

Aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin

DISSERTATION

Induktion und Funktion von Interleukin-10
in CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lasse Köhler

aus Berlin

Gutachter: 1.: Prof. Dr. rer. nat. A. Radbruch
2.: Priv.-Doz. Dr. med. G. Riemekasten
3.: Prof. Dr. rer. nat. R. Bräuer

Datum der Promotion: 07.09.2012

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....1

1.1 Das Immunsystem.....1

1.2 Die CD4+ T-Helferzellen (TH).....2

 1.2.1 TH1-, TH2- und TH17-Zellen.....2

 1.2.2 Regulatorische TH-Lymphozyten.....3

1.3 CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen (TReg).....4

 1.3.1 Phänotyp der CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen (TReg).....4

 1.3.2 Entwicklung der CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen (TReg).....5

 1.3.3 Bedeutung von IL-2 für CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen (TReg).....5

 1.3.4 Mechanismus der Suppression.....6

 1.3.5 Kontaktabhängigkeit der Suppression.....7

 1.3.6 Konkurrenz um Wachstumsfaktoren als ein suppressiver Mechanismus.....7

 1.3.7 Zytokinvermittelte Suppression.....8

1.4 Suppression von Autoimmunerkrankungen durch TReg9

 1.4.1 Zelluläre Strategien zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen.....10

2. ZIELSETZUNG11

3. MATERIAL & METHODEN.....12

3.1 Materialien.....12

 3.1.1 Medien und Puffer.....12

 3.1.2 Rekombinante Zytokine und TLR-Liganden.....12

 3.1.3 Verwendete Antikörper.....13

 3.1.4 Zelllinien.....14

 3.1.5 Verwendete Mausstämme.....14

3.2 Zellpräparationen.....15

 3.2.1 Präparation von Milz- und Lymphknotenzellen.....15

 3.2.2 Isolierung von dendritischen Zellen aus Milz und Lymphknoten.....15

3.3 Magnetische Zellsortierung (MACS).....15

 3.3.1 Anreicherung von TReg (CD4+CD25+ T-Zellen).....16

 3.3.2 Isolierung von Dendritischen Zellen (CD11c+).....16

 3.3.3 Anreicherung von naiven Zellen (CD4+CD62L+)16

3.4 Durchflusszytometrie17

 3.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie.....17

 3.4.2 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS).....18

 3.4.3 Immunfluoreszenzfärbung (Oberflächenfärbung).....18

3.4.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	18
3.4.5 Foxp3 Färbung.....	19
3.4.6 IL-10 Sekretionsassay (Zytokinfärbung an der Oberfläche).....	19
3.4.7 CFDA-SE Markierung	20
3.4.8 Auswertung der CFDA-SE Markierung (Proliferationsinhibition durch TReg)	20
3.5 T-Zellstimulation und T-Zellkulturen.....	21
3.5.1 TReg - Stimulation.....	21
3.5.2 TH1 Polarisierung von naiven T-Zellen.....	22
3.5.3 TReg in vitro Funktionstest (Suppressionsassay).....	22
3.6 Retrovirale Transduktion.....	22
3.6.1 Generierung des Virusüberstandes.....	22
3.6.2 Infektion der T-Zellen.....	23
3.7 Tierexperimentelle Methoden.....	23
3.7.1 Ficoll-Dichtegradienten-Separation	23
3.7.2 Adoptiver Transfer	23
3.7.3 „delayed type hypersensitivity“ (DTH) -Reaktion.....	24
3.7.4 DNA Immunisierung (GeneGun).....	24
3.8 Statistische Auswertung.....	25
3.8.1 Signifikanztest	25
4. ERGEBNISSE.....	26
4.1 Induktion von IL-10 in TReg in vitro.....	26
4.1.1 Stimulations- und Kostimulationsbedingungen.....	26
4.1.2 TLR Signale und pro-inflammatorische Zytokine	29
4.1.3 Einfluss des Notch-Signalwegs.....	30
4.1.4 Einfluss von ICOS.....	34
4.2. Charakterisierung der in vitro stimulierten TReg	37
4.2.1 Kinetik der Foxp3 und der IL-10 Expression	37
4.2.2 Koexpression von IL-10 und Foxp3.....	39
4.2.3 Koexpression weiterer relevanter Zytokine	40
4.3 Funktionelle Analyse der in vitro stimulierten TReg.....	41
4.3.1 Suppression von naiven T-Zellen in vitro.....	42
4.3.2 Suppression von naiven T-Zellen in vivo.....	43
4.3.3 Suppression von Effektor T-Zellen in vivo	47
5. DISKUSSION.....	52
5.1 Induktion von IL-10 bei der in vitro Stimulation von TReg.....	52
5.1.1 Bedeutung von kostimulatorischen Signalen.....	53

5.1.2 Bedeutung des Notch-Signalwegs.....	53
5.1.3 Bedeutung von Zytokinen.....	54
5.1.4 Bedeutung weiterer untersuchter Faktoren.....	55
5.1.5 Analyse von TReg Subpopulationen	56
5.2 Reinheit und Expansion der in vitro stimulierten TReg	57
5.3 Zytokinprofil der in vitro stimulierten TReg	59
5.4 Therapeutisches Potential von vorbehandelten TReg.....	60
5.4.1 Notwendigkeit einer in vitro Vorbehandlung.....	60
5.4.2 Optimierung der in vitro Vorbehandlung.....	61
5.4.3 Notwendigkeit einer erneuten T-Zellrezeptoraktivierung in vivo.....	62
5.4.4 Mechanismen der Suppression durch in vitro behandelte TReg.....	63
5.4.5 Klinische Szenarien zur kurativen Behandlung	64
5.4.6 Alternativer Ansatz: Aktivierung der TReg in vivo.....	65
5.5 Ausblick.....	66
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	67
7. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	69
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	81
9. LEBENSLAUF.....	83
10. DANKSAGUNG.....	85
11. ERKLÄRUNG.....	86

1. EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Zur Abwehr von Infektionen mit pathogenen Bakterien, Parasiten, Pilzen und Viren entwickelte sich bei den höheren Wirbeltieren, insbesondere den Säugetieren, ein komplexes Abwehrsystem, welches in seiner Gesamtheit als Immunsystem bezeichnet wird. Funktionell wird eine Trennung in ein angeborenes und ein erworbenes (adaptives) Immunsystem vorgenommen.

Das angeborene Immunsystem basiert auf der Erkennung von Pathogenen aufgrund wiederkehrender Strukturmerkmale [1]. Unter Beteiligung der Mastzellen, Makrophagen und des Komplementsystems gelingt es, Infektionen frühzeitig lokal zu begrenzen, weitere Immunzellen zu rekrutieren oder den Erreger gar komplett abzuwehren. Zum angeborenen Immunsystem werden ferner auch die Natürlichen Killerzellen und weitere Faktoren gerechnet. Man geht davon aus, dass der überwiegende Teil der Pathogene vom angeborenen Immunsystem frühzeitig eliminiert werden kann.

Die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems zeichnen sich durch eine Antigen-spezifität und durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus [2;3]. Bei der Genese der Lymphozyten kommt es zu einer somatischen Rekombination, welche bedingt, dass die einzelnen B- und T-Lymphozyten jeweils nur Antigenrezeptoren einer Spezifität exprimieren. Bei Antigenkontakt werden nur diese spezifischen Lymphozyten aktiviert, können expandieren und differenzieren zu Effektor-Lymphozyten, welche dann gegen den Erreger vorgehen können. Gleichzeitig bilden sich Gedächtniszellen, die eine schnelle, gezielte Immunantwort bei Reinfektion ermöglichen. Historisch wird noch eine weitere Einteilung in eine humorale und in eine zelluläre Immunität vorgenommen.

Die humorale Immunität richtet sich vor allem gegen Antigene auf der Oberfläche von Erregern oder Toxinen in den Extrazellulärräumen. Die von B-Lymphozyten gebildeten Antikörper ermöglichen hierbei eine Neutralisierung von Toxinen und eine Opsonierung von Pathogenen.

Die zelluläre Immunität richtet sich hauptsächlich gegen Viren und intrazelluläre Bakterien. Die infizierten Zellen präsentieren hierbei die Erregerpeptide im *major histocompatibility complex I* (MHC I), was zu einer Aktivierung der spezifischen

zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen führt. Die CD4⁺ T-Helferzellen erfüllen im Rahmen der zellulären Immunität vielfältige Aufgaben (siehe 1.2) [4].

1.2 Die CD4⁺ T-Helferzellen (T_H)

Die CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H) spielen eine zentrale Rolle bei der adaptiven Immunantwort, indem sie sowohl direkt über Zell-Zell-Kontakte, als auch über lösliche Zytokine die Immunantwort beeinflussen [5]. Nach Antigen-spezifischer Stimulation durch reife Antigen-präsentierende Zellen (APZ) produzieren die aktivierten T_H-Zellen den Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2) [6]. Dieser Faktor ist maßgeblich für die Proliferation der naiven T_H-Zellen verantwortlich. Die Richtung der Differenzierung (Priming) zu Effektor-T-Zellen ist vom Zytokinmilieu, der Stärke der Aktivierung und von weiteren Faktoren abhängig.

1.2.1 T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen

Auch bei den T_H-Zellen ist aufgrund ihrer vielfältigen Aufgaben eine weitere Unterteilung in unterschiedliche Subpopulationen sinnvoll. Die Abbildung 1 liefert einen Überblick über die verschiedenen diskutierten T_H-Subpopulationen.

T_H1-Zellen ermöglichen insbesondere die Abwehr von intrazellulären Erregern. Eine Differenzierung zu T_H1-Zellen wird durch das Zytokin IL-12 gefördert, welches von APZ nach Stimulation mit Pathogenen sekretiert wird [7;8]. Dieser Stimulus induziert den T_H1 spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet [9], welcher die Transkription von Interferon- γ (IFN- γ) fördert [10]. Die differenzierten T_H1-Zellen sind in der Lage Makrophagen und zytotoxische T-Zellen zu aktivieren [11;12] und damit die Abwehr zu verstärken.

Bei einer Infektion mit extrazellulären Erregern wird das Zytokin IL-4 freigesetzt, welches eine T_H2-Differenzierung begünstigt. Der T_H2-spezifische Transkriptionsfaktor Gata3 [13] fördert nun die Transkription der Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13. Vor allem IL-4, als klassisches T_H2 Zytokin, induziert den Antikörper Klassenwechsel zu IgE. Diese IgE Antikörper sind an der Abwehr von extrazellulären Erregern maßgeblich beteiligt [14].

Kürzlich wurden die T_H17-Zellen als eine weitere hochgradig pro-inflammatorische T_H-Subpopulation beschrieben, welcher eine entscheidende Rolle bei der Genese von Entzündungsreaktionen und bei der Entstehung von Autoimmunität zugeschrieben wird

[15]. Diese T_H17 Zellen produzieren *in vitro* und *in vivo* das stark inflammatorisch wirkende Zytokin IL-17 [16] und zeichnen sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors *retinoic acid-related orphan nuclear receptor- γt* (ROR- γt) aus.

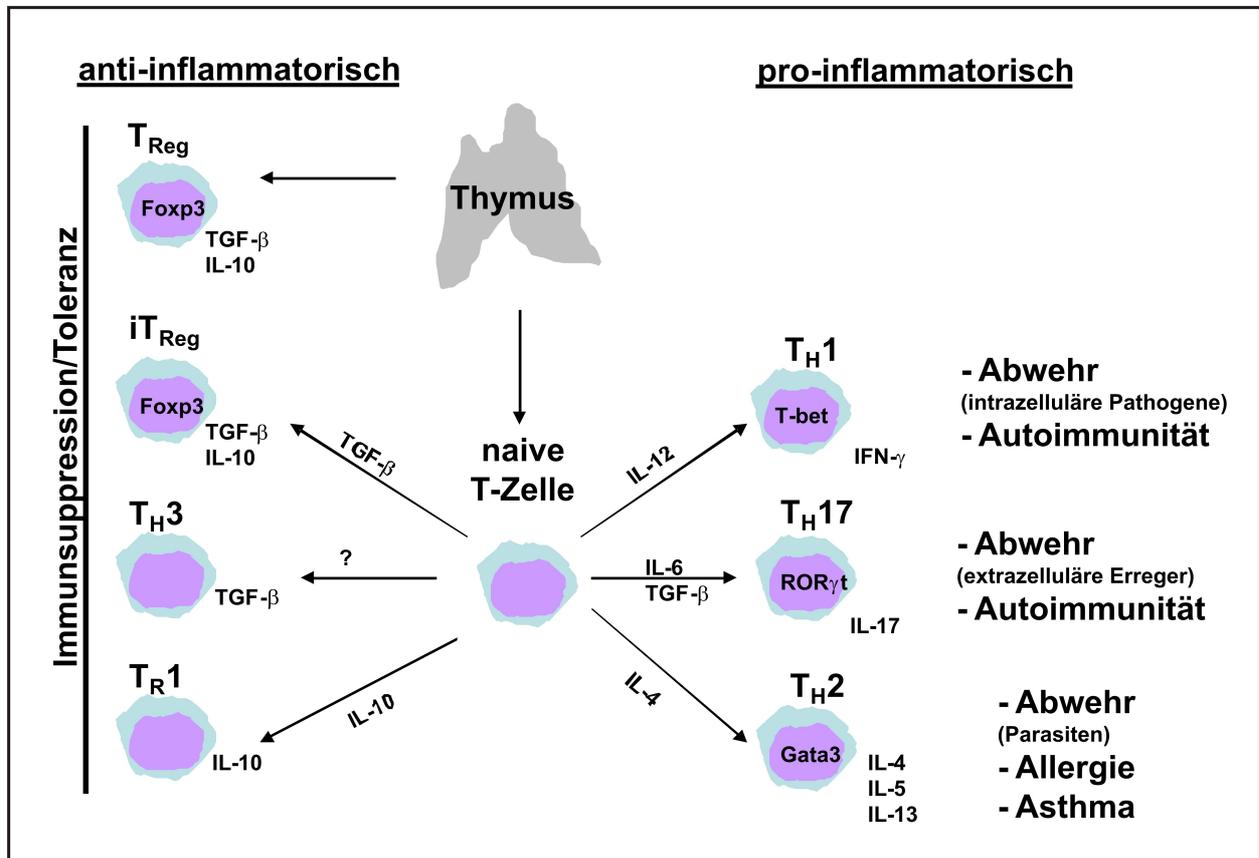


Abbildung 1: Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Helferzellen

Im Thymus werden die natürlichen regulatorischen T_{Reg} und naive T-Zellen selektiert. Diese naiven T_H Zellen können in der Peripherie zu Effektor T-Zellpopulationen (T_{H1} , T_{H2} , T_{H17}) oder in verschiedene regulatorische Populationen (iT_{Reg} , T_{H3} , T_{R1}) differenzieren. Bei der Differenzierung begünstigen verschiedene Zytokine die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren. Die einzelnen Subpopulationen zeichnen sich durch die Produktionen bestimmter Zytokine und damit verbundenen spezialisierten Funktionen aus.

1.2.2 Regulatorische T_H -Lymphozyten

Die regulatorischen T_H -Zellen werden durch ihre suppressiven Eigenschaften definiert und bilden eine sehr heterogene Gruppe (Abb.1). Diese Zellen werden zum einen bereits im Thymus generiert und werden als $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) bezeichnet oder nach Antigenkontakt induziert, wie T_{H3} [17], T_{R1} -Zellen [18] und induzierte regulatorische T-Zellen (iT_{Reg}) [19].

Im Zusammenhang mit der Entstehung oraler Toleranz wurden die T_H3 -Zellen beschrieben, welche die Suppression vorwiegend über TGF- β vermitteln [17]. Die T_{R1} -Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nach Antigenstimulation große Mengen des immunsuppressiven Zytokins IL-10 produzieren und so in der Lage sind, T_H1 - und T_H2 -Antworten zu inhibieren [18;20]. Ferner können in Anwesenheit von TGF- β auch T_{Reg} (iT_{Reg}) induziert werden [19]. Bei diesen iT_{Reg} wird der Transkriptionsfaktor Foxp3 jedoch lediglich transient exprimiert [21]. Im Gegensatz dazu ist die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 bei den im Thymus entstandenen T_{Reg} stabil. Diese konstitutiv vorhandenen T_{Reg} sind unter anderem für den Erhalt der Selbsttoleranz essentiell und somit an der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen beteiligt.

1.3 CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (T_{Reg})

1.3.1 Phänotyp der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{Reg})

Ursprünglich führte die konstitutive Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) zur Identifikation der T_{Reg} als eigenständige, suppressive T_H -Zellsubpopulation [22]. Bei Menschen und Mäusen liegt der Anteil der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) an den gesamten peripheren CD4⁺ T_H -Zellen bei 5-10% [22;23]. Zusätzlich zu CD25 sind noch GTR (*glucocorticoid-induced TNF receptor-related gene*) und CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) als weitere spezifische Oberflächenmoleküle auf den T_{Reg} beschrieben. Nach Aktivierung können jedoch auch naive T_H -Zellen CD25, CTLA-4 oder GTR exprimieren, so dass bei Verwendung dieser Marker immer auch ein geringer Anteil nicht regulatorischer T-Zellen in die Betrachtung eingeschlossen wird.

Ein spezifischer Marker für T_{Reg} ist die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead box P3 (FOXP3)*, der die Entwicklung und Funktion der T_{Reg} kontrolliert [24;25]. Mutationen im *Foxp3* Gen führen zu charakteristischen Autoimmunerkrankungen und sind sowohl bei Mäusen (*scurfy syndrome*) [26], als auch beim Menschen IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*) beschrieben [27]. Molekular ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 durch direkte Interaktion mit *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) und *nuclear factor of activated T cells* (NF-AT) an der Transkriptionsrepression der Zytokine IL-2, IL-4 und Interferon (IFN)- γ beteiligt [28]. Der NF-AT/Foxp3 Komplex ist ferner für die verstärkte Expression von CD25 und CTLA-4 verantwortlich und damit Voraussetzung für suppressive Aktivität der T_{Reg} [29].

1.3.2 Entwicklung der CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{Reg})

Bei der Reifung der T_H-Lymphozyten im Thymus entsteht durch Umordnung der T-Zellrezeptor (TZR) Gene eine Vielzahl verschiedener Thymozyten (s. 1.1). Bereits im Thymus finden hierbei zwei wichtige Selektionsprozesse statt, bei der die überwiegende Mehrzahl der Thymozyten durch Apoptose eliminiert wird. Hierbei wird durch die positive Selektion sichergestellt, dass nur Thymozyten überleben, deren TZR die selbst-MHC-Moleküle erkennen. Die Thymozyten, welche über ihren TZR eine sehr hohe Affinität für selbst-MHC bzw. selbst-MHC/Peptid-Komplexe besitzen und daher als potentiell autoreaktiv gelten müssen, werden bei der folgenden negativen Selektion eliminiert.

Die CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) entgehen dieser negativen Selektion, obwohl sie einen TZR besitzen, welcher für körpereigene Peptide spezifisch ist. Die genaue Ursache dafür ist noch nicht hinreichend geklärt, es wird jedoch diskutiert, dass ihr TZR eine geringe Affinität, dafür aber eine hohe Avidität für körpereigene Strukturen besitzt („altered Selektion“) [30]. Die Expression des für T_{Reg} spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 kann im Thymus bereits drei Tage nach der Geburt nachgewiesen werden [31]. Wird zu diesem Zeitpunkt eine Thymektomie durchgeführt, kommt es zur Manifestation von Autoimmunerkrankungen [32]. Bei Menschen konnte gezeigt werden, dass die Frequenz an Foxp3⁺ T-Zellen bereits zwei Wochen nach der Geburt die Proportionen des Erwachsenen erreicht [33].

1.3.3 Bedeutung von IL-2 für CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{Reg})

Die T_{Reg} exprimieren zwar konstitutiv die α-Kette des IL-2 Rezeptors (CD25), können jedoch selbst kein IL-2 produzieren. Diese Diskrepanz führte zu einer Vielzahl von Hypothesen in Verbindung mit IL-2 und dessen Rezeptor bezüglich der Entwicklung, Homöostase und der suppressiven Funktion bei den T_{Reg}.

Der funktionelle IL-2 Rezeptor setzt sich aus den drei Ketten IL-2Rα (CD25), IL-2Rβ und IL-2Rγ zusammen. Die γ-Kette des IL-2 Rezeptors ist ferner auch an der Bildung der Rezeptoren für IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 beteiligt. Bei Studien mit *Il2*^{-/-}, *Il2rα*^{-/-} und *Il2rβ*^{-/-} Mäusen konnten Foxp3⁺ T-Zellen im Thymus und in der Peripherie detektiert werden, was zeigte, dass der IL-2 Signalweg nicht essentiell für die Entwicklung der T_{Reg} ist [34]. Bei *Il2rγ*^{-/-} Mäusen hingegen konnten keine Foxp3⁺ T-Zellen

detektiert werden, was zu der Vermutung führte, dass eines der weiteren Zytokine, welche die gemeinsame γ -Kette nutzen, für die Entstehung der T_{Reg} essentiell ist [34].

Auch wenn in den $Il2^{-/-}$, $Il2r\alpha^{-/-}$ und $Il2r\beta^{-/-}$ Mäusen $Foxp3^{+} T_{\text{Reg}}$ nachgewiesen werden konnten, so doch nur eine geringe Anzahl. Diese legt nahe, dass IL-2 ein wichtiger Wachstumsfaktor für T_{Reg} ist und dem IL-2 somit eine essentielle Rolle bei der Homöostase der T_{Reg} zukommt [34]. Als Folge der reduzierten Anzahl an $Foxp3^{+} T_{\text{Reg}}$ kam es bei den defizienten Mäusen zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen.

Der Einfluss von IL-2 auf die Aktivierung der T_{Reg} Funktion ist weniger gut beschrieben. Die Analyse der T_{Reg} Aktivierung *in vitro* zeigte, dass eine IL-2 Vorbehandlung deren suppressive Kapazität erhöht [35]. Auch in einem Kolitis-Modell führte die Applikation eines IL-2-IgG Fusionsproteins zu einer Besserung [36]. Welche suppressiven Mechanismen durch das IL-2 induziert werden, ist noch nicht ausreichend beschrieben. Erste Arbeiten weisen darauf hin, dass IL-2 *in vitro* und *in vivo* bei T_{Reg} eine kritische Komponente für die Induktion des suppressiven Zytokins IL-10 ist [35;37]. Mögliche weitere Faktoren, welche an der *in vitro* Induktion von IL-10 beteiligt sind, sollen in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.3.4 Mechanismus der Suppression

In verschiedenen Tiermodellen können Autoimmunphänomene durch Transfer von T_{Reg} inhibiert werden. Hierbei kann die Aktivierung und die Expansion von naiven-, Effektor- und von Gedächtnis-T-Zellen supprimiert werden. Ferner sind T_{Reg} in der Lage, autoreaktive B-Zellen zu unterdrücken, bei ihnen Apoptose zu induzieren [38] und die Immunglobulinproduktion [39] zu unterdrücken. Auch bei NK-Zellen [40] und bei Dendritischen Zellen konnten inhibierende Effekte gezeigt werden [41].

Die Induktion der suppressiven Kapazität der T_{Reg} erfordert eine TZR spezifische Aktivierung. Für die Suppression an sich sind jedoch auch TZR unabhängige Effekte (sogenannte *bystander* Suppression) beschrieben [42;43]. Die genauen Mechanismen der T_{Reg} vermittelten Suppression werden kontrovers diskutiert und es wurden aufgrund von zahlreichen Arbeiten *in vitro* und *in vivo* sehr unterschiedliche Mechanismen postuliert. Die meisten Autoren bevorzugen eine Gliederung in kontaktabhängige Suppression, Konkurrenz um Wachstumsfaktoren und zytokinvermittelte Suppression.

1.3.5 Kontaktabhängigkeit der Suppression

In ersten Arbeiten zum Mechanismus der T_{Reg} vermittelten Suppression wurde die Inhibition der Proliferation von naiven T-Zellen *in vitro* untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in diesem System die Oberflächenmoleküle CTLA-4, CD80, CD86, und LAG3 wichtig für die Suppression sind (Übersichtsarbeit [44]). In neueren Arbeiten wird ferner eine Suppression über Infusion von cAMP via gap junctions [45] oder die direkte Zytolyse der Zielzellen postuliert [46]. Eine Blockade von immunsuppressiven Zytokinen, wie IL-10 hatte keinen Einfluss auf die Suppression von naiven T-Zellen *in vitro*. Dies schien in Kombination mit der Beobachtung, dass eine Trennung von T_{Reg} und naiven T-Zellen mittels einer semipermeablen Membran (Transwell Experimente) eine Suppression aufhebt, eine Beteiligung löslicher Faktoren auszuschließen. Die Trennung der T_{Reg} von ihren Zielzellen führt jedoch auch dazu, dass der Abstand zwischen den beiden Zellen ca. 100mal größer als der Durchmesser einer einzelnen T-Zelle wird. Diese Distanz können auch lösliche Faktoren in biologisch aktiver Form nicht zurücklegen [47]. Diese Überlegungen liefern ein Indiz dafür, dass die realen Bedingungen der Suppression *in vitro* nur ungenügend imitiert werden können. Dies birgt die Gefahr, dass man *in vitro* Effekte beobachtet, die bei der Suppression *in vivo* keine entscheidende Rolle spielen.

1.3.6 Konkurrenz um Wachstumsfaktoren als ein suppressiver Mechanismus

Die T_{Reg} exprimieren, im Gegensatz zu den naiven T-Zellen, konstitutiv CD25 (die α -Kette des IL-2 Rezeptors) auf ihrer Oberfläche. Daher wurde schon früh postuliert, dass die T_{Reg} zum Beginn einer Immunreaktion das IL-2 besser aufnehmen können und so den Zellen in ihrer Umgebung diesen Wachstumsfaktor entziehen. Die Suppression der Aktivierung und Proliferation von naiven T-Zellen wäre somit mit dem Verlust von Wachstumssignalen zu erklären. Für diese Hypothese spricht, dass die T_{Reg} *in vitro* tatsächlich das von den naiven T-Zellen abgegebene IL-2 aufnehmen. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte eine Sättigung unter einer Zugabe hoher IL-2 Konzentrationen die Suppression wieder aufheben [35]. Eine Konkurrenz um IL-2 konnte auch bei Studien *in vivo* gezeigt werden. In einer neueren Publikation wird als Erweiterung dieses Suppressionsmodells ferner eine Induktion der Apoptose in den Effektor-T-Zellen durch den Entzug der Wachstumsfaktoren aufgezeigt [48]. Dies gilt nicht nur für IL-2, sondern auch für andere Wachstumsfaktoren wie IL-7.

1.3.7 Zytokinvermittelte Suppression

Während die Suppression *in vitro* wohl von anderen Mechanismen dominiert wird (s.1.3.5), wird eine essentielle Rolle von IL-10 und TGF- β in vielen *in vivo* Modellen beschrieben. Analysen von Mäusen, bei denen nur die T_{Reg} defizient für IL-10 sind, zeigten, dass die T_{Reg} das immunologische Gleichgewicht an Schnittstellen zur Außenwelt (z.B. Kolon, Lunge und Haut) mit Hilfe von IL-10 erhalten [49]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte auch eine essentielle Rolle von T_{Reg} und IL-10 in Asthma- [50], Allergie-, Pneumonitis- [51], Hauttransplantations- [52] und Kolitismodellen [53] bestätigt werden. Bei der Kolitis konnte ferner gezeigt werden, dass T_{Reg} in der intestinalen Lamina propria den Ausbruch von Kolitis mit Hilfe von IL-10 kontrollieren [54], während T_{Reg} aus den Lymphknoten oder der Milz kaum IL-10 produzierten [54;55]. Neueste Arbeiten in einem Multiple Sklerose (MS) Modell zeigen, dass T_{Reg} auch im zentralen Nervensystem (ZNS) Immunreaktionen mittels IL-10 Sekretion kontrollieren [54;56]. Insgesamt können IL10⁺ T_{Reg} nur am Ort des Immungeschehens nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass sie erst durch die Aktivierung am Ort der Immunreaktion in die Lage versetzt werden, IL-10 zu exprimieren.

