mit WT Zellen (gleich 1 gesetzt). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Tieren $\pm$ SEM (* $p < 0,05$).

4.4 Die Überexpression von CREM α in T-Zellen induziert eine verstärkte B-Zell Antwort

Sowohl IL-17a als auch IL-21 sind an der Bildung von Keimzentren (*germinal centers*, GCs) und der B-Zell Differenzierung beteiligt. Da die CREM TG Maus erhöhte Level von IL-17a und IL-21 exprimiert (Abschnitt 4.3.2, (144)), erfolgte eine Analyse des Einflusses der T-Zell spezifischen CREM α Überexpression auf die humorale Immunantwort.

4.4.1 CREM-Überexpression führt in Lupus Mäusen zu einer verstärkten B-Zell Hyperaktivität

B-Zellen aus der Milz von fas $^{-/-}$ und fas $^{-/-}$ Mäusen mit einer CREM α Überexpression wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von GL-7 untersucht. GL-7 ist ein Marker für aktivierte B-Zellen und für GC B-Zellen, die sich in einer Vorstufe zur Differenzierung in Plasmazellen befinden. Im Vergleich zu fas $^{-/-}$ Mäusen war sowohl die GL-7 Expression auf der B-Zell Oberfläche (Abbildung 24 A und B) als auch der Prozentsatz der GL-7 exprimierenden Zellen in der CD19 $^{+}$ Population (Abbildung 24 C) in den CREM TG fas $^{-/-}$ Mäusen in den Milzen etwa um das Dreifache erhöht. Die stärkere B-Zell Aktivierung korrelierte mit einem ver-

stärkten Auftreten von anti-Doppelstrang DNA (anti-dsDNA) Antikörpern im Serum der Mäuse (Abbildung 24 D). Diese Auto-Antikörper weisen auch im humanen SLE die stärkste Assoziation mit Gewebe-Schäden auf (150-152).

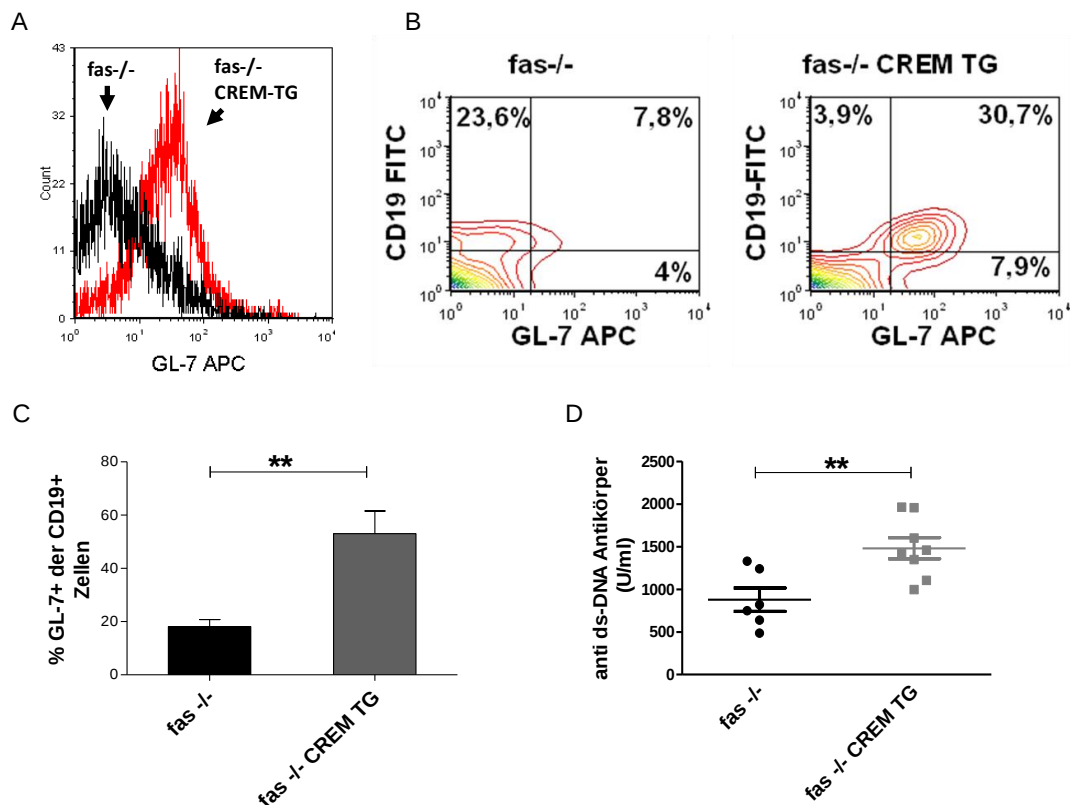


Abbildung 24: Aktivierte B-Zellen und anti-ds DNA Antikörper in CREM TG *fas*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu *fas*^{-/-} Mäusen. A-C) Milzzellen wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. A) zeigt die Analyse der GL-7-Expression, gegatet auf CD19⁺ Zellen, als Histogramm der Haupt-Fluoreszenz-Intensität, B) zeigt eine Dichtediagramm-Darstellung der CD19 und GL-7 Expression der gesamten Milzzellen und C) den prozentualen Anteil GL-7⁺ Zellen an CD19⁺ Milzzellen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von 7 Tieren $\pm$ SEM (** p < 0,01, zweiseitig ungepaarter t-Test). D) Anti-dsDNA Antikörper in Seren von 32 Wochen alten *fas*^{-/-} (links) und *fas*^{-/-} CREM TG (rechts) Mäusen wurden mittels ELISA bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.11). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von 6 bis 8 Tieren $\pm$ SEM (** p < 0,01, t-Test zweiseitig ungepaart).

4.4.2 Die hyperaktiven B-Zellen gehen einher mit einem vermehrten Anteil an follikulären T-Helferzellen

Da die B-Zell Reaktion in den GCs durch TfhS reguliert wird, wurde nun der Anteil an TfhS in den *fas*^{-/-} Mäusen und CREM TG *fas*^{-/-} Mäusen ermittelt. Zur Charakterisierung der Tfh Population wurde die Expression von PD-1 und CXCR5 bzw. ICOS und CXCR5 auf CD4⁺ Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Im Vergleich zu *fas*^{-/-} Mäusen wiesen *fas*^{-/-} CREM TG

Mäuse eine Erhöhung der Tfh_s auf, die in etwa einer Verdoppelung der Expression entsprach (Abbildung 25 A-D).

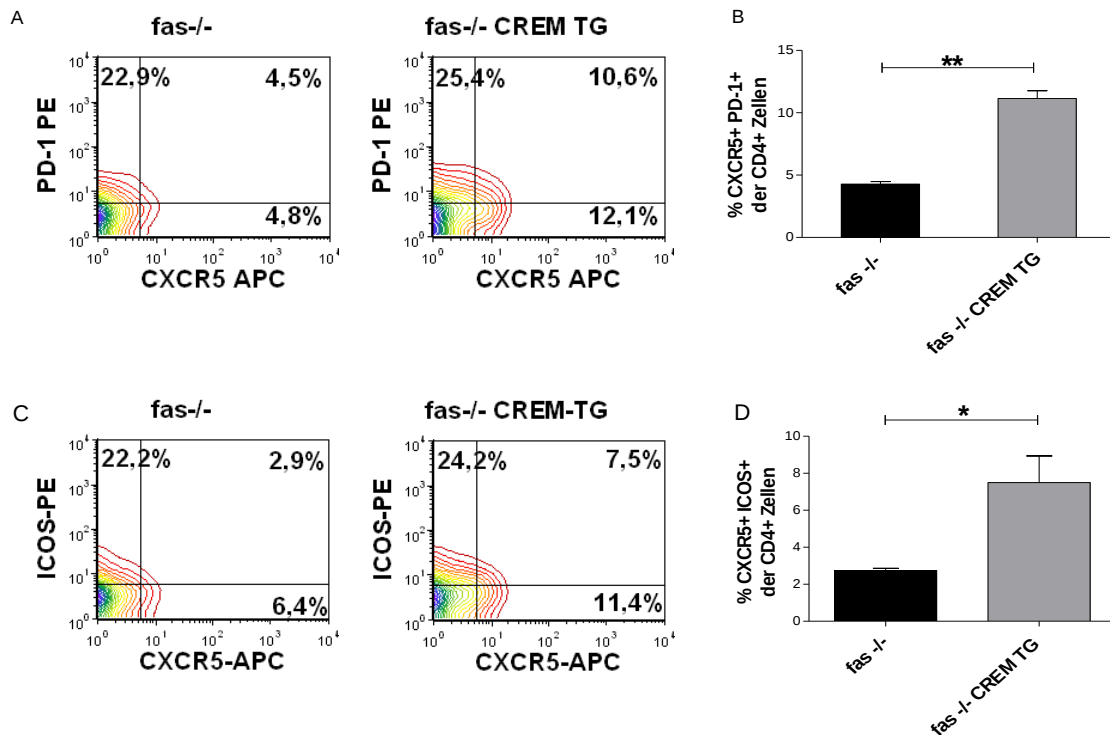


Abbildung 25: Tfh_s in CREM TG fas-/- Mäusen. A) Repräsentatives Dichtediagramm von CD4⁺ Milzzellen von fas-/- (links) und fas-/- CREM TG Mäusen (rechts). Die folliculären T-Helferzellen sind durch die Expression von PD-1 und CXCR5 (oberer Quadrant) charakterisiert. B) Anteil von Tfh_s an CD4⁺ Milzzellen von fas-/- (schwarz) und fas-/- CREM-TG Mäusen gemessen an der PD-1⁺CXCR5⁺ Expression der CD4⁺ Zellen in Prozent. C) Repräsentatives Dichtediagramm von CD4⁺ Milzzellen von fas-/- (links) und fas-/- CREM TG Mäusen (rechts). Die folliculären T-Helferzellen sind durch die Expression von ICOS und CXCR5 (oberer Quadrant) charakterisiert. D) Anteil von Tfh_s an CD4⁺ Milzzellen von fas-/- (schwarz) und fas-/- CREM-TG Mäusen gemessen an der ICOS⁺CXCR5⁺ Expression der CD4⁺ Zellen in Prozent. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von 3 Tieren ± SEM (* p < 0,05 ** p < 0,01, t-Test zweiseitig ungepaart).

4.4.3 Die Rolle von CREM α in follikulären T-Helfer-Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob CREM α auch unabhängig von fas Einfluss auf TfhS nimmt. Dazu wurden die follikulären T-Helferzellen in der CREM TG Maus betrachtet.

CREM TG wiesen in peripheren Lymphknoten etwa doppelt so viele CXCR5⁺ T-Zellen wie WT Tiere auf (Abbildung 26 A). *In vitro* anti-CD3/CD28 stimulierte T-Zellen aus den CREM TG Tieren zeigten darüber hinaus auf mRNA-Ebene eine signifikant höhere Induktion von CXCR5 verglichen mit WT T-Zellen (Abbildung 26 B). Um *in vivo* eine Tfh Antwort zu induzieren, wurde den Tieren NP-CGG gespritzt, ein Antigen, welches standardmäßig als Immunisierungs-Reagenz zur Auslösung von T-Zell abhängigen GC Antworten eingesetzt wird. Im Vergleich zu WT Tieren wiesen CREM TG Tiere sieben Tage nach i.p. Gabe von NP-CGG und Alum ein verstärktes Auftreten von CXCR5⁺ICOS⁺ positiven CD4⁺ Zellen in den Milzen auf (Abbildung 26 C und D).

