

Dipl.-Biol. Marc Patrick Schuster

„The unusual NF κ B inhibitor I κ B_{NS} regulates Foxp3 expression“

Abstract

The present study demonstrates that the unusual NF κ B inhibitor I κ B_{NS} is a novel regulator of the forkhead box P3 transcription factor 3 (Foxp3). Foxp3 entirely governs the development and functioning of immune suppressive regulatory T cells (Tregs). Flow cytometrical analyses uncovered a reduction of regulatory T cells by 50% in I κ B_{NS}-deficient mice. Nevertheless, mature Tregs, although reduced in number, displayed a normal phenotype and suppressive functioning. The generation of mixed bone marrow chimeric mice demonstrated that I κ B_{NS} controls Treg development by an intrinsic mechanism. This effect was proven to be distinct from reduced proliferation or enhanced apoptosis.

Analyses of Treg precursor cells from the thymus of I κ B_{NS}-deficient mice revealed reduced transition by the immature Foxp3⁻ precursor into the mature Foxp3⁺ Treg state, followed from delayed Foxp3 induction. In contrast to studies using other NF κ B-compromised mice, which display reduction of regulatory T cells as well, generation of thymic Treg precursor cells was not affected in I κ B_{NS}-deficient mice. On the molecular level, I κ B_{NS} expression was found in these Treg precursor cells in the thymus, but also by other thymic subsets. Using CD4⁺CD25⁻ T cells as a model system, interaction of I κ B_{NS} with p50 and c-Rel on the molecular level was detected. Within the Foxp3 locus I κ B_{NS} bound to the conserved non-coding sequences CNS2 and CNS3 and luciferase constructs containing CNS2 expressed in primary T cells from I κ B_{NS}-deficient mice showed reduced transcriptional activity.

The *in vivo* relevance of impaired Treg generation was analysed by a transfer colitis model. I κ B_{NS}-deficient T cells adoptively transferred into RAG-deficient mice developed to a weaker extent in Foxp3⁺ Treg cells compared to wildtype controls. Thereby colitis was exacerbated in recipients of I κ B_{NS}-deficient T cells.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Kontrolle des Transkriptionsfaktors Foxp3 und der Entwicklung immunsuppressiver regulatorischer T-Zellen (Tregs) durch den atypischen NF κ B Inhibitor I κ B_{NS}. Foxp3 kontrolliert sowohl die Differenzierung, als auch die inhibitorische Funktion reifer regulatorischer T-Zellen. Der Verlust des Proteins führt zu fatalen Autoimmunerkrankungen, wie dem Immundysfunktion-, Polyendokrinopathie- und Enteropathie-verursachendes X-gekoppeltes Syndrom (IPEX), da Immunsuppression durch regulatorische T-Zellen nicht mehr stattfindet. Erhöhte transkriptionelle Aktivität des Foxp3 Locus führt hingegen zu einer Steigerung der Aktivität und Differenzierung regulatorischer T-Zellen, wodurch das Wachstum solider Tumoren begünstigt werden kann. I κ B_{NS} wird nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors in konventionellen T-Zellen induziert. Erstmals beschrieben wurde das Protein im Zusammenhang mit der apoptotischen Deletion autoreaktiver T-Zell-Klone im Thymus, die auch als negative Selektion bekannt ist, da in Peptid-induzierbaren Modellen der negativen Selektion eine starke Expression von I κ B_{NS} in autoreaktiven T-Zellen gezeigt wurde. Die Analyse I κ B_{NS}-defizienter Mäuse hat jedoch keinen Einfluss des Proteins auf die negative Selektion zeigen können. Daher blieb die Funktion des Proteins während der T-Zell Reifung im Thymus ungeklärt.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Bildung regulatorischer T-Zellen in I κ B_{NS}-defizienten Mäusen stark verringert ist. Die immunsuppressive Wirkung von regulatorische T-Zellen bleibt hingegen unbeeinflusst. Durch die Generierung von gemischten Knochenmark-Chimären-Mäusen wurde nachgewiesen, dass die verringerte Anzahl regulatorischer T-Zellen auf einer intrinsischen Wirkung von I κ B_{NS} beruht. Jedoch konnten verminderte Stabilität reifer Tregs, sowie reduzierte Proliferation und erhöhte Apoptose *in vivo* als mögliche Ursachen der geringeren Anzahl regulatorischer T-Zellen ausgeschlossen werden. Publierte Beispiele reduzierter Treg Entwicklung in vergleichbar NF κ B-kompromitierten Mäusen führten den beobachteten Phänotyp auf die verringerte Bildung von Treg-Vorläuferzellen im Thymus zurück. Korrespondierende Analysen in I κ B_{NS}-defizienten Mäusen im Zuge der vorliegenden Arbeit zeigten hingegen eine Akkumulation dieser Zellen

als Ergebnis einer verzögerten Induktion des Transkriptionsfaktors Foxp3. Durch die *in vitro* Konvertierung aufgereinigter Vorläufer Zellen aus I κ B_{NS}-defizienten und wildtypische Foxp3-Reporter Mäusen in reife Tregs wurde der direkte Einfluss von I κ B_{NS} auf die Foxp3 Induktion während der Reifung regulatorischer T-Zellen gezeigt. Dessen direkte Interaktion mit dem Foxp3 Locus wurde durch DNA-Präzipitation nachgewiesen. Die hierbei für die Regulation genutzten NF κ B-Bindungsstellen auf der DNA liegen in zwei Spezies-konservierten regulatorischen Sequenzen des Foxp3 Locus, die CNS2 und CNS3 genannt werden. Durch Luciferase Reporter-Assays wurde schließlich die geringere transkriptionelle Aktivität von CNS2 in I κ B_{NS}-defizienten T-Zellen nachgewiesen. Da atypische I κ B Proteine auf Interaktion mit NF κ B Untereinheiten angewiesen sind, um Transkription zu regulieren, wurde untersucht mit welchen dieser Proteine I κ B_{NS} interagiert. Es konnte eine starke Bindung an die Proteine p50 und c-Rel gezeigt werden, wobei darauf hinzuweisen ist, dass c-Rel- und I κ B_{NS}-defiziente Mäuse eine übereinstimmende Reduktion regulatorischer T-Zellen zeigen. Schließlich wurde die physiologische Relevanz reduzierter Treg-Induktion in einem Transfer-Colitis Modell, das chronische Darm-Entzündung simuliert, untersucht. Konventionelle T-Zellen aus I κ B_{NS}-defizienten Mäusen, die in RAG1-defiziente Tiere transferiert wurden, differenzierten verglichen mit wildtypischen Kontrollen zu einem wesentlich geringeren Teil in Foxp3⁺ Zellen aus. Durch die reduzierte Bildung immunsuppressiver Tregs verlief die Entzündungsreaktion nach dem Transfer I κ B_{NS}-defizienter Zellen deutlich verstärkt.

Zusammenfassend stellt diese Arbeit eine Verbindung zwischen einem atypischen NF κ B Inhibitor, I κ B_{NS}, und der Regulation von Foxp3 und damit der Bildung von regulatorischen T-Zellen heraus. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass der Verlust von I κ B_{NS} die Bildung eines T-Zell-Subtyps spezifisch verringert.