Während eine IL-10 Defizienz vergleichsweise milde Symptome zeigt, führt eine Defizienz in TGF- β oder einem Bestandteil der Signaltransduktion zu einer frühen und fatalen Multi-Organimmunpathologie [57]. Ursache für diese Pathologie ist eine Kombination aus verstärkter Aktivierung von T-Zellen in Abwesenheit von TGF- β und einer Verringerung der Anzahl an T_{Reg} in der Peripherie trotz unveränderter Genese im Thymus [57]. TGF- β ist somit ein essentieller Faktor für die Homöostase der T_{Reg}. Für TGF- β ist ferner noch eine Inhibition der T_{H1} Differenzierung von naiven T-Zellen beschrieben [58]. Diese Inhibition erklärt auch, warum der Transfer von Foxp3⁺ T_{Reg} aus TGF- β 1 defizienten Mäusen nicht in der Lage ist, einer experimentellen Kolitis vorzubeugen [58].

Welche Faktoren an der Induktion von IL-10 und TGF- β beteiligt sind, ist noch weitestgehend unklar. Erste Arbeiten zeigten, dass *in vitro* IL-2 in T_{Reg} die Expression von IL-10 induziert [35]. Auch *in vivo* ist IL-2 an der Induktion von IL-10 und TGF- β beteiligt [37]. In dieser Arbeit soll nun die *in vitro* Induktion von IL-10 genauer charakterisiert werden. Die suppressive Kapazität dieser *in vitro* stimulierten T_{Reg} soll anschließend in Tiermodellen *in vivo* untersucht werden.

1.4 Suppression von Autoimmunerkrankungen durch T_{Reg}

Neben der zentralen Depletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus (s. 1.3.2) und einer peripheren Induktion von Anergie in autoreaktiven T-Zellen, sind vor allem die T_{Reg} entscheidend an Ausbildung und Erhalt der Selbsttoleranz beteiligt [23;59]. Sofern die Selbsttoleranz durchbrochen wird, können Autoimmunreaktionen auftreten.

Im Tiermodell führte die Depletion von T_{Reg} zur spontanen Ausbildung der autoimmunen Gastritis, Thyroiditis, von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [60;61] und des Typ I Diabetes. Andererseits führt diese Depletion auch zu einer verstärkten Reaktion gegen Viren [62], Parasiten [63] und gegen körpereigene Tumoren [64].

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen im Tiermodell sind auch beim Menschen bei Autoimmunerkrankungen qualitative und quantitative Veränderungen bei den T_{Reg} beschrieben. So wurden bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) [65] und mit juveniler idiopathischer Arthritis gezeigt, dass es Veränderungen bei den CD4⁺CD25^{hi} T_{Reg} gibt [66]. Sowohl bei der juvenilen idiopathischen Arthritis, als auch bei der RA ist die Frequenz an CD4⁺CD25^{hi} T_{Reg} in der Synovialflüssigkeit stark erhöht. *In vitro* zeigen diese T_{Reg} eine suppressive Aktivität, was zu der These führte, dass es zu einer Inaktivierung der T_{Reg} im Gelenk aufgrund der hohen Konzentrationen von pro-inflammatorischen Mediatoren kommt. Direkt konnten inaktivierende Effekte für TNF gezeigt werden [67]. Klinische Studien zeigen ferner, dass die Behandlung der RA mit dem α TNF-Antikörper Infliximab zum Anstieg von CD4⁺CD25^{hi} T-Zellen führt, welche mittels TGF- β und IL-10 supprimieren [68].

Zu einer Verstärkung der Entzündung bei der RA trägt auch bei, dass das reichliche Angebot an TGF- β und IL-6 im Gelenk die Differenzierung von T_H17 Zellen fördert [69]. Diese Anreicherung von T_H17 Zellen im Gelenk konnte u.a. bei der juvenilen idiopathischen Arthritis gezeigt werden. Die Anzahl an T_H17 Zellen stand hierbei im reziproken Verhältnis zur Anzahl der T_{Reg} [70].

Bei weiteren Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematoses (SLE), Sjögren Syndrom, Wegner's Granulomatose, Sarkoidose, Multipler Sklerose (MS) und Myasthenia Gravis sind ebenfalls qualitative und quantitative Veränderungen der T_{Reg} beschrieben (Übersichtsarbeit [67]). Auch Polymorphismen in für die Funktion von T_{Reg} wichtigen Genen sind bekannt. So konnte bei Patienten mit Typ I Diabetes gezeigt werden, dass die Genese der Diabetes durch genetische Polymorphismen des IL2R α (CD25) [71] Gens begünstigt wird.

1.4.1 Zelluläre Strategien zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen

Bei schweren Autoimmunerkrankungen ist eine autologe Stammzelltransplantation die einzige wirksame Behandlungsoption [72]. Diese Behandlung ist jedoch nur für besonders schwere Fälle geeignet, da sie mit einer erhöhten Letalität verbunden ist.

Bei weniger schweren Krankheitsverläufen führt eine medikamentöse Therapie zur Linderung der Symptome. Obwohl sich diese Therapie in den letzten Jahren enorm verbessert hat, muss beachtet werden, dass die Medikamente nicht bei allen Patienten gleich gut wirken und zum Teil erhebliche Nebenwirkungen auftreten können.

Da T_{Reg} bei der physiologischen Suppression von Autoimmunphänomenen eine Schlüsselrolle einnehmen, erscheint der Einsatz dieser Zellen zur Therapie eine viel versprechende Option. Der Erfolg von adoptiv transferierten T_{Reg} bei der Unterdrückung von Autoimmunkrankheiten in den Tiermodellen [73], lässt spekulieren, dass eine derartige Behandlung auch bei Patienten zur Besserung der Beschwerden führt.

Eine mögliche Herangehensweise besteht darin, naive T-Zellen viral mit dem spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 zu transfizieren [24] oder Foxp3 mittels TZR vermittelter Aktivierung in Anwesenheit von TGF- β (iT_{Reg}) zu induzieren. Diese Ansätze bieten den Vorteil, dass man naive T-Zellen benutzen kann, die in hoher Anzahl leicht zugänglich sind. Da jedoch die Foxp3 Expression in den iT_{Reg} lediglich transient ist [21] und Foxp3 vermutlich nicht der einzige Faktor ist, der den Phänotyp der T_{Reg} bestimmt, erscheinen diese Ansätze zu unsicher.

Eine Behandlung mit natürlichen T_{Reg} scheint aufgrund des stabilen Phänotyps derzeit als wesentlich aussichtsreicher. Dabei können die natürlichen T_{Reg} isoliert, *ex vivo* aktiviert und expandiert werden [74;75]. Hierbei kann die Anzahl, der Aktivierungsgrad und das suppressive Potenzial der Zellen gezielt beeinflusst werden. Solche aktivierten natürlichen T_{Reg} könnten möglicherweise bei Retransfer die chronisch aktivierten Effektorzellen supprimieren und somit zur Wiederherstellung des gestörten immunologischen Gleichgewichts beitragen. Ein solcher Ansatz soll in dieser Arbeit verfolgt werden.

2. ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Arbeit soll die Induktion und Funktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 in CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) untersucht werden. Hierbei soll zunächst geklärt werden, welche Faktoren in der Lage sind, *in vitro* IL-10 in T_{Reg} zu induzieren. Ferner sollen die phänotypischen Veränderungen, die Expansion und die Reinheit der T_{Reg} nach der *in vitro* Stimulation zur Induktion von IL-10 ermittelt werden.

Diese *in vitro* stimulierten T_{Reg} sollen dann in Tiermodellen auf ihre suppressive Kapazität untersucht werden. Hierbei sollen insbesondere die Notwendigkeit einer *in vitro* Aktivierung, die Rolle der Antigen-spezifität und die Abhängigkeit der Suppression vom induzierten IL-10 genauer untersucht werden.

Diese Zielsetzung ermöglicht es, erste Hinweise zu erlangen, welche Bedingungen zur optimalen Stimulation der T_{Reg} nötig sind und ob eine Behandlung mit *in vitro* stimulierten T_{Reg} eine Option bei der Therapie von autoimmun und anderen entzündlichen Erkrankungen darstellen könnte.

3. MATERIAL & METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Medien und Puffer

<u>RPMI 1640 Medium</u>	100 U/ml Penicillin (PAA Laboratories), 10% FCS (Sigma), 50 µM 2-Mercaptoethanol (Invitrogen/Life Technologies), 100 g/ml Streptomycin (PAA Lab.)
<u>PBS; pH 7,2</u>	137 mM NaCl (Merck), 2,7 mM KCl (Merck), 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (Merck), 8,0 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (Merck)
<u>PBS/BSA; pH 7,2</u>	PBS, 0,5% (w/v) bovine serum albumin frV (PAA Laboratories)
<u>PBS/BSA/Azid; pH 7,2 (PBA)</u>	PBS/BSA, 0,02% (w/v) NaN ₃ (Merck)
<u>Erythrozyten Lyse Puffer</u>	0,01 M KHCO ₃ (Merck), 0,155 M NH ₄ Cl (Merck), 0,1 mM EDTA (Sigma)
<u>Saponin 0,5% (w/v)</u>	0,5 g Saponin (Sigma), 100 ml PBS/BSA/Azid
<u>Formaldehyd 2%</u>	27 ml Formaldehyd 37% (Merck), 500 ml PBS

3.1.2 Rekombinante Zytokine und TLR-Liganden

Tabelle 1: verwendete rekombinante Zytokine und TLR-Liganden

<u>Stimulus</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Quelle</u>
rIL-1	10 ng/ml	R&D Systems
rIL-2	50 ng/ml	R&D Systems
IL-4	100 ng/ml	Kulturüberstand
rIL-6	20 ng/ml	R&D Systems
rIL-12	10 ng/ml	R&D Systems
rTNF-α	10 ng/ml	R&D Systems
LPS (E. coli)	1 µg/ml	InvivoGen
Flagellin	1 µg/ml	InvivoGen

3.1.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

DRFZ – Deutsches Rheumaforschungszentrum ; RKI – Robert-Koch Institut

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Bezugsquelle
<u>Stimulation von murinen T-Zellen</u>			
CD3	145-2C11	-	BD Biosciences
CD28	37.51	-	BD Biosciences
ICOS	MIC-280	-	Kroczek, RKI
<u>Fluoreszenzmarkierung zum durchflusszytometrischen Nachweis</u>			
CD4	GK1.4	FITC/PE/PerCP/APC	BD Biosciences
CD11c	HL3	FITC	BD Biosciences
CD19	1D3	APC	BD Biosciences
CD25	7D4/PC61	PE/APC	BD Biosciences
CD103 (α_E)	M290	PE	BD Biosciences
Foxp3	FJK-16s	PE	eBioscience
Fc R II/III	2.4G2/75	-	DRFZ
ICOS	MIC-280	PE/BIO	Kroczek, RKI
IFN- γ	AN18.17.23	PE/APC	BD Biosciences
IL-2	JES6-5H4	PE	BD Biosciences
IL-4	11B11	PE	BD Biosciences
IL-10	JES5-16E3	PE/APC	BD Biosciences
IL-17	TC11-18H10	PE	BD Biosciences
MHC-II	M-114	PE, Cy5	DRFZ
Ratten IgG	polyklonal	-	Rockland
SA	(sekundär Ak)	APC/ PE	BD Biosciences
V β 5	MR9-4	PE	BD Biosciences
<u>Blockade von Zytokinen</u>			
IL-10	JES5-2A5-7	-	DRFZ
TGF- β	1D11.16.8	-	DRFZ

3.1.4 Zelllinien

HEK293T-Zellen sind von humanen embryonalen Nierenzellen abgeleitet (HEK - human embryonic kidney). Die Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Nach je 2 - 3 Tagen wurden die Zellen in Verhältnissen von 1:10 umgesetzt.

A20 B-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Nach je 3 Tagen wurden die Zellen in Verhältnissen von 1:5 umgesetzt.

3.1.5 Verwendete Mausstämme

Die Mäuse der Inzuchtstämme Balb/c und CB57/Bl6 wurden unter pathogenfreien Bedingungen (spf - specific pathogen free) in der Versuchstierzucht des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin Marienfelde gezüchtet und gehalten. Es wurden männliche und weibliche Tiere im Alter zwischen 6-12 Wochen verwendet. Darüber hinaus wurden die in Tabelle 3 gelisteten knockout- und transgenen Mausstämme verwendet.

Tabelle 3: Verwendete knockout- und transgene Mausstämme

DRFZ – Deutsches Rheumaforschungszentrum

Bezeichnung	Phänotyp	Quelle
DO11.10	exprimieren transgenen TZR spezifisch für das Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ (Balb/c Hintergrund)	DRFZ
OT-II	exprimieren transgenen TZR spezifisch für das Peptid OVA ₃₂₃₋₃₃₉ (C57Bl/6 Hintergrund)	DRFZ
ICOS ^{-/-}	defizient für das kostimulatorische Molekül ICOS	A. Hutloff
Foxp3-IRES-eGFP	Die T-Zellen, welche Foxp3 exprimieren, koexprimieren ebenfalls eGFP	B. Malaisen

3.2 Zellpräparationen

3.2.1 Präparation von Milz- und Lymphknotenzellen

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, die Milzen und die axillaren, mandibulären, brachialen und inguinalen Lymphknoten entnommen und eine Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Erythrozyten wurden anschließend in einem hypotonischen Erythrozyten-Lysepuffer lysiert (3 min, 1 mL/Milz). Dann wurden die Zellen gewaschen und verbleibende Aggregate mit Hilfe eines Nyloonsiebs (70 µm Porengröße) entfernt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Einzelzellsuspensionen standen nun für die Isolierung von Zellpopulationen zur Verfügung.

3.2.2 Isolierung von dendritischen Zellen aus Milz und Lymphknoten

Die Milzen und Lymphknoten wurden entnommen, mit einer Schere zerkleinert, in serumfreies RPMI Medium, das Collagenase Typ 4 (1 mg/ml; Sigma) und DNase I (0,5 mg/ml; Sigma) enthielt, überführt und für 20 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Milzen und Lymphknoten wurden dann über ein Zellsieb der Maschenweite von 70 µm weiter zerkleinert. Nach einem Waschschrift mit PBS/BSA wurden die Zellen zentrifugiert (300x g, 4 °C, 10 min) und in 4 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen. Nach einem weiteren Waschschrift standen die Zellen für die Sortierung zur Verfügung.

3.3 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Die magnetische Zellsortierung (MACS[®], Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) ist eine Methode, mit der man schnell größere Mengen an Lymphozyten anreichern kann. Hierfür werden die Zielzellen mit Hilfe von Antikörpern mit paramagnetischen Partikeln (Microbeads) markiert. Die Zellen werden nun auf eine Säule mit Metallkügelchen gegeben, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die markierten Zellen werden aufgrund von magnetischen Wechselwirkungen auf der Säule zurückgehalten, während die restlichen Zellen in mehreren Waschschriften (PBS/BSA) entfernt werden. Nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld, können die markierten Zellen von der Säule eluiert werden. Man erhält somit eine markierte (positiv) Fraktion und eine nicht-markierte (negativ) Fraktion. Die Sortierungen erfolgten manuell oder unter

Zuhilfenahme des automatischen Sortiergeräts AutoMACS[®] (Miltenyi Biotec). Die Reinheit der sortierten Zellen wurde routinemäßig durchflusszytometrisch überprüft.

3.3.1 Anreicherung von T_{Reg} (CD4⁺CD25⁺ T-Zellen)

Zur Separation von T_{Reg} wurde die Milz- und Lymphknotenzellsuspension mit CD25-bio Antikörpern (DRFZ) inkubiert und anschließend mit α -Biotin Beads (Miltenyi Biotec; 1:10) markiert. Die Separation der markierten Zellen erfolgte mittels repetitiver Anwendung des AutoMACS-Programms „positive selection II“ (posseld2). Die Reinheit der sortierten Zellen betrug bei der Verwendung von Wildtyp Mäusen stets >90%.

Sofern die MHCII⁺ Zellen ebenfalls für den Versuch benötigt wurden, erfolgte anschließend eine Markierung mit α -MHCII-Beads (Miltenyi Biotec; 1:10) und eine Anreicherung mit Hilfe des Programms „posseld2“. Die Reinheit betrug bei allen Versuchen >95%.

3.3.2 Isolierung von Dendritischen Zellen (CD11c⁺)

Für die Isolierung von konventionellen CD11c⁺ Dendritischen Zellen wurden Zellsuspensionen aus Milz oder Lymphknoten mit α CD11c Microbeads inkubiert. Anschließend wurden diese manuell über 2 Säulen (Miltenyi Biotec) aufgereinigt. Die Reinheit in den CD11c⁺ Zellen betrug in der Regel >80%.

3.3.3 Anreicherung von naiven Zellen (CD4⁺CD62L⁺)

Milz- und Lymphknotenzellen wurden mit CD4-FITC (BD Biosciences, CTR3) gefärbt, mit α -FITC-Multisort-Mikrobeads (Miltenyi Biotec) markiert. Ein entscheidender Vorteil der verwendeten Multisort-Mikrobeads ist, dass man die Magnetpartikel nach dem Sortieren wieder entfernen kann, so dass man die sortierten Zellen (CD4⁺) anschließend aufgrund einer weiteren Eigenschaft (z.B. CD62L⁺) erneut magnetisch sortieren kann. Die Zellen wurden nach der Markierung mit den Multisort-Mikrobeads manuell angereichert. Die Reinheit der angereicherten CD4⁺ Zellen betrug stets >99%. Die α -FITC-Multisort-Mikrobeads wurden danach mit Hilfe des „release reagent“ (Miltenyi biotec) entfernt. Zum Abtrennen verbleibender markierter Zellen wurde die Suspension einmal mit dem Programm „deplete“ sortiert. Danach wurden die CD4⁺

T-Zellen mit α CD62L-Magnetpartikel-Antikörper-Konjugaten (Miltenyi Biotec; 1:50) markiert und mit dem Programm „posseld2“ sortiert. Die Reinheit der CD4⁺CD62L⁺ T-Zellpopulation betrug in der Regel >98%. Diese Zellen wurden zur T_H1- Polarisierung oder nach Depletion von CD25⁺ Zellen für *in vivo* Suppressionsexperimente eingesetzt.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen anhand von relativer Größe, Granularität und emittierten Fluoreszenzfarbstoffen auf Einzelzellebene charakterisiert. Die Zellen passieren dabei in einem Flüssigkeitsstrahl einzeln einen oder mehrere Laserstrahlen. Die Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden mithilfe eines optischen Systems auf verschiedene Detektoren geleitet. Die Messdaten werden von einem angeschlossenen Computer verarbeitet und gespeichert. Eine umfassende Beschreibung dieser Methode ist der Literatur zu entnehmen [76].

Die durchflusszytometrische Analyse wurde an einem FACS-Calibur (Becton Dickinson) mit einem luftgekühlten Argonlaser und einem zweiten, roten Dioden-Laser vorgenommen. An diesem Gerät können bis zu 6 Eigenschaften aufgezeichnet werden.

- „Vorwärtsstreulicht“ (FSC; Streulicht im Winkel von 2-10°; korreliert mit Zellgröße)
- „Seitwärtsstreulicht“ (SSC; 90° reflektiertes Licht; korreliert mit der Granularität)
- FL1 [530 nm] FITC (Fluorescein-isothiocyanat) / CFDA-SE (Fluoreszin)
- FL2 [585 nm] PE (Phycoerythrin)
- FL3 [>650 nm] PerCP / PI (Propidiumjodid)
- FL4 [>670 nm] APC (Allophycocyanin) / Cy5 (Cytochrom 5)

Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte mit der Cellquest Research Software (Becton Dickinson) oder mit dem Programm FlowJo (Tree Star Inc.). Hierbei wurden mit Hilfe von Analysefenstern selektiv nur die Lymphozyten betrachtet. Ferner wurden die toten Zellen mit dem DNA-Farbstoff Propidiumjodid (PI) angefärbt und bei der Auswertung nicht berücksichtigt. PI gelangt nur bei toten oder stark beschädigten Zellen durch die Zellmembran. Sofern es nötig war, z.B. bei Transferexperimenten,

wurden weitere Analysefenster gesetzt, um selektiv bestimmte Populationen zu betrachten.

3.4.2 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Mit einem fluoreszenzaktivierten Zellsorter (FACS) lassen sich Zellpopulationen trennen, die sich in der Expression verschiedener Oberflächenantigene unterscheiden. Das Prinzip des Zellsorters unterscheidet sich nicht wesentlich von der Durchflusszytometrie. Zusätzlich zur Technik der Durchflusszytometrie kann beim Zellsorter die elektrische Ladung der Flüssigkeitstropfen, welche die markierten Zellen enthalten, durch ein elektrisches Feld aus dem Flüssigkeitsstrom abgelenkt werden. Dadurch lassen sich die markierten Zellen von den unmarkierten Zellen abtrennen. Zur Sortierung wurde ein FACS ARIA (BD Biosciences) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden B-Zellen mittels einer CD19-PE Markierung und T_{Reg} Sub-Populationen mit Hilfe von PE gekoppelten ICOS oder CD103 (α_E) Antikörpern sortiert. Die erreichte Reinheit bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung lag stets über 99%.

3.4.3 Immunfluoreszenzfärbung (Oberflächenfärbung)

Die hergestellten Einzelzellsuspensionen wurden zunächst 10 min mit α Fc γ -Rezeptor und Ratten-IgG in PBS/BSA inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde 7 min bei 4°C mit einer optimalen Konzentration an Antikörpern inkubiert und erneut gewaschen. Sofern es sich beim Primärantikörper um ein biotinyliertes Konjugat handelte, wurde in einem weiteren Färbeschritt noch mit Streptavidin konjugierten Fluorochromen gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden dann in 200-300 μ l PBS/BSA aufgenommen und 1 μ g/ml Propidiumjodid (PI) zu den Zellen gegeben, um tote Zellen anzufärben.

3.4.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Zur intrazellulären Zytokinfärbung wurden die T-Zellen mit 1 μ g/ml Ionomycin (Sigma) und 10 ng/ml Phorbolmyristataacetat (PMA, Sigma) in RPMI-Medium (max. Konz. 2×10^6 Zellen/ml) für 4-6 h im Brutschrank stimuliert. Nach 1-2 h wurde der Sekretionshemmer Brefeldin A (5 μ g/ml, Sigma) zugegeben. Die stimulierten Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit 2% Formaldehyd (Merck) in PBS für 10 min bei

Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBA gewaschen und bis zur intrazellulären Färbung im Kühlschrank gelagert.

Um die intrazellulär fixierten Zytokine anzufärben, muss die Zellmembran durch Zugaben des Detergenz Saponin in den Puffer (0,5% Saponin in PBA) permeabilisiert werden. Die Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurde, wie bei der Oberflächenfärbung beschrieben, in saponinhaltigem Puffer durchgeführt und die Antikörperfärbung erfolgte 20 min lang bei Raumtemperatur in saponinhaltigen Puffer. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 200-300 µl PBA aufgenommen und durchflusszytometrisch charakterisiert.

3.4.5 Foxp3 Färbung

Für die Analyse des Transkriptionsfaktors Foxp3 wurde ein spezielles Färbeprotokoll der Firma eBioscience verwendet. Hierbei wurden die Zellen bei 8°C für 3-18 h in einem speziellen Fix/Permpuffer fixiert, dann mehrmals gewaschen (PBS und Perm-puffer) und im Permpuffer mit den entsprechenden Antikörperkonjugaten (inklusive Foxp3 Antikörper) für 30 min auf Eis gefärbt. Nach nochmaligem waschen wurden die Zellen in 300-500 µL PBS/BSA aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

3.4.6 IL-10 Sekretionsassay (Zytokinfärbung an der Oberfläche)

Die Affinitätsmatrix-Technologie (*secretion assay*, Miltenyi Biotec) dient zur durchflusszytometrischen Analyse der Zytokinproduktion von lebenden Zellen. Dazu werden Zellen mit einem bispezifischen Antikörper markiert (Affinitätsmatrix). Dieser besteht aus zwei aneinander gekoppelten Antikörpern. Der eine ist spezifisch für CD45, ein ubiquitäres Oberflächenantigen auf Leukozyten, so dass dieser Antikörper an die Lymphozyten bindet. Der zweite Antikörper ist spezifisch für das zu detektierende Zytokin. Wenn die Zelle während der Sekretionsphase das entsprechende Zytokin sekretiert, so bindet dieses an die Matrix auf der Zelloberfläche.

Dabei muss die Zelldichte entsprechend gering sein, so dass sekretierte Zytokine nicht von der Matrix auf eigentlich negativen Nachbarzellen gebunden werden (*crossfeeding*). Die gebundenen Zytokine können durch Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten α -Zytokin-Antikörper durchflusszytometrisch analysiert werden. Mit Hilfe dieser Methode kann die Zytokinproduktion zu einem bestimmten Zeitpunkt auf lebenden

Zellen analysiert werden. Weiterhin ermöglicht die Technologie die Sortierung lebender zytokinproduzierender Zellen.

3.4.7 CFDA-SE Markierung

Um die Proliferation von naiven T-Zellen *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen, wurden die CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen mit dem Farbstoff CFDA-SE (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-succinimidylester; Sigma, St. Louis, MO) gefärbt. Dieser Farbstoff verbindet sich mit den Proteinen der Zellen, wobei innerhalb der ersten 24 Stunden ca. 99% der gefärbten Proteine metabolisiert werden, so dass nach einem Tag nur Proteine mit einer relativ langen Halbwertszeit markiert bleiben. Diese Färbung bleibt auch nach der Teilung der Zelle noch vorhanden, allerdings wird die Intensität der Färbung auf die Tochterzellen gleichermaßen verteilt, so dass ein Bandenmuster entsteht, das die einzelnen Zellgenerationen darstellt.

Zur Markierung der naiven T-Zellen mit CFDA-SE wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, um die Proteine des Puffers zu entfernen. Dann erfolgte die Inkubation von 1x10⁷ Zellen/mL in 1 mM CFSE in PBS für 2:45 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von RPMI beendet und die Zellen anschließend gewaschen.

3.4.8 Auswertung der CFDA-SE Markierung (Proliferationsinhibition durch T_{Reg})

Die CFDA-SE Markierung ermöglicht es, durchflusszytometrisch die Anzahl der T-Zellen in jeder einzelnen Zellteilungsgeneration mit Hilfe von Analysefenstern zu bestimmen. Wie bereits erwähnt, verdoppelt sich die Zellzahl bei jeder Teilung, so dass bei hohen Zellteilungsraten die Anzahl der Zellen in den späten Generationen überwiegt. Dies führt dazu, dass bei alleiniger Beurteilung der Zellteilung anhand der Anzahl der T-Zellen in jeder Generation fälschlicher Weise auf eine zu starke Teilungsrate geschlossen wird. Daher wurde rechnerisch die Zellteilung pro Ausgangszelle bestimmt:

Zunächst wurden mit Hilfe von Analysefenstern die absoluten Zellzahlen x_i der Generationen $i = 0$ bis $i = n$ bestimmt und die Anzahl an Ausgangszellen P berechnet:

$$P = \sum_{i=0}^n \frac{x_i}{2^i}$$

Anschließend erfolgte die Berechnung der insgesamt durchgelaufenen Zellteilungen Z :

$$Z = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{2_i} \times (2^i - 1)$$

Mit beiden Größen erfolgte dann die Berechnung der Zellteilungen / Ausgangszelle Z_P :

$$Z_P = \frac{Z}{P}$$

Die bestimmten Zellteilungen pro Ausgangszelle der einzelnen Proben sollten nun direkt verglichen werden. Um die bestimmten Werte mit und ohne Inhibition durch T_{Reg} leichter vergleichen zu können, wurden die berechneten Werte aller Proben jeweils auf die Zellteilung pro Ausgangszelle ohne Inhibition $Z_{P(ohne)}$ bezogen:

$$Prolifertion_{T_{Reg}} (\%) = \frac{Z_P(T_{Reg})}{Z_P(ohne)} \times 100\%$$

Die berechnete prozentuale Proliferation bei Zugabe von T_{Reg} ermöglicht es nun direkt auf das Ausmaß der Inhibition zu schließen. Ferner kann die suppressive Aktivität verschiedener T_{Reg} -Populationen miteinander verglichen werden.