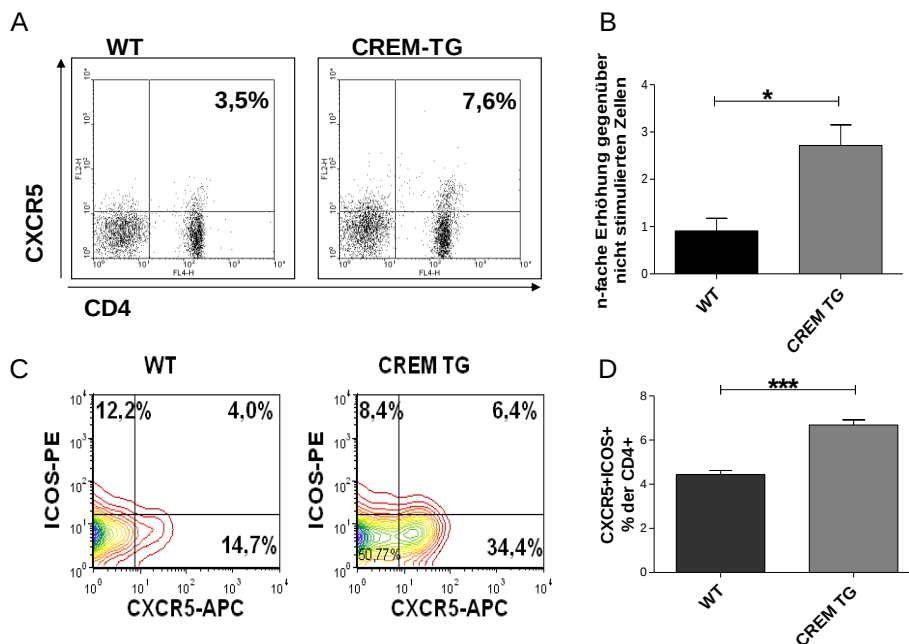


Abbildung 26: Tfh in CREM TG Mäusen. A) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von vier Experimenten, gezeigt sind CD4⁺CXCR5⁺ Zellen (oberer Quadrant) in peripheren Lymphknoten unbehandelter Tiere. B) CXCR5 mRNA in CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit anti-CD3/CD28 Antikörpern für fünf Tage. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM (* $p < 0,05$, t-Test zweiseitig ungepaart). C) Analyse der Tfh nach Immunisierung mit NP-CGG (siehe Abschnitt 3.1.5). Gezeigt ist ein repräsentatives Dichtediagramm von vier Analysen. Tfh sind als CD4⁺ICOS⁺CXCR5⁺ Zellen im oberen Quadranten zu sehen. D) Relativer Anteil CXCR5⁺ICOS⁺ Zellen der CD4⁺ Milzzellen nach Immunisierung mit NP-CGG. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier Tieren $\pm$ SEM (*** $p < 0,001$ t-Test zweiseitig ungepaart).

4.4.4 CREM α induziert eine verstärkte Immunisierung

Ob das verstärkte Auftreten von Tfh auch in den CREM TG Mäusen zu einer verstärkten B-Zell Aktivierung führt, wurde ebenfalls durch *in vivo* Immunisierungs-Experimente mit NP-CGG untersucht. Dazu wurden die Mäuse i.p. mit NP-CGG und Alum immunisiert und nach 7 Tagen auf die Expression von GL-7 in den B-Zellen der Milz bzw. nach 10 Tagen auf NP-spezifische IgGs in den Seren untersucht (Abbildung 27). Im Vergleich zum WT zeigte sich ein vermehrter Anteil an GL-7 exprimierenden B-Zellen in den CREM-TG Tieren sowie vermehrte spezifische IgGs in den Seren dieser Mäuse.

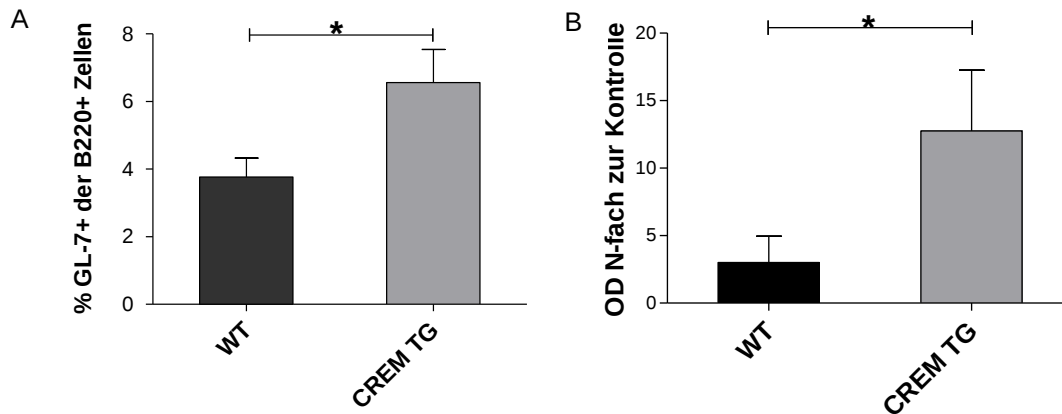


Abbildung 27: Verstärkte B-Zell Antwort in immunisierten Mäusen mit CREM Überexpression.

A) Analyse der B-Zell Aktivierung nach Immunisierung mit NP-CGG (siehe Abschnitt 3.1.5). Anteil der GL-7 exprimierenden B-Zellen in der Milz von WT (schwarzer Balken) und CREM TG Mäusen (grauer Balken). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von 7 voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM (* $p < 0,05$, zweiseitig ungepaarter t-Test). B) OD-Werte NP-spezifischer IgGs in den Seren der Mäuse nach NP-CGG Immunisierung. Gezeigt ist die relative Erhöhung der OD-Werte von Seren aus WT Mäusen (schwarzer Balken) und CREM TG Mäusen (grauer Balken) gegenüber einer unbehandelten Kontrolle. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von 5 voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM (* $p < 0,05$, zweiseitig ungepaarter t-Test).

5 Diskussion

CD4⁺ T-Zellen sind wesentlich an der Regulation der adaptiven Immunantwort beteiligt. Sie spielen aber auch eine Rolle bei vielen Autoimmunerkrankungen, die mit einem Zusammenbruch der Selbst-Toleranz einhergehen. Im Fokus der SLE Forschung standen bislang primär B-Lymphozyten, da die Produktion pathogener Auto-Antikörper eine zentrale Bedeutung für die Immunpathologie bei SLE spielt. Zunehmend wird allerdings auch die Bedeutung der T-Lymphozyten erkannt. Diese sind zum einen durch die Interaktion mit B-Zellen an der Antikörperproduktion beteiligt und setzen außerdem Zytokine frei, die im Weiteren in Entzündungsprozesse eingreifen (Abbildung 28) (153).

T-Zellen von SLE Patienten weisen eine Reihe von Abweichungen gegenüber denen von gesunden Patienten auf (154). Die Ursachen für die Besonderheiten der SLE T-Zellen sind bislang nicht vollständig geklärt. SLE T-Zellen zeigen eine erhöhte Sekretion von IL-17a und IL-21, jedoch eine verminderte Freisetzung von IL-2 (27, 154, 155) (Abbildung 28). Betrachtet man die T-Zell Subpopulationen, so treten bei SLE Patienten verstärkt Th17 und Tfh Zellen auf, während Tregs vermindert sind oder eine defekte Funktionalität aufweisen (30, 75, 77, 103). Bei diesen drei Zelltypen handelt es sich interessanterweise auch um die Zelltypen mit der höchsten Plastizität (123). Es ist allerdings nicht bekannt, ob es zu Konversionen zwischen diesen T-Zell Subtypen beispielsweise während schwerer Krankheitsschübe kommt. Jedoch könnten geringe IL-2 Level und die gleichzeitig erhöhten Mengen an IL-6 und IL-21 (156, 157), eine Verminderung der Foxp3 Expression und somit die Umwandlung zu Th17 Zellen fördern.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CREM α , ein Transkriptionsfaktor der in SLE T-Zellen überexprimiert ist und dessen Promotoraktivität mit der Krankheitsaktivität im SLE korreliert, in einem murinen Lupus-Modell zu einem verstärkten Auftreten von Autoimmunität führt. Die Expression von CREM α hat eine funktionelle Relevanz in Tregs, Th17- und Tfh-Zellen und trägt somit maßgeblich zur aberranten T-Zell Funktion im SLE bei.

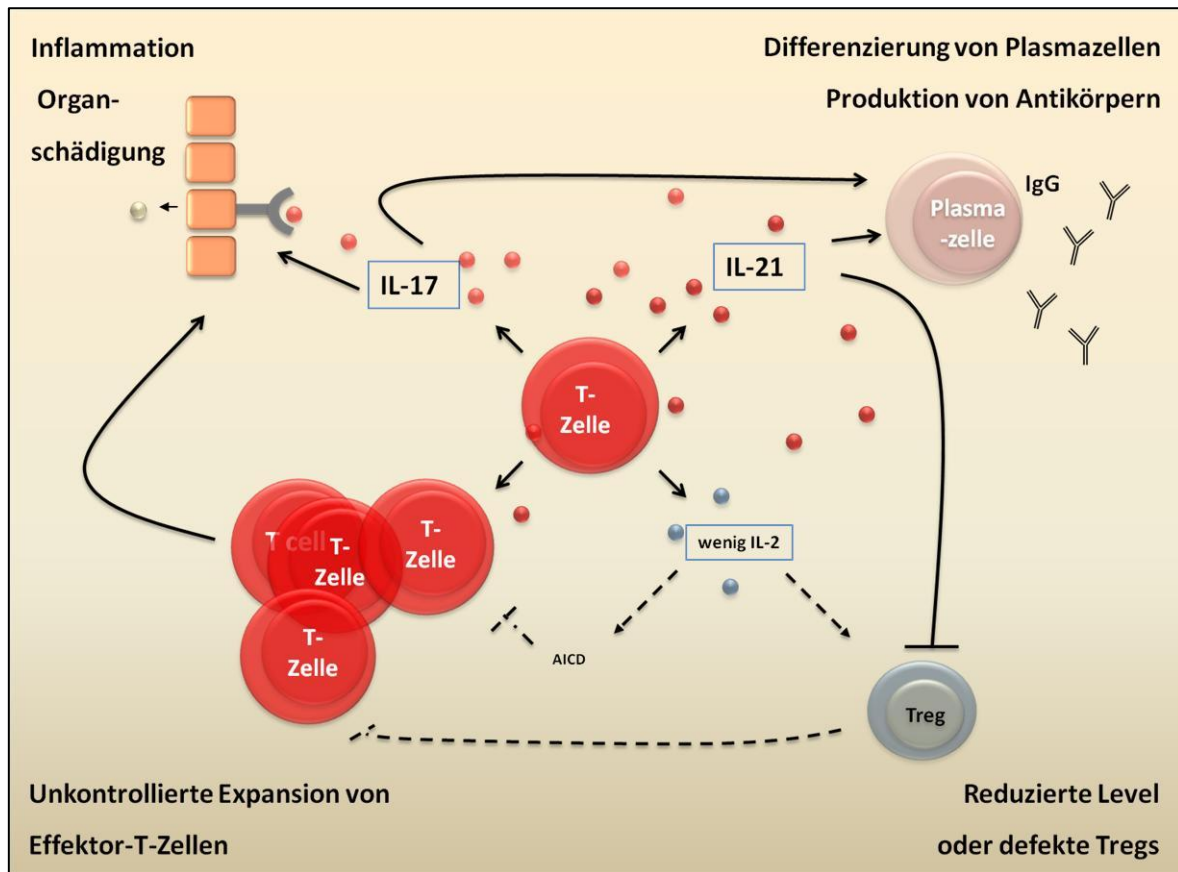


Abbildung 28: Der Beitrag von T-Zellen in der Immunpathogenese des SLE. SLE T-Zellen weisen ein charakteristisches Zytokin-Expressions-Profil auf, das auf vielfältige Weise zur systemischen Immunität und Organschädigung beiträgt. Zum einen exprimieren SLE T-Zellen mehr IL-17a und IL-21, was zu der vermehrten Produktion von Antikörpern und zu chronischer Entzündung führt. Auf der anderen Seite werden nur geringe Level IL-2 produziert, was eine Verringerung des aktivierungs-induzierten Zelltods (AICD) und eine verminderte Anzahl bzw. Funktionalität der Tregs nach sich zieht. Dies wiederum führt zu einer unkontrollierten Expansion von autoreaktiven T-Zellen (153).

5.1 CREMα führt zu verstärkten Krankheitserscheinungen im murinen Lupus

Die fas^{-/-} CREM TG Maus zeigte einen Phänotyp, der durch ein früheres Einsetzen der für fas^{-/-} Mäuse typischen Auffälligkeiten (Lymphadenopathie und Splenomegalie) gekennzeichnet war. Ursächlich dafür war eine Expansion doppelt negativer T-Zellen. Die weitere Betrachtung der T-Zellen ergab eine verringerte Anzahl regulatorischer Zellen, während es zu einer Erhöhung der Zellen kam, die hoch-inflammatorische Zytokine wie IL-17a und IL-21 sezernieren. IL-17a und IL-21 sind die „Leitzytokine“ von Th17 Zellen. Th1 Zellen, die durch eine Sekretion von IFN-γ gekennzeichnet sind, stehen ebenfalls in Verbindung mit inflammatorischen Prozessen. Die IFN-γ Sekretion unterschied sich allerdings zwischen fas^{-/-} und fas^{-/-} CREM TG Mäusen nicht. Eine gestörte Homöostase zwischen regulatorischen T-Zellen und Th17 Zellen gilt als kritischer Auslöser für

Autoimmunität. Eine defekte Funktion oder verringerte Anzahl von regulatorischen T-Zellen sowie das verstärkte Auftreten von IL-17a produzierenden Zellen könnten also verantwortlich sein für die früher einsetzende Erkrankung der fas-/- Mäuse mit CREM-Überexpression in T-Zellen.