3.5 T-Zellstimulation und T-Zellkulturen

3.5.1 T_{Reg} - Stimulation

Zur Stimulation der T_{Reg} wurden verschiedene Methoden verwendet:

Für die Stimulation mit **immobilisierten α CD3 Antikörpern** wurden Mikrotiterplatten mit 1 μ g/ml α CD3 in PBS befüllt und für 3h bei 37°C inkubiert. Optional wurden in diesem Schritt α CD28 (1 μ g/ml) oder α ICOS (4 μ g/ml) Antikörper koimmobilisiert. Die beschichteten Platten wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden isolierte T_{Reg} in RPMI Medium mit 10% FCS in die Platten gegeben, so dass alle T_{Reg} Kontakt zur Plattenoberfläche hatten.

Für die Stimulation mit **MHCII⁺ APZ, CD19⁺ B-Zellen oder CD11c⁺ DZ** wurden diese Zellen zunächst mit 30 Gy bestrahlt und mit den T_{Reg} in einem Verhältnis von 2:1 bei einer Gesamtdichte von 4×10^6 /ml in RPMI Medium mit 10% FCS kokultiviert. Es wurden lösliches α CD3 (1 μ g/ml) und optional α CD28 (1 μ g/ml) zugegeben.

Für die Stimulation mit **Notch Liganden transfizierten A20 B-Zellen** wurden diese mit 100 Gy bestrahlt und mit den T_{Reg} in einem Verhältnis von 2:1 in RPMI Medium mit 10%

FCS kokultiviert. Bei einigen Proben wurden 125 nM GSI (Insolution γ -secretase inhibitor X, Calbiochem) zugefügt.

3.5.2 T_H1 Polarisierung von naiven T-Zellen

2,5 x 10⁶ naive (CD4⁺CD62L⁺) T-Zellen (Do11.10) wurden mit 1,25 x 10⁷ APZ mit 1 μ g/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ – Peptid in einem Volumen von 6 ml in einer 6-Loch-Platte kultiviert. Für die Polarisierung von naiven CD4⁺ T-Zellen wurde rekombinantes IL-12 (R&D; 10 ng/ml) und der neutralisierende α L-4 Antikörper (11B11; 10 μ g/ml) zugegeben. Alle Zytokine und Antikörper wurden vor der Zugabe steril filtriert (0,2 μ m Filter, Sarstedt). Am dritten Tag wurde das wachstumsfördernde Zytokin IL-2 (10 ng/ml) dazugegeben und die Zellen mittels eines Ficoll-Dichtegradienten am sechsten Tag geerntet. Bei der Polarisierung der naiven CD4⁺CD62L⁺ Zellen zu T_H1 Zellen wurde nach 6 Tagen routinemäßig ein Anteil von >80% INF- γ positiven Zellen erreicht. Eine Expression von IL-4 konnte, wie erwartet, bei den polarisierten T_H1 Zellen nicht nachgewiesen werden.

3.5.3 T_{Reg} *in vitro* Funktionstest (Suppressionsassay)

In diesem Test sollte die suppressive Kapazität von T_{Reg} auf die Proliferation naiver T-Zellen (CD4⁺CD62L⁺) *in vitro* untersucht werden. Hierbei wurden naive T-Zellen (T_{resp}) mit naiven DZ, α CD3 (0,5 μ g/ml) und α CD28 (1 μ g/ml) Antikörpern für 72 h in einer 96 Lochplatte (Rundboden; BD Biosciences) in RPMI Medium mit 10% FCS kokultiviert. Das Verhältnis zwischen den naiven T-Zellen und den DZ betrug stets 10:1 (pro Ansatz 10⁶ naive T-Zellen und 10⁵ DZ).

Die zu untersuchenden T_{Reg} wurden der Kultur im Verhältnis von 1:2 bis 1:32 zu den markierten naiven T-Zellen hinzugefügt. Um die Suppression der T_{resp} durch die T_{Reg} beurteilen zu können, wurden die T_{resp} vor der Kultur mit CFSE markiert und die Teilungsraten der einzelnen Proben ermittelt und verglichen (s.o.).

3.6 Retrovirale Transduktion

3.6.1 Generierung des Virusüberstandes

HEK293T-Zellen wurden in einer Dichte von 5x10⁶/ml in 10 ml DMEM Medium mit 10% FCS in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach

der Ca_2PO_4 -Methode transfiziert. Hierzu wurden in FACS-Röhrchen 5 μg des Pseudotyping-Plasmids, 10 μg des Verpackungsplasmids und 15 μg des retroviralen Expressionsplasmids mit 200 μl 1,25 M CaCl_2 -Lösung und 750 μl Wasser vermischt. Unter ständigem Vortexen wurde tropfenweise 1 ml 2x HBS-Puffer zugegeben. Es wurde für einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 4 h wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit neuem Medium versehen. Nach 48 h wurde der Virusüberstand abgenommen, filtriert (0,45 μm) und mit 10 mM HEPES gepuffert. Der so generierte Überstand kann bis zu einer Woche bei 4°C aufbewahrt werden.

3.6.2 Infektion der T-Zellen

Zwischen 24 h und 30 h nach der Stimulation wurden die T-Zellkulturen infiziert. Hierzu wurde der Kulturüberstand größtenteils abgenommen und aufbewahrt. Dem Virusüberstand wurde Polybren (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma) zugesetzt und der Überstand auf die Zellen gegeben (1,5 ml für 12 well; 1 ml für 24 well). Es folgte eine Zentrifugation bei 700x g für 75 min bei ca. 32°C. Anschließend wurde der Virusüberstand abgenommen und durch den aufbewahrten Kulturüberstand ersetzt.

3.7 Tierexperimentelle Methoden

3.7.1 Ficoll-Dichtegradienten-Separation

Bevor *in vitro* kultivierte Zellen adoptiv in Rezipiententiere transferiert werden konnten, wurden die Zellen über einen Ficoll-Gradienten (Histopaque 1083, Sigma) gereinigt, um tote Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Die Ficoll-Hypaque-Lösung besitzt mit 1,077 g/ml eine größere Dichte als lebende Lymphozyten, so dass diese von den restlichen Zellen abgetrennt werden können. Nach Zentrifugation bei 800x g für 20 min bei Raumtemperatur (ohne Bremse) wurde die Interphase abgenommen und 2x mit PBS gewaschen.

3.7.2 Adoptiver Transfer

Die generierten T-Zellen wurden intravenös (i.v.) in die Schwanzvene von Wildtyp Rezipienten injiziert. Zuvor wurde die Vene mittels Bestrahlung mit einer Wärmelampe

geweitet. Mit Hilfe einer 30G Kanüle (Braun, Melsungen, Deutschland) wurden den Rezipienten dann $0,5 \times 10^6$ bis 1×10^6 T-Zellen in die Schwanzvene transferiert. Es wurden nie mehr als 200 μ l pro Maus transferiert.

3.7.3 „delayed type hypersensitivity“ (DTH) -Reaktion

In diesen Experimenten wurden Ovalbumin-spezifische naive T-Zellen *in vitro* zu T_H1-Zellen polarisiert und anschließend in Rezipiententiere intravenös transferiert. Am darauf folgenden Tag wurde aus einer OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid Lösung (in PBS) und dem gleichen Volumen an inkompletten Freund's Adjuvans (IFA) eine Emulsion hergestellt. Von dieser Emulsion wurden ca. 5ng OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid in die linke Pfote injiziert, in die rechte Pfote erfolgte eine Injektion eines vergleichbaren Volumens einer PBS/IFA Emulsion ohne Peptid. Das applizierte OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid wird von den APZ aufgenommen, kann präsentiert werden und aktiviert die Antigen-spezifischen transferierten Zellen. Im Rahmen dieser Aktivierung kommt es zu einer massiven Entzündung und Schwellung der Pfote. Diese Schwellung wurde mit einer Federmeßuhr (Mitutoyo, Neuss) gemessen. Die Messung erfolgte täglich, ohne Kenntnis der Gruppenzuordnung, durch Marko Janke. Der Kotransfer von T_{Reg} ermöglichte es, deren suppressive Aktivität anhand der Verringerung der Schwellung zu beurteilen.

3.7.4 DNA Immunisierung (GeneGun)

Für die DNA Immunisierung mit der GeneGun wurde DNA auf Goldpartikel präzipitiert, die Patronen mit den Goldpartikeln beladen und die Mäuse mit den DNA/Goldpartikeln vakziniert. Dabei wurde im Wesentlichen nach den Angaben des Herstellers (BioRad, Hercules, CA) vorgegangen. So wurden 25mg 1 Micron Gold (BioRad) mit 100 μ L Spermidin (Sigma; 0,05M in H₂O) versetzt, gemischt und 5s ins Ultraschallbad gehalten, um eventuelle Goldaggregate aufzubrechen. Dann wurde eine entsprechende Menge Vektor DNA (in H₂O) hinzugegeben. Nach dem Durchmischen wurden 100 μ L CaCl (1M) unter ständigem Vortexen tröpfchenweise zugefügt. Nach 15min war der Präzipitationsvorgang abgeschlossen. Es wurden ca. 50 μ g Plasmid (pOva)/Schlauch verwendet, was einer Menge von 1 μ g DNA /Schuss entspricht.

Anschließend wurden die Goldpartikel viermalig mit 100%igem Ethanol gewaschen. Nach Zugabe von 3,5mL PVP-Lösung waren die DNA/Goldpartikel bereit für die Beschichtung der Patronen (*coating*). Dazu wurde die Lösung gevortext und mit Hilfe

einer Spritze in einen Teflonschlauch (BioRad) aufgesogen. Dieser wurde in die „Tubing-Prep-Station“ (BioRad) eingespannt. Nachdem sich das Gold gleichmäßig abgesetzt hatte, wurde die PVP-Lösung abgezogen und der Schlauch durch einen Stickstoffstrom unter Rotation getrocknet. Anschließend wurde der beschichtete Schlauch in ca. 45 Stücke zerschnitten. Diese Patronen konnten bei 8°C über mehrere Wochen gelagert werden. Die Immunisierung erfolgte, indem die DNA/Goldpartikel durch Heliumdruck in die rasierte Bauchhaut „geschossen“ wurden. Dabei wurden drei nicht überlappende Stellen pro Maus ausgewählt und immunisiert. Diese Versuche wurden in Kooperation mit Susan Brandenburg durchgeführt, die dieses System im Labor etabliert hatte.

3.8 Statistische Auswertung

3.8.1 Signifikanztest

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software Prism (Graphpad Software, Inc.).

Für den Vergleich zweier Gruppen wurde bei normalverteilten Daten (z.B. der Zytokin-expression) ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test verwendet. Bei nicht normalverteilten Daten (z.B. den funktionellen *in vivo* Untersuchungen) wurde ein zweiseitiger, ungepaarter Mann-Whitney-Test verwendet.

P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant gewertet. Aufgrund des Pilot-Charakters der Studie wurde auf Adjustierung für multiples Testen verzichtet.

4. ERGEBNISSE

CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) sind entscheidend an der Begrenzung von potentiell schädlichen Immunreaktionen beteiligt. In den letzten Jahren mehren sich die Anzeichen, dass diese Immunsuppression *in vivo* vor allem von den Zytokinen Interleukin-10 (IL-10) und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) vermittelt wird. Eines dieser suppressiven Zytokine, das IL-10, kann in den CD4⁺CD25⁺ T-Zellen *in vitro*, in Anwesenheit von hohen Dosen an Interleukin-2 (IL-2), induziert werden [35].

In der vorliegenden Arbeit sollte die *in vitro* Induktion von IL-10 in den T_{Reg} genauer charakterisiert und optimiert werden. Anschließend sollten diese *in vitro* behandelten T_{Reg} verwendet werden, um die funktionelle Rolle von IL-10 bei der Suppression *in vivo* näher zu untersuchen. Die Analyse der suppressiven Kapazität dieser T_{Reg} in den *in vivo* Modellen sollte ferner erste Hinweise auf das therapeutische Potential dieser *in vitro* behandelten IL-10 produzierenden T_{Reg} liefern.

4.1 Induktion von IL-10 in T_{Reg} *in vitro*

Fügt man einer *in vitro* T_{Reg} Kultur hohe Konzentrationen an IL-2 hinzu, so führt eine anschließende Restimulation mit PMA/Ionomycin zu einem signifikanten Anstieg der Frequenzen an IL-10 produzierenden T_{Reg} [35]. In diesem Assay kann die Frequenz an IL-10 produzierenden Zellen durch eine zusätzliche Gabe von IL-4 weiter erhöht werden. In Abwesenheit von IL-2 ist keine gesteigerte Induktion von IL-10 durch IL-4 zu verzeichnen. Die IL-4 vermittelten Effekte scheinen dementsprechend hauptsächlich additiven Charakter zu besitzen.

Ausgehend von dieser Arbeit sollten nun diese Stimulationsbedingungen untersucht und so optimiert werden, dass möglichst hohe Frequenzen an IL-10 bei Restimulation induziert werden. In Vorbereitung auf die geplante Analyse der suppressiven Kapazität *in vivo*, sollten die *in vitro* behandelten T_{Reg} ferner phänotypisch charakterisiert werden (Teil 4.2).

4.1.1 Stimulations- und Kostimulationsbedingungen

Bei *in vitro* T-Zellkulturen hängt die Aktivierung und damit verbunden auch die Zytokinproduktion von vielen Parametern ab. In diesem Versuchsteil sollte der Einfluss

der primären T-Zellrezeptor (TZR) Stimulation und der Einfluss von zusätzlichen kostimulatorischen Signalen auf die Zytokinexpression untersucht werden.

Zur Stimulation und Quervernetzung des TZR werden entweder immobilisierte α CD3 Antikörper oder α CD3 Antikörper in Verbindung mit Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) verwendet. In einem ersten Versuchsteil wurden diese beiden Stimulationsansätze miteinander verglichen. Hierbei wurde, in Anlehnung an die zugrunde liegende Publikation, die alleinige Gabe von IL-2 und die Zugabe einer Kombination aus IL-2 und IL-4 untersucht [35].

Es zeigte sich, dass eine Stimulation der T_{Reg} in Gegenwart von APZ stets zu einer signifikant höheren Induktion von IL-10 führte (Abb. 2A). Diese höhere Induktion war sowohl bei alleiniger Gabe von IL-2, als auch bei der Kombination mit IL-4 zu beobachten (Abb. 2A).

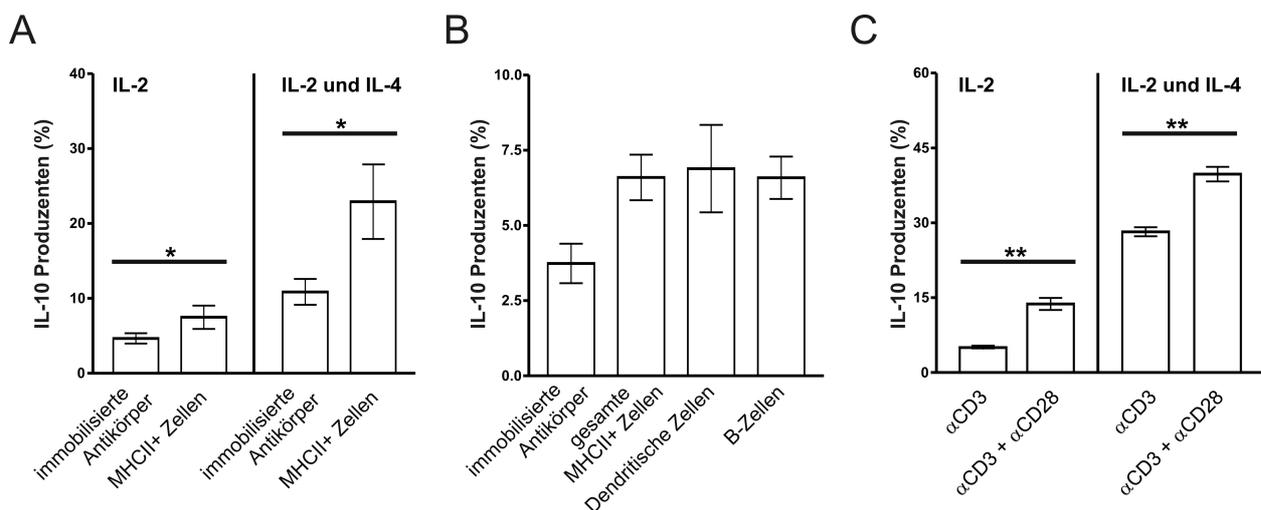


Abbildung 2: Optimierung der *in vitro* Stimulationsbedingungen

Zunächst wurden $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (T_{Reg}) entweder mit immobilisierten α CD3 Antikörpern oder mit löslichen Antikörpern und $MHCII^+$ APZ *in vitro* stimuliert. Den Kulturen wurde entweder IL-2 oder eine Kombination aus IL-2 und IL-4 zugegeben. Nach drei Tagen wurde nach PMA/Ionomycin Restimulation die Frequenz an IL-10 produzierenden T_{Reg} analysiert (A). In einem zweiten Versuchsteil wurden unter den beschriebenen Bedingungen mit IL-2 eine Stimulation mit den Subpopulationen Dendritische Zellen ($CD11c^+$) oder B-Zellen ($CD19^+$), mit der von den gesamten APZ ($MHCII^+$) verglichen (B). Die Induktion von IL-10 bei Kostimulation mit α CD28 wurde im Versuchsteil C untersucht. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$)

Eine mögliche Erklärung für die Überlegenheit der APZ bei der Induktion von IL-10 besteht darin, dass weitere Oberflächenmoleküle oder Zytokine der APZ zu der Induktion beitragen. Um diesen günstigen Effekt bei der Induktion von IL-10 weiter zu

untersuchen, wurden die bereits im ersten Versuchsteil verwendeten MHCII⁺ sortierten APZ mit zwei Untergruppen der APZ, den Dendritischen Zellen (CD11c⁺) und den B-Zellen (CD19⁺), in ihrem Potential IL-10 zu induzieren vergleichend untersucht.

Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der mit Stimulation mit MHCII⁺ sortierten APZ, CD11c⁺ Dendritischen Zellen (DZ) oder CD19⁺ B-Zellen bei der Induktion von IL-10 (Abb. 2B). Auch die Stimulation mit aus Knochenmarksvorläuferzellen *in vitro* generierten DZ (so genannten *bone-marrow derived DZ*) führte zu keiner signifikant erhöhten Induktion (Daten nicht gezeigt). Für die effektive Expansion der T_{Reg} und für die Induktion von hohen Frequenzen an IL-10 produzierenden T_{Reg} erwies sich in diesen Versuchen eine doppelte so hohe Anzahl an APZ in den *in vitro* Kulturen als günstig (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zum TZR Signal können die APZ auch über kostimulatorische Moleküle die Zytokinproduktion der T_{Reg} beeinflussen. So können z.B. die Moleküle der B7-Familie auf den APZ den CD28 Korezeptor der T_{Reg} stimulieren und so deren Expansion und Zytokinproduktion beeinflussen. In der Literatur ist beschrieben, dass diese Signale via CD28 bei den T_{Reg} essentiell für die Entstehung, Homöostase [77] und wohl auch für die Expansion der T_{Reg} [78] sind. Unter Verwendung von isolierten humanen T_{Reg} konnte auch gezeigt werden, dass nur die Kostimulation über CD28 zur Erhaltung der Foxp3 Expression und der *in vitro* und *in vivo* suppressiven Funktion beiträgt [79]. Die kostimulatorischen Moleküle ICOS, OX40, CD27, 4-1BB und CD40L hatten keinen Einfluss auf die suppressive Kapazität der T_{Reg} [79].

In einem weiteren Versuchsteil dieser Dissertation wurde deshalb der Einfluss einer Kostimulation mit Hilfe eines αCD28 Antikörpers untersucht. Hierbei wurde erneut eine alleinige Gabe von IL-2 und die Kombination von IL-2 und IL-4 untersucht. Die Kostimulation über αCD28 Antikörper führte unter beiden Bedingungen zu einer signifikant erhöhten Induktion von IL-10 in den T_{Reg} (Abb. 2C).

Zusammenfassend führte eine TZR Stimulation der T_{Reg} mit αCD3 und eine Kostimulation mit αCD28 Antikörpern unter Verwendung von MHCII⁺ APZ zur maximalen Induktion von IL-10. Diese Bedingungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in allen weiteren Versuchen verwendet.

4.1.2 TLR Signale und pro-inflammatorische Zytokine

Im Rahmen von Infektionen und entzündlichen Prozessen werden eine Vielzahl von Mediatoren ausgeschüttet, welche auch die T_{Reg} beeinflussen. Einige Autoren beschreiben eine Aktivierung und Induktion der suppressiven Kapazität der T_{Reg} (u.a. durch pro-inflammatorische Zytokine und Toll-like Rezeptor (TLR) - Liganden) zu diesem Zeitpunkt in Vorbereitung auf die spätere Eindämmung der Immunreaktion.

Toll-like Rezeptor (TLR) Liganden, welche u.a. im Rahmen von bakteriellen Infektionen auftreten, aktivieren über TLR das angeborene Immunsystem. Sie tragen ferner zur Aktivierung von DZ und somit zur Induktion des adaptiven Immunsystems bei. Neuere Arbeiten zeigen, dass diverse TLR auch auf T_{Reg} exprimiert werden [80] und eine Stimulation mit den TLR Liganden LPS (TLR4) [81] und Flagellin (TLR5) [82] die suppressive Kapazität der T_{Reg} erhöhen. Über welchen Mechanismus die T_{Reg} die verstärkte Suppression vermitteln, ist nicht ausreichend untersucht. Daher wurde der Einfluss dieser TLR Liganden auf die Induktion von IL-10 in dieser Arbeit untersucht. Die Gabe der TLR-Liganden LPS oder Flagellin hatte in diesem Assay jedoch keinen Einfluss auf die Induktion von IL-10 in den T_{Reg} (Abb. 3A).

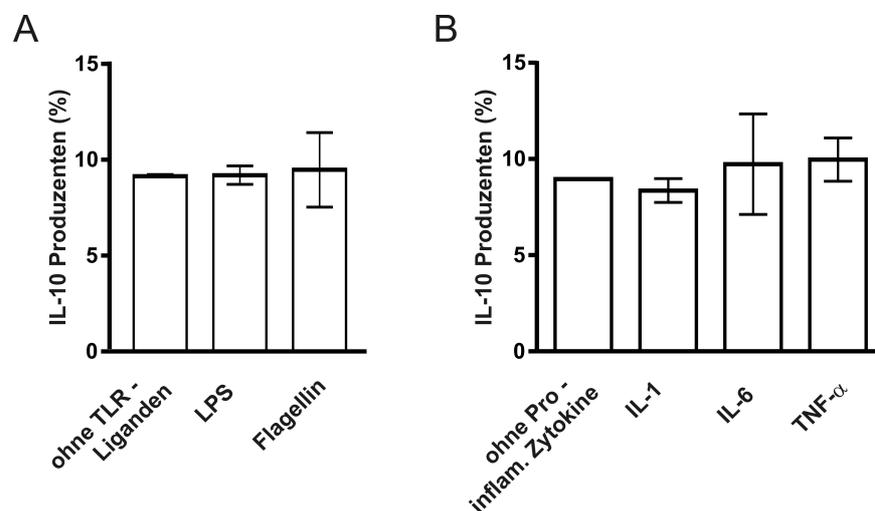


Abbildung 3: IL-10 Expression nach Stimulation mit TLR oder pro-inflammatorischen Zytokinen

T_{Reg} wurden mit α CD3, APZ und IL-2 für drei Tage stimuliert und die Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} nach PMA/Iono Restimulation bestimmt. In einigen Proben wurden die TLR – Liganden LPS oder Flagellin der Kultur hinzugefügt (A). In weiteren Versuchen wurden die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α der Kultur hinzugefügt (B).

Im Rahmen von entzündlichen Prozessen werden ferner verschiedene Zytokine (v.a. TNF- α , IL-1 und IL-6) gebildet, welche an der Rekrutierung von Immunzellen und der Unterhaltung der Entzündung beteiligt sind. Der entzündliche Prozess trägt zur Aktivierung von DZ bei, welche dann IL-1 und IL-6 exprimieren. Diese Zytokine erhöhen u.a. die Sensitivität der T_{Reg} für IL-2 [83] und bahnen somit die spätere suppressive Kapazität in den T_{Reg}. Für IL-6 ist jedoch auch beschrieben, dass es zunächst die Suppression von T_{Reg} unterdrückt [84]. Der Einfluss von TNF- α auf die suppressive Kapazität der T_{Reg} ist nicht eindeutig beschrieben, so trat in Abhängigkeit von den untersuchten Bedingungen ein inhibitorischer [67] oder fördernder Effekt [85] auf. Auch für die pro-inflammatorischen Zytokine konnte in dem untersuchten *in vitro* System kein Effekt auf die IL-10 Produktion in T_{Reg} beobachtet werden (Abb.3B).

Die Tatsache, dass die pro-inflammatorischen Zytokine und die TLR-Liganden keine Effekte bei der IL-10 Induktion in diesem *in vitro* Assay haben, bedeutet nicht, dass sie unter physiologischen Bedingungen *in vivo* keine Rolle spielen. So lassen sich die Kinetik und die Konzentrationen der einzelnen Faktoren und Zellen *in vivo* nicht ausreichend *in vitro* nachstellen. Es gibt z.B. Hinweise, dass eine Neutralisation von TNF- α mittels monoklonaler Antikörper (Infliximab) bei Patienten mit RA zum Anstieg von CD4⁺CD25^{hi} T-Zellen führt, welche mit Hilfe der Zytokine TGF- β und IL-10 supprimieren [68].

4.1.3 Einfluss des Notch-Signalwegs

Neuere Arbeiten zeigen, dass die pro-inflammatorischen T_H1- und T_H17-Zellen unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, große Mengen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zu produzieren. Diese Fähigkeit trägt entscheidend zur physiologischen Begrenzung von Entzündungsreaktionen bei [86]. Mit dem Notch-Signalweg konnte kürzlich ein Regulator identifiziert werden, der sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die IL-10 Produktion von T_H1-Zellen kontrolliert [87]. Bei diesem Signalweg führt die Bindung der Notch-Liganden an die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors zur Abspaltung der intrazellulären Domäne mit Hilfe einer γ -Sekretase. Die abgespaltene intrazelluläre Domäne transloziert in den Zellkern, wo sie an der Aktivierung verschiedener Gene beteiligt ist. Insbesondere unter T_H1 polarisierenden Bedingungen kann über Notch - und STAT4-abhängige Mechanismen eine Potenzierung der IL-10 Expression in naiven T-Zellen beobachtet werden [87].

In Hinblick auf die regulatorischen T-Zellen sind Notch-Signale v.a. bei der TGF- β induzierten Generierung von speziellen T_{Reg} (iT_{Reg}) beschrieben [88]. Ein Einfluss von Notch auf die Induktion von IL-10 wurde bisher nur in den Foxp3⁻ regulatorischen T_R1 Zellen beschrieben [89;90]. In diesem Versuchsteil sollte daher untersucht werden, ob der Notch-Signalweg, ähnlich wie bei T_H1-Zellen, auch an der Potenzierung der IL-10 Produktion in Foxp3⁺ T_{Reg} beteiligt ist. In Anlehnung an die Arbeiten bezüglich der T_H1-Zellen wurden die T_{Reg} zunächst mit APZ stimuliert, welche die Notch-Liganden (Delta-like 1, Delta-like 4, Jagged 1) exprimieren [87]. Die Gabe eines γ -Sekretase Inhibitors (GSI), welcher die Spaltung des Notch-Rezeptors und damit den Notch-Signalweg unterbindet, ermöglicht es, den Einfluss der Notch-Liganden auf die Produktion von IL-10 zu untersuchen.

Zunächst wurde die Stimulation der T_{Reg} mit Notch-Liganden unter nicht polarisierenden (IL-2) und unter T_H1-Stimulationsbedingungen (IL-2 und IL-12) untersucht. In zwei unabhängigen Versuchen führte die Stimulation mit den Notch-Liganden der Delta-Familie zu einer Erhöhung der IL-10 Expression in den T_{Reg} (Abb. 4). Die Liganden der Delta-Familie sind auch bei den naiven T-Zellen unter T_H1 Bedingungen die potentesten Induktoren von IL-10 [87]. Im Gegensatz zu den naiven T-Zellen, bei denen die Blockierung des Notch-Signalwegs durch Gabe des GSI die Induktion von IL-10 vollständig inhibieren konnte, hatte die Blockierung mit Hilfe des GSI bei den T_{Reg} keinen Einfluss auf die IL-10 Induktion.

Eine Erklärung für die unveränderte Expression von IL-10 nach Gabe des GSI ist, dass der gewählte Zeitpunkt der GSI Gabe und die eingesetzte Konzentration auf den Erfahrungswerten bei den naiven T-Zellen beruhten. Bei diesen T-Zellen hatten sich hohe Konzentrationen an GSI als toxisch für die Zellen erwiesen. Die T_{Reg} unterscheiden sich jedoch in vielen Aspekten von den naiven T-Zellen, so dass sie möglicherweise anders auf den GSI ansprechen, und somit andere Konzentrationen oder repetitive Gaben nötig gewesen wären. Alternativ können die geringfügig erhöhten Frequenzen an IL-10 produzierenden T_{Reg} bei Stimulation mit den Delta-Liganden auch durch eine Anreicherung weiterer kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der verschiedenen APZ erklärt werden.

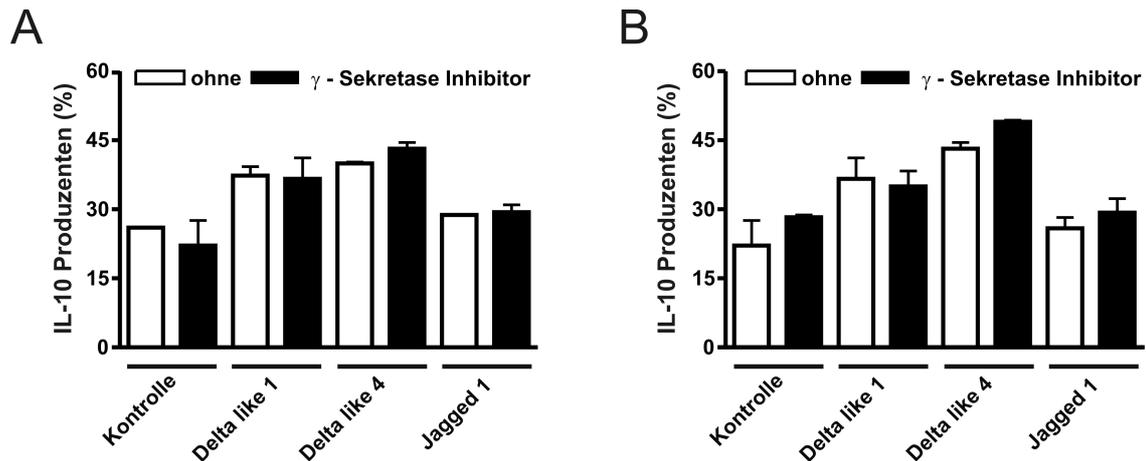


Abbildung 4: Stimulation der T_{Reg} mit Notch Ligand exprimierenden APZ

A20 B-Hybridomzellen wurden mit Notch Liganden transfiziert und mittels FACS Sortierung angereichert. Die T_{Reg} wurden mit diesen A20 B-Hybridomzellen, αCD3, αCD28 unter neutralen Bedingungen mit IL-2 (A) oder unter T_{H1} ähnlichen Bedingungen mit IL-2 und IL-12 (B) stimuliert. In einigen Proben wurde den Kulturen ein γ-Sekretase Inhibitor (GSI) beigefügt, welcher mit der γ-Sekretase einen essentiellen Bestandteil der Notch Signalkette inhibiert. Dargestellt ist die Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} bei Restimulation mit PMA/Ionomycin am vierten Tag der Kultur.

Im ersten Versuchsteil konnte eine Erhöhung der Induktion von IL-10 bei der Stimulation mit bestimmten Notch-Liganden beobachtet werden. Dieser Effekt konnte jedoch nicht mit Hilfe des GSI unterdrückt werden, so dass unklar blieb, ob es sich hierbei um eine Notch-abhängige Induktion von IL-10 handelte. Um den Einfluss von Notch auf die IL-10 Produktion näher zu untersuchen, wurden in einem zweiten Versuchsteil CD4⁺CD25⁺ T-Zellen retroviral mit einem konstitutiv aktiven intrazellulären Notch-3-Konstrukt transfiziert. Die transfizierten T_{Reg} wurden nach vier Tagen unter neutralen (IL-2), T_{H1} (IL-2 und IL-12) oder T_{H2} (IL-2 und IL-4) polarisierenden Bedingungen analysiert. Hierbei wurde die IL-10 Expression von Notch- und kontroll-transfizierten T_{Reg} verglichen.

Im Gegensatz zu naiven T-Zellen, bei denen es unter T_{H1} polarisierenden Bedingungen mit dem Notch Konstrukt zu einer drastischen IL-10 Induktion (0,9% => 38%) kommt (Abb. 5A und [87]), war der Anstieg der IL-10 Expression bei den transfizierten T_{Reg} deutlich geringer (8,7% => 16,4%)(Abb. 5A). Eine Induktion von IL-10 durch Notch- im Vergleich zu kontroll-transfizierten T_{Reg} konnte unter allen untersuchten Bedingungen beobachtet werden (Abb. 5B). Interessanterweise exprimierten auch 8,7% der kontroll-transfizierten T_{Reg} IL-10, was auf eine hohe endogene IL-10 Expression schließen lässt.

Diese endogene IL-10 Expression ist auch bei den nicht transfizierten T_{Reg} (6% und 6,7%) signifikant höher als bei den naiven T-Zellen (<1%) (Abb. 5A).

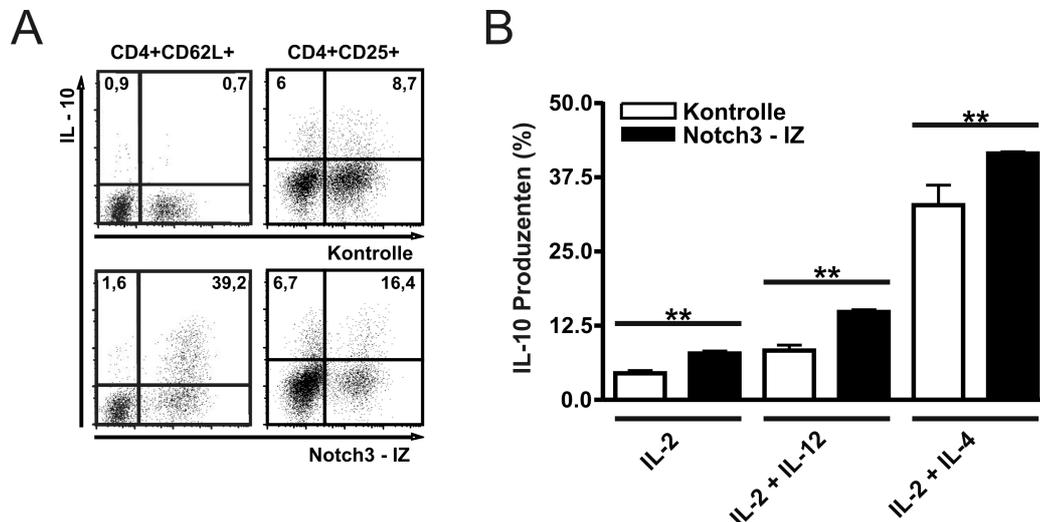


Abbildung 5: IL-10 Expression nach Transfektion mit einer intrazellulären Notch3 Domäne

T_{Reg} wurden mit α CD3, α CD28 und APZ unter neutralen Bedingungen (IL-2), T_H1 Bedingungen (IL-2 und IL-12) oder T_H2 Bedingungen (IL-2 und IL-4) stimuliert. Am darauf folgenden Tag wurden die T_{Reg} mit Retroviren transfiziert, welche eine intrazelluläre Notch3 Domäne oder ein kontroll-Konstrukt enthielten. Beide Konstrukte enthielten zusätzlich IRES-GFP zur Detektion der transfizierten Zellen. Am fünften Tag der Kultur wurde die Frequenz an IL-10⁺ innerhalb der T_{Reg} nach PMA/Ionomycin Stimulation untersucht. Dargestellt ist jeweils der Anteil der IL-10⁺ T-Zellen an den transfizierten und an den nicht-transfizierten T-Zellen unter T_H1 Bedingungen (A). Zum Vergleich ist eine Transfektion von naiven CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen dargestellt (A linke Seite, Abbildung zur Verfügung gestellt von S. Rutz; aus [87]). In Teil (B) der Abbildung ist die Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} innerhalb der transfizierten T_{Reg} dargestellt. (***P* < 0,01)

Die Tatsache, dass eine Transfektion mit dem Notch-Konstrukt zu einer signifikanten Induktion von IL-10 führte, lieferte einen ersten Hinweis, dass Notch auch bei den T_{Reg} an der IL-10 Induktion beteiligt sein könnte. Anhand dieser Ergebnisse kann jedoch nur bedingt auf die physiologische Rolle bei der Induktion geschlossen werden, da es im Rahmen der Transfektion zu einer Überexpression von Notch kam, welches nicht der physiologischen Situation entspricht. Hier müssten weiterführende Versuche z.B. unter Verwendung von T_{Reg} aus KO Mäusen durchgeführt werden, um den Stellenwert von Notch bei der IL-10 Induktion in T_{Reg} vollständig zu klären.

4.1.4 Einfluss von ICOS

Inducible costimulator (ICOS) ist ein kostimulatorisches Molekül, welches strukturelle Ähnlichkeiten mit CD28 und CTLA-4 besitzt. Im Gegensatz zum, auf CD4⁺ T-Zellen konstitutiv exprimierten CD28, wird ICOS *de novo* induziert.

Die CD4⁺ T-Zellen aus sekundären lymphatischen Organen mit der höchsten ICOS Expression auf der Oberfläche weisen auch die höchste Frequenz des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 bei Stimulation mit PMA/Ionomycin auf. Neuere Arbeiten zeigen, dass die ICOS Expression auch bei humanen Lymphozyten mit der IL-10 Expression korreliert [91] und ICOS somit bei murinen und humanen Lymphozyten ein interessanter Oberflächenmarker für IL-10⁺ T-Zellen ist. Arbeiten mit einem Diabetes-Modell weisen ferner darauf hin, dass CD4⁺CD25⁺ Zellen in den Läsionen im Pankreas eine Autoimmunreaktion mit Hilfe von ICOS und IL-10 unterbinden [92].

Da die Expression von IL-10 vorwiegend in den CD4⁺ T-Zellen mit hoher Expression an ICOS zu finden ist und ICOS womöglich auch funktionell bei der Suppression relevant ist, sollte zunächst der Einfluss von ICOS auf die IL-10 Expression in T_{Reg} genauer untersucht werden. Hierfür wurde die Korrelation von ICOS und IL-10 Expression bei T_{Reg} (CD4⁺CD25⁺) und bei nicht regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁻) nach *ex vivo* PMA/Ionomycin Stimulation untersucht.

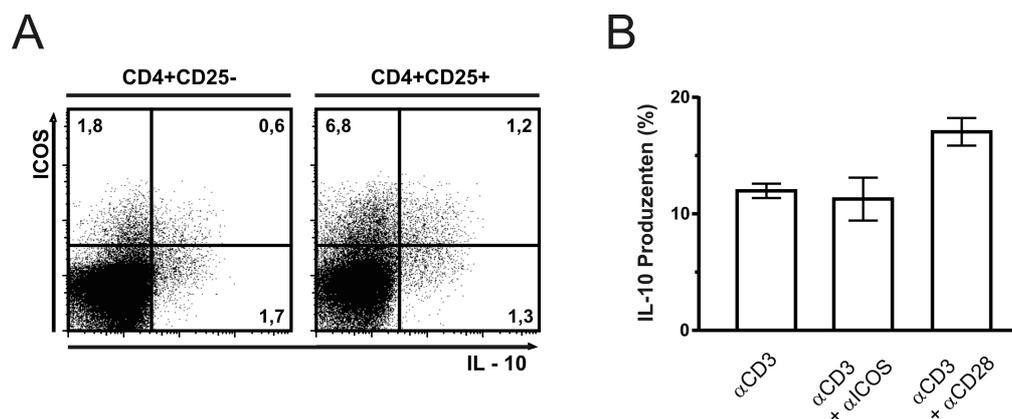


Abbildung 6: Korrelation von ICOS und IL-10 auf T_{Reg} und Stimulation der T_{Reg} via ICOS

CD4⁺CD25⁻ und die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden *ex vivo* isoliert und nach PMA/Ionomycin Stimulation auf ICOS und IL-10 gefärbt (A). Ferner wurden T_{Reg} drei Tage mit immobilisierten αCD3, αCD3 + αICOS oder αCD3 + αCD28 Antikörpern unter Zugabe von IL-2 kultiviert und nach PMA/Ionomycin Restimulation die Expression von IL-10 untersucht. Dargestellt ist die Frequenz an IL-10⁺ CD4⁺ T-Zellen (B).

Auffallend war zunächst, dass die Frequenz an ICOS⁺ bei den CD4⁺CD25⁺ T_{Reg} mit 6-9% wesentlich höher ist als die 2-3% bei den CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (Abb. 6A). Betrachtet man ausschließlich die IL-10⁺ T_{Reg}, so koexprimierte die Hälfte dieser Zellen ICOS (Abb. 6A).

Da die T_{Reg} eine vergleichsweise hohe Frequenz an ICOS⁺ Zellen aufwies und es sich bei ICOS um ein kostimulatorisches Molekül handelt, wurde dann untersucht, ob mittels eines stimulierenden αICOS Antikörper IL-10 in den T_{Reg} induziert werden kann. Diese Kostimulation wurde direkt mit der αCD28 Kostimulation verglichen, von der bereits bekannt war, dass sie mit einer erhöhten Expression von IL-10 einhergeht (Abb. 2A). Im Gegensatz zur Kostimulation mit αCD28 Antikörpern, führte die Verwendung eines αICOS Antikörpers zu keiner signifikanten Veränderung der IL-10 Expression (Abb. 6B). Dies gab einen ersten Hinweis, dass eine Kostimulation via ICOS nicht entscheidend an der Induktion von IL-10 in diesem Assay beteiligt ist. Um den Einfluss von ICOS weiter zu untersuchen wurden T_{Reg} von ICOS Knock-out Mäusen und T_{Reg} von Wildtyp Mäusen untersucht, die unter vergleichbaren Bedingungen gezüchtet wurden und in Alter und Geschlecht vergleichbar waren. Bei mehreren unabhängig durchgeführten *in vitro* Kulturen erwies sich die Induktion von IL-10 in den ICOS KO T_{Reg} im Vergleich zu den Wildtyp T_{Reg} als sehr variabel (Daten nicht gezeigt). Eine deutliche Induktion von IL-10 konnte jedoch in den ICOS KO T_{Reg} stets gemessen werden und über alle Experimente gemittelt, war die Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} bei den ICOS KO T_{Reg} nicht signifikant geringer, als bei den Wildtyp T_{Reg}. Dies deckt sich mit funktionellen Analysen *in vivo*, bei denen die ICOS KO T_{Reg} sich als vergleichbar suppressiv erwiesen (persönliche Mitteilung Susan Brandenburg).

Da eine Kostimulation über ICOS nicht im signifikanten Maße zur Induktion von IL-10 beitrug, wurde dann untersucht, ob das induzierte kostimulatorische Molekül ICOS möglicherweise vornehmlich auf bereits aktivierten T-Zellen oder auf T_{Reg} mit einem Effektor/Gedächtnis-ähnlichen Phänotyp exprimiert wird. Diese Effektor/Gedächtnis-ähnlichen T_{Reg} wurden ursprünglich anhand der Expression des Integrin αEβ7 charakterisiert. Es ist beschrieben, dass die αE⁻CD25⁺ T_{Reg} mit Hilfe von CCR7 und L-Selektin durch die lymphoiden Organen rezirkulieren können, während die αE⁺CD25⁺ T_{Reg} effektiv zu entzündeten Stellen migrieren [93].

Da ICOS v.a. auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, wurden eine ICOS Färbung auf den aus Foxp3 Reporter Mäusen (siehe Material und Methoden) isolierten CD4⁺CD25⁺

T_{Reg}, durchgeführt. Dies ermöglichte eine Unterscheidung von aktivierten T-Zellen und T_{Reg} anhand des linienspezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3. Es zeigt sich, dass aufgrund der Aktivierung bei 26% der aktivierten (Foxp3⁻) T-Zellen ICOS induziert wurde (Abb. 7A), während bei den Foxp3⁺ T_{Reg} nur 6% der Zellen ICOS exprimierten. Betrachtet man die ICOS⁺ Zellen innerhalb der isolierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, so exprimieren ein Großteil dieser T_{Reg} den Transkriptionsfaktor Foxp3 (6,0 Foxp3⁺ / 0,9 Foxp3⁻) (Abb. 7A). Eine Doppelfärbung von ICOS und dem Integrin α_E bei den Foxp3⁺ T_{Reg} zeigte, dass ca. 23% der α_E⁺ T_{Reg} ICOS koexprimieren, während dies bei den α_E⁻ T_{Reg} nur 7% sind (Abb. 7A). Dies spricht für eine deutliche Anreicherung von ICOS bei den α_E⁺ T_{Reg}, für welche der Effektor/Gedächtnis Phänotyp beschrieben ist.

Dies legte die Vermutung nahe, dass ICOS ebenfalls ein Marker für Effektor/Gedächtnis T_{Reg} und damit auch für IL-10 produzierende T_{Reg} sein könnte. Daher wurden die T_{Reg} vor der Stimulation *in vitro* durchflusszytometrisch (FACS) in ICOS⁺ und ICOS⁻ T_{Reg} sortiert. Als Vergleich dienten T_{Reg}, welche anhand des Effektor/Gedächtnis T_{Reg} Markers α_E vorsortiert wurden. Bei Restimulation nach der *in vitro* Kultur erwies sich die Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} in der ICOS⁺- und in der α_E⁺ vorsortierten Fraktion höher als in den jeweiligen negativen Fraktionen (Abb. 7B + C). Bei einer Anreicherung von ICOS⁺ T_{Reg} (Abb. 7B) konnte im Vergleich zu den ICOS⁻ vorsortierten T_{Reg} eine 5x höhere Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} erzielt werden. Bei der Anreicherung über α_E, war eine doppelt so hohe Frequenz zu verzeichnen (Abb. 7C).

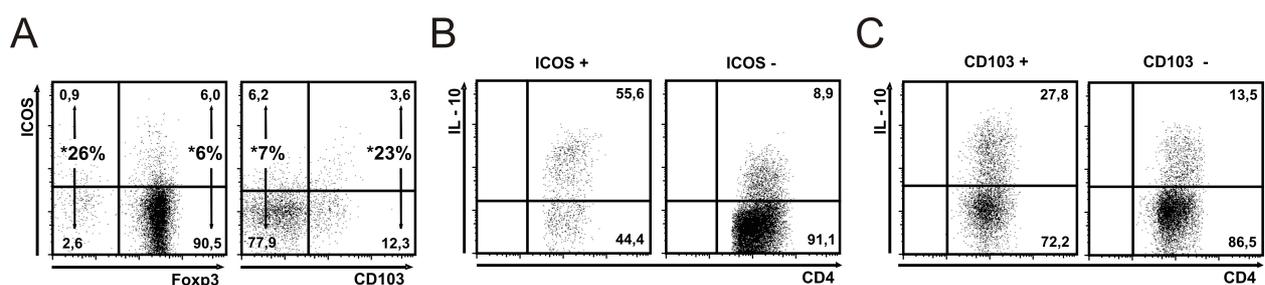


Abbildung 7: Potential der IL-10 Induktion unter Verwendung von T_{Reg} Subpopulationen

CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden aus Foxp3 Reporter Mäusen isoliert und *ex vivo* ICOS und α_E auf diesen T_{Reg} gefärbt (A). [* gekennzeichnete Zahlen geben den prozentualen Anteil ICOS⁺ Zellen innerhalb der Foxp3 bzw. der CD103 pos. oder neg. Populationen an]. Ferner wurden T_{Reg} aus Wildtyp Mäusen durchflusszytometrisch auf ICOS⁺ und ICOS⁻ (B) oder auf α_E⁺ (CD103⁺) und α_E⁻ (CD103⁻) (C) sortiert. Diese einzelnen sortierten T_{Reg} sub-Populationen wurden dann mit APZ, αCD3, αCD28 und IL-2 stimuliert. Am vierten Tag erfolgte die PMA/Ionomycin Restimulation mit anschließender Färbung von IL-10. Dargestellt ist die Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg}.

Die durchgeführten Experimente wiesen darauf hin, dass ICOS ein Oberflächenmarker ist, welcher zwar mit der IL-10 Expression korreliert, aber ein Signal über ICOS keine Voraussetzung für die IL-10 Induktion war. Dieser Versuch erhärtete die Vorstellung einer Akkumulation von ICOS und α_E in einer Effektor/Gedächtnis T_{Reg} Population.

4.2. Charakterisierung der *in vitro* stimulierten T_{Reg}

4.2.1 Kinetik der Foxp3 und der IL-10 Expression

Für die Isolierung von T_{Reg} hat sich eine Sortierung anhand der Oberflächenmarker $CD4^+$ und $CD25^+$ bewährt. Sofern nicht spezielle Fragestellungen untersucht werden, wird diese Strategie bei der Sortierung von murinen T_{Reg} von den meisten Experimentator/Innen verwendet. Die Anreicherung anhand des Oberflächenmarkers CD25 hat jedoch den Nachteil, dass auch nicht regulatorische T-Zellen nach Aktivierung CD25 auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit bei dieser Sortierungsstrategie neben den T_{Reg} auch ein geringer Prozentsatz an aktivierten T-Zellen isoliert wird. Bei dem verwendeten *in vitro* Assay werden dementsprechend neben den T_{Reg} auch ein Anteil von ca. 5% nicht regulatorischer T-Zellen stimuliert. Es ist nicht bekannt, ob diese aktivierten T-Zellen *in vitro* besser expandieren und dabei womöglich die T_{Reg} überwachsen. Der linienspezifische Transkriptionsfaktor Foxp3 wäre sicherlich ein besserer Marker für die Sortierung von T_{Reg} , er ist jedoch als intrazelluläres Molekül einer Färbung auf lebenden T_{Reg} nicht zugänglich.

Um die Fragestellung, ob die nicht regulatorischen $Foxp3^-$ T-Zellen gegenüber den T_{Reg} einen Wachstumsvorteil haben zu untersuchen, wurde unter den in Versuchsteil 4.1.1 optimierten Bedingungen mit APZ, $\alpha CD3$ - und $\alpha CD28$ Antikörpern eine Kinetik erstellt. Der Anteil an T_{Reg} innerhalb der *in vitro* stimulierten T-Zellen konnte anhand der Färbung des spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 über sechs Tage verfolgt werden. *Ex vivo* exprimierten ca. 95% der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen den Transkriptionsfaktor Foxp3. Sofern kein IL-2 der Kultur hinzugefügt wurde, sank der Anteil an $Foxp3^+$ T_{Reg} innerhalb von 3 Tagen unter 50% (Abb. 8A). Dies verdeutlicht, dass IL-2 zusätzlich zu seiner Rolle bei der Induktion von IL-10 [35;37] auch für die Homöostase der T_{Reg} essentiell ist [34]. Bei der Zugabe von IL-2 allein oder in Kombination mit IL-4 fällt der Anteil an $Foxp3^+$ T_{Reg} zwar im Laufe der Kultur ebenfalls ab, bleibt jedoch in Zeitraum von 6 Tagen stets über 85% (IL-2) bzw. 75% (IL-2+4). Die Abnahme der Frequenz an

Foxp3⁺ T-Zellen kann entweder mit einer stärkeren Expansion der Foxp3⁺ T-Zellen oder mit einem Verlust der Foxp3 Expression einzelner T_{Reg} im Rahmen der *in vitro* Stimulation erklärt werden. In diesem Zusammenhang wäre eine mögliche Erklärung für den höheren Anteil an den Foxp3⁺ T-Zellen bei Zugabe von IL-4 eine stärkere Expansion der Foxp3⁺ T-Zellen in Rahmen einer T_H2 Differenzierung [94]. Insgesamt limitiert der Wachstumsvorteil der Foxp3⁺ T-Zellen in der *in vitro* Kultur die mögliche Stimulationsdauer, so dass auf mehrere Stimulationszyklen verzichtet wurde.

Neben Foxp3 wurde im Rahmen der Kinetik auch die Induktion von IL-10 täglich untersucht. Die aufgenommene Kinetik zeigte hierbei, dass die Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} bei alleiniger Zugabe von IL-2 und bei der Kombination mit IL-4 bis zum vierten Tag ansteigt und danach wieder abfällt (Abb. 8B). Das beobachtete Maximum um den vierten Tag korreliert mit dem Zeitpunkt der Untersuchung bei der zugrunde liegenden Publikation, bei der die Induktion am dritten Tag untersucht wurde [35].

In Abwägung der beiden Parameter IL-10 und Foxp3 scheint eine Stimulationsdauer von 3-4 Tagen ein guter Kompromiss zu sein. Zu diesem Zeitpunkt ist die Frequenz an Foxp3⁺ T-Zellen mit mindestens 85% noch recht hoch (95% *ex vivo*), während die Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} ein Plateau erreicht. Für alle weiteren Versuche wurde diese Stimulationsdauer gewählt.

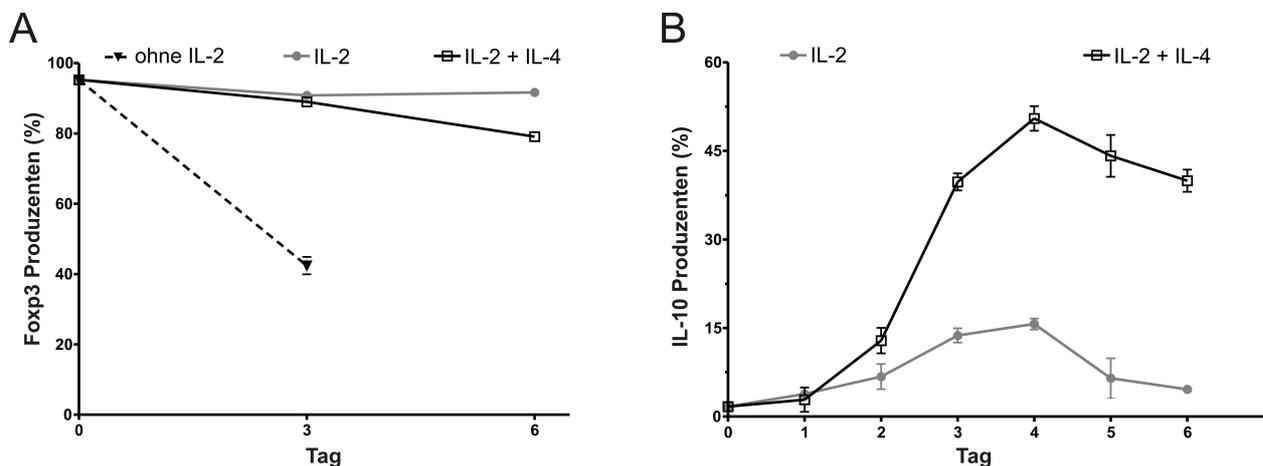


Abbildung 8: Kinetik der Foxp3 und der IL-10 Expression der *in vitro* Kultur

T_{Reg} wurden mit αCD3, αCD28 und APZ *in vitro* stimuliert, wobei eine alleinige Zugabe des Zytokins IL-2 mit der Gabe der beiden Zytokine IL-2 und IL-4 verglichen wurde. Am dritten und sechsten Tag wurden Proben entnommen und die Frequenz des Transkriptionsfaktor Foxp3 gemessen (A) Als Vergleich diente hier eine Gruppe, bei der keine Zytokine hinzugefügt wurden. Ferner wurde über sechs Tage die Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} bei Restimulation mit PMA/Ionomycin bestimmt (B).

4.2.2 Koexpression von IL-10 und Foxp3

Möchte man diese *in vitro* stimulierten T_{Reg} für Suppressionsexperimente verwenden, so muss sichergestellt sein, dass die $Foxp3^+$ T-Zellen (T_{Reg}) dieses Zytokin produzieren und nicht die bei der Sortierung ebenfalls angereicherten aktivierten $Foxp3^-$ T-Zellen. Eine intrazelluläre Kofärbung von Foxp3 und IL-10 ist derzeit technisch nicht möglich, so dass ein Protokoll ohne intrazelluläre Färbungen etabliert wurde. Hierfür wurden die T_{Reg} aus genetisch veränderten Foxp3-IRES-eGFP Reporter-mäusen (siehe Material und Methoden), welche in den $Foxp3^+$ T-Zellen ebenfalls eGFP exprimieren, für die Kultur verwendet. Somit konnten die $Foxp3^+$ T_{Reg} ohne weitere Färbung anhand der eGFP Expression identifiziert werden. Nach Restimulation dieser T_{Reg} wurde das sekretierte IL-10 mit Hilfe eines Sekretionsassays (siehe Material und Methoden) auf der Oberfläche gebunden und gefärbt.