5.2 CREM α reguliert Auftreten und Funktionalität von regulatorischen T-Zellen

Tregs sind ein immunregulatorischer T-Zell Subtyp, welcher im gesunden Organismus maßgeblich verhindert, dass es zum Verlust von Toleranz und zur Entstehung von Autoimmunität kommt. Immunantworten mit fehlregulierten T-Zellen stehen vermutlich im Zusammenhang mit einer verringerten Anzahl an Tregs, einem Defekt ihrer Funktionalität oder einer Resistenz der Effektor T-Zellen gegenüber der Treg vermittelten Suppression. Es ist bekannt, dass FoxP3 die Expression von CREM α induziert und nTregs große Mengen CREM α exprimieren (137, 138). Welche funktionelle Rolle CREM α in Tregs einnimmt, ist bislang nicht aufgeklärt und war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Durchflusszytometrische Analysen bestätigten eine starke CREM Proteinexpression in humanen nTregs und iTregs (Abbildung 10 A und B). Tregs aus SFMCs zeigten eine nochmals erhöhte CREM Expression (Abbildung 11 A und B). Allerdings zeigen *in vitro* Suppressionsassays keine defekte Funktionalität von Tregs in SFMCs (158), so dass die Relevanz der erhöhten CREM Expression in SFMC Tregs unklar ist.

Die funktionelle Rolle von CREM α in Tregs wurde in dieser Arbeit anhand von drei Mausmodellen analysiert: Der CREM TG Maus, der CREM-/- Maus und der fas-/- CREM TG Maus. Fas-/- CREM TG Mäuse zeigten eine reduzierte Anzahl FoxP3+ T-Zellen (Abbildung 8). Weiterhin ließ die massive Expansion von DNTs in diesen Tieren eine Störung der T-Zell Regulation vermuten. In fas-/- unabhängigen Modellen wurde der Einfluss von CREM α auf Anzahl und Differenzierung von Tregs untersucht. Dabei zeigte sich, dass CREM-/- Tiere signifikant mehr nTregs und iTregs aufweisen (Abbildung 13 A und B), während die CREM α Überexpression sich zumindest auf die Anzahl der iTregs negativ auswirkte (Abbildung 12 C). Weiterhin konnte eine funktionelle Relevanz der CREM α Expression in Tregs gezeigt werden. NTregs von CREM-/- Tieren zeigten eine stärkere Suppressivität *in vitro* und *in vivo* (Abbildung 14 A und B, Abbildung 15 A und B). In der Transferkolitis erkrankten die mit Tregs transferierten Mäuse weniger stark, wobei die mit CREM-/- Tregs transferierten Tiere gesünder blieben als die mit WT Tregs transferierten Tiere. Dies konnte belegt werden durch eine verminderte IL-17a Expression auf T-Zell Ebene (Abbildung 15 A und B). Die Expression von IFN- γ Zellen war ebenfalls bei den zusätzlich mit Tregs transferierten Tieren vermindert, allerdings ergab sich kein Unterschied zwischen dem CREM-/- und WT Treg Transfer (Abbildung 15 A). Offenbar wirkt sich die CREM α gesteuerte Suppressivität der Tregs in

diesem *in vivo* Modell primär auf die Th17 Differenzierung aus. Eine selektive Suppression von T-Zell Subtypen durch einen bestimmten Transkriptionsfaktor in Tregs kennt man auch von STAT3 (159), IRF-4 und T-bet (160, 161), so dass vorstellbar wäre, dass CREM α einen Mechanismus steuert, der primär Th17 Zellen kontrolliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CREM α ein negativer Regulator von Tregs ist. Als zu Grunde liegende Mechanismen ist sowohl eine direkte transkriptionelle Regulation der Genexpression Treg-relevanter Gene durch CREM α denkbar, als auch ein indirekter Effekt durch Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren oder ein indirekter Effekt durch die Hemmung der IL-2 Expression. In Microarray-Analysen fanden wir eine verstärkte Expression von Granzym und Perforin, was darauf hinweisen würde, dass CREM α an einem zytotoxischen Mechanismus der Treg vermittelten Suppression beteiligt ist. Eine Hemmung der TGF- β Produktion durch CREM α wäre ebenso vorstellbar und könnte die selektive Suppression der Th17 Zellen in der Transferkolitis erklären. Weiterhin wurde eine Interaktion von CREM und FoxP3 gezeigt (Abbildung 16 A-C). Ob es eine funktionelle Relevanz dieser Interaktion gibt, ist bislang unklar. Möglich wäre, dass CREM α die Bindung von FoxP3 an seine Zielgene verhindert und in CREM α - Zellen damit eine stärkere Induktion der FoxP3 regulierten Gene vorliegt. Ebenfalls denkbar wäre, dass CREM α durch die Interaktion mit FoxP3 die Komplexbildung mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie z. B. ROR γ T stört, was zu einer verstärkten Konversion in Th17-Zellen führen könnte.

Die Regulation der FoxP3 Expression selbst ist bislang nicht komplett aufgedeckt und wäre ebenfalls ein denkbarer Mechanismus, durch den CREM α Tregs reguliert, da eine Regulation von CREB bekannt ist. So befindet sich ein T-Zell Rezeptor Response Element im ersten FoxP3 Intron, mit einer CpG Stelle, deren Methylierung durch CREB reguliert wird und welche die Stabilität der FoxP3 Expression in iTregs steuert (162, 163). Diese Region wird als *Treg-specific demethylated region* (TSDR) bezeichnet. Es wäre denkbar, dass CREM α ebenfalls in der TSDR bindet und regulierend auf die Methylierung einwirkt.

Weitere molekularbiologische Analyse sind notwendig, um den oder die zugrunde liegenden Mechanismen die in (Abbildung 29) zusammengefasst sind, weiter aufzudecken.

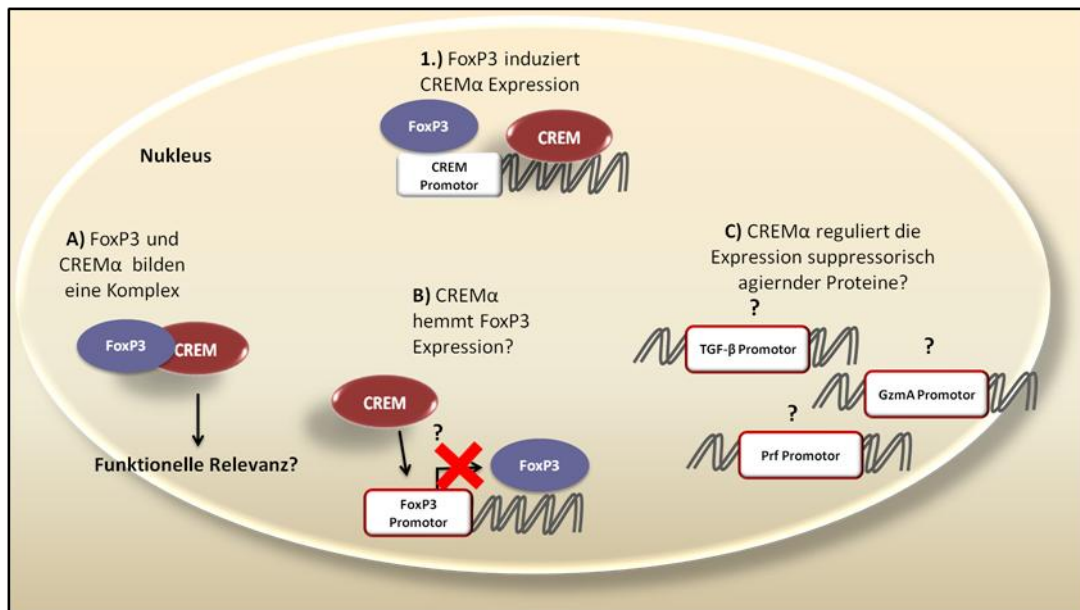


Abbildung 29: Mechanismen durch die CREMα Tregs steuern könnte. FoxP3 induziert die CREMα Expression, dadurch liegen große Mengen CREMα in Tregs vor (1). Es sind mehrere Mechanismen denkbar durch die CREMα FoxP3 regulieren könnte. Eine Interaktion von CREMα und FoxP3 könnte zu einer verminderten Bindung von FoxP3 an Zielpromotoren führen (A). Es ist ebenfalls möglich, dass CREMα in einer Art Feed-back Mechanismus die FoxP3 Transkription hemmt (B). Auch denkbar wäre, dass CREMα direkt oder indirekt Einfluss auf GzmA, Prf und TGF-β nimmt und so die Suppressivität der Tregs reguliert (C).

5.3 CREMα induziert Th17 Zellen

Th17 Zellen sind maßgeblich an chronischen Entzündungsprozessen und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt (25-27). Kürzlich konnte im humanen System gezeigt werden, dass CREMα im Promotorbereich von IL-17a bindet und eine Aktivierung des Promotors bewirkt (Abbildung 30). Zusätzlich wurde in SLE T-Zellen eine verstärkte Bindung von CREMα nachgewiesen (164). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Mechanismus im Mausmodell gezeigt werden. CHIP-Experimente belegen eine Bindung von CREMα an den IL-17a Promotor, die kongruent zu den humanen SLE-Daten auch in den CREMα überexprimierenden Tieren verstärkt ist (Abbildung 30, (164)). CREMα war bislang als transkriptioneller Repressor bekannt, der die IL-2 Produktion hemmt. Dies geschieht zum einen durch eine direkte Repression an der CRE Bindestelle, die sonst durch CREB aktiviert würde und weiterhin durch die Rekrutierung einer HDAC1 und DNMT3, was zu einer Induktion von CpG-DNA Hypermethylierungen am IL-2 Locus führt (Abschnitt 1.5.1 (134)). Daten der hier vorliegenden Arbeit und Daten im humanen System (164). legen es nahe, dass CREMα, im Gegensatz zu der suppressiven Funktion am IL-2 Promotor, am IL-17a Promotor zu einer CpG DNA Hypomethylierung und Chromatin-Azetylierung beiträgt und damit eine

aktivierende Funktion einnimmt. Möglicherweise ermöglichen die Bindung von CREM α und die darauf folgende Öffnung des Chromatins weiteren Transkriptionsfaktoren wie STAT3 und ROR γ T die Bindung an den IL-17a Promotor (164). Die verstärkte Bindung und Aktivierung des IL-17a Promotors resultiert in einer veränderten Th17 Differenzierung in CREM KO und CREM TG Mausmodellen. Während CREM TG T-Zellen *in vitro* verstärkt IL-17a exprimieren, ist die Th17 *in vitro* Differenzierung in CREM KO vermindert (Abbildung 18, Abbildung 19). *In vivo* zeigt sich in Entzündungsmodellen ebenfalls eine stärkere Expression von IL-17a und IL-21, den Leitzytokinen von Th17 Zellen. Die verstärkte Th17 Differenzierung der CREM TG Tiere geht einher mit einer verstärkten Krankheitsaktivität. So zeigten vorherige Studien eine erhöhte Reaktion im Model der murinen Kontaktdermatitis (144). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse in zwei Kolitis-Modellen untersucht. DNFB (Hapten) und DSS induzierte Kolitis sind zwei seit zwanzig Jahren zur Erforschung von *inflammatory bowel disease* verwendete gut etablierte Modelle (165). In beiden Modellen entwickelt sich eine akute Entzündungsreaktion, wobei in der DSS Kolitis IL-6, IL-17a und *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) vorherrschen (166). In der Hapten-induzierten Kolitis ist die Expression von IL-12, IL-17a sowie IFN- γ dominierend. Die Rolle von Th17 Zellen und IL-17a in der DSS Kolitis ist umstritten. Zwar zeigt die IL-17a-/- Maus eine schwächere Manifestation der DSS Kolitis, allerdings zeigen andere Studien eine durchaus protektive Rolle des Zytokins (167, 168). Darüber hinaus erkranken auch T-Zell defiziente Tiere (RAG-/- Mäuse) nach DSS-Applikation. Es handelt sich also nicht um eine rein T-Zell vermittelte Erkrankung. Die Hapten-induzierte Kolitis mit DNFB oder *trinitrobenzene sulfonic acid* (TNBS) gilt als eine T-Zell vermittelte Kolitis. Die Rolle von IL-17a in der TNBS Kolitis ist weniger umstritten. Es kommt im Vergleich zur DSS Kolitis zu einer noch höheren Sekretion von IL-17a (166), die schon nach 24h einsetzt. IL-17R-/- Mäuse erkranken weniger stark im Vergleich zu WT (169). IL-21 als weiteres Th17 Zytokin kommt eine pathogene Rolle in beiden Kolitismodellen zu (170), IL-21 defiziente Mäuse entwickeln in beiden Modellen schwächere Entzündungsreaktionen als WT Mäuse und die Gabe von IL-21R Fc führt zu einem mildereren DSS Kolitis Verlauf (171). Man kann also annehmen, dass die erhöhten IL-17a und IL-21 Level in der CREM TG-Maus die stärkere Krankheitsaktivität verursachen.

Eine weitere *in vivo* Relevanz der CREM induzierten verstärkten IL-17a und IL-21-Expression zeigte sich in der CREM TG fas-/- Maus, die eine erhöhte Anzahl von DNTs aufwies sowie eine verstärkte IL-17a und IL-21 Expression (Abbildung 7, Abbildung 9). Es ist bekannt, dass IL-17a maßgeblich zu der Pathogenese bei fas-/- Mäusen beiträgt (172). Fas-/- Mäuse exprimieren erhöhte Level DNTs, die große Mengen IL-17a sezernieren (173). Die IL-17a Expression korreliert zusätzlich mit dem Fortschreiten der Erkrankung (172). Eine erhöhte Anzahl DNTs, die IL-17a produzieren, wurde ebenfalls in SLE-Patienten nachgewie-

sen (147), sowie eine Infiltration von IL-17a produzierenden Zellen in Haut, Lunge und Niere von SLE und Lupus Nephritis Patienten (28, 147, 174, 175).

Es ist schlussfolgernd anzunehmen, dass eine verstärkte Expression von CREM in T-Zellen durch die Sekretion von IL-17a und IL-21 zu inflammatorischen Prozessen und Organschädigungen beiträgt.

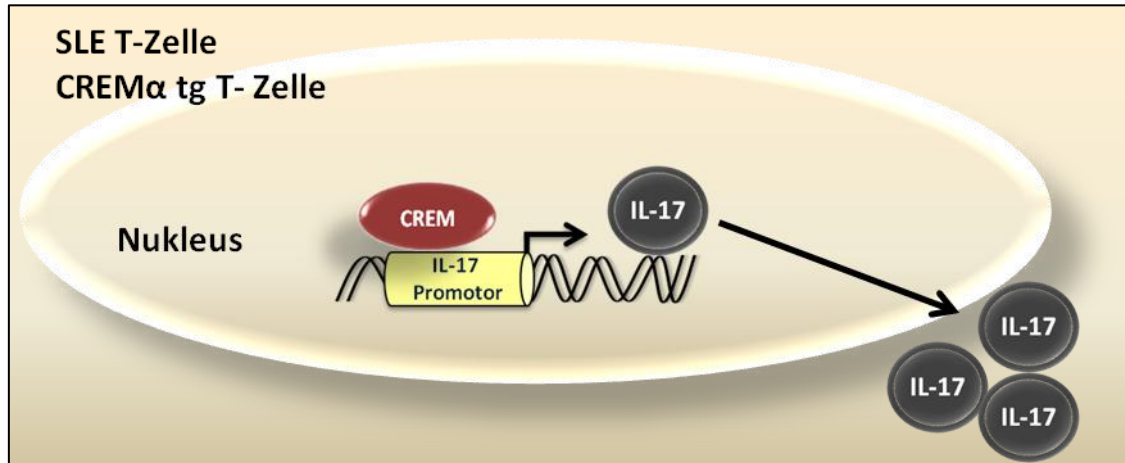


Abbildung 30: Modell für die Induktion der IL-17a Expression durch CREMα. In SLE T-Zellen und T-Zellen CREM TG Mäuse liegen große Mengen von CREM im Nukleus vor. Es kommt zu einer verstärkten Bindung von CREMα an eine CRE-ähnliche Stelle im IL-17a Promotor und dadurch zu einer Induktion der IL-17a Expression.

5.4 CREMα Überexpression in T-Zellen führt zu verstärkten B-Zell Antworten

Verstärkte B-Zell Antworten und das Auftreten von Auto-Antikörpern sind ursächlich für die SLE Pathogenese. In SLE Patienten kommt es im Gegensatz zu gesunden Personen, bei denen autoreaktive B-Zellen eliminiert werden oder in Apoptose gehen, zu einer Differenzierung von autoreaktiven B-Zellen in Plasmazellen und Memory B-Zellen (93). Wie es zu diesem Verlust der B-Zell Toleranz kommt, ist noch nicht vollständig geklärt, eine T-Zell Interaktion gilt aber als wahrscheinlich. Die B-Zell Hilfe erfolgt vornehmlich durch eine distinkte T-Zell Population, sogenannte Tfh.

Sowohl in CREM TG, als auch in CREM TG fas^{-/-} Mäusen wurde, verglichen mit den Mäusen ohne CREMα Überexpression, ein höherer Anteil von Tfh in den peripheren Lymphorganen festgestellt (Abbildung 26 und Abbildung 25). Darüber hinaus zeigte sich in der CREM-TG fas^{-/-} Maus eine verstärkte B-Zell Aktivierung, einhergehend mit einem erhöhten anti-dsDNA Antikörper-Spiegel im Serum (Abbildung 24). Eine T-Zell spezifische Immunisierung der CREM-TG Mäuse resultierte in einer im Vergleich zum WT stärkeren B-Zell Aktivierung sowie in einer erhöhten Freisetzung von spezifischen IgGs (Abbildung 27). Der zugrunde liegende Mechanismus ist höchst wahrscheinlich die verstärkte IL-17a und IL-21 Produktion in CREM TG Tieren, sowie ein verstärktes Auftreten von Tfh. Zuletzt genanntes könnte

allerdings auch durch IL-21 verursacht sein. Es konnte nicht vollständig geklärt werden, welcher der Faktoren entscheidend zu der verstärkten B-Zell Antwort beiträgt, oder ob sie möglicherweise synergistisch wirken (Abbildung 31). Frühere Experimente aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Induktion der IL-21 Expression selber durch CREM aus einer stärkeren Kalzium Freisetzung in CREM TG Zellen resultiert, was zu einer Bindung von *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) an den IL-21 Promotor führt (176). Die verstärkte Kalzium Freisetzung ist Folge einer Supprimierung der CD3 ζ Expression durch CREM α (Abbildung 32).

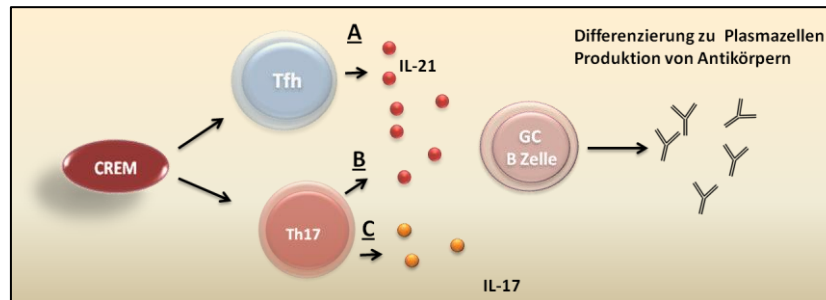


Abbildung 31: Modell für eine Verstärkung der B-Zell Antwort durch CREM α . Die verstärkte B-Zell-Antwort in CREM TG Tieren könnte durch verschiedene Mechanismen verursacht sein. Zum einen treten in CREM TG Tieren vermehrt Tfh's auf, die IL-21 sezernieren und B-Zell Hilfe leisten (A). Zum anderen treten in CREM TG Tieren verstärkt Th17 Zellen auf, die ebenfalls IL-21 sezernieren (B). Ebenso könnte von den Th17 Zellen sezerniertes IL-17a zur Plasma-Zell Differenzierung führen (C).

Es ist bekannt und durch viele murine Modelle belegt, dass eine hohe Anzahl Tfh's oder eine verstärkte B-Zell Hilfe zur aberranten positiven Selektion von autoreaktiven B-Zellen führt. Belegt wird dies durch murine Lupus Modelle, in denen eine erhöhte Anzahl Tfh's nachgewiesen wurde (95, 97, 99). Des Weiteren belegen Studien eine gesteigerte Menge zirkulierender CD4+CXCR5+ Zellen, die ebenfalls PD-1 und ICOS (103) exprimieren und im Blut einiger SLE Patienten vorkommen. Das Auftreten dieser Zellen korreliert mit der Höhe des Autoantikörper-Titers. Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass CREM α als Mediator von Tfh's und Induktor der IL-21 Expression möglicherweise über den Einfluss auf T-Zellen hinaus auch die verstärkte B-Zell Antwort im SLE beeinflusst.

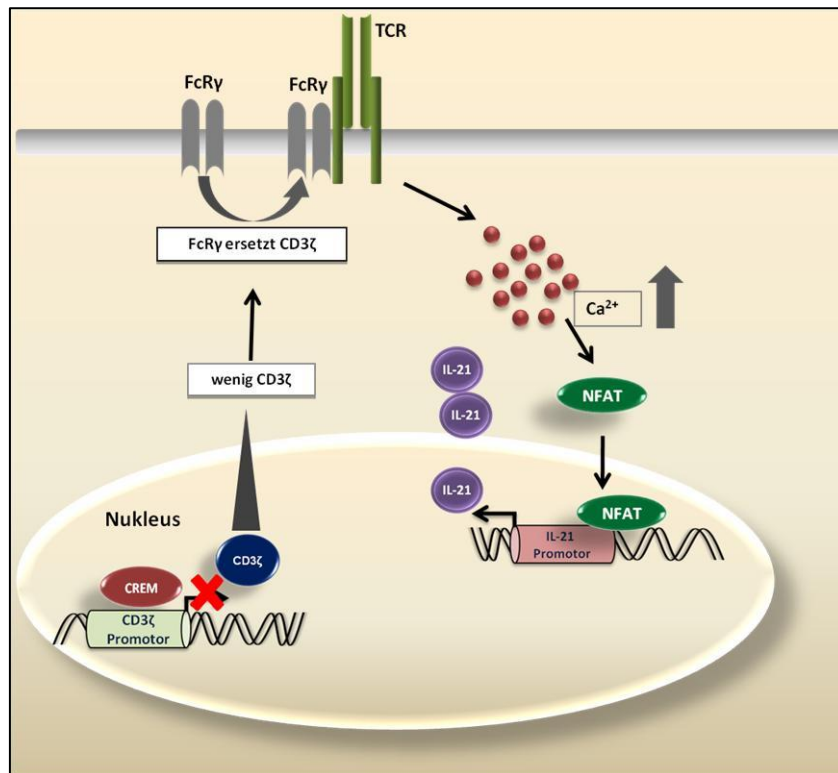
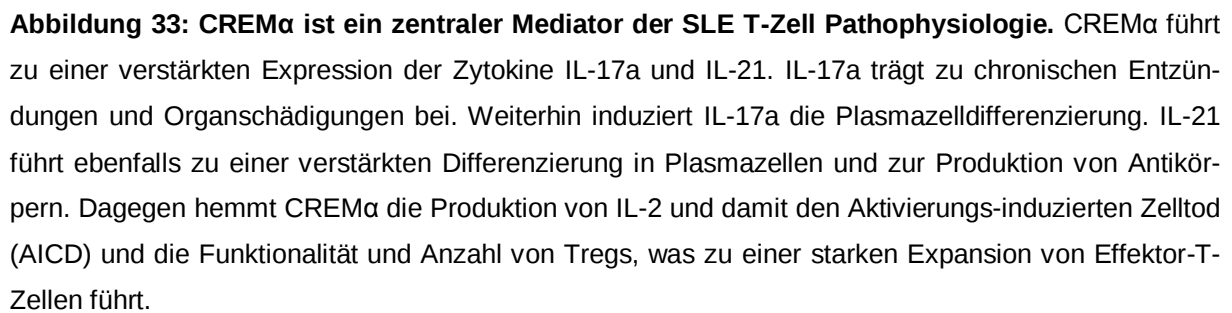


Abbildung 32: CREMα induziert die IL-21 Expression durch eine Repression der CD3ζ Expression. CREMα bindet an den CD3ζ Promotor und inhibiert dessen Transkription. Die Funktion der CD3ζ Kette wird durch die FcRγ-Kette ersetzt, nachfolgend kommt es zu einer verstärkten Signalweitergabe und zu einer stärkeren Freisetzung von Kalzium, was zu einer Aktivierung von NFAT führt. NFAT wandert daraufhin in den Nukleus ein und induziert die IL-21 Transkription.