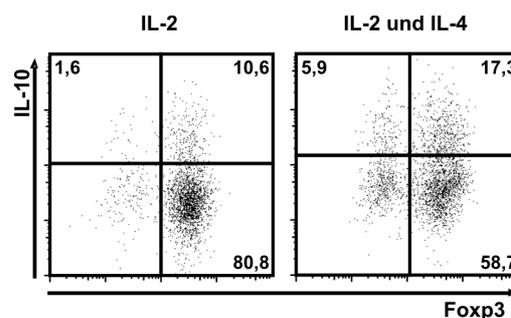


Abbildung 9: Korrelation von Foxp3 und IL-10 bei den *in vitro* stimulierten T_{Reg}

$CD4^+CD25^+$ T_{Reg} wurden aus Foxp3 Reporter Mäusen, welche Foxp3 und den Fluoreszenzmarker eGFP koexprimieren, isoliert und mit $\alpha CD3$, $\alpha CD28$ und APZ *in vitro* stimuliert. Der Zusatz von IL-2 wurde erneut mit der Kombination von IL-2 und IL-4 verglichen. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin restimuliert und mit einem Sekretionsassay das abgegebene IL-10 direkt auf der Oberfläche der Zelle aufgefangen und angefärbt (Sekretionsassay siehe Material und Methoden).

Betrachtet man die Korrelation von Foxp3 und IL-10, so zeigt sich, dass das IL-10 hauptsächlich von den $Foxp3^+$ T_{Reg} sekretiert wird (Abb. 9). Unter den Bedingungen mit IL-2 waren ca. 85% der IL-10 sekretierenden T-Zellen $Foxp3^+$. Im Vergleich dazu war die Gesamtfrequenz an IL-10 sekretierenden T-Zellen bei Zugabe von IL-2 und IL-4 zwar doppelt so hoch, allerdings war der Anteil an $Foxp3^+$ T_{Reg} innerhalb der IL-10 sekretierenden T-Zellen mit ca. 75% geringer (Abb. 9 rechts).

Dieser Versuchsteil zeigte, dass das IL-10 hauptsächlich von den $Foxp3^+$ T_{Reg} stammt, was eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz *in vivo* war. Vergleicht man die beiden

verwendeten Bedingungen, so führte eine alleinige Gabe von IL-2 zu einer günstige Situation mit einer Frequenz von >90% Foxp3⁺ T-Zellen, innerhalb derer sich der Hauptteil der IL-10 Produzenten befand. Die Kombination aus IL-2 und IL-4 hingegen führte annähernd zu einer Verdopplung der Gesamtfrequenz an IL-10⁺ T-Zellen, welche jedoch bezogen auf die Foxp3 Expression eine geringere Reinheit aufwiesen.

4.2.3 Koexpression weiterer relevanter Zytokine

Für die geplanten Suppressionsexperimente *in vivo* war ferner eine wichtige Voraussetzung, dass in den T_{Reg} neben dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 nicht weitere pro-inflammatorische Zytokine, wie INF- γ (T_{H1}), IL-4 (T_{H2}), und IL-17 (T_{H17}) induziert werden. Physiologischer Weise wird die Expression der Zytokine IL-2, IL-4, INF- γ und IL-17 durch den spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 in T_{Reg} reprimiert [28;95]. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es unter den Stimulationsbedingungen *in vitro* auch zur Induktion dieser Zytokine kommt.

In diesem Versuch wurde daher die Expression der Zytokine INF- γ , IL-4, IL-2 und IL-17 bei PMA/Ionomycin Stimulation vor und nach der Kultur untersucht. Um eine mögliche Koexpression mit IL-10, wie sie z.B. bei T_{H1}-Zellen beschrieben ist zu untersuchen wurden jeweils Kofärbungen mit IL-10 durchgeführt.

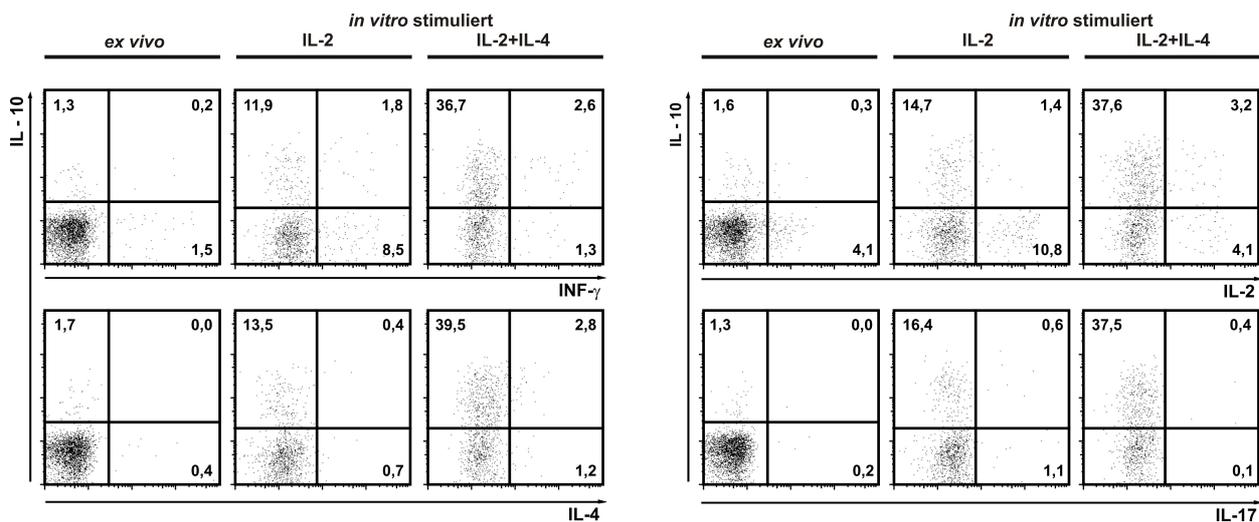


Abbildung 10: Induktion weiterer relevanter Zytokine

T_{Reg} wurden drei Tage *in vitro* mit α CD3, α CD28 und APZ stimuliert. Diese stimulierten T_{Reg} wurden anschließend mit PMA/Ionomycin restimuliert und die Expression der Zytokine INF- γ (T_{H1}), IL-4 (T_{H2}), IL-2 (aktiviert T-Zellen), IL-17 (T_{H17}) und IL-10 analysiert. Hierbei wurden eine alleinige Zugabe von IL-2 und die Kombination aus IL-2 und IL-4 untersucht. Als Vergleich dienten *ex vivo* stimulierte T_{Reg}.

Bei PMA/Ionomycin Stimulation der *ex vivo* untersuchten T_{Reg} konnte keine relevante Expression der untersuchten Zytokine festgestellt werden. Lediglich das IL-2 war in ca. 4% der T-Zellen nachweisbar (Abb. 10). Diese Zahl korreliert mit der Frequenz an Foxp3⁻ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD25⁺ sortierten Zellen, so dass das IL-2 vermutlich von diesen Zellen stammt.

Betrachtet man nun die Zytokinexpression der T_{Reg} nach *in vitro* Stimulation, so wurde IL-10 unter den beiden untersuchten Bedingungen am stärksten induziert (Abb.10). Bei den weiteren untersuchten Zytokinen traten nur sehr geringe Veränderungen auf. Diese geringfügigen Änderungen von IL-2, INF- γ und IL-4 in einigen Proben sind wahrscheinlich auf eine T_{H1} bzw. T_{H2} Polarisation der wenigen Foxp3⁻ T-Zellen zurückzuführen.

Insgesamt zeigte dieser Versuch, dass durch Gabe von IL-2 oder IL-2 + IL-4 selektiv das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 induziert wurde. Die ausbleibende Koexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen stellte eine wichtige Voraussetzung zum Einsatz dieser T_{Reg} *in vivo* dar.

4.3 Funktionelle Analyse der *in vitro* stimulierten T_{Reg}

Im Teil 4.1 dieser Arbeit wurde ein Protokoll optimiert, mit dem *in vitro* hohe Frequenzen des immunsuppressiven Zytokins IL-10 in T_{Reg} induziert werden konnten. Hierbei wurden die T_{Reg} mit APZ, α CD3 und α CD28 Antikörpern in Anwesenheit von IL-2 oder einer Kombination aus IL-2 und IL-4 über 3-4 Tage stimuliert. Eine phänotypische Charakterisierung in Teil 4.2 ergab, dass in den T_{Reg} hauptsächlich das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 induziert wird. Es konnten nur sehr geringe Mengen der pro-inflammatorischen Zytokine INF- γ , IL-4 und IL-17 nachgewiesen werden.

Die Analyse dieser unter definierten Bedingungen stimulierten T_{Reg}, von denen bekannt ist, dass sie bei erneuter Stimulation IL-10 exprimieren, ermöglichte es nun funktionelle Untersuchungen zur Rolle von IL-10 bei der Suppression *in vitro* und *in vivo* durchzuführen. Die Analyse der *in vitro* stimulierten T_{Reg} liefert ferner erste Hinweise, ob diese Vorbehandlung auch für therapeutische Ansätze geeignet wäre.

4.3.1 Suppression von naiven T-Zellen *in vitro*

Zunächst wurde die suppressive Kapazität der T_{Reg} in einem *in vitro* Suppressionsassay untersucht. In diesem Assay werden naive $CD4^+CD62L^+$ T-Zellen (T_{resp}) isoliert, CFDA-SE markiert und mit Dendritischen Zellen, $\alpha CD3$ - und $\alpha CD28$ Antikörpern stimuliert. Die zu untersuchenden T_{Reg} werden den naiven T-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen zugesetzt. Eine mögliche Suppression der Proliferation kann anhand des bei der Teilung der T_{resp} Zellen entstehenden CFDA-SE Musters nach drei Tagen durchflusszytometrisch analysiert werden.

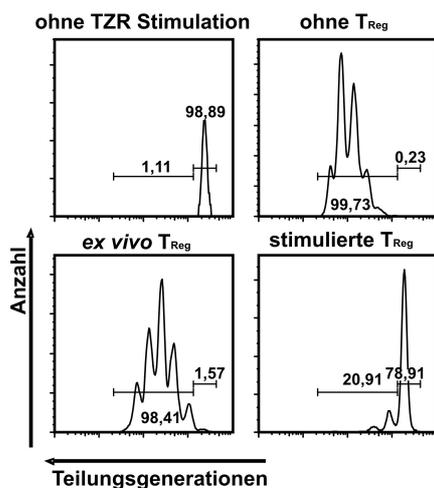
In diesem Assay wurden die *in vitro* mit $\alpha CD3$, $\alpha CD28$, APZ und IL-2 über drei Tage stimulierten T_{Reg} und die *ex vivo* isolierten T_{Reg} in der suppressiven Kapazität verglichen. Wurden die T_{resp} in diesem Assay in Abwesenheit von T_{Reg} stimuliert, so wurden nahezu alle naiven T-Zellen zur Teilung angeregt (Abb. 11A oben rechts). Diese Proliferation wurde durch Zugabe von T_{Reg} deutlich inhibiert (Abb. 11A unten), wobei die Inhibition bei den vorher *in vitro* stimulierten T_{Reg} stärker ausfiel. Die abgebildeten Histogramme (Abb. 11A) lassen nur bedingt auf die Stärke der Suppression schließen, so dass die Teilung/Vorläuferzelle als Maß für die Proliferation der T_{resp} berechnet wurde (siehe Material und Methoden). Die Proliferation ohne Zugabe von T_{Reg} wurde als 100% gesetzt und der prozentuale Anteil bei den Proben mit T_{Reg} auf diesen Wert bezogen.

Betrachtet man die Proliferation bei Zugabe der zuvor *in vitro* stimulierten T_{Reg} , so fällt auf, dass diese T_{Reg} die Proliferation der naiven T-Zellen nahezu vollständig inhibierten (Abb. 11B). Die Suppression der *ex vivo* isolierten T_{Reg} war deutlich schwächer, was zeigte, dass die *in vitro* Stimulation der T_{Reg} die suppressive Kapazität signifikant erhöhte. In allen untersuchten Verhältnissen korreliert die Stärke der Suppression mit der Anzahl der T_{Reg} (Abb. 11B).

Eine mögliche Ursache für die Überlegenheit der behandelten T_{Reg} ist, dass sie *in vitro* effektiver IL-2 aufnehmen können als unbehandelte T_{Reg} und somit effektiver mit den T_{resp} um IL-2 und andere Wachstumsfaktoren konkurrieren können [96]. Alternativ kann die Suppression auch durch die Induktion des suppressiven Zytokins IL-10 in diesen T_{Reg} erklärt werden [35]. Es wird jedoch allgemein davon ausgegangen, dass die Suppression *in vitro* unabhängig von IL-10 ist [96]. Im Gegensatz zu den meisten anderen Suppressionsassays, wurden in diesem Experiment jedoch DZ zur Stimulation verwendet, welche zu den Zielzellen des von den T_{Reg} abgegebenen IL-10 gehören. Somit könnte diese Variante des Suppressionsassays sensibler auf die Einflüsse von

IL-10 sein. Erste Versuche einer Neutralisierung von IL-10 in diesem Assay lieferten ein Indiz dafür, dass die Suppression unter diesen Bedingungen nur bei einem niedrigen $T_{Reg}:T_{resp}$ Verhältnis von IL-10 abhängig ist (Daten nicht gezeigt). Wurde die Anzahl an T_{Reg} erhöht, so konnte die Suppression nicht mehr durch eine Blockade von IL-10 aufgehoben werden. Vermutlich wurde bei einer hohen Anzahl an T_{Reg} die Suppression von der Konkurrenz um Wachstumsfaktoren dominiert.

A



B

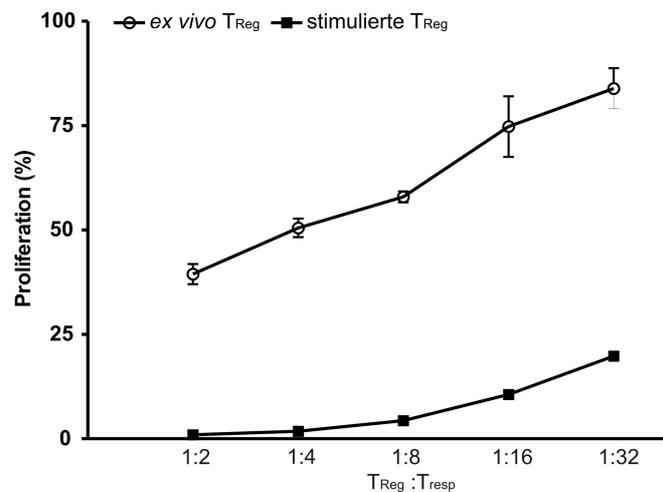


Abbildung 11: T_{Reg} vermittelte Suppression der Proliferation von naiven T-Zellen *in vitro*

CFDA-SE markierte naive $CD4^+CD62L^+$ T-Zellen wurden mit $CD11c^+$ DZ, $\alpha CD3$ und $\alpha CD28$ drei Tage *in vitro* stimuliert. Diesen Zellen wurden $\alpha CD3$, $\alpha CD28$, IL-2, APZ und zuvor drei Tage *in vitro* stimulierten T_{Reg} oder *ex vivo* isolierten T_{Reg} in verschiedenen Verhältnissen hinzugefügt, um deren suppressive Kapazität zu untersuchen. Durchflusszytometrisch wurde die Frequenz an proliferierten T_{resp} Zellen ohne Antikörperstimulation (A oben links), ohne Zugabe von T_{Reg} (A oben rechts) oder unter Zugabe der *ex vivo* isolierten T_{Reg} (A unten links) bzw. der zuvor *in vitro* stimulierten T_{Reg} (A unten rechts) ermittelt. Ferner wurde die Teilung/Vorläuferzelle als Maß für die Proliferation der T_{resp} bestimmt (siehe Material und Methoden). Die berechnete Proliferation ohne T_{Reg} wurde als 100% gesetzt und die weiteren Werte auf diesen bezogen (B).

4.3.2 Suppression von naiven T-Zellen *in vivo*

Bei der *in vitro* Analyse der suppressiven Kapazität der zuvor *in vitro* stimulierten T_{Reg} zeigte sich ein deutlicher Vorteil im Vergleich zu *ex vivo* isolierten T_{Reg} . In diesem Versuchsteil sollte nun untersucht werden, ob die stimulierten T_{Reg} auch *in vivo* die

Proliferation von naiven T-Zellen supprimieren können und ob diese Suppression zytokinvermittelt ist.

Um die Proliferation von naiven T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, stand ein Modell zur Verfügung, in dem die transferierten T-Zellen mit Hilfe einer sehr milden Form der Immunisierung (DNA Vakzinierung) antigenspezifisch zur Teilung angeregt werden konnten. Diese milde Immunisierung ermöglichte es, auch geringe Unterschiede im Suppressionsgrad zu untersuchen. Bei der gewählten DNA Vakzinierung (GeneGun) wurden Goldpartikel mit einem Ovalbumin Protein kodierenden Plasmid beladen und mittels Heliumdruck intradermal appliziert. Hierbei wurden u.a. Langerhans und Dendritische Zellen mit dem Plasmid transfiziert [97]. Diese APZ wurden dadurch aktiviert, wanderten in die drainierenden Lymphknoten [98] und präsentierten dort das transfizierte Ovalbumin. Die präsentierten OVA-Peptide konnten dann die zwei Tage vor der Vakzinierung intravenös (i.v.) transferierten naiven ($CD4^+CD25^-CD62L^+$) Ovalbumin-spezifischen T-Zellen (OTII) zur Teilung anregen. Diese naiven Ovalbumin-spezifischen T-Zellen waren mit CFDA-SE markiert, so dass anhand der Zellzahlen in jeder Teilungsgeneration die Zellteilungsrate und damit die Proliferation ermittelt werden konnte (siehe Material und Methoden). Transferierte man in diesem Modell vor der Vakzinierung die zu untersuchenden T_{Reg} , so konnte man deren suppressive Kapazität anhand der Proliferation der naiven T-Zellen bestimmen.

In diesem *in vivo* Suppressionsmodell wurden zunächst Ovalbumin-spezifische T_{Reg} (OTII) untersucht. Hierbei wurde die Proliferation der naiven T-Zellen nach Vakzinierung in Tieren untersucht, bei denen *in vitro* stimulierte T_{Reg} , *ex vivo* isolierte T_{Reg} oder keine T_{Reg} transferiert wurden. Bei der Suppressionsanalyse *in vivo* wurde deutlich, dass die unbehandelten *ex vivo* isolierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} nicht in der Lage sind, die Proliferation der naiven T-Zellen zu supprimieren (Abb. 12A). Dies war zunächst unerwartet, da diese T_{Reg} eine Spezifität für Ovalbumin besitzen und somit davon auszugehen ist, dass diese *in vivo* aktiviert werden können. Diese Aktivierung scheint aber nicht ausreichend zu sein, um die Proliferation der naiven T Zellen effektiv zu supprimieren. Im Gegensatz dazu, waren die *in vitro* stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} in der Lage, die Proliferation der naiven T-Zellen auf ca. 1/3 des Ausgangswerts zu reduzieren (Abb. 12A).

Ob eine Antigen-Spezifität der T_{Reg} eine essentielle Voraussetzung für die Suppression ist, konnte bisher noch nicht hinreichend geklärt werden. So gibt es Berichte, dass nach TZR spezifischer Aktivierung der T_{Reg} eine Antgenspezifität für die Suppression nicht

mehr essentiell ist (sog. *bystander suppression* [42;99]). Um eine mögliche bystander Suppression zu untersuchen, wurde die suppressive Kapazität von *in vitro* stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg}, mit der von *in vitro* stimulierten Wildtyp T_{Reg} verglichen. Hierbei konnte eine Suppression der Proliferation sowohl bei den Ovalbumin-spezifischen T_{Reg}, als auch bei den Wildtyp T_{Reg} beobachtet werden (Abb. 12B). Die Suppression fiel bei den Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} wesentlich stärker aus als bei den Wildtyp T_{Reg}, was dafür spricht, dass neben der beschriebenen bystander Suppression vermutlich auch antigenspezifische Mechanismen an der Suppression beteiligt sind.

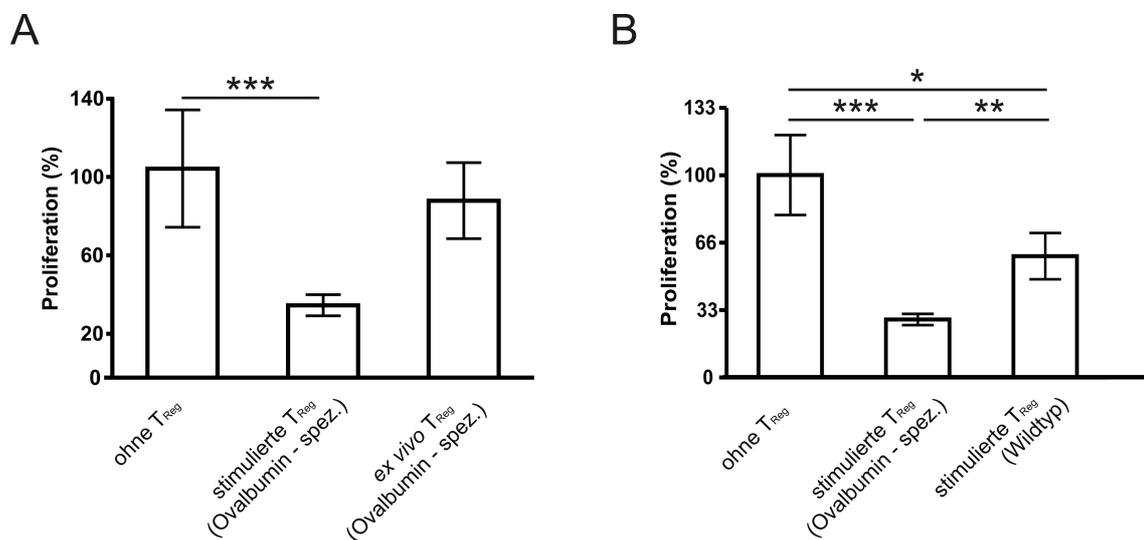


Abbildung 12: Suppressive Kapazität der *in vitro* stimulierten T_{Reg} *in vivo*

Naive Ovalbumin-spezifische T-Zellen wurden mit CFDA-SE markiert, in Wildtyp Empfängertiere transferiert, zwei Tage später mittels Ovalbumin Vakzinierung aktiviert und die Proliferation nach weiteren vier Tagen analysiert. Als Maß für die Proliferation der naiven T-Zellen wurde die Teilung/Vorläuferzelle ohne T_{Reg} Transfer bestimmt (100%) und die Proliferation der weiteren Gruppen darauf bezogen (siehe Material und Methoden). Zunächst erhielten die Empfängertiere *ex vivo* isolierte Ovalbumin-spezifische T_{Reg} (N=5), mit αCD3, αCD28, IL-2 und APZ *in vitro* drei Tage stimulierte Ovalbumin-spezifische T_{Reg} (N=5) oder keinen Zelltransfer (N=5) (A). In einem weiteren Versuchsteil wurde die Proliferation ohne Transfer von T_{Reg} (N=5) mit der von Gruppen verglichen, bei denen stimulierte Ovalbumin-spezifische T_{Reg} (N=3) oder stimulierte Wildtyp T_{Reg} (N=3) transferiert wurden. [Der *in vivo* Suppressionsassay wurde in Kooperation mit Susan Brandenburg durchgeführt]. (*P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,005).

Aus den ersten Arbeiten mit Wildtyp T_{Reg} in diesem *in vivo* Suppressionsmodell war bereits bekannt, dass die Zytokine IL-10 und TGF- β kooperativ zur Suppression *in vivo* beitragen [37]. Daher wurden, um den Mechanismus der Suppression genauer zu charakterisieren, die Zytokine IL-10 und TGF- β mit Hilfe von i.p. applizierten Antikörpern neutralisiert.

Bei Blockade der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β *in vivo*, wurde die Suppression bei der Gruppe mit den stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} und bei der Gruppe mit den stimulierten Wildtyp T_{Reg} signifikant aufgehoben (Abb. 13). Der beschriebene kooperative Effekt von IL-10 und TGF- β bei der Suppression zeigte sich auch in diesen Versuchen, so konnten bei alleiniger Blockade von IL-10 nur wesentlich geringere Effekte beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei den *in vitro* stimulierten Wildtyp T_{Reg} wurde die Suppression der Proliferation ausschließlich durch IL-10 und TGF- β vermittelt (Abb. 13). Wurden Ovalbumin-spezifische T_{Reg} verwendet, so konnte eine stärkere suppressive Aktivität beobachtet werden, welche auf zytokinunabhängige Effekte zurückzuführen ist (Abb. 13).

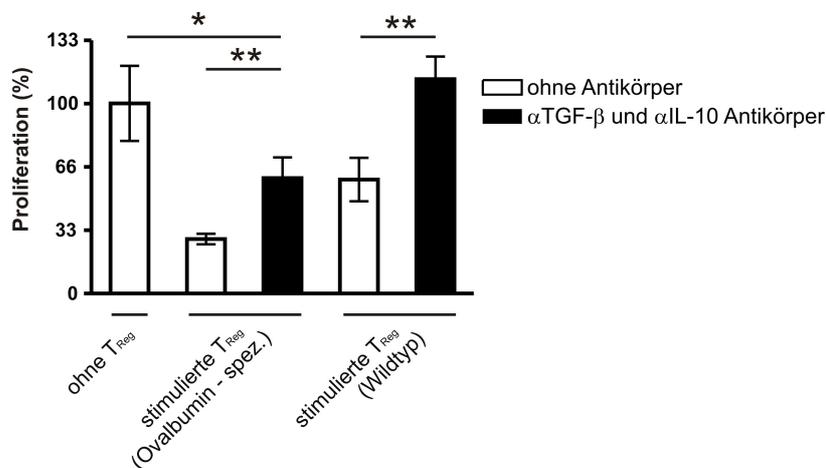


Abbildung 13: Zytokin-Abhängigkeit der *in vivo* vermittelten Suppression

Nach Transfer von CFDA-SE markierten Ovalbumin-spezifischen naiven T-Zellen wurden diese zwei Tage später mittels Ovalbumin Vakzinierung aktiviert und deren Proliferation nach weiteren vier Tagen analysiert. Die angegebene Proliferation (Bestimmung der Proliferation siehe Material und Methoden) bezieht sich jeweils auf die Proliferation in der Gruppe ohne T_{Reg} (100%). Es wurden Ovalbumin-spezifische T_{Reg} und Wildtyp T_{Reg} *in vitro* mit α CD3, α CD28, IL-2 und APZ drei Tage stimuliert und vor der Vakzinierung transferiert. Bei der Hälfte der sechs Tiere wurden vor Transfer der T_{Reg} neutralisierende α IL-10 und α TGF- β Antikörper i.p. appliziert. Die Gruppenstärke ohne Transfer von T_{Reg} betrug fünf Tiere pro Gruppe. [Der *in vivo* Suppressionsassay wurde in Kooperation mit Susan Brandenburg durchgeführt] (*P < 0,05 ; **P < 0,01).

Eine mögliche Erklärung für die antigenspezifischen Effekte ist, dass sowohl die naiven T-Zellen als auch die bereits *in vitro* stimulierten T_{Reg} *in vivo* von denselben DZ stimuliert werden. An den DZ können die T_{Reg} die Aktivierung und die Proliferation der naiven T-Zellen durch die Konkurrenz um Bindungsstellen oder im Rahmen einer Modulation der DZ beeinflussen [100].

Zusammenfassend zeigte die Analyse der Suppression naiver T-Zellen *in vivo*, dass eine *in vitro* Stimulation der T_{Reg} absolute Voraussetzung für eine effektive Suppression ist. Diese Suppression wurde durch die Zytokine IL-10 und TGF- β vermittelt, wobei diese bei antigenspezifischen T_{Reg} von weiteren Mechanismen ergänzt wurde.