5.5 CREMα induziert T-Zell vermittelte Autoimmunität

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CREMα sowohl Induktor von Th17 und Tfh Zellen als auch ein negativer Regulator von Tregs ist. Bei diesen T-Zell Subtypen handelt es sich um T-Zellen, welche die höchste Plastizität aufweisen. Derzeit nimmt man an, dass Stabilität und Plastizität der T-Zell Subtypen durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst werden (123). Zum einen führen die verschiedenen Zelltypen der angeborenen Immunantwort zu unterschiedlichen T-Zell Antworten. DCs und Neutrophile führen primär zu Th17 Antworten. Wo hingegen NK-Zellen zu Th1-dominierten T-Zell Antworten führen und Basophile überwiegend Th2-Antworten induzieren. Eine ebenfalls große Rolle spielen verschiedene Transkriptionsfaktoren und deren Interaktion untereinander. Als Beispiel seien hier GATA-3 und T-bet genannt, die ihre eigene Expression induzieren, wobei T-bet einen dominant negativen Einfluss auf die GATA-3 Expression ausübt. Bcl-6 wirkt autoinhibitorisch und FoxP3 und RORγT inhibieren sich gegenseitig (123). Vor diesem Hintergrund ist CREMα interessant, als ein Transkriptionsfaktor, der in die Steuerung der T-Zell Subtypen mit hoher Plastizität involviert ist und über dessen molekularen Wirkungsmechanismen bislang wenig bekannt war.



6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundlagen für ein tiefergehendes Verständnis der Rolle von CREM α in der zellulären Immunantwort gelegt. Dennoch bleiben einige Fragen offen und neue wurden aufgeworfen. Durch welche Wirkungsmechanismen CREM α Tregs reguliert, muss in weitergehenden Studien gezeigt werden. Geplant sind dazu unter anderem Reporter-Gen-Assays. Dazu soll die T-Zell-Line EL-4 mit einem CREM α Expressions-Plasmid und Luziferase-Reporter-Gen-Plasmiden transfiziert werden. Die Luziferase-Reporter-Gen-Plasmide enthalten den FoxP3 Promotor bzw. zusätzlich zum FoxP3 Promotor die TSDR (dankend erhalten von Jochen Huehn, Helmholtz Institut für Infektionsforschung, Braunschweig) (Abbildung 34) (163). Bei der TSDR handelt es sich um eine Region im ersten FoxP3 Intron. Der Methylierungsstatus dieser Region reguliert die FoxP3 Expression. Die TSDR enthält interessanterweise eine CRE-Stelle, deren Bindungsspezifität für CREB bereits gezeigt wurde und die wir auf eine Bindung von CREM testen werden (162). Die Experimente werden zeigen, ob es eine veränderte FoxP3 Expression bei CREM α Kotransfektion gibt und ob CREM α an der TSDR oder den FoxP3 Promotor selber bindet.

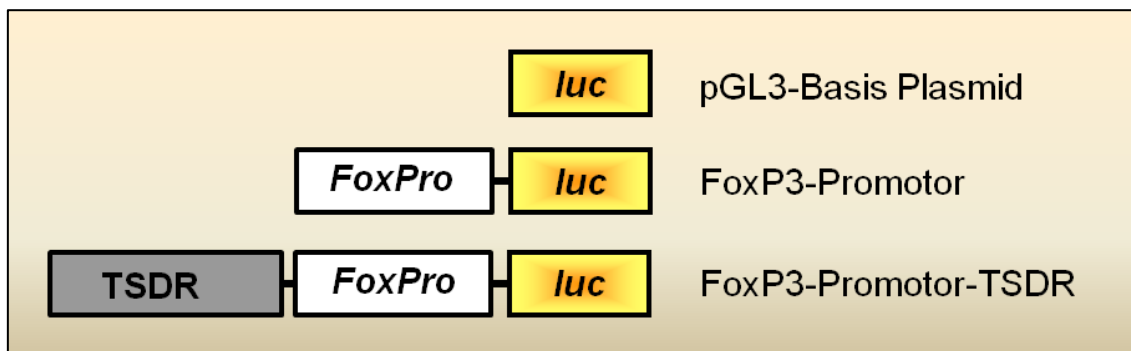


Abbildung 34: Schematische Darstellung der FoxP3-Reporter-Gen-Plasmide. Der FoxP3 Promotor und die TSDR Region wurden in ein pGL3 Luziferase-Reporter-Plasmid inkloniert. Ein Konstrukt enthält nur den FoxP3 Promotor, während ein zweites den FoxP3 Promotor und die TSDR Sequenz enthält.

Die differentiell exprimierten Gene, die mittels Microarray differenziert wurden, müssten durch eingehendere Analysen bestätigt werden. Eine genauere Analyse der RNA- und Protein-Expression dieser Gene in WT und CREM $^{-/-}$ Tieren sowie ChIP- und Reporter-Gen-Assays können zeigen, ob es sich tatsächlich um neue CREM regulierte Gene handelt. Geplant sind außerdem weitere Koimmunpräzipitations-Experimente sowie eine Analyse der Expression der durch FoxP3 direkt induzierten Gene in CREM $^{-/-}$ Tregs und CREM TG Tregs, um die Auswirkungen der FoxP3/CREM Komplexbildung zu analysieren.

Eine interessante Frage ist, ob CREM α die Konversion von Tregs in Th17 Zellen induziert. Dazu könnte man ein von J. Bluestone etabliertes Maus-Modell anwenden. Dieses Modell

beruht auf einer sogenannten Foxp3-GFP-Cre x R26-YFP Maus (112). Das Cre-lox System kommt häufig in der Mausgenetik zum Tragen und ermöglicht ein spezifisches Ausschalten eines Gen-Locus. Man verwendet dazu eine Maus, die das CRE-Rekombinase (Rec) Enzym exprimiert, und kreuzt diese in eine Maus die an spezifischen Stellen im Genom loxP-Stellen aufweist. LoxP-Stellen sind Erkennungsstellen für das CRE-Rekombinase-Enzym (CRE-Rec), die dazwischenliegende Gensequenz wird bei Anwesenheit der Rekombinase herausgeschnitten. Mit diesem System ist es möglich, die Induktion und auch Herunterregulierung von FoxP3 zu beobachten. Dazu wird die FoxP3-Cre-GFP Maus, die unter der Kontrolle des FoxP3 Promotors ein *green fluorescent protein*-CRE-Rekombinase Fusionsprotein (GFP-CRE) exprimiert (177), mit einer Reporter Maus gekreuzt, die *yellow fluorescent protein* (YFP) unter der Kontrolle des Rosa26 Promotors nach der Exzision einer loxP flankierten Stopp-Kassette exprimiert (Rosa26-loxP-Stop-loxP-YFP-Maus) (178) (Abbildung 35). Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen dieser Maus ermöglicht die Einteilung in drei verschiedene Treg-Subtypen. GFP+YFP(niedrig) Zellen dieser Maus markieren Zellen die gerade erst FoxP3 hochreguliert haben, GFP+YFP+ Zellen sind FoxP3 exprimierende Zellen (Tregs) und GFP-YFP+ Zellen sind Zellen, die FoxP3 ehemals exprimierten und dann herunterreguliert haben (exTregs). Diese exTregs weisen einen aktivierten Gedächtnis-T-Zell Phänotyp auf und sezernieren inflammatorische Zytokine, darunter IFN- γ und IL-17a (163). Es wäre von Interesse, diese Maus generell in einem murinen Lupus Modell zu untersuchen und gegebenenfalls in den fas-/- Hintergrund einzukreuzen. Verringerte Treg-Level und verstärkte Level IL-17a exprimierender Zellen könnten eine Folge der Konversion von Tregs zu IL-17+ Zellen sein. Darüber hinaus wäre ein Einkreuzen dieser Maus in die CREM TG Maus interessant, um zu sehen, ob CREM α das Auftreten von exTregs und damit die Konversion von Tregs zu IL-17 exprimierenden Zellen beeinflusst.

Zur weiteren Analyse der B-Zell Antwort in CREM TG Tieren ist eine histologische Analyse der Milzen geplant. Dazu sollen die GCs in den Milzen der fas-/- Tiere, sowie die Milzen von NP-CGG immunisierten Tieren mit und ohne CREM α Überexpression durch immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen nachgewiesen werden. Eine schwere Komplikation als Folge der verstärkten anti-dsDNA Level ist im SLE häufig eine Nephritis. Fas-/- Mäuse entwickeln keine Nephritis. Ob die verstärkte B-Zell Antwort in CREM TG Tieren auch zu einer verstärkten Nephritis führt, soll daher im Modell des Pristan-induzierten Lupus untersucht werden. Hier kommt es durch i.p. Injektion von Pristan zur Produktion von anti-dsDNA Antikörpern und zum Auftreten von Nierenschädigungen (179, 180). Dies könnte eine direkte Assoziation von CREM α mit Organschädigungen im SLE belegen.

Weiterhin ist von Interesse, ob CREM α auch über die Relevanz von SLE und Kolitis hinaus in weiteren Erkrankungen von Bedeutung ist. Dazu werden CREM TG Tiere derzeit in weiteren

Tiermodellen, darunter Modelle für murine Hepatitis, Myositis und im akuten Lungenversagen, analysiert.

Die weitere Analyse der zellulären Immunantwort durch CREMα wird zu einem besseren Verständnis über T-Zell Subtypen in Homöostase und Autoimmunität führen und die Wertigkeit von CREMα als therapeutisches Target definieren.

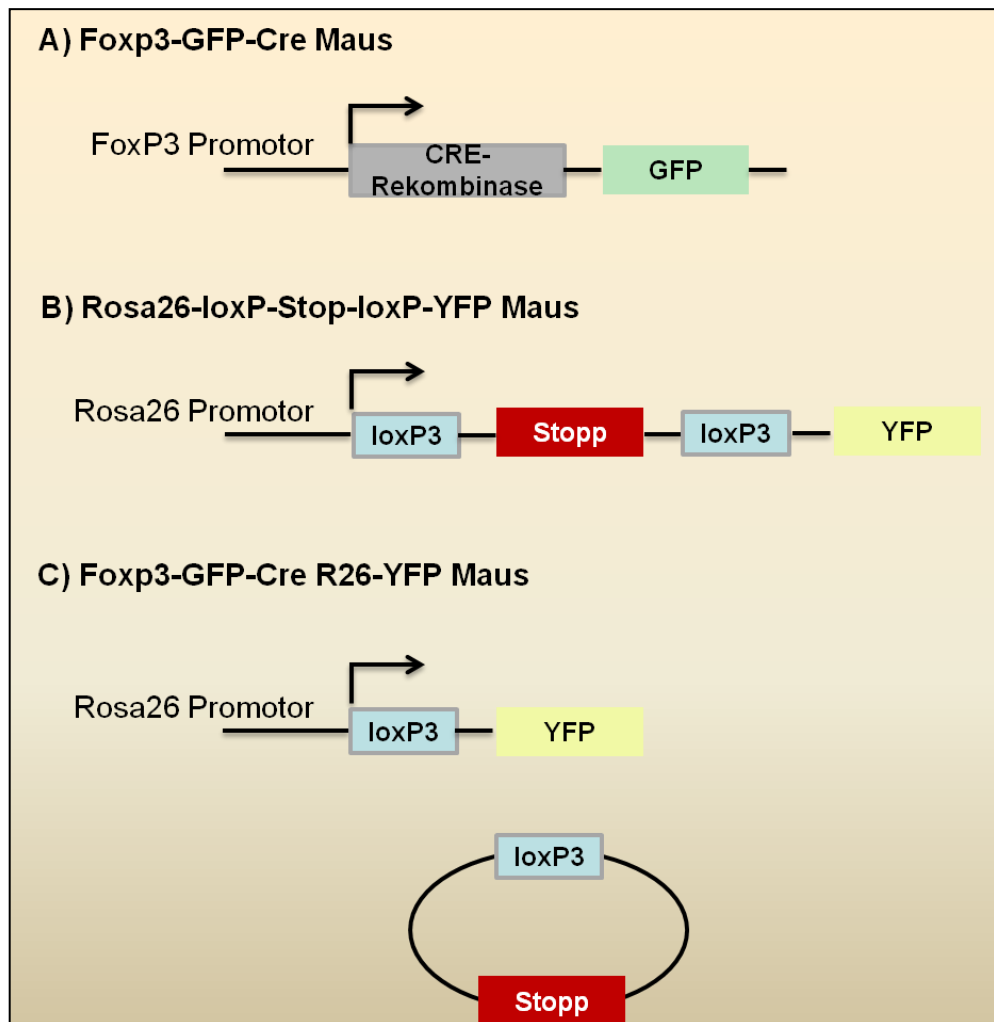


Abbildung 35: Modell der FoxP3-GFP-Rosa-YFP Maus zur Analyse von exTregs. Die FoxP3-GFP-CRE Maus exprimiert in FoxP3+ Zellen ein GFP-Rekombinase Fusionsprotein. B) Die Rosa26-loxP-Stop-loxP-YFP Maus trägt im Rosa26 Promotor ein von LoxP Stellen flankiertes Stopp-Codon, dass die YFP Expression steuert. C) Die Kreuzung der beiden Mäuse ergibt die Foxp3-GFP-Cre R26-YFP Maus. In Zellen dieser Maus, die CRE-Rekombinase exprimieren, wird das Stopp-Signal ausgeschnitten und YFP exprimiert.

Literaturverzeichnis

1. Parker, D. C. (1993) T cell-dependent B cell activation, *Annu Rev Immunol* 11, 331-360.
2. Germain, R. N. (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation, *Cell* 76, 287-299.
3. Zamoyska, R. (1998) CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses?, *Curr Opin Immunol* 10, 82-87.
4. Cantrell, D. A., and Smith, K. A. (1984) The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model, *Science* 224, 1312-1316.
5. Tsokos, G. C., Kovacs, B., and Liossis, S. N. (1997) Lymphocytes, cytokines, inflammation, and immune trafficking, *Curr Opin Rheumatol* 9, 380-386.
6. Herrmann, M., Voll, R. E., and Kalden, J. R. (2000) Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus, *Immunol Today* 21, 424-426.
7. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L., and Glimcher, L. H. (2003) Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses, *Annu Rev Immunol* 21, 713-758.
8. Jager, A., and Kuchroo, V. K. (2010) Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation, *Scand J Immunol* 72, 173-184.
9. Ferber, I. A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C. G. (1996) Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), *J Immunol* 156, 5-7.
10. Matthys, P., Vermeire, K., Mitera, T., Heremans, H., Huang, S., and Billiau, A. (1998) Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice, *Eur J Immunol* 28, 2143-2151.
11. Kelchtermans, H., Billiau, A., and Matthys, P. (2008) How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check, *Trends Immunol* 29, 479-486.
12. Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B., and Rao, A. (2006) Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility, *Annu Rev Immunol* 24, 607-656.
13. Singh, R. R. (2003) IL-4 and many roads to lupuslike autoimmunity, *Clin Immunol* 108, 73-79.
14. 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, 235-238.
15. 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, 179-189.
16. 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, 231-234.
17. 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, 484-487.
18. Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. S., Jetten, A. M., and Dong, C. (2007) Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells, *Nature* 448, 480-483.
19. 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, 967-974.

20. Manel, N., Unutmaz, D., and Littman, D. R. (2008) The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ , *Nat Immunol* 9, 641-649.
21. Yang, L., Anderson, D. E., Baecher-Allan, C., Hastings, W. D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K., and Hafler, D. A. (2008) IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells, *Nature* 454, 350-352.
22. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2009) IL-17 and Th17 Cells, *Annu Rev Immunol* 27, 485-517.
23. Nishihara, M., Ogura, H., Ueda, N., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Tsuji, F., Aono, H., Ishihara, K., Huseby, E., Betz, U. A., Murakami, M., and Hirano, T. (2007) IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state, *Int Immunol* 19, 695-702.
24. Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S., and Dong, C. (2007) STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells, *J Biol Chem* 282, 9358-9363.
25. 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, 233-240.
26. Hirota, K., Yoshitomi, H., Hashimoto, M., Maeda, S., Teradaira, S., Sugimoto, N., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ito, H., Nakamura, T., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. (2007) Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model, *J Exp Med* 204, 2803-2812.
27. Nalbandian, A., Crispin, J. C., and Tsokos, G. C. (2009) Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts, *Clin Exp Immunol* 157, 209-215.
28. Yang, J., Chu, Y., Yang, X., Gao, D., Zhu, L., Wan, L., and Li, M. (2009) Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum* 60, 1472-1483.
29. 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, 589-593.
30. Wong, C. K., Lit, L. C., Tam, L. S., Li, E. K., Wong, P. T., and Lam, C. W. (2008) Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity, *Clin Immunol* 127, 385-393.
31. Crispin, J. C., Oukka, M., Bayliss, G., Cohen, R. A., Van Beek, C. A., Stillman, I. E., Kyttaris, V. C., Juang, Y. T., and Tsokos, G. C. (2008) Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys, *J Immunol* 181, 8761-8766.
32. Aarvak, T., Chabaud, M., Miossec, P., and Natvig, J. B. (1999) IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells, *J Immunol* 162, 1246-1251.
33. Matusevicius, D., Kivisakk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., and Link, H. (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis, *Mult Scler* 5, 101-104.
34. Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2003) Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice, *J Immunol* 171, 6173-6177.
35. Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., Sudo, K., Nakae, S., Sasakawa, C., and Iwakura, Y. (2009) Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses, *Immunity* 30, 108-119.
36. Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Vanden Bos, T., Gurgel, J., Derry, J., Tocker, J., and Peschon, J. (2006) Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex, *J Immunol* 177, 36-39.

-
37. 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, 821-852.
 38. Aggarwal, S., and Gurney, A. L. (2002) IL-17: prototype member of an emerging cytokine family, *J Leukoc Biol* 71, 1-8.
 39. Laan, M., Lotvall, J., Chung, K. F., and Linden, A. (2001) IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases, *Br J Pharmacol* 133, 200-206.
 40. Woltman, A. M., de Haij, S., Boonstra, J. G., Gobin, S. J., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2000) Interleukin-17 and CD40-ligand synergistically enhance cytokine and chemokine production by renal epithelial cells, *J Am Soc Nephrol* 11, 2044-2055.
 41. Witowski, J., Pawlaczyk, K., Breborowicz, A., Scheuren, A., Kuzlan-Pawlaczyk, M., Wisniewska, J., Polubinska, A., Friess, H., Gahl, G. M., Frei, U., and Jorres, A. (2000) IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells, *J Immunol* 165, 5814-5821.
 42. Albanesi, C., Cavani, A., and Girolomoni, G. (1999) IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha, *J Immunol* 162, 494-502.
 43. Schwarzenberger, P., Huang, W., Ye, P., Oliver, P., Manuel, M., Zhang, Z., Bagby, G., Nelson, S., and Kolls, J. K. (2000) Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis, *J Immunol* 164, 4783-4789.
 44. Cai, X. Y., Gommoll, C. P., Jr., Justice, L., Narula, S. K., and Fine, J. S. (1998) Regulation of granulocyte colony-stimulating factor gene expression by interleukin-17, *Immunol Lett* 62, 51-58.
 45. Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V. K. (2009) Interleukin-17 and type 17 helper T cells, *N Engl J Med* 361, 888-898.
 46. Mitsdoerffer, M., Lee, Y., Jager, A., Kim, H. J., Korn, T., Kolls, J. K., Cantor, H., Bettelli, E., and Kuchroo, V. K. (2010) Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14292-14297.
 47. Doreau, A., Belot, A., Bastid, J., Riche, B., Trescol-Biemont, M. C., Ranchin, B., Fabien, N., Cochat, P., Pouteil-Noble, C., Trolliet, P., Durieu, I., Tebib, J., Kassai, B., Ansieau, S., Puisieux, A., Eliaou, J. F., and Bonnefoy-Berard, N. (2009) Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus, *Nat Immunol* 10, 778-785.
 48. Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science* 299, 1057-1061.
 49. 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, 330-336.
 50. Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W., and Sakaguchi, S. (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, *J Exp Med* 192, 303-310.
 51. Shevach, E. M. (2000) Regulatory T cells in autoimmunity*, *Annu Rev Immunol* 18, 423-449.
 52. Sakaguchi, S. (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self, *Nat Immunol* 6, 345-352.
 53. 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, 287-296.
 54. 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, 4180-4183.
-

55. McNally, A., Hill, G. R., Sparwasser, T., Thomas, R., and Steptoe, R. J. (2011) CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7529-7534.
56. Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. (2008) How regulatory T cells work, *Nat Rev Immunol* 8, 523-532.
57. 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, 271-283.
58. Annacker, O., Asseman, C., Read, S., and Powrie, F. (2003) Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis, *J Autoimmun* 20, 277-279.
59. 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, 1433-1442.
60. Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., and Vignali, D. A. (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function, *Nature* 450, 566-569.
61. 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, 2480-2488.
62. Wing, K., and Sakaguchi, S. (2010) Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity, *Nat Immunol* 11, 7-13.
63. Abdulahad, W. H., Boots, A. M., and Kallenberg, C. G. (2011) FoxP3+ CD4+ T cells in systemic autoimmune diseases: the delicate balance between true regulatory T cells and effector Th-17 cells, *Rheumatology (Oxford)* 50, 646-656.
64. Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., and Puccetti, P. (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells, *Nat Immunol* 4, 1206-1212.
65. Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism, *Nat Rev Immunol* 4, 762-774.
66. Brandenburg, S., Takahashi, T., de la Rosa, M., Janke, M., Karsten, G., Muzzulini, T., Orinska, Z., Bulfone-Paus, S., and Scheffold, A. (2008) IL-2 induces in vivo suppression by CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells, *Eur J Immunol* 38, 1643-1653.
67. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005) Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization, *J Exp Med* 201, 723-735.
68. Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C., and Horak, I. (1993) Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene, *Cell* 75, 253-261.
69. Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W. (1995) Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment, *Immunity* 3, 521-530.
70. Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, 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, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse, *Nat Genet* 27, 68-73.
71. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S. A., and Ramsdell, F. (2003) An essential role for Scurfy in CD4+CD25+ T regulatory cells, *Nat Immunol* 4, 337-342.
72. Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., and Ochs, H. D. (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3, *Nat Genet* 27, 20-21.
73. 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., Prohl, 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, 18-20.
74. Buckner, J. H. (2010) Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases, *Nat Rev Immunol* 10, 849-859.
75. La Cava, A. (2008) T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus, *Lupus* 17, 421-425.
76. Lee, J. H., Wang, L. C., Lin, Y. T., Yang, Y. H., Lin, D. T., and Chiang, B. L. (2006) Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus, *Immunology* 117, 280-286.
77. Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G., and Lipsky, P. E. (2007) Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus, *J Immunol* 178, 2579-2588.
78. Okada, T., and Cyster, J. G. (2006) B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses, *Curr Opin Immunol* 18, 278-285.
79. Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Forster, R. (2000) Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production, *J Exp Med* 192, 1545-1552.
80. Schaerli, P., Willmann, K., Lang, A. B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000) CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function, *J Exp Med* 192, 1553-1562.
81. Kim, C. H., Rott, L. S., Clark-Lewis, I., Campbell, D. J., Wu, L., and Butcher, E. C. (2001) Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells, *J Exp Med* 193, 1373-1381.
82. Chtanova, T., Tangye, S. G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M. R., Rolph, M. S., and Mackay, C. R. (2004) T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells, *J Immunol* 173, 68-78.
83. Kim, C. H., Lim, H. W., Kim, J. R., Rott, L., Hillsamer, P., and Butcher, E. C. (2004) Unique gene expression program of human germinal center T helper cells, *Blood* 104, 1952-1960.
84. Bryant, V. L., Ma, C. S., Avery, D. T., Li, Y., Good, K. L., Corcoran, L. M., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S. G. (2007) Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells, *J Immunol* 179, 8180-8190.
85. Linterman, M. A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R. R., Srivastava, M., Hogan, J. J., Verma, N. K., Smyth, M. J., Rigby, R. J., and Vinuesa, C. G. (2010) IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses, *J Exp Med* 207, 353-363.
86. Zotos, D., Coquet, J. M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L. M., Godfrey, D. I., Toellner, K. M., Smyth, M. J., Nutt, S. L., and Tarlinton, D. M. (2010) IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism, *J Exp Med* 207, 365-378.
87. Vogelzang, A., McGuire, H. M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C. R., and King, C. (2008) A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells, *Immunity* 29, 127-137.
88. Yu, D., Batten, M., Mackay, C. R., and King, C. (2009) Lineage specification and heterogeneity of T follicular helper cells, *Curr Opin Immunol* 21, 619-625.
89. Nurieva, R. I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X. O., Kang, H. S., Ma, L., Wang, Y. H., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q., and Dong, C. (2008) Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages, *Immunity* 29, 138-149.
90. Yu, D., Rao, S., Tsai, L. M., Lee, S. K., He, Y., Sutcliffe, E. L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., Ellyard, J. I., Parish, I. A., Ma, C. S., Li, Q. J.,