4.3.3 Suppression von Effektor T-Zellen *in vivo*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die *in vitro* stimulierten T_{Reg} *in vitro* und *in vivo* die Proliferation von naiven T-Zellen inhibieren konnten, wurde deren suppressive Kapazität auf bereits differenzierte Effektor T-Zellen untersucht. Dies war insbesondere deshalb von Interesse, da die Effektor T-Zellen bei vielen Erkrankungen die schädlichen Effekte vermitteln.

Für die Analyse der Suppression von Effektor T-Zellen wurde eine DTH (*delayed-type hypersensitivity*) Reaktion als Modell für eine T_{H1} vermittelte Entzündungsreaktion gewählt [101]. In diesem Modell wurden Ovalbumin-spezifische CD4⁺ T-Zellen *in vitro* zu T_{H1} Zellen polarisiert und in Empfängertiere transferiert. Am darauf folgenden Tag erfolgte eine Ovalbumin-spezifische Stimulation der T_{H1} Zellen mittels einer, in die Fußsohle der Tiere applizierten Lösung von Ovalbumin-Peptid, in inkompletem Freundem Adjuvans. Die im Rahmen einer Entzündungsreaktion auftretende Schwellung des Fußes wurde als ein Maß für die Stärke der Immunreaktion täglich gemessen. Ein Ko-Transfer von T_{Reg} ermöglichte es, deren suppressive Kapazität auf die T_{H1} polarisierten Effektor T-Zellen anhand der gemessenen Schwellung zu beurteilen [37;102;103].

Zunächst wurde die suppressive Kapazität von *in vitro* stimulierten Wildtyp T_{Reg} untersucht, welche die Proliferation von naiven T-Zellen *in vitro* und *in vivo* signifikant inhibieren konnten (siehe 4.3.1 und 4.3.2). Diese Wildtyp T_{Reg} sind insbesondere deshalb interessant, weil sie beim Menschen leichter zu gewinnen wären und ferner das auslösende Antigen bei vielen Autoimmunreaktionen nicht bekannt ist.

Am ersten Tag nach Induktion der DTH ist bei allen Tieren aufgrund der ausgeprägten Entzündungsreaktion eine deutliche Schwellung der Füße messbar (Abb.14). Im Vergleich zu der Gruppe ohne T_{Reg} Transfer wurde am zweiten und dritten Tag eine geringere Schwellung bei der Gruppe mit den stimulierten Wildtyp T_{Reg} gemessen (Abb. 14). Diese beobachtete Reduktion der Schwellung war äußerst gering und erwies sich in zwei unabhängigen Versuchen jeweils als statistisch nicht signifikant. Offenbar ist eine bystander Suppression nicht ausreichend, um differenzierte Effektor T-Zellen zu supprimieren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der *in vivo* Suppression von naiven T-Zellen ist auch im DTH Modell keine signifikante Suppression nach Transfer von unbehandelten *ex vivo* isolierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} oder Wildtyp T_{Reg} messbar.

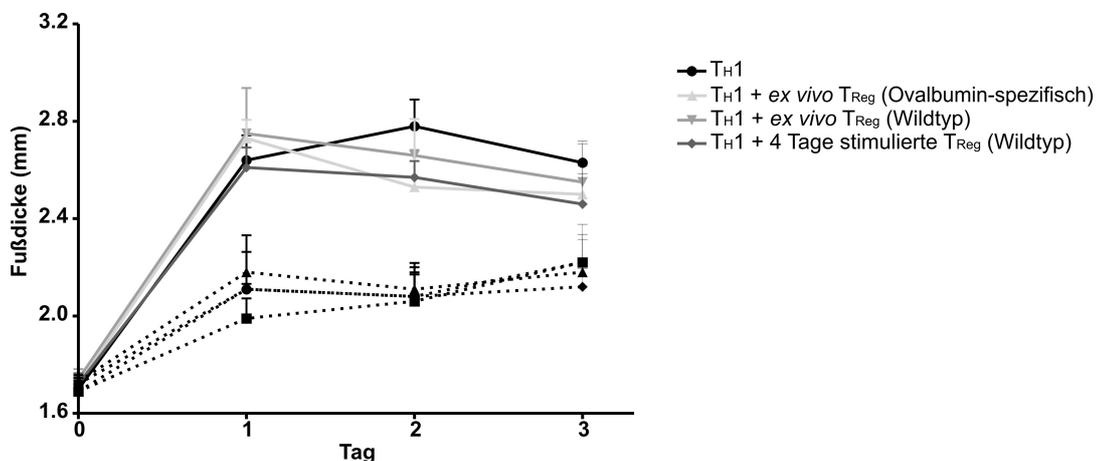


Abbildung 14: Analyse der suppressiven Kapazität von *in vitro* stimulierten Wildtyp T_{Reg}

In vitro generierte Ovalbumin-spezifische T_{H1} polarisierte Zellen wurden alleine oder mit den zu untersuchenden T_{Reg} in Empfängertiere transferiert. Am darauf folgenden Tag wurde eine DTH mittels Ova/IFA Injektion in einen Fuß ausgelöst (–), als Kontrolle diente eine PBS/IFA Applikation in den anderen Fuß (···). Die Dicke der Füße wurde täglich gemessen. Neben dem alleinigen Transfer von T_{H1} Zellen (N=5) wurde ein Kotransfer von T_{H1} und mit $\alpha CD3$, $\alpha CD28$, IL-2, IL-4 und APZ *in vitro* drei Tage stimulierten Wildtyp T_{Reg} (N=5), *ex vivo* isolierten Wildtyp T_{Reg} (N=5) oder *ex vivo* isolierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} (N=5) untersucht. [Die Versuche wurden in Kooperation mit Marko Janke durchgeführt.]

Da der Transfer von *in vitro* stimulierten Wildtyp T_{Reg} die Entzündungsreaktion nicht signifikant supprimieren konnte, wurden nun die *in vitro* stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} untersucht, welche in dem *in vivo* Suppressionmodell für naive T-Zellen die Proliferation stärker supprimieren konnten. Aus früheren Versuchen der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass bereits 1 Tag stimulierte Ovalbumin-spezifische T_{Reg} im DTH Modell die Entzündungsreaktion effektiv unterdrücken können.

Vergleicht man die *in vitro* Induktion von IL-10 nach einem und vier Tagen Stimulation, so fiel diese bei den 1 Tag stimulierten T_{Reg} deutlich geringer aus. Hier exprimierten, ähnlich wie bei der bereits beschriebenen Kinetik (4.2.2), nur ca. 5% der T_{Reg} IL-10 bei PMA/Ionomycin Restimulation, während es bei den 4 Tagen stimulierten T_{Reg} mit ca. 25% etwa 5mal so viele waren (Abb. 15A).

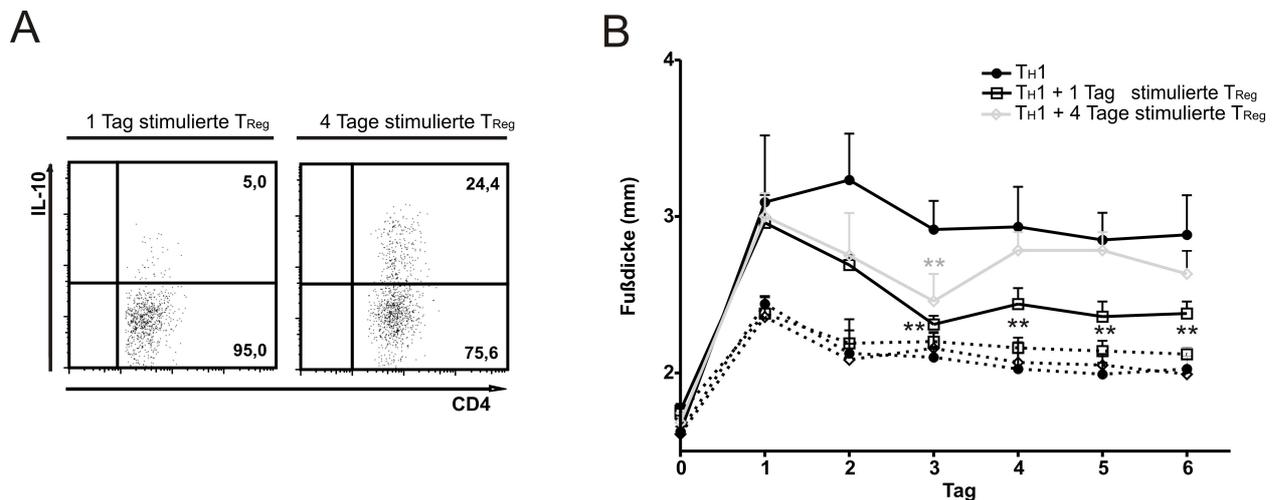


Abbildung 15: Suppressive Kapazität von *in vitro* stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg}

Ovalbumin-spezifische T_{Reg} wurden entweder einen Tag mit immobilisierten αCD3 und IL-2 *in vitro* stimuliert oder für vier Tage mit αCD3, αCD28, IL-2, IL-4 und APZ *in vitro* stimuliert. Anschließend wurde die Frequenz an IL-10 produzierenden T_{Reg} bei Restimulation mit PMA/Ionomycin bestimmt (A).

Die stimulierten T_{Reg} wurden zusammen mit *in vitro* generierten Ovalbumin-spezifischen T_H1 Zellen in Empfängertiere transferiert. Am darauf folgenden Tag wurde eine DTH mittels Ova/IFA Injektion in einen Fuß ausgelöst (–), als Kontrolle wurde PBS/IFA in den anderen Fuß appliziert (···). Die Dicke der Füße wurde täglich gemessen. Die Gruppenstärke betrug sechs Tiere pro Gruppe. [Die DTH Versuche wurden in Kooperation mit Marko Janke durchgeführt.]

(***P* < 0,01; 4 Tage stimuliert T_{Reg} vs. T_H1; ***P* < 0,01; 1 Tag stimuliert T_{Reg} vs. T_H1)

Sowohl die 1 Tag als auch die 4 Tage stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} waren in der Lage die Schwellung am zweiten und dritten Tag der Messung stark zu reduzieren. Während die Schwellung bei den Tieren der Gruppe mit den 1 Tag stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} auch die folgenden Tage auf einem vergleichsweise geringem Niveau blieb, stieg die Schwellung bei der Gruppe mit den 4 Tage stimulierten T_{Reg} wieder an. Die gemessene Schwellung der Füße bei den Tieren, welche einen Transfer von 4 Tagen stimulierten T_{Reg} erhalten hatten, erreichte am vierten Tag der Messung das Niveau der Tiere, welche gar keine T_{Reg} erhalten hatten und veränderte sich an den darauf folgenden Tagen nicht mehr (Abb.15B).

Die Tatsache, dass die 1 Tag stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} , von denen bei Transfer ein signifikant geringerer Anteil das Potential IL-10 zu exprimieren besaß, die Entzündung länger unterdrückten, erschien zunächst ungewöhnlich. Eine mögliche Erklärung für den Verlust der suppressiven Kapazität von den 4 Tage stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} ist, dass die Suppression in diesem Modell nur initial von IL-10 abhängig war und die Suppression zu späteren Zeitpunkten von anderen Mechanismen dominiert wurde.

Um dies zu untersuchen, wurden die 1 Tag stimulierten T_{Reg} gewählt, welche eine starke Suppression über den gesamten Versuchszeitraum gezeigt hatten und es wurde bei einigen Tieren IL-10 mittels eines applizierten Antikörpers neutralisiert.

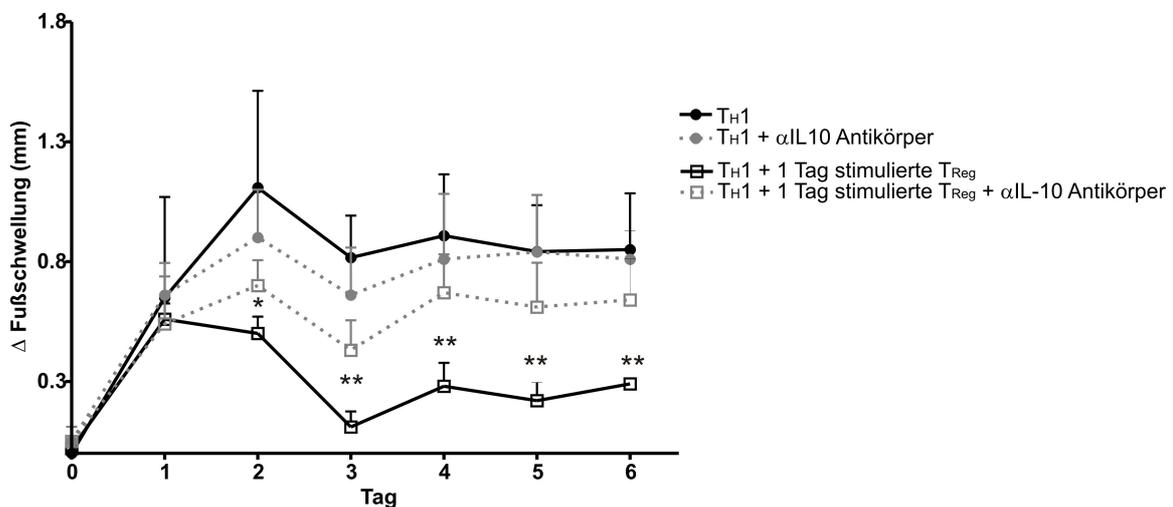


Abbildung 16: IL-10 Abhängigkeit der T_{Reg} vermittelten Suppression von Effektor T-Zellen

In vitro polarisierte Ovalbumin-spezifische T_{H1} Zellen wurden allein oder zusammen mit einen Tag mit immobilisierten $\alpha CD3$ und IL-2 *in vitro* stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} in Empfängertiere transferiert. Bei einigen Tieren wurde ein $\alpha IL-10$ Antikörper i.p. appliziert. Am darauf folgenden Tag wurde eine DTH mittels Ova/IFA Injektion ausgelöst, als Kontrolle wurde PBS/IFA appliziert. Dargestellt ist die Fußschwellung (Fußdicke Ova/IFA – Fußdicke PBS/IFA). Die Gruppenstärke betrug jeweils 6 Tiere pro Gruppe. [In Kooperation mit Marko Janke durchgeführt.] (T_{Reg} vs. T_{Reg} mit $\alpha IL-10$: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$)

Bei den Tieren, bei denen IL-10 neutralisiert wurde, war ein signifikanter Anstieg der Fußschwellung bereits am zweiten Tag der Messung zu beobachten (Abb.16). Diese stärkere Reaktion konnte auch an den weiteren Tagen gemessen werden. Die alleinige Gabe der IL-10 Antikörper ohne Transfer von T_{Reg} hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Entzündungsreaktion, was nahe legte, dass das IL-10, welches die Suppression größtenteils vermittelte, von den transferierten T_{Reg} stammte (Abb.16).

Diese Ergebnisse widerlegen die Hypothese, dass die Suppression in der DTH in der späten Phase weniger stark von IL-10 anhängig ist. Eine weitere mögliche Erklärung für die nachlassende suppressive Kapazität der 4 Tage stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} ist, dass die Stimulation der T_{Reg} über 4 Tage *in vitro* und die erneute Aktivierung *in vivo* zu stark sind und damit zur Inaktivierung oder Eliminierung der T_{Reg} beitragen [104;105]. Diese Hypothese konnte nicht überprüft werden, da eine Detektion und Analyse der transferierten T_{Reg} in den Empfängertieren aufgrund der geringen Anzahl an transferierten Zellen nicht möglich war.

Insgesamt zeigte die Analyse der Suppression von Effektor T-Zellen *in vivo*, dass auch in diesem Modell eine *in vitro* Stimulation eine essentielle Voraussetzung für die T_{Reg} vermittelte Suppression im Transfermodell ist. Im Gegensatz zu den Versuchen, bei denen die Suppression von naiven T-Zellen *in vivo* untersucht wurde, waren nur die *in vitro* stimulierten Ovalbumin-spezifischen T_{Reg} , nicht aber die Wildtyp T_{Reg} , in der Lage die DTH effektiv zu supprimieren.

5. DISKUSSION

Ist das immunologische Gleichgewicht zwischen effektor und regulatorischen Zellen gestört, können u.a. chronisch entzündliche Erkrankungen auftreten. Eine mögliche Option zur Wiederherstellung des Grundzustandes ist, das Gewicht der regulatorischen Zellen zu stärken. Interessanter Weise ist für viele derzeit verwendeten Medikamente ein solcher Effekt auf die T_{Reg} beschrieben. So konnte für das Basistherapeutikum Glatirameracetat zur Behandlung der Multiplen Sklerose (MS) gezeigt werden, dass es die Entstehung von Foxp3^+ T_{Reg} induziert [106]. Auch eine Behandlung mit Glukokortikoiden führt bei Asthma Patienten zu einer erhöhten Foxp3 und IL-10 Expression [107]. Schließlich sei noch Infliximab erwähnt, welches zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird und zu einer Induktion von Foxp3^+ T_{Reg} führt [68]. Trotz dieser Erfolge ermöglichen diese Medikamente keine Heilung und sind mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen verbunden.

In dieser Arbeit sollte als mögliche Alternative eine *in vitro* Stimulation von T_{Reg} unter Aktivierung der Effektorfunktion von regulatorischen T-Zellen untersucht werden. Als ein funktionell relevantes Effektormolekül wurde das Interleukin-10 (IL-10) gewählt, um anhand dieses Parameters die Kulturbedingungen zur Induktion der Effektorkapazität der regulatorischen T-Zellen zu optimieren. Mit Hilfe solcher aktivierten T_{Reg} könnten die chronisch aktivierten Effektorzellen unterdrückt werden und damit dem Körper eine Regeneration mit erfolgreicher Wiedereinstellung des immunologischen Gleichgewichts ermöglicht werden. Im Vergleich zu den bisher eingesetzten Medikamenten könnten spezifische regulatorische T-Zellen eine langfristige und nebenwirkungsarme Suppression vermitteln.

5.1 Induktion von IL-10 bei der *in vitro* Stimulation von T_{Reg}

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass den Zytokinen IL-10 und TGF- β bei der T_{Reg} vermittelten Suppression eine entscheidende Rolle zukommt (Übersichtsarbeit [108]). Eine Induktion dieser Zytokine *in vitro* könnte dazu beitragen, dass die T_{Reg} *in vivo* eine stärkere suppressive Kapazität aufweisen. Bei Experimenten, in denen der Mechanismus der Suppression durch T_{Reg} untersucht wurde, konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass IL-2 zur Induktion von IL-10 *in vitro* beiträgt [35]. Mit Hilfe dieses etablierten Stimulationsassays [35] konnte in der vorliegenden

Arbeit durch Zugabe oder Blockade einzelner Faktoren deren Potential zur Induktion von IL-10 weiter untersucht werden. Dies ermöglicht ein Screening von Faktoren und somit eine Etablierung eines effektiven Protokolls zur *in vitro* Induktion von IL-10 in T_{Reg} . Obwohl von den *in vitro* Ergebnissen nicht direkt auf die induzierenden Faktoren *in vivo* geschlossen werden kann, erhält man zumindest Kandidaten, welche in Folgeexperimenten in funktionellen Tiermodellen gezielt analysiert werden können.

5.1.1 Bedeutung von kostimulatorischen Signalen

Wurden bei der *in vitro* Stimulation Antigenpräsentierende Zellen (APZ) verwendet, so konnten im Vergleich zur Stimulation mit immobilisierten Antikörpern stets signifikant höhere Frequenzen an IL-10 produzierenden T_{Reg} induziert werden. Dies führte zu der These, dass die APZ über Oberflächenmoleküle oder über Zytokine weitere kostimulatorische Signale liefern. In dieser Arbeit wurde die Kostimulation über CD28 untersucht, welche bei den T_{Reg} essentiell für die Entstehung, Homöostase [77] und wohl auch für die Expansion der T_{Reg} [78] ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kostimulation über CD28 zu einer signifikanten Induktion von IL-10 in T_{Reg} führt. Dies deckt sich mit Publikationen zur Rolle von CD28 bei humanen T_{Reg} , bei denen gezeigt werden konnte, dass nur die Kostimulation über CD28 zur Erhaltung der suppressiven Funktion *in vitro* und *in vivo* beiträgt [79]. Bei diesen Experimenten mit humanen T_{Reg} hatten die kostimulatorischen Moleküle ICOS, OX40, CD27, 4-1BB und CD40L keinen Einfluss auf die suppressive Kapazität der T_{Reg} [79]. In Übereinstimmung mit diesen publizierten Daten, führte die Kostimulation über ICOS auch im verwendeten Assay ebenfalls zu keiner signifikant gesteigerten Induktion von IL-10.

5.1.2 Bedeutung des Notch-Signalwegs

Die Notch-Proteine sind evolutionär stark konservierte Typ-I Transmembranrezeptoren. Die Interaktion von den Liganden mit dem Notchrezeptor führt zur Abspaltung einer intrazellulären Domäne, welche die Transkription verschiedener Gene reguliert. Der Notch Signalweg ist an der Regulation von Zelldifferenzierungsprozessen beteiligt und eine Fehlregulierung wird u.a. mit der Genese der T-Zellleukämie und soliden Tumoren in Verbindung gebracht [109].

Sowohl für T_{R1} und T_{H1} Zellen konnte gezeigt werden, dass der Notch Signalweg an der Regulation der Expression von IL-10 beteiligt ist [87;89;90].

In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss des Notch-Signalwegs auf die Induktion von IL-10 in T_{Reg} untersucht. In T_{Reg} führte eine retrovirale Überexpression von Notch zu einer signifikanten Induktion von IL-10. Dies zeigt, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs in T_{Reg} zur Induktion beitragen kann. Inwieweit dies auch im Rahmen einer physiologischeren Stimulation der Notchrezeptoren über die Notchliganden auf APZ der Fall ist, wurde in einem weiteren Versuchsteil untersucht. Hierbei wurde, um den Anteil des Notch-Signalwegs an der Induktion zu beurteilen, dieser Signalweg mit Hilfe eines Inhibitors in einigen Proben blockiert. Bei den durchgeführten Experimenten hatte die Blockade des Notch-Signalwegs in den T_{Reg} keinen signifikanten Einfluss auf die IL-10 Expression.

Um den Einfluss des Notch-Signalwegs auf die Zytokininduktion bei T_{Reg} weiterführend zu untersuchen, könnten T_{Reg} aus Knockout (KO) Mäusen verwendet werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die IL-10 Induktion in T_{Reg} aus RBP-J κ KO Mäusen, bei denen die Notch Signaltransduktion unterbunden ist, mit der bei Wildtyp Mäusen zu vergleichen.

5.1.3 Bedeutung von Zytokinen

Aus den Experimenten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass vor allem IL-2 an der Induktion von IL-10 in T_{Reg} beteiligt ist [35]. Für IL-4 wurde eine verstärkende Wirkung auf die IL-2 abhängige Induktion von IL-10 beschrieben [35]. Für die Zytokine IL-7, IL-9 und IL-15, welche wie IL-2 und IL-4 ebenfalls Signale über die γ -Kette des IL-2 Rezeptors vermitteln, konnten keine signifikanten Effekte auf die Induktion von IL-10 gezeigt werden (persönliche Mitteilung Maurus de la Rosa).

Ein Übergewicht an pro-inflammatorischen Zytokinen wird u.a. für den zerstörerischen Entzündungsprozess bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (RA), verantwortlich gemacht. Daher ist eine Option für die Behandlung auch die Blockade dieser Zytokine mit TNF- α Antikörpern (Adalimumab, Infliximab), löslichem TNF- α -Rezeptor (Etanercept) oder IL-1-Rezeptor-Antagonisten (Anakinra). Inwieweit die pro-inflammatorischen Zytokine neben der Unterhaltung der Entzündung auch auf die T_{Reg} wirken, ist noch nicht ausreichend beschrieben. Es gibt in der Literatur Hinweise, dass die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 die Sensitivität der T_{Reg} für IL-2 erhöhen [83]. Dies führte zu der These, dass man die Effekte von IL-2 in Hinblick auf die Induktion von IL-10, aber auch auf die Überlebensrate [110] mit Hilfe

dieser Zytokine steigern kann. Für das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α sind sowohl inhibitorische [67] als auch fördernde Effekte [111] auf die suppressive Kapazität der T_{Reg} beschrieben.

Im *in vitro* Assay hatte die Gabe der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-6, welche im entzündeten Gewebe in hohen Konzentrationen gebildet werden, keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion von IL-10 in T_{Reg}. Möglicherweise entfalten diese Zytokine ihre Wirkung hauptsächlich über andere Mechanismen oder andere Immunzellen. So fördert IL-6 in Anwesenheit von TGF- β auch im entzündeten Gelenk die Differenzierung der stark inflammatorisch wirkenden T_H17 Zellen [69]. Ferner konnte gezeigt werden, dass T_{Reg} mittels Shedding den TNF-Rezeptor II von der Zelloberfläche schneiden können [85] und somit ähnlich, wie beim therapeutisch eingesetzten Infliximab, sekretiertes TNF- α neutralisieren können. Da nicht beliebig viele Rezeptoren mittels Shedding abgeschnitten werden können, ist die Wirkung dieses Mechanismus bei längeren Entzündungen sicherlich nicht mehr effektiv. Die Behandlung mit dem TNF- α Antikörper Infliximab führte ferner in klinischen Studien zu einem Anstieg von CD4⁺CD25^{high} T-Zellen, welche mit Hilfe der Zytokine TGF- β und IL-10 supprimieren [68].

Auf Grundlage dieser Studien wäre es interessant den Effekt von Infliximab auf die Induktion von IL-10 bei der *in vitro* Stimulation der T_{Reg} genauer zu untersuchen. Da vermutlich nur sehr wenige Zellen in diesem *in vitro* System TNF- α exprimieren, ist ein drastischer Effekt von Infliximab *in vitro* jedoch nicht sehr wahrscheinlich.

5.1.4 Bedeutung weiterer untersuchter Faktoren

Toll Like Rezeptoren (TLR) erkennen konservierte molekulare Muster auf Bakterien, Viren und Pilzen. Die Liganden dieser TLR können sowohl Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems aktivieren. Für die TLR Liganden LPS (TLR4) [81] und Flagellin (TLR5) [82] wurde ein verstärkender Effekt auf die suppressive Kapazität der T_{Reg} gezeigt. Im verwendeten *in vitro* Assay hatten diese TLR Liganden keinen Effekt auf die *in vitro* Induktion von IL-10 in den T_{Reg}. In Übereinstimmung damit waren die T_{Reg} von MyD88^{-/-} Mäusen, bei denen ein wichtiger Faktor der TLR Signaltransduktion nicht exprimiert werden kann, ebenso suppressiv wie Wildtyp T_{Reg} (persönliche Mitteilung Susan Brandenburg). Sofern die TLR Liganden signifikante Einflüsse auf die T_{Reg} ausüben, so wirken sich diese vermutlich nicht auf die IL-10

Expression aus. Wahrscheinlich sind die Hauptziele der TLR Liganden eher die APZ, so dass die Effekte auf die T_{Reg} von indirekter Natur sind.

Weitere Arbeiten zeigen, dass IL-10 produzierende $CD4^+$ T-Zellen *in vitro* durch repetitive Stimulation in Anwesenheit von Vitamin D3 und Dexamethasone induziert werden können [112]. Eine Stimulation von T_{Reg} in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen Vitamin D3 und Dexamethasone führte im verwendeten Assay über 4 Tage zu keiner erhöhten Induktion von IL-10 (Daten nicht gezeigt). Der Hauptgrund hierfür ist vermutlich, dass die viertägige Stimulation zu kurz war, um einen Effekt zu beobachten. Auf eine längere Stimulation wurde aufgrund der sinkenden Frequenz an $Foxp3^+$ Zellen im Laufe der Stimulation (siehe hierzu 5.2) verzichtet. Sofern die Proliferation der $Foxp3^+$ T-Zellen in diesem *in vitro* System begrenzt werden kann (siehe dazu auch 5.2), wäre eine Stimulation der T_{Reg} über mehrere Zyklen mit Dexamethasone äußerst interessant, da bei der Behandlung mit Glukokortikoid *in vivo* schon gezeigt werden konnte, dass dies zu einer erhöhten Expression von $Foxp3$ und IL-10 führt [107].