- Parish, C. R., Mackay, C. R., and Vinuesa, C. G. (2009) The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment, *Immunity* 31, 457-468.
91. Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., Wang, Y. H., and Dong, C. (2009) Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells, *Science* 325, 1001-1005.
92. King, C., Tangye, S. G., and Mackay, C. R. (2008) T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses, *Annu Rev Immunol* 26, 741-766.
93. Pugh-Bernard, A. E., Silverman, G. J., Cappione, A. J., Villano, M. E., Ryan, D. H., Insel, R. A., and Sanz, I. (2001) Regulation of inherently autoreactive VH4-34 B cells in the maintenance of human B cell tolerance, *J Clin Invest* 108, 1061-1070.
94. Linterman, M. A., Rigby, R. J., Wong, R. K., Yu, D., Brink, R., Cannons, J. L., Schwartzberg, P. L., Cook, M. C., Walters, G. D., and Vinuesa, C. G. (2009) Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity, *J Exp Med* 206, 561-576.
95. Vinuesa, C. G., Cook, M. C., Angelucci, C., Athanasopoulos, V., Rui, L., Hill, K. M., Yu, D., Domasch, H., Whittle, B., Lambe, T., Roberts, I. S., Copley, R. R., Bell, J. I., Cornall, R. J., and Goodnow, C. C. (2005) A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity, *Nature* 435, 452-458.
96. Vinuesa, C. G., Sanz, I., and Cook, M. C. (2009) Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease, *Nat Rev Immunol* 9, 845-857.
97. Odegard, J. M., Marks, B. R., DiPlacido, L. D., Poholek, A. C., Kono, D. H., Dong, C., Flavell, R. A., and Craft, J. (2008) ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity, *J Exp Med* 205, 2873-2886.
98. Herber, D., Brown, T. P., Liang, S., Young, D. A., Collins, M., and Dunussi-Joannopoulos, K. (2007) IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression, *J Immunol* 178, 3822-3830.
99. Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H. P., Wang, G., Qi, C. F., Hwu, P., Shaffer, D. J., Akilesh, S., Roopenian, D. C., Morse, H. C., 3rd, Lipsky, P. E., and Leonard, W. J. (2004) Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6, *J Immunol* 173, 5361-5371.
100. Bubier, J. A., Sproule, T. J., Foreman, O., Spolski, R., Shaffer, D. J., Morse, H. C., 3rd, Leonard, W. J., and Roopenian, D. C. (2009) A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1518-1523.
101. Sawalha, A. H., Kaufman, K. M., Kelly, J. A., Adler, A. J., Aberle, T., Kilpatrick, J., Wakeland, E. K., Li, Q. Z., Wandstrat, A. E., Karp, D. R., James, J. A., Merrill, J. T., Lipsky, P., and Harley, J. B. (2008) Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus, *Ann Rheum Dis* 67, 458-461.
102. Webb, R., Merrill, J. T., Kelly, J. A., Sestak, A., Kaufman, K. M., Langefeld, C. D., Ziegler, J., Kimberly, R. P., Edberg, J. C., Ramsey-Goldman, R., Petri, M., Reveille, J. D., Alarcon, G. S., Vila, L. M., Alarcon-Riquelme, M. E., James, J. A., Gilkeson, G. S., Jacob, C. O., Moser, K. L., Gaffney, P. M., Vyse, T. J., Nath, S. K., Lipsky, P., Harley, J. B., and Sawalha, A. H. (2009) A polymorphism within IL21R confers risk for systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum* 60, 2402-2407.
103. Simpson, N., Gatenby, P. A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D. A., Tangye, S. G., Manku, H., Vyse, T. J., Roncador, G., Huttley, G. A., Goodnow, C. C., Vinuesa, C. G., and Cook, M. C. (2010) Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum* 62, 234-244.
104. Hori, S. (2011) Regulatory T cell plasticity: beyond the controversies, *Trends Immunol* 32, 295-300.
105. Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2007) T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity, *Nat Immunol* 8, 345-350.

106. McGeachy, M. J., Bak-Jensen, K. S., Chen, Y., Tato, C. M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D. J. (2007) TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology, *Nat Immunol* 8, 1390-1397.
107. 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, 371-381.
108. Yang, X. P., Ghoreschi, K., Steward-Tharp, S. M., Rodriguez-Canales, J., Zhu, J., Grainger, J. R., Hirahara, K., Sun, H. W., Wei, L., Vahedi, G., Kanno, Y., O'Shea, J. J., and Laurence, A. (2011) Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5, *Nat Immunol* 12, 247-254.
109. Yang, X. O., Nurieva, R., Martinez, G. J., Kang, H. S., Chung, Y., Pappu, B. P., Shah, B., Chang, S. H., Schluns, K. S., Watowich, S. S., Feng, X. H., Jetten, A. M., and Dong, C. (2008) Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs, *Immunity* 29, 44-56.
110. Komatsu, N., Mariotti-Ferrandiz, M. E., Wang, Y., Malissen, B., Waldmann, H., and Hori, S. (2009) Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1903-1908.
111. Radhakrishnan, S., Cabrera, R., Schenk, E. L., Nava-Parada, P., Bell, M. P., Van Keulen, V. P., Marler, R. J., Felts, S. J., and Pease, L. R. (2008) Reprogrammed FoxP3+ T regulatory cells become IL-17+ antigen-specific autoimmune effectors in vitro and in vivo, *J Immunol* 181, 3137-3147.
112. Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S. L., Jeker, L. T., Penaranda, C., Martinez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., and Bluestone, J. A. (2009) Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo, *Nat Immunol* 10, 1000-1007.
113. Koenen, H. J., Smeets, R. L., Vink, P. M., van Rijssen, E., Boots, A. M., and Joosten, I. (2008) Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells, *Blood* 112, 2340-2352.
114. Ayyoub, M., Deknuydt, F., Raimbaud, I., Dousset, C., Leveque, L., Bioley, G., and Valmori, D. (2009) Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8635-8640.
115. Voo, K. S., Wang, Y. H., Santori, F. R., Boggiano, C., Arima, K., Bover, L., Hanabuchi, S., Khalili, J., Marinova, E., Zheng, B., Littman, D. R., and Liu, Y. J. (2009) Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4793-4798.
116. Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M., Ivanov, II, 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 RORgamma t function, *Nature* 453, 236-240.
117. Du, J., Huang, C., Zhou, B., and Ziegler, S. F. (2008) Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3, *J Immunol* 180, 4785-4792.
118. Vinuesa, C. G., Tangye, S. G., Moser, B., and Mackay, C. R. (2005) Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity, *Nat Rev Immunol* 5, 853-865.
119. Lee, Y. K., Turner, H., Maynard, C. L., Oliver, J. R., Chen, D., Elson, C. O., and Weaver, C. T. (2009) Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage, *Immunity* 30, 92-107.
120. Bending, D., De la Pena, H., Veldhoen, M., Phillips, J. M., Uyttenhove, C., Stockinger, B., and Cooke, A. (2009) Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice, *J Clin Invest* 119, 565-572.

121. Martin-Orozco, N., Chung, Y., Chang, S. H., Wang, Y. H., and Dong, C. (2009) Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells, *Eur J Immunol* 39, 216-224.
122. Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlaschi, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells, *J Exp Med* 204, 1849-1861.
123. Murphy, K. M., and Stockinger, B. (2010) Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances, *Nat Immunol* 11, 674-680.
124. De Cesare, D., and Sassone-Corsi, P. (2000) Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 64, 343-369.
125. Sassone-Corsi, P. (1995) Transcription factors responsive to cAMP, *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 355-377.
126. Foulkes, N. S., Borrelli, E., and Sassone-Corsi, P. (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription, *Cell* 64, 739-749.
127. Montminy, M. (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP, *Annu Rev Biochem* 66, 807-822.
128. Mayr, B., and Montminy, M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 599-609.
129. von Mikecz, A., Zhang, S., Montminy, M., Tan, E. M., and Hemmerich, P. (2000) CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus, *J Cell Biol* 150, 265-273.
130. Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M., and Evans, R. M. (1996) Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling, *Nature* 383, 99-103.
131. Asahara, H., Santoso, B., Guzman, E., Du, K., Cole, P. A., Davidson, I., and Montminy, M. (2001) Chromatin-dependent cooperativity between constitutive and inducible activation domains in CREB, *Mol Cell Biol* 21, 7892-7900.
132. Ferreri, K., Gill, G., and Montminy, M. (1994) The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1210-1213.
133. Tenbrock, K., Juang, Y. T., Leukert, N., Roth, J., and Tsokos, G. C. (2006) The transcriptional repressor cAMP response element modulator alpha interacts with histone deacetylase 1 to repress promoter activity, *J Immunol* 177, 6159-6164.
134. Hedrich, C. M., Rauen, T., and Tsokos, G. C. (2011) cAMP responsive element modulator (CREM){alpha} signaling mediates epigenetic remodeling of the human IL2 gene: implications in systemic lupus erythematosus (SLE), *J Biol Chem*.
135. Barton, K., Muthusamy, N., Chanyangam, M., Fischer, C., Clendenin, C., and Leiden, J. M. (1996) Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB, *Nature* 379, 81-85.
136. Tenbrock, K., Juang, Y. T., Tolnay, M., and Tsokos, G. C. (2003) The cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator suppresses IL-2 production in stimulated T cells by a chromatin-dependent mechanism, *J Immunol* 170, 2971-2976.
137. Bodor, J., Fehervari, Z., Diamond, B., and Sakaguchi, S. (2007) ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells, *Eur J Immunol* 37, 884-895.
138. Williams, L. M., and Rudensky, A. Y. (2007) Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3, *Nat Immunol* 8, 277-284.
139. Vaeth, M., Gogishvili, T., Bopp, T., Klein, M., Berberich-Siebelt, F., Gattenloehner, S., Avots, A., Sparwasser, T., Grebe, N., Schmitt, E., Hunig, T., Serfling, E., and Bodor, J. (2011) Regulatory T cells facilitate the nuclear accumulation of inducible cAMP

- early repressor (ICER) and suppress nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1), *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2480-2485.
140. Rauen, T., Benedyk, K., Juang, Y. T., Kerkhoff, C., Kyttaris, V. C., Roth, J., Tsokos, G. C., and Tenbrock, K. (2011) A novel intronic CREM promoter is regulated by AP-1 and accounts for altered activation-induced CREM expression in T cells from patients with systemic lupus erythematosus, *J Biol Chem*.
141. Tenbrock, K., Juang, Y. T., Gourley, M. F., Nambiar, M. P., and Tsokos, G. C. (2002) Antisense cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator up-regulates IL-2 in T cells from patients with systemic lupus erythematosus, *J Immunol* 169, 4147-4152.
142. Juang, Y. T., Wang, Y., Solomou, E. E., Li, Y., Mawrin, C., Tenbrock, K., Kyttaris, V. C., and Tsokos, G. C. (2005) Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV, *J Clin Invest* 115, 996-1005.
143. Tenbrock, K., Kyttaris, V. C., Ahlmann, M., Ehrchen, J. M., Tolnay, M., Melkonyan, H., Mawrin, C., Roth, J., Sorg, C., Juang, Y. T., and Tsokos, G. C. (2005) The cyclic AMP response element modulator regulates transcription of the TCR zeta-chain, *J Immunol* 175, 5975-5980.
144. Lippe, R. (2011) Einfluss der Überexpression von CREM α auf die T-Zellphysiologie in vitro und in vivo, In *Institut für Immunologie*, Universitätsklinikum Münster, Münster.
145. Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice, *Gastroenterology* 98, 694-702.
146. Wofsy, D., Ledbetter, J. A., Hendler, P. L., and Seaman, W. E. (1985) Treatment of murine lupus with monoclonal anti-T cell antibody, *J Immunol* 134, 852-857.
147. Crispin, J. C., and Tsokos, G. C. (2009) Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype, *J Immunol* 183, 4675-4681.
148. Ahlmann, M., Varga, G., Sturm, K., Lippe, R., Benedyk, K., Viemann, D., Scholzen, T., Ehrchen, J., Muller, F. U., Seidl, M., Matus, M., Tsokos, G. C., Roth, J., and Tenbrock, K. (2009) The cyclic AMP response element modulator {alpha} suppresses CD86 expression and APC function, *J Immunol* 182, 4167-4174.
149. Solomou, E. E., Juang, Y. T., and Tsokos, G. C. (2001) Protein kinase C-theta participates in the activation of cyclic AMP-responsive element-binding protein and its subsequent binding to the -180 site of the IL-2 promoter in normal human T lymphocytes, *J Immunol* 166, 5665-5674.
150. Ravirajan, C. T., Rahman, M. A., Papadaki, L., Griffiths, M. H., Kalsi, J., Martin, A. C., Ehrenstein, M. R., Latchman, D. S., and Isenberg, D. A. (1998) Genetic, structural and functional properties of an IgG DNA-binding monoclonal antibody from a lupus patient with nephritis, *Eur J Immunol* 28, 339-350.
151. Ehrenstein, M. R., Katz, D. R., Griffiths, M. H., Papadaki, L., Winkler, T. H., Kalden, J. R., and Isenberg, D. A. (1995) Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice, *Kidney Int* 48, 705-711.
152. Okamura, M., Kanayama, Y., Amastu, K., Negoro, N., Kohda, S., Takeda, T., and Inoue, T. (1993) Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology, *Ann Rheum Dis* 52, 14-20.
153. Ohl, K., and Tenbrock, K. (2011) Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus, *J Biomed Biotechnol* 2011, 432595.
154. Tenbrock, K., Juang, Y. T., Kyttaris, V. C., and Tsokos, G. C. (2007) Altered signal transduction in SLE T cells, *Rheumatology (Oxford)* 46, 1525-1530.
155. Sarra, M., and Monteleone, G. (2010) Interleukin-21: a new mediator of inflammation in systemic lupus erythematosus, *J Biomed Biotechnol* 2010, 294582.

-
156. Linker-Israeli, M., Deans, R. J., Wallace, D. J., Prehn, J., Ozeri-Chen, T., and Klinenberg, J. R. (1991) Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis, *J Immunol* 147, 117-123.
 157. Li, J., Pan, H. F., Cen, H., Tian, J., Ma, Y., Tao, J. H., and Ye, D. Q. (2010) Interleukin-21 as a potential therapeutic target for systemic lupus erythematosus, *Mol Biol Rep.*
 158. Wehrens, E. J., Mijnheer, G., Duurland, C. L., Klein, M., Meerding, J., van Loosdregt, J., de Jager, W., Sawitzki, B., Coffey, P. J., Vastert, B., Prakken, B. J., and van Wijk, F. (2011) Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells, *Blood* 118, 3538-3548.
 159. Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R. M., Liang, Y., Kas, A., and Rudensky, A. Y. (2009) CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner, *Science* 326, 986-991.
 160. Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J. M., Chu, T. T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A. Y. (2009) Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses, *Nature* 458, 351-356.
 161. Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., and Campbell, D. J. (2009) The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation, *Nat Immunol* 10, 595-602.
 162. 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, 1543-1551.
 163. Polansky, J. K., Schreiber, L., Thelemann, C., Ludwig, L., Kruger, M., Baumgrass, R., Cording, S., Floess, S., Hamann, A., and Huehn, J. (2010) Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells, *J Mol Med (Berl)* 88, 1029-1040.
 164. Rauen, T., Hedrich, C. M., Juang, Y. T., Tenbrock, K., and Tsokos, G. C. (2011) cAMP responsive element modulator (CREM){ α } induces IL-17A expression and mediates epigenetic alterations at the IL17A locus in patients with systemic lupus erythematosus, *J Biol Chem.*
 165. Strober, W., Fuss, I. J., and Blumberg, R. S. (2002) The immunology of mucosal models of inflammation, *Annu Rev Immunol* 20, 495-549.
 166. Alex, P., Zachos, N. C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T. E., Conklin, L. S., Centola, M., and Li, X. (2009) Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis, *Inflamm Bowel Dis* 15, 341-352.
 167. Ito, R., Kita, M., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Iwakura, Y., Okanoue, T., Yoshikawa, T., Kataoka, K., and Mazda, O. (2008) Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice, *Biochem Biophys Res Commun* 377, 12-16.
 168. Ogawa, A., Andoh, A., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2004) Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice, *Clin Immunol* 110, 55-62.
 169. Zhang, Z., Zheng, M., Bindas, J., Schwarzenberger, P., and Kolls, J. K. (2006) Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis, *Inflamm Bowel Dis* 12, 382-388.
 170. Morrison, P. J., Ballantyne, S. J., and Kullberg, M. C. (2011) Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity, *Immunology* 133, 397-408.
 171. Fina, D., Sarra, M., Fantini, M. C., Rizzo, A., Caruso, R., Caprioli, F., Stolfi, C., Cardolini, I., Dottori, M., Boirivant, M., Pallone, F., Macdonald, T. T., and Monteleone, G. (2008) Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21, *Gastroenterology* 134, 1038-1048.
 172. Zhang, Z., Kytaridis, V. C., and Tsokos, G. C. (2009) The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis, *J Immunol* 183, 3160-3169.
-

173. Kyttaris, V. C., Zhang, Z., Kuchroo, V. K., Oukka, M., and Tsokos, G. C. (2010) Cutting edge: IL-23 receptor deficiency prevents the development of lupus nephritis in C57BL/6-lpr/lpr mice, *J Immunol* 184, 4605-4609.
174. Wang, Y., Ito, S., Chino, Y., Goto, D., Matsumoto, I., Murata, H., Tsutsumi, A., Hayashi, T., Uchida, K., Usui, J., Yamagata, K., and Sumida, T. (2010) Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis, *Clin Exp Immunol* 159, 1-10.
175. Kwan, B. C., Tam, L. S., Lai, K. B., Lai, F. M., Li, E. K., Wang, G., Chow, K. M., Li, P. K., and Szeto, C. C. (2009) The gene expression of type 17 T-helper cell-related cytokines in the urinary sediment of patients with systemic lupus erythematosus, *Rheumatology (Oxford)* 48, 1491-1497.
176. Kim, H. P., Korn, L. L., Gamero, A. M., and Leonard, W. J. (2005) Calcium-dependent activation of interleukin-21 gene expression in T cells, *J Biol Chem* 280, 25291-25297.
177. Zhou, X., Jeker, L. T., Fife, B. T., Zhu, S., Anderson, M. S., McManus, M. T., and Bluestone, J. A. (2008) Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity, *J Exp Med* 205, 1983-1991.
178. Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., William, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M., and Costantini, F. (2001) Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus, *BMC Dev Biol* 1, 4.
179. Reeves, W. H., Lee, P. Y., Weinstein, J. S., Satoh, M., and Lu, L. (2009) Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons, *Trends Immunol* 30, 455-464.
180. Satoh, M., and Reeves, W. H. (1994) Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane, *J Exp Med* 180, 2341-2346.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Aachen unter der Betreuung von Herrn PD Dr. med. Klaus Tenbrock durchgeführt. Im Nachfolgenden möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. med. Klaus Tenbrock danke ich für die Überlassung der hochaktuellen und interessanten Aufgabenstellung und die hervorragende Hilfe bei der Bearbeitung des Projektes. Durch eine exzellente Betreuung hat er jede Phase intensiv begleitet und mit konstruktiven, wie wertvollen Ideen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Im Rahmen der Promotion konnte ich von seinem großen T-Zell-immunologischen Fachwissen profitieren. Darüber hinaus lehrte er mich viel über Hartnäckigkeit und Zielstrebigkeit mit denen man wissenschaftlichen Fragestellungen gegenüberzutreten muss.

Herrn Univ. Prof. Dr. Rainer Fischer danke ich für die freundliche Betreuung der Arbeit und für die Übernahme des Gutachtens. Dies machte eine Promotion in Kooperation mit der medizinischen Fakultät erst möglich. Darüber hinaus bedanke ich mich für äußerst kompetente und sachdienliche Hilfestellungen bei der Fokussierung der Projekte.

Bei Herrn Univ. Prof. Dr. Jürgen Bernhagen bedanke ich mich für die Bereitschaft, der Prüfungskommission meiner Promotionsprüfung beizusitzen und für die Unterstützung und Förderung während meiner gesamten Diplomarbeit und darüber hinaus.

Herrn Univ. Prof. Dr. Norbert Wagner danke ich für die Beratung und Unterstützung bei vielen unserer Projekte.

Unseren Kooperationspartnern der Harvard Universität in Boston Prof. Dr. George Tsokos, Dr.med. Thomas Rauen und Dr. Jose C. Crispin danke ich für die große Hilfe bei verschiedensten Projekten und Publikationen.

Dr. Halima Moncrieffe und Prof. Dr. Lucy Wedderburn vom Institut of Child Health in London danke ich für die freundliche Kooperation bei der Analyse der regulatorischen T-Zellen aus Kniepunktat von JIA Patienten.

Jeff Bierwagen und Karin Maschke-Neuss danke ich für die Hilfe bei den KoIP und ChIP Experimenten, sowie für die zuverlässige Übernahme von unzähligen anfallenden Laborarbeiten.

Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Nora Honke, Anastasia Wiener, Tobias Pastusiak und Jeff Bierwagen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft, ohne die die Durchführung vieler Experimente nicht möglich gewesen wäre.

Frau Dr. Eva Verjans danke ich für die engagierte Hilfe bei den ELISA Untersuchungen und vielen weiteren Experimenten sowie für die konstruktiven Diskussionen und die freundschaftliche Unterstützung.

Bei Frau Dr. Angela Schippers möchte ich mich in besonderem Maße bedanken. Mit kompetenten Ratschlägen und tatkräftiger Hilfe hat sie mich stets unterstützt und trägt großen Anteil an dieser Arbeit. Ebenso danke ich Dr. Stephan Dreschers und Dr. Thomas Clahsen, die mir stets sachkundige Hilfestellung geleistet haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir das Studium der Biologie ermöglichten, immer an mich geglaubt haben und ein immens wichtiger Rückhalt während der Anfertigung der Promotion waren. Meiner Schwester Anna-Lena, meinen Brüdern Kai und Henrik und meiner besten Freundin Vera Mauelshagen danke ich, weil sie mir stets unterstützend und ermutigend zur Seite standen.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Kim Karena Ohl
Geburtsdatum/-ort: 28.04.1982 in Waldbröl
Anschrift: Weidenweg 1, 52074 Aachen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1988 – 1992 GGS Marienberghausen
1992 – 2001 Hollenberggymnasium Waldbröl, Schulabschluss Abitur
(Gesamtnote: 1,9)

Studium

Oktober 2001 – September 2002 Studium Agrarwissenschaften an der RFWU Bonn

Oktober 2002 – März 2005 Studium der Biologie an der RFWU Bonn, September 2004 Vordiplom (Gesamtnote: Sehr gut)

April 2005- September 2007 Studium der Biologie an der RWTH Aachen, Abschluss:Diplom
Mündliche Diplomprüfungen der Fächer:
Bioorganische Chemie (Note: 1,0), Genetik (Note: 1,0), Immunologie (Note: 1,0), Molekular- und Zellbiologie (Note: 1,3)

Oktober 2007-September 2008 Diplomarbeit zum Thema „Molekulare Wechselwirkungen im MIF/CXCR Liganden/Rezeptor-System“ am Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie an der RWTH Aachen unter Leitung von Univ. Prof. Dr. J. Bernhagen.
(Note: sehr gut)

Praktische Tätigkeiten

Februar 2004- März 2004	2-Monatiges Praktikum bei der Firma Sarstedt; Nümbrecht (Herstellung und Vertrieb von Verbrauchsmaterialien und Geräten für Medizin und Wissenschaft.)
November 2006- Februar 2007	3-monatiges Forschungspraktikum im Institut für Biologie I; RWTH Aachen
März 2007-Juni 2007	Wissenschaftliche Hilfskraft, Biologie I; RWTH Aachen
Januar 2008–September 2008	Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Biochemie; Uniklinikum Aachen

Forschung

Oktober 2008-heute	Dissertation zum Thema „Regulation der Immunantwort durch CREM α “ in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin an der RWTH Aachen unter Leitung von Herrn PD Dr.med. Klaus Tenbrock
--------------------	--

Aachen, den 22.Dezember 2011

Kim Ohl