5.1.5 Analyse von T_{Reg} Subpopulationen

Subpopulationen mit spezifischen Eigenschaften bieten eine Reihe von Vorteilen. So könnten z.B. nur spezielle T_{Reg} Subpopulationen, welche ein hohes Potential besitzen IL-10 zu exprimieren, *in vitro* behandelt werden. Ferner könnten T_{Reg} mit einem günstigen Migrationsverhalten zu den entzündeten Geweben eingesetzt werden.

Anhand der Expression des Integrin $\alpha_E\beta_7$ wurde erstmals eine Subpopulation von T_{Reg} mit einem Effektor/Gedächtnis-ähnlichen Phänotyp beschrieben [113]. Diese $\alpha_E^+CD25^+$ T_{Reg} zeigten bei der Analyse *ex vivo* eine stärkere Expression von IL-10 [113]. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Stimulation konnte gezeigt werden, dass nach der *in vitro* Stimulation die Frequenz an IL-10 produzierenden T_{Reg} bei den $\alpha_E^+CD25^+$ T_{Reg} ungefähr doppelt so hoch war wie bei den $\alpha_E^-CD25^+$ T_{Reg} . Neben dem erhöhten Potential IL-10 zu exprimieren, ist auch beschrieben, dass die $\alpha_E^+CD25^+$ T_{Reg} effektiv zu entzündeten Stellen migrieren und dort stark suppressiv sind [93], so dass sich durch Verwendung dieser Zellen die Anzahl der transferierten T_{Reg} reduzieren ließe.

Bei den $\alpha_E^+CD25^+$ T_{Reg} konnte ferner eine stärkere Expression von ICOS gezeigt werden [113]. Das kostimulatorische Molekül ICOS befindet sich v.a. auf $CD4^+$ T-Zellen

mit einem erhöhten Potential IL-10 zu exprimieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei den ICOS⁺ T_{Reg}-Zellen überwiegend um Foxp3⁺ T_{Reg} handelt. Die Induktion von IL-10 in diesen T_{Reg} erfolgt jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach nicht durch eine Kostimulation über ICOS. Vielmehr scheint ICOS ein Aktivierungsmarker für T_{Reg} zu sein und ist damit vornehmlich auf T_{Reg} vorhanden, welche das Potential besitzen IL-10 zu exprimieren. Im Vergleich zur Stimulation von α_E^+ T_{Reg} *in vitro* erwies sich die Stimulation von ICOS⁺ T_{Reg} als wesentlich effektiver bei der Induktion von IL-10. Inwieweit die ICOS⁺ T_{Reg} ebenfalls effektiv in entzündete Gewebe migrieren wie die α_E^+ T_{Reg}, muss noch näher untersucht werden. Funktionelle Arbeiten in einem Maus Diabetes-Modell weisen darauf hin, dass ICOS⁺CD4⁺CD25⁺ Zellen in den Läsionen im Pankreas eine Autoimmunreaktion mit Hilfe von IL-10 unterbinden [92].

Die gezeigte erhöhte Induktion von IL-10 bei der *in vitro* Stimulation von ICOS⁺ T_{Reg} oder α_E^+ T_{Reg} zeigt, dass der Einsatz dieser Subpopulation eine Alternative zu den verwendeten, nicht weiter untergliederten CD4⁺CD25⁺ sortierten T_{Reg} sein könnte.

5.2 Reinheit und Expansion der *in vitro* stimulierten T_{Reg}

Eine wichtige Voraussetzung für adoptive Zelltransfers ist die Reinheit der sortierten und expandierten T_{Reg}. Die Sortierung der T_{Reg} erfolgte in dieser Arbeit anhand der konstitutiven Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25). Jedoch können auch naive T-Zellen nach Aktivierung auf ihrer Oberfläche CD25 exprimieren. Von diesen aktivierten T-Zellen können die T_{Reg} anhand des spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 unterschieden werden [25;114].

Analysen von T_{Reg} aus sekundären lymphatischen Organen zeigten, dass ca. 95% der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen Foxp3 exprimieren und somit einen T_{Reg} Phänotyp aufweisen. Bei der durchgeführten Stimulation der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen *in vitro* expandierten die aktivierten (Foxp3⁻) T-Zellen stets stärker als die T_{Reg}. Dieser Effekt war insbesondere dann evident, wenn der *in vitro* Kultur kein rekombinantes IL-2 hinzugefügt wurde. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass bei den T_{Reg} der Transkriptionsfaktor Foxp3 die Expression von IL-2 reprimiert [28] und somit eine autokrine Stimulation nicht möglich ist. Somit ist für den Erhalt und die Expansion der T_{Reg} essentiell, dass andere Zellen ihnen IL-2 zur Verfügung stellen. Diese entscheidende Rolle von IL-2 bei der

Homöostase von T_{Reg} wurde bereits bei Experimenten mit Knockout Mäusen [34] und durch experimentelle Untersuchungen *in vivo* belegt [115].

Wurde IL-2 der *in vitro* Kultur hinzugefügt, konnte eine effektive Expansion der T_{Reg} beobachtet werden. Wurde zusätzlich zu IL-2 auch IL-4 hinzugefügt, so wurde eine geringere Frequenz an Foxp3^+ T-Zellen detektiert. Eine mögliche Erklärung für den stärkeren Abfall an Foxp3^+ Zellen bei Zugabe von IL-4 ist, dass IL-4 über die Aktivierung von STAT6 eine $T_{\text{H}2}$ ähnliche Differenzierung begünstigt [116], während IL-2 alleine hauptsächlich über die Aktivierung von STAT5 die Proliferation der T_{Reg} fördert [94]. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte unter dem Einfluss von IL-4 eine stärkere Induktion von IL-10 beobachtet werden. Die geringere Reinheit und die stärkere Frequenz an IL-10⁺ Zellen bei Gabe von IL-4 kann auch damit erklärt werden, dass IL-4 die Induktion von weiteren Foxp3^+ T-Zellen inhibieren kann und die Entstehung von IL-10⁺ Foxp3^- T-Zellen begünstigt [117]. Es ist ferner beschrieben, dass in T_{Reg} Subpopulationen der $T_{\text{H}2}$ Transkriptionsfaktor IRF4 exprimiert wird und dass diese T_{Reg} möglicherweise an der Suppression von $T_{\text{H}2}$ Antworten beteiligt sein können [118]. Insofern könnten unter $T_{\text{H}2}$ ähnlichen Bedingungen *in vitro* stimulierte T_{Reg} besonders interessant für $T_{\text{H}2}$ dominierte Erkrankungen, wie den Allergien, sein.

Die abnehmende Frequenz der Foxp3^+ T_{Reg} bei Stimulation *in vitro* limitiert natürlich die mögliche Stimulationsdauer. Neueste Arbeiten zeigen, dass Rapamycin (Sirolimus) die Proliferation der Foxp3^- T-Zellen *in vitro* begrenzen kann und ähnliche Effekte auch *in vivo* zeigt [119]. Ob Rapamycin unter den gewählten Bedingungen ebenfalls zu einer Verbesserung der Reinheit führt und ferner die Induktion von IL-10 nicht beeinflusst, müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Eine verbesserte Reinheit würde eine Vielzahl von weiteren *in vitro* Experimenten ermöglichen. So wäre z.B. eine *in vitro* Analyse der Stabilität des induzierten IL-10 möglich, wie sie bei naiven T-Zellen beschrieben ist [120]. Ferner könnten längerfristige Protokolle, welche bei Foxp3^- T-Zellen zu einer IL-10 Induktion führten [121], auch bei den T_{Reg} untersucht werden.

5.3 Zytokinprofil der *in vitro* stimulierten T_{Reg}

In Vorbereitung auf die *in vivo* Experimente sollten die *in vitro* stimulierten T_{Reg} in Hinblick auf ihr Zytokinprofil charakterisiert werden. Hierbei musste insbesondere gewährleistet sein, dass es zu keiner signifikanten Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen im Rahmen der Stimulation kommt.

In Übereinstimmung mit der gängigen Literatur, konnten im Rahmen dieser Arbeit bei der Stimulation *ex vivo* isolierter CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nur sehr geringe Mengen an INF- γ , IL-4, IL-10 und IL-17 nachgewiesen werden. Diese geringe Zytokinexpression ist auf eine Repression von Zytokinen durch den T_{Reg} spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 zurückzuführen [28]. Bei ca. 5% der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen konnte eine Expression von IL-2 detektiert werden. Diese Frequenz korreliert mit der der kontaminierenden Foxp3⁻ aktivierten T-Zellen, welche bei der Anreicherung anfallen (Reinheit s. 5.2), und stammt vermutlich von diesen aktivierten T-Zellen.

Bei der Analyse der Zytokinexpression nach drei Tagen *in vitro* Stimulation wurde nur für IL-10 eine starke Induktion in den T_{Reg} beobachtet. Die Effektor-Zytokine INF- γ , IL-2, IL-4 oder IL-17 konnten, wie bei der Stimulation von T_{Reg} *ex vivo*, nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Zytokine auch in diesem Zusammenhang hauptsächlich von den wenigen kontaminierenden Foxp3⁻ T-Zellen stammen. Die geringe Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen bei signifikanter Induktion von IL-10 ist eine wichtige Voraussetzung für einen therapeutischen Einsatz dieser T_{Reg}.

Im Vergleich zur alleinigen Gabe von IL-2 konnte bei der Gabe von IL-2 und IL-4 eine deutlich gesteigerte IL-10 Expression beobachtet werden. Wie bereits im Abschnitt 5.2 dieser Arbeit diskutiert, wird spekuliert, dass unter T_{H2} polarisierenden Bedingungen T_{Reg} begünstigt werden könnten [118], welche sich insbesondere für die Suppression von T_{H2} Antworten eignen könnten. Sollte sich dies bestätigen, wäre es in diesem System relativ einfach solche polarisierten T_{Reg} unter Zugabe von geeigneten Zytokinen bei der *in vitro* Stimulation zu generieren.

5.4 Therapeutisches Potential von vorbehandelten T_{Reg}

Beim möglichen therapeutischen Einsatz von T_{Reg} ist die Notwendigkeit einer *in vitro* Stimulation und der Antigenpezifität der T_{Reg}, der Mechanismus der Suppression und weitere Parameter von entscheidender Bedeutung. Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern hierbei einige Hinweise und werden im Folgenden in diesem Kontext diskutiert.

5.4.1 Notwendigkeit einer *in vitro* Vorbehandlung

Bei Patienten mit refraktärer Colitis Ulzerosa hat sich eine Leukapherese zur Abtrennung der Leukozyten als wirksam erwiesen. In neuesten Arbeiten wurde ein Protokoll entwickelt, welches es ermöglicht T_{Reg} aus dem Leukaphereseprodukt abzutrennen [122]. Würde man, wie angedacht, diese T_{Reg} im Rahmen einer klinischen Phase I Studie retransferieren [123], so könnte man bei den Patienten das Verhältnis von T_{Reg} zu Effektor T-Zellen zugunsten der regulatorischen Zellen verschieben.

Eine solche alleinige Steigerung der Frequenz an regulatorischen T-Zellen wurde auch in dieser Dissertation mittels Transfer von *ex vivo* isolierten T_{Reg} untersucht. In den in dieser Arbeit untersuchten Tiermodellen (DTH und DNA Vakzinierung) konnten jedoch keine signifikanten Besserungen bei Transfer von unbehandelten T_{Reg} beobachtet werden. Berücksichtigt man jedoch, dass die T_{Reg} bei den angeregten klinischen Studien aus Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung gewonnen werden sollen, so besteht die Möglichkeit, dass ein Teil der T_{Reg} im Rahmen dieser Entzündung bereits aktiviert worden ist. Da diese T_{Reg} aber offensichtlich nicht in der Lage sind die Erkrankung unter Kontrolle zu bringen, ist eher davon auszugehen, dass ein alleiniger Retransfer allenfalls zu einer geringen Besserung führt.

Wesentlich günstiger auf die suppressive Kapazität der isolierten T_{Reg} erwies sich in dieser Dissertation eine *in vitro* Stimulation der T_{Reg} vor dem Retransfer. Diese *in vitro* Stimulation induzierte in den T_{Reg} vor allem das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, welches in dieser Arbeit im DTH Modell und bei der DNA Vakzinierung entscheidend an der Suppression beteiligt war. Somit scheint diese Behandlung besonders bei Therapie von entzündlichen Erkrankungen geeignet, bei denen eine essentielle Rolle von IL-10 nachgewiesen ist.

Bei einer *in vitro* Vorbehandlung von T_{Reg} zur therapeutischen Behandlung von Patienten müssen sehr strenge Maßstäbe an die Reinheit der T_{Reg} gestellt werden, um

zu vermeiden, dass sich die Situation durch den Transfer von aktivierten kontaminierenden Effektor T-Zellen möglicherweise verschlimmert. Die Entdeckung neuer Marker für T_{Reg}, wie die fehlende Expression des IL-7 Rezeptors und die mangelnde Expression von CD49d [124] ermöglichen es, die Reinheit der Sortierung in Zukunft weiter zu steigern. Ferner können neue Sortierungsstrategien, welche auf wenige Schritte beschränkt sind, die Gefahr einer Kontamination minimieren [125].

5.4.2 Optimierung der *in vitro* Vorbehandlung

Die Optimierung der Stimulationsbedingungen orientierte sich in dieser Arbeit an der Induktion des Effektorzytokins IL-10. Obwohl IL-10 in beiden *in vivo* Modellen maßgeblich zur Suppression beitrug (s. 5.4.4), deuten einige Ergebnisse darauf hin, dass die Stärke der Effektorkapazität von T_{Reg} nicht ausschließlich anhand der IL-10 Expression beurteilt werden kann.

Vorversuche bei dem DNA Vakzinierungsmodell zur Analyse der Suppression von naiven T-Zellen zeigten, dass T_{Reg}, welche mit IL-2 *in vitro* vorbehandelt waren, die Proliferation stärker supprimierten als T_{Reg}, welche mit IL-2 und IL-4 stimuliert wurden (Daten nicht gezeigt). Dies war unerwartet, da die Zugabe von IL-4 zu einer signifikant höheren Induktion von IL-10 führte. Leider konnte aufgrund der begrenzten Anzahl an zu untersuchenden Gruppen in den folgenden *in vivo* Versuchen keine weiteren Vergleiche vorgenommen werden.

Ein weiteres Indiz, dass IL-10 kein optimaler Indikator für die Stärke der suppressiven Kapazität ist, lieferte ferner die Stimulationsdauer. So wurde zunächst eine Stimulationsdauer von 3-4 Tagen favorisiert, da an diesen Tagen eine hohe Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} detektiert wurde. Jedoch zeigten die über diesen Zeitraum stimulierten T_{Reg} im DTH Modell, bei dem das Ausmaß einer Entzündungsreaktion über mehrere Tage beobachtet werden kann, nur über 3 Tage eine suppressive Aktivität. Eine längerfristige Suppression konnte bei der DTH jedoch mit einem Tag aktivierten T_{Reg} erzielt werden, obwohl die Frequenz an IL-10⁺ T_{Reg} zum Zeitpunkt des Transfers bei diesen signifikant geringer war. Inwieweit der Verlust der suppressiven Kapazität der drei Tage aktivierten T_{Reg} auf eine Inaktivierung, deren Tod oder auf andere Effekte zurückzuführen ist, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass weitere Faktoren nötig sind, um das suppressive Potenzial der *in vitro* stimulierten T_{Reg} bereits vor der *in vivo* Analyse

abzuschätzen zu können. Dies ist wichtig, da es nicht praktikabel ist T_{Reg} aus diversen Stimulationsbedingungen in den *in vivo* Modellen zu testen. Faktoren, die für diese Einschätzung besonderes geeignet erscheinen, sind das Effektorzytokin TGF- β sowie die Expression von geeigneten Homingmarkern, wie CD103 (αE).

5.4.3 Notwendigkeit einer erneuten T-Zellrezeptoraktivierung *in vivo*

Erste Studien beschreiben die T-Zellrezeptorstimulation als essentielle Voraussetzung bei der Aktivierung der T_{Reg} , während die T_{Reg} ihre Funktion weitestgehend über „bystander“ Mechanismen vermitteln [42;43]. In dieser Dissertation wurde die suppressive Kapazität von mittels DNA Vakzinierung aktivierten polyklonalen Wildtyp T_{Reg} mit der von antigenspezifischen T_{Reg} verglichen. In diesem Modell zur Suppression von naiven T-Zellen vermittelten die antigenspezifischen T_{Reg} eine deutlich stärkere Suppression. Es konnte gezeigt werden, dass dies darauf zurück zu führen ist, dass die antigenspezifischen T_{Reg} neben der Suppression über die Zytokine IL-10 und TGF- β auch über andere Mechanismen inhibierend wirken. Hier könnte zur Suppression beitragen, dass die T_{Reg} und die Effektor T-Zellen das gleiche Antigen auf einer APZ präsentiert bekommen. Die dadurch bedingte enge räumliche Nähe ermöglicht es den T_{Reg} die APZ bzw. die T-Effektorzellen direkt zu beeinflussen.

Auch im DTH Modell zur Suppression von Effektor T-Zellen gibt es Hinweise, dass antigenspezifische T_{Reg} eine stärkere suppressive Kapazität besitzen. Diese stärkeren suppressiven Effekte von antigenspezifischen T_{Reg} konnten auch in anderen Modellen beobachtet werden. So konnte in Studien zur Therapie von Typ I Diabetes gezeigt werden, dass antigenspezifische T_{Reg} bis zu 100 fach effektiver bei Vorbeugung des Diabetes, bei der Unterdrückung einer etablierten Erkrankung und bei der Verhinderung der Abstoßung von transplantierten Langerhansschen Inseln sind [126-128].

Weitere Untersuchungen im gewählten DTH Modell zur Suppression von Effektor T-Zellen zeigten ferner, dass nur die antigenspezifischen T_{Reg} eine langfristige Suppression gewährleisten, während die Suppression durch Wildtyp T_{Reg} nur wenige Tage anhält (persönliche Mitteilung Marko Janke). Vermutlich trägt die Antigenpezifität dazu bei, dass die T_{Reg} *in vivo* repetitiv aktiviert werden können und am Ort der Immunreaktion verbleiben. Da es für die kurzfristige Immunsuppression günstige Medikamente gibt, ist unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse eine Verwendung von polyklonalen T_{Reg} , die nur kurzzeitige Effekte vermitteln, derzeit nicht zu favorisieren.

Anzustreben ist vielmehr eine längerfristige Suppression mit antigenspezifischen T_{Reg} . Ein großer Vorteil beim Einsatz von antigenspezifischen T_{Reg} könnte ferner darin bestehen, dass eine unerwünschte bystander Suppression aller Immunreaktionen vermutlich nicht zustande kommt. So konnte im Modell zur allogenen Transplantation gezeigt werden, dass das Immunsystem auf eine virale Infektion reagieren konnte, während gleichzeitig die spezifische Toleranz des Transplantat erhalten blieb [129].

Die Isolierung solcher antigenspezifischen T_{Reg} stellt technisch eine große Herausforderung dar, könnte aber zum Beispiel über eine Tetramer basierte Sortierungsstrategie [130] realisiert werden. Alternativ könnten auch chimäre Rezeptoren in den $CD4^+CD25^+$ T-Zellen transgen exprimiert werden [131]. Solche chimären Rezeptoren bestehen aus einer Antigen-MHC extrazellulären Domäne und einer intrazellulären *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) Signaldomäne. Der Kontakt von T-Zellenrezeptoren von potentiell pathologischen antigenspezifischen T-Zellen mit der extrazellulären Antigen-MHC Domäne auf den T_{Reg} führt dann über die Aktivierung der intrazellulären Domäne zur Induktion der Effektorfunktion in den T_{Reg} .

An dieser Stelle sollte jedoch kritisch erwähnt werden, dass bei den meisten Autoimmunerkrankungen die an der Pathogenese beteiligten Antigene noch nicht ausreichend oder gar nicht beschrieben sind.

Alternativ könnte man auch Effektor T-Zellen, welche die Zielstruktur erkennen und zur Verschlimmerung der Erkrankung beitragen, mit Foxp3 transfizieren und so versuchen, sie in T_{Reg} zu konvertieren. Eine Induktion von IL-10 *in vitro* ist auch in diesen transfizierten T-Zellen möglich (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte gezeigt werden, dass sich die epigenetischen Muster von induzierten und natürlichen T_{Reg} unterscheiden [21] und ein solcher Ansatz daher mit erheblichen Sicherheitsbedenken verbunden ist.

5.4.4 Mechanismen der Suppression durch *in vitro* behandelte T_{Reg}

Betrachtet man die Literatur, so wird von verschiedenen Autoren aufgrund der experimentellen Ergebnisse eine Vielzahl von unterschiedlichen Mechanismen der Suppression postuliert (siehe Einleitung und Übersichtsarbeit [44]). Vermutlich tragen verschiedene Mechanismen zur Suppression bei, wobei sich deren Effekte addieren oder gar potenzieren können. Der Mechanismus der vermittelten Suppression ist für die

Auswahl der zu behandelnden Erkrankung und des daraus resultierenden Modells von entscheidender Bedeutung (siehe 5.4.5).

Die Vorbehandlung der T_{Reg} *in vitro* war darauf angelegt, möglichst effektiv die Expression von IL-10 zu induzieren. Dieses IL-10 war in beiden untersuchten *in vivo* Modellen im signifikanten Maße an der Suppression beteiligt. In Übereinstimmungen mit anderen Arbeiten [132] war IL-10 insbesondere bei der Suppression von etablierten Effektor T-Zellen im DTH Modell essentiell. Bei dem untersuchten Modell zur Suppression von naiven T-Zellen konnte ein additiver Effekt von IL-10 und TGF- β bei der Suppression gezeigt werden. Diese Beobachtung bestätigte erste Arbeiten unserer Arbeitsgruppe mit diesem Modell, bei denen diese Zytokinabhängigkeit der Suppression bei Applikation von IL-2 *in vivo* beobachtet wurde [37]. Dass die Behandlung mit IL-2 auch zur Induktion von TGF- β in T_{Reg} führt, konnte anhand der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Genexpressionsanalysen von T_{Reg} nach *in vivo* Applikation von IL-2 (Daten nicht gezeigt) und in anderen Arbeiten [34] gezeigt werden.

Zusätzlich zu der über IL-10 und TGF- β vermittelten Suppression konnten auch weitere, antigenspezifische Effekte beobachtet werden. Dies führt zu der Hypothese, dass vor allem den APZ eine zentrale Rolle bei der Entscheidung über die Stärke der Aktivierung zukommt. Da die APZ auch an der Aktivierung der Effektor T-Zellen beteiligt sind, ergibt sich somit eine Möglichkeit, die Aktivierung der Effektor T-Zellen mit der der T_{Reg} zu koordinieren und aufeinander abzustimmen. Eine Analyse der APZ, welche die Immunreaktion vermitteln, und ihrer Interaktion mit den T-Zellen wäre sicherlich von großer Bedeutung. Eine Möglichkeit die Interaktion *in vivo* zu untersuchen wäre die intravitale Mikroskopie [133]. Eine Analyse der *in vivo* beteiligten APZ wäre sicherlich äußerst interessant, jedoch sehr viel schwieriger zu bewerkstelligen.

5.4.5 Klinische Szenarien zur kurativen Behandlung

Da die Diagnose von entzündlichen Erkrankungen in der Regel nicht vor dem Auftreten von klinischen Symptomen erfolgt, ist eine präventive Therapie nicht möglich. Eine Ausnahme bildet hierbei die Transplantation, bei der bereits vor der Operation bekannt ist, dass es zu Abstoßungsreaktionen kommen kann. Hier könnte bei der Vorbereitung des Eingriffs eine Selektion und Manipulation von geeigneten T_{Reg} erfolgen. Erste Studien zur Behandlung von Transplantatrezipienten mit T_{Reg} sind bereits in der Vorbereitung [134].

Bei anderen entzündlichen Erkrankungen könnte ein Transfer von T_{Reg} die Immunreaktion beschränken und so eine Neueinstellung des Gleichgewichts ermöglichen. Für eine Behandlung mit den *in vitro* stimulierten T_{Reg} kommen vor allem Erkrankungen in Frage, bei denen eine Suppression durch IL-10 nachgewiesen ist. Tierexperimentelle Arbeiten, bei denen sich der IL-10 Knockout selektiv auf $Foxp3^+$ regulatorische T-Zellen beschränkte, zeigte eine Abhängigkeit von IL-10 bei Erkrankungen, welche an der Schnittstelle zur Außenwelt v.a. auf Schleimhäuten auftreten [135]. In Übereinstimmung damit wurde eine essentielle Rolle von IL-10 in Asthma- [136], Pneumonitis- [51], Hauttransplantations- [52] und Kolitismodellen [54;137] gezeigt. Wie bereits in 5.4.1 diskutiert, wird erwägt, T_{Reg} im Rahmen einer Phase I klinischen Studie bei refraktärer Colitis Ulzerosa zu transferieren [123]. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass eine *in vitro* Aktivierung der T_{Reg} mit Induktion von IL-10 in diesem Zusammenhang eine vielversprechende Option wäre.

5.4.6 Alternativer Ansatz: Aktivierung der T_{Reg} *in vivo*

Langfristig wäre sicherlich eine selektive Aktivierung der T_{Reg} *in vivo* anzustreben, da diese technisch weniger aufwendig, vermutlich kostengünstiger und somit für viele Patienten eine realisierbare Therapie wäre.

Bei experimentellen Arbeiten führte eine Gabe eines $\alpha CD3$ Antikörpers und eine nasale Applikation von Proinsulin zur Expansion von $Foxp3^+$ T_{Reg} , welche die Zytokine IL-10 und TGF- β produzieren [138]. Auch die Applikation von mit Peptid gepulsten DZ führte zur Induktion von suppressiven $IL10^+Foxp3^+$ T_{Reg} in einem Asthma Modell [139]. Wie bereits erwähnt, kann bei Patienten auch das immunmodulatorische Medikamente Rapamycin benutzt werden, um selektiv T_{Reg} *in vivo* zu expandieren [119;140].

Bei allen diesen beschriebenen Ansätzen zur Aktivierung der T_{Reg} *in vivo*, kann eine Wirkung des applizierten Medikaments auf alle Leukozyten und damit das Auftreten von unerwünschten Effekten nicht ausgeschlossen werden. Daher ist vorerst eine Manipulation der T_{Reg} *in vitro* vorzuziehen. Ein Vorteil bei der Manipulation *in vitro* besteht schließlich darin, dass die T_{Reg} markiert werden können und so bei eventuell auftretenden Komplikationen mit spezifischen Antikörpern depletiert werden können [141].

5.5 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Dissertation ergeben sich einige Fragen, die weiterführend bearbeitet werden sollten. Zunächst sollte die Evaluation geeigneter Marker für die induzierte Effektorfunktion der T_{Reg} und die Dauer der *in vitro* Stimulation der T_{Reg} untersucht werden. Hierbei sollte in weiteren *in vivo* Modellen überprüft werden, welche *in vitro* Stimulationsdauer eine langfristige Suppression *in vivo* gewährleistet. Ferner sollte v. a. die Langlebigkeit der Suppression genauer untersucht werden. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass diesem Zytokin bei der Suppression durch die *in vitro* stimulierten T_{Reg} eine entscheidende Rolle zukommt, würden sich insbesondere Tiermodelle eignen, bei denen ein Einfluss von aus T_{Reg} stammenden IL-10 beschrieben ist. Hierbei kommen u.a. Kolitis- und Asthmamodelle in Frage. Mit Hilfe einer Markierung sollte bei den Versuchen der Verbleib und der Aktivierungsstatus der transferierten T_{Reg} *in vivo* verfolgt werden.

Ferner sollte die Isolierung und eine Induktion von IL-10 in humanen T_{Reg} untersucht und etabliert werden. Hierfür könnten die T_{Reg} aus Blutproben, aus Milz- und Lymphknotenbiopsien, aus Gelenk-Punktionen oder aus dem Leukapheresenprodukt gewonnen werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen (T_{Reg}) sind, als zentraler Bestandteil der Immunregulation, an der Suppression inadäquater Immunreaktionen und an der Termination von akuten Entzündungen beteiligt. Ist ihre Anzahl vermindert oder sind sie funktionell defizitär, so ist das immunologische Gleichgewicht gestört und es kommt zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis.

In der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob ein Transfer von *in vitro* aktivierten T_{Reg} eine Behandlungsoption bei inflammatorischen Erkrankungen darstellen könnte. Hierbei wurde die Induktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, welches bei einer Vielzahl von Tiermodellen die suppressive Aktivität der T_{Reg} vermittelt, als Marker für die Induktion der Effektorfunktion von T_{Reg} verwendet. Als optimale Bedingung zur effektiven Induktion von IL-10 erwies sich eine dreitägige Kostimulation über CD28 in Anwesenheit von IL-2 oder einer Kombination aus IL-2 und IL-4.

Die suppressive Kapazität der *in vitro* stimulierten T_{Reg} wurde anschließend in einem DTH- und in einem DNA Vakzinierungsmodell *in vivo* untersucht. Im Gegensatz zu den unbehandelten T_{Reg}, vermittelten ausschließlich die *in vitro* stimulierten T_{Reg} eine signifikante suppressive Aktivität. Ferner konnte gezeigt werden, dass das induzierte IL-10 in beiden Tiermodellen maßgeblich zur Suppression beitrug. Bei dem DNA Vakzinierungsmodell konnte zusätzlich ein kooperativer Effekt mit TGF-β und eine zytokinunabhängige Suppression bei Applikation von antigenspezifischen T_{Reg} beobachtet werden.

Die funktionelle Analyse der *in vivo* Suppressionsmodelle lieferte erste Hinweise, dass eine alleinige Optimierung der *in vitro* Stimulation anhand Induktion des Zytokins IL-10 nicht ausreichend ist, um die suppressive Kapazität der T_{Reg} zu beurteilen. So führte u.a. eine eintägige *in vitro* Stimulation zu einer länger anhaltenden Suppression, obwohl unter diesen Bedingungen geringere Frequenzen an IL-10⁺ T_{Reg} bei Transfer zu verzeichnen war. Da eine langfristige Suppression zur Wiederherstellung des immunologischen Gleichgewichts angestrebt wird, müssten weitere Parameter, wie zum Beispiel die Expression von TGF-β und Migrationsmarkern, in die Untersuchung mit eingeschlossen werden. Hierbei könnten z.B. die CD103(αE)⁺ T_{Reg} weiter untersucht werden, welche aktiv zu entzündeten Geweben migrieren und für welche in dieser Arbeit eine verstärkte Induktion von IL-10 bei *in vitro* Stimulation gezeigt werden konnte.

In den weiteren Experimenten sollte ferner auch das Überleben und der funktionelle Status der T_{Reg} über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern insgesamt erste Hinweise, dass eine Behandlung mit *in vitro* stimulierten T_{Reg} die Effektor T-Zellen und damit auch die Entzündungsreaktion unterdrücken kann. Aussichtsreich erscheinen insbesondere antigenspezifische T_{Reg}, da diese eine lang anhaltende Suppression vermitteln und eine generelle Immunsuppression als Nebenwirkung der Therapie vermutlich vermieden werden kann.

7. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

1. **Janeway,C.A. and Medzhitov,R.**, Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 2002. **20**: 197-216.
2. **Delves,P.J. and Roitt,I.M.**, Advances in immunology: The immune system - Second of two parts. *New England Journal of Medicine* 2000. **343**: 108-117.
3. **Delves,P.J. and Roitt,I.M.**, The immune system - First of two parts. *New England Journal of Medicine* 2000. **343**: 37-49.
4. **Lanzavecchia,A.**, Receptor-Mediated Antigen Uptake and Its Effect on Antigen Presentation to Class-II-Restricted Lymphocytes-T. *Annual Review of Immunology* 1990. **8**: 773-793.
5. **Abbas,A.K., Murphy,K.M., and Sher,A.**, Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996. **383**: 787-793.
6. **Smith,K.A.**, Interleukin-2 - Inception, Impact, and Implications. *Science* 1988. **240**: 1169-1176.
7. **Macatonia,S.E., Hsieh,C.S., Murphy,K.M., and Ogarra,A.**, Dendritic Cells and Macrophages Are Required for Th1 Development of Cd4+ T-Cells from Alpha-Beta-Tcr Transgenic Mice - Il-12 Substitution for Macrophages to Stimulate Ifn-Gamma Production Is Ifn-Gamma-Dependent. *International Immunology* 1993. **5**: 1119-1128.
8. **Moser,M. and Murphy,K.M.**, Dendritic cell regulation of T(H)1-T(H)2 development. *Nature Immunology* 2000. **1**: 199-205.
9. **Szabo,S.J., Kim,S.T., Costa,G.L., Zhang,X.K., Fathman,C.G., and Glimcher,L.H.**, A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000. **100**: 655-669.
10. **Mosmann,T.R. and Coffman,R.L.**, 2 Types of Mouse Helper T-Cell Clone - Implications for Immune Regulation. *Immunology Today* 1987. **8**: 223-227.
11. **Dighe,A.S., Campbell,D., Hsieh,C.S., Clarke,S., Greaves,D.R., Gordon,S., Murphy,K.M., and Schreiber,R.D.**, Tissue-Specific Targeting of Cytokine Unresponsiveness in Transgenic Mice. *Immunity* 1995. **3**: 657-666.
12. **Flesch,I.E.A., Hess,J.H., Huang,S., Aguet,M., Rothe,J., Bluethmann,H., and Kaufmann,S.H.E.**, Early Interleukin-12 Production by Macrophages in Response to Mycobacterial Infection Depends on Interferon-Gamma and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha. *Journal of Experimental Medicine* 1995. **181**: 1615-1621.
13. **Zheng,W.P. and Flavell,R.A.**, The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997. **89**: 587-596.
14. **Abbas,A.K., Williams,M.E., Burstein,H.J., Chang,T.L., Bossu,P., and Lichtman,A.H.**, Activation and Functions of Cd4+ T-Cell Subsets. *Immunological Reviews* 1991. **123**: 5-22.

15. **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.,** Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006. **441**: 231-234.
16. **Kolls,J.K. and Linden,A.,** Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004. **21**: 467-476.
17. **Mills,K.H.G. and McGuirk,P.,** Antigen-specific regulatory T cells - their induction and role in infection. *Seminars in Immunology* 2004. **16**: 107-117.
18. **Groux,H., OGarra,A., Bigler,M., Rouleau,M., Antonenko,S., deVries,J.E., and Roncarolo,M.G.,** A CD4(+) T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997. **389**: 737-742.
19. **Fantini,M.C., Becker,C., Monteleone,G., Pallone,F., Galle,P.R., and Neurath,M.F.,** Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4(+)CD25(-) T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *Journal of Immunology* 2004. **172**: 5149-5153.
20. **Groux,H., Cottrez,F., Hurst,S.D., and Coffman,R.L.,** T regulatory cells 1 (Tr1) inhibit a Th2 specific response in vivo. *Faseb Journal* 2000. **14**: A992.
21. **Floess,S., Freyer,J., Siewert,C., Baron,U., Olek,S., Polansky,J., Schlawe,K., Chang,H.D., Bopp,T., Schmitt,E., Klein-Hessling,S., Serfling,E., Hamann,A., and Huehn,J.,** Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *Plos Biology* 2007. **5**: 169-178.
22. **Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., and Toda,M.,** Immunological Self-Tolerance Maintained by Activated T-Cells Expressing Il-2 Receptor Alpha-Chains (Cd25) - Breakdown of A Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune-Diseases. *Journal of Immunology* 1995. **155**: 1151-1164.
23. **Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Shimizu,J., Yamazaki,S., Sakihama,T., Itoh,M., Kuniyasu,Y., Nomura,T., Toda,M., and Takahashi,T.,** Immunologic tolerance maintained by CD25(+) CD4(+) regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological Reviews* 2001. **182**: 18-32.
24. **Hori,S., Nomura,T., and Sakaguchi,S.,** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003. **299**: 1057-1061.
25. **Hori,S. and Sakaguchi,S.,** Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and Infection* 2004. **6**: 745-751.
26. **Blair,P.J., Bultman,S.J., Haas,J.C., Rouse,B.T., Wilkinson,J.E., and Godfrey,V.L.,** Cd4(+)Cd8(-) T-Cells Are the Effector-Cells in Disease Pathogenesis in the Scurfy (Sf) Mouse. *Journal of Immunology* 1994. **153**: 3764-3774.
27. **Ochs,H.D., Ziegler,S.F., and Torgerson,T.R.,** FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunological Reviews* 2005. **203**: 156-164.
28. **Betelli,E., Dastrange,M., and Oukka,M.,** Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005. **102**: 5138-5143.

29. **Wu,Y.Q., Borde,M., Heissmeyer,V., Feuerer,M., Lapan,A.D., Stroud,J.C., Bates,D.L., Guo,L., Han,A.D., Ziegler,S.F., Mathis,D., Benoist,C., Chen,L., and Rao,A.**, FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006. **126**: 375-387.
30. **Itoh,M., Takahashi,T., Sakaguchi,N., Kuniyasu,Y., Shimizu,J., Otsuka,F., and Sakaguchi,S.**, Thymus and autoimmunity: Production of CD25(+)CD4(+) naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *Journal of Immunology* 1999. **162**: 5317-5326.
31. **Sakaguchi,S.**, Naturally arising CD4(+) regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology* 2004. **22**: 531-562.
32. **Ziegler,S.F.**, FOXP3: Of mice and men. *Annual Review of Immunology* 2006. **24**: 209-226.
33. **Fuchizawa,T., Adachi,Y., Ito,Y., Higashiyama,H., Kanegane,H., Futatani,T., Kobayashi,I., Kamachi,Y., Sakamoto,T., Tsuge,I., Tanaka,H., Banham,A.H., Ochs,H.D., and Miyawaki,T.**, Developmental changes of FOXP3-expressing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and their impairment in patients with FOXP3 gene mutations. *Clinical Immunology* 2007. **125**: 237-246.
34. **Fontenot,J.D., Rasmussen,J.P., Gavin,M.A., and Rudensky,A.Y.**, A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology* 2005. **6**: 1142-1151.
35. **de la Rosa,M., Rutz,S., Dorninger,H., and Scheffold,A.**, Interleukin-2 is essential for CD4(+)CD25(+) regulatory T cell function. *European Journal of Immunology* 2004. **34**: 2480-2488.
36. **Stallmach,A., Wittig,B., Giese,T., Pfister,K., Hoffmann,J.C., Bulfone-Paus,S., Kundendorf,U., Meuer,S.C., and Zeitz,M.**, Protection of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by an interleukin 2-IgG2b fusion protein in mice. *Gastroenterology* 1999. **117**: 866-876.
37. **Brandenburg,S., Takahashi,T., de la Rosa,M., Janke,M., Karsten,G., Muzzolini,T., Orinska,Z., Bulfone-Paus,S., and Scheffold,A.**, IL-2 induces in vivo suppression by CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *European Journal of Immunology* 2008. **38**: 1643-1653.
38. **Ludwig-Portugall,I., Hamilton-Williams,E.E., Gottschalk,C., and Kurts,C.**, Cutting edge: CD25(+) regulatory T cells prevent expansion and induce apoptosis of B cells specific for tissue autoantigens. *Journal of Immunology* 2008. **181**: 4447-4451.
39. **Nakamura,K., Kitani,A., Fuss,I., Pedersen,A., Harada,N., Nawata,H., and Strober,W.**, TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4(+)CD25(+) regulatory T cell activity in both humans and mice. *Journal of Immunology* 2004. **172**: 834-842.

40. **Ghiringhelli,F., Menard,C., Terme,M., Flament,C., Taieb,J., Chaput,N., Puig,P.E., Novault,S., Escudier,B., Vivier,E., Lecesne,A., Robert,C., Blay,J.Y., Bernard,J., Caillat-Zucman,S., Freitas,A., Tursz,T., Wagner-Ballon,O., Capron,C., Vainchenker,W., Martin,F., and Zitvogel,L.,** CD4(+) CD25(+) regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *Journal of Experimental Medicine* 2005. **202**: 1075-1085.
41. **Misra,N., Bayry,J., Lacroix-Desmazes,S., Kazatchkine,M.D., and Kaveri,S.V.,** Cutting edge: Human CD4(+)CD25(+) T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *Journal of Immunology* 2004. **172**: 4676-4680.
42. **Karim,M., Feng,G., Wood,K.J., and Bushell,A.R.,** CD25(+)CD4(+) regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood* 2005. **105**: 4871-4877.
43. **Takahashi,T., Kuniyasu,Y., Toda,M., Sakaguchi,N., Itoh,M., Iwata,M., Shimizu,J., and Sakaguchi,S.,** Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology* 1998. **10**: 1969-1980.
44. **Vignali,D.A.A., Collison,L.W., and Workman,C.J.,** How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* 2008. **8**: 523-532.
45. **Bopp,T., Becker,C., Klein,M., Klein-Hessling,S., Palmetshofer,A., Serfling,E., Heib,V., Becker,M., Kubach,J., Schmitt,S., Stoll,S., Schild,H., Staeger,M.S., Stassen,M., Jonuleit,H., and Schmitt,E.,** Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell mediated suppression. *Journal of Experimental Medicine* 2007. **204**: 1303-1310.
46. **Gondek,D.C., Lu,L.F., Quezada,S.A., Sakaguchi,S., and Noelle,R.J.,** Cutting edge: Contact-mediated suppression by CD4(+)-CD25(+) regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of Immunology* 2005. **174**: 1783-1786.
47. **Scheffold,A., Huhn,J., and Hofer,T.,** Regulation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *European Journal of Immunology* 2005. **35**: 1336-1341.
48. **Pandiyani,P., Zheng,L.X., Ishihara,S., Reed,J., and Lenardo,M.J.,** CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells induce cytokine deprivation -mediated apoptosis of effector CD4(+) T cells. *Nature Immunology* 2007. **8**: 1353-1362.
49. **Rubtsov,Y.P., Rasmussen,J.P., Chi,E.Y., Fontenot,J., Castelli,L., Ye,X., Treuting,P., Siewe,L., Roers,A., Henderson,W.R., Muller,W., and Rudensky,A.Y.,** Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008. **28**: 546-558.
50. **Kearley,J., Barker,J.E., Robinson,D.S., and Lloyd,C.M.,** Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *Journal of Experimental Medicine* 2005. **202**: 1539-1547.

51. **Huang,X.P., Zhu,J.G., and Yang,Y.P.**, Protection against autoimmunity in nonlymphopenic hosts by CD4(+) CD25(+) regulatory T cells is antigen-specific and requires IL-10 and TGF-beta. *Journal of Immunology* 2005. **175**: 4283-4291.
52. **Kingsley,C.I., Karim,M., Bushell,A.R., and Wood,K.J.**, CD25(+)CD4(+) regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *Journal of Immunology* 2002. **168**: 1080-1086.
53. **Annacker,O., Pimenta-Araujo,R., Burlen-Defranoux,O., Barbosa,T.C., Cumano,A., and Bandeira,A.**, CD25(+) CD4(+) T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *Journal of Immunology* 2001. **166**: 3008-3018.
54. **Uhlig,H.H., Coombes,J., Mottet,C., Izcue,A., Thompson,C., Fanger,A., Tannapfel,A., Fontenot,J.D., Ramsdell,F., and Powrie,F.**, Characterization of Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) and IL-10-secreting CD4(+)CD25(+) T cells during cure of colitis. *Journal of Immunology* 2006. **177**: 5852-5860.
55. **Maynard,C.L., Harrington,L.E., Janowski,K.M., Oliver,J.R., Zindl,C.L., Rudensky,A.Y., and Weaver,C.T.**, Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3(+) and Foxp3(-) precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nature Immunology* 2007. **8**: 931-941.
56. **McGeachy,M.J., Stephens,L.A., and Anderton,S.M.**, Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: Contribution of CD4(+)CD25(+) regulatory cells within the central nervous system. *Journal of Immunology* 2005. **175**: 3025-3032.
57. **Li,M.O., Sanjabi,S., and Flavell,R.A.**, Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006. **25**: 455-471.
58. **Li,M.O., Wan,Y.S.Y., and Flavell,R.A.**, T cell-produced transforming growth factor-beta 1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 2007. **26**: 579-591.
59. **Shevach,E.M., DiPaolo,R.A., Andersson,J., Zhao,D.M., Stephens,G.L., and Thornton,A.M.**, The lifestyle of naturally occurring CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunological Reviews* 2006. **212**: 60-73.
60. **Coombes,J.L., Robinson,N.J., Maloy,K.J., Uhlig,H.H., and Powrie,F.**, Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunological Reviews* 2005. **204**: 184-194.
61. **Xystrakis,E., Boswell,S.E., and Hawrylowicz,C.**, T regulatory cells and the control of allergic disease. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2006. **6**: 121-133.
62. **Rouse,B.T., Sarangi,P.P., and Suvas,S.**, Regulatory T cells in virus infections. *Immunological Reviews* 2006. **212**: 272-286.
63. **Belkaid,Y., Blank,R.B., and Suffia,I.**, Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunological Reviews* 2006. **212**: 287-300.
64. **Kretschmer,K., Apostolou,I., Jaeckel,E., Khazaie,K., and von Boehmer,H.**, Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunological Reviews* 2006. **212**: 163-169.

65. **Cao,D., Malmstrom,V., Baecher-Allan,C., Hafler,D., Klareskog,L., and Trollmo,C.,** Isolation and functional characterization of regulatory CD25(bright)CD4(+) T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology* 2003. **33**: 215-223.
66. **Prakken,B.J., Samodal,R., Le,T.D., Giannoni,F., Yung,G.P., Scavulli,J., Amox,D., Roord,S., de Kleer,I., Bonnin,D., Lanza,P., Berry,C., Massa,M., Billetta,R., and Albani,S.,** Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004. **101**: 4228-4233.
67. **Valencia,X., Stephens,G., Goldbach-Mansky,R., Wilson,M., Shevach,E.M., and Lipsky,P.E.,** TNF downmodulates the function of human CD4(+)CD25(hi) T-regulatory cells. *Blood* 2006. **108**: 253-261.
68. **Nadkarni,S., Mauri,C., and Ehrenstein,M.R.,** Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *Journal of Experimental Medicine* 2007. **204**: 33-39.
69. **Veldhoen,M., Hocking,R.J., Atkins,C.J., Locksley,R.M., and Stockinger,B.,** TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006. **24**: 179-189.
70. **Nistala,K., Moncrieffe,H., Newton,K.R., Varsani,H., Hunter,P., and Wedderburn,L.R.,** Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis and Rheumatism* 2008. **58**: 875-887.
71. **Qu,H.Q., Montpetit,A., Ge,B., Hudson,T.J., and Polychronakos,C.,** Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and type 1 diabetes. *Diabetes* 2007. **56**: 1174-1176.
72. **Alexander,T., Thiel,A., Rosen,O., Massenkeil,G., Sattler,A., Kohler,S., Mei,H., Radtke,H., Gromnica-Ihle,E., Burmester,G.R., Arnold,R., Radbruch,A., and Hiepe,F.,** Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood* 2009. **113**: 214-223.
73. **Asano,M., Toda,M., Sakaguchi,N., and Sakaguchi,S.,** Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *Journal of Experimental Medicine* 1996. **184**: 387-396.
74. **Levings,M.K., Sangregorio,R., and Roncarolo,M.G.,** Human CD25(+)CD4(+) T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *Journal of Experimental Medicine* 2001. **193**: 1295-1301.
75. **Ng,W.F., Duggan,P.J., Ponchel,F., Matarese,G., Lombardi,G., Edwards,A.D., Isaacs,J.D., and Lechler,R.I.,** Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001. **98**: 2736-2744.
76. **Radbruch,A.,** Flow Cytometry and Cell Sorting - a laboratory handbook. *Springer Verlag, Heidelberg* 1992.

77. **Guo,F., Iclozan,C., Suh,W.K., Anasetti,C., and Yu,X.Z.**, CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells. *Journal of Immunology* 2008. **181**: 2285-2291.
78. **Hombach,A.A., Kofler,D., Hombach,A., Rappl,G., and Abken,H.**, Effective proliferation of human regulatory T cells requires a strong costimulatory CD28 signal that cannot be substituted by IL-2. *Journal of Immunology* 2007. **179**: 7924-7931.
79. **Golovina,T.N., Mikheeva,T., Suhoski,M.M., Aqui,N.A., Tai,V.C., Shan,X.C., Liu,R.H., Balcarcel,R.R., Fisher,N., Levine,B.L., Carroll,R.G., Warner,N., Blazar,B.R., June,C.H., and Riley,J.L.**, CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function. *Journal of Immunology* 2008. **181**: 2855-2868.
80. **Sutmuller,R.P.M., Morgan,M.E., Netea,M.G., Grauer,O., and Adema,G.J.**, Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends in Immunology* 2006. **27**: 387-393.
81. **Caramalho,I., Lopes-Carvalho,T., Ostler,D., Zelenay,S., Haury,M., and Demengeot,J.**, Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine* 2003. **197**: 403-411.
82. **Crellin,N.K., Garcia,R.V., Hadisfar,O., Allan,S.E., Steiner,T.S., and Levings,M.K.**, Human CD4(+) T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4(+)CD25(+) T regulatory cells. *Journal of Immunology* 2005. **175**: 8051-8059.
83. **Kubo,T., Hatton,R.D., Oliver,J., Liu,X.F., Elson,C.O., and Weaver,C.T.**, Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *Journal of Immunology* 2004. **173**: 7249-7258.
84. **Pasare,C. and Medzhitov,R.**, Toll pathway-dependent blockade of CD4(+)CD25(+) T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003. **299**: 1033-1036.
85. **Chen,X., Baumel,M., Mannel,D.N., Howard,O.M.Z., and Oppenheim,J.J.**, Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4(+)CD25(+) T regulatory cells. *Journal of Immunology* 2007. **179**: 154-161.
86. **Jankovic,D., Kullberg,M.C., Feng,C.G., Goldszmid,R.S., Collazo,C.M., Wilson,M., Wynn,T.A., Kamanaka,M., Flavell,R.A., and Sheri,A.**, Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *Journal of Experimental Medicine* 2007. **204**: 273-283.
87. **Rutz,S., Janke,M., Kassner,N., Hohnstein,T., Krueger,M., and Scheffold,A.**, Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008. **105**: 3497-3502.
88. **Samon,J.B., Champhekar,A., Minter,L.M., Telfer,J.C., Miele,L., Fauq,A., Das,P., Golde,T.E., and Osborne,B.A.**, Notch1 and TGF beta 1 cooperatively regulate Foxp3 expression and the maintenance of peripheral regulatory T cells. *Blood* 2008. **112**: 1813-1821.

89. **Hoyne,G.F., Le Roux,I., Corsin-Jimenez,M., Tan,K., Dunne,J., Forsyth,L.M.G., Dallman,M.J., Owen,M.J., Ish-Horowicz,D., and Lamb,J.R.,** Serrate1-induced Notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *International Immunology* 2000. **12:** 177-185.
90. **Vigouroux,S., Yvon,E., Wagner,H.J., Biagi,E., Dotti,G., Sili,U., Lira,C., Rooney,C.M., and Brenner,M.K.,** Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes. *Journal of Virology* 2003. **77:** 10872-10880.
91. **Ito,T., Hanabuchi,S., Wang,Y.H., Park,W.R., Arima,K., Bover,L., Qin,F.X.F., Gilliet,M., and Liu,Y.J.,** Two functional subsets of FOXP3(+) regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008. **28:** 870-880.
92. **Herman,A.E., Freeman,G.J., Mathis,D., and Benoist,C.,** CD4(+)CD25(+) T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *Journal of Experimental Medicine* 2004. **199:** 1479-1489.
93. **Huehn,J., Siegmund,K., Lehmann,J.C.U., Siewert,C., Haubold,U., Feuerer,M., Debes,G.F., Lauber,J., Frey,O., Przybylski,G.K., Niesner,U., de la Rosa,M., Schmidt,C.A., Bauer,R., Buer,J., Scheffold,A., and Hamann,A.,** Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4(+) regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* 2004. **199:** 303-313.
94. **Kovanen,P.E. and Leonard,W.J.,** Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunological Reviews* 2004. **202:** 67-83.
95. **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.,** Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008. **29:** 44-56.
96. **Scheffold,A., Murphy,K.M., and Hofer,T.,** Competition for cytokines: T-reg cells take all. *Nature Immunology* 2007. **8:** 1285-1287.
97. **Torres,C.A.T., Iwasaki,A., Barber,B.H., and Robinson,H.L.,** Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *Journal of Immunology* 1997. **158:** 4529-4532.
98. **Steele,K.E., Stabler,K., and VanderZanden,L.,** Cutaneous DNA vaccination against Ebola virus by particle bombardment: Histopathology and alteration of CD3-positive dendritic epidermal cells. *Veterinary Pathology* 2001. **38:** 203-215.
99. **Thornton,A.M. and Shevach,E.M.,** Suppressor effector function of CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *Journal of Immunology* 2000. **164:** 183-190.
100. **Onishi,Y., Fehervari,Z., Yamaguchi,T., and Sakaguchi,S.,** Foxp3(+) natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008. **105:** 10113-10118.

101. **Cher,D.J. and Mosmann,T.R.**, 2 Types of Murine Helper T-Cell Clone .2. Delayed-Type Hypersensitivity Is Mediated by Th1 Clones. *Journal of Immunology* 1987. **138**: 3688-3694.
102. **Menning,A., Hopken,U.E., Siegmund,K., Lipp,M., Hamann,A., and Huehn,J.**, Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets. *European Journal of Immunology* 2007. **37**: 1575-1583.
103. **Siegmund,K., Feuerer,M., Siewert,C., Ghani,S., Haubold,U., Dankof,A., Krenn,V., Schon,M.P., Scheffold,A., Lowe,J.B., Hamann,A., Syrbe,U., and Huehn,J.**, Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* 2005. **106**: 3097-3104.
104. **Chen,Y.H., Inobe,J., Marks,R., Gonnella,P., Kuchroo,V.K., and Weiner,H.L.**, Peripheral Deletion of Antigen-Reactive T-Cells in Oral Tolerance. *Nature* 1995. **376**: 177-180.
105. **Webb,S., Morris,C., and Sprent,J.**, Extrathymic Tolerance of Mature T-Cells - Clonal Elimination As A Consequence of Immunity. *Cell* 1990. **63**: 1249-1256.
106. **Hong,J., Li,N.L., Zhang,X.J., Zheng,B., and Zhang,J.W.Z.**, Induction of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005. **102**: 6449-6454.
107. **Karagiannidis,C., Akdis,M., Holopainen,P., Woolley,N.J., Hense,G., Ruckert,B., Mantel,P.Y., Menz,G., Akdis,C.A., Blaser,K., and Schmidt-Weber,C.B.**, Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004. **114**: 1425-1433.
108. **Li,M.O. and Flavell,R.A.**, Contextual regulation of inflammation: A duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity* 2008. **28**: 468-476.
109. **Rizzo,P., Osipo,C., Foreman,K., Golde,T., Osborne,B., and Miele,L.**, Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene* 2008. **27**: 5124-5131.
110. **Wuest,T.Y., Willette-Brown,J., Durum,S.K., and Hurwitz,A.A.**, The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2008. **84**: 973-980.
111. **Chen,X., Baumel,M., Mannel,D.N., Howard,O.M.Z., and Oppenheim,J.J.**, Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4(+)CD25(+) T regulatory cells. *Journal of Immunology* 2007. **179**: 154-161.
112. **Barrat,F.J., Cua,D.J., Boonstra,A., Richards,D.F., Crain,C., Savelkoul,H.F., de Waal-Malefyt,R., Coffman,R.L., Hawrylowicz,C.M., and O'Garra,A.**, In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *Journal of Experimental Medicine* 2002. **195**: 603-616.

113. **Lehmann,J., Huehn,J., de la Rosa,M., Maszyna,F., Kretschmer,U., Krenn,V., Brunner,M., Scheffold,A., and Hamann,A.,** Expression of the integrin alpha(E)beta(7) identifies unique subsets of CD25(+) as well as CD25(-) regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002. **99**: 13031-13036.
114. **Fontenot,J.D., Gavin,M.A., and Rudensky,A.Y.,** Foxp3 programs the development and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nature Immunology* 2003. **4**: 330-336.
115. **Antony,P.A., Paulos,C.M., Ahmadzadeh,M., Akpinarli,A., Palmer,D.C., Sato,N., Kaiser,A., Heinrichs,C., Klebanoff,C.A., Tagaya,Y., and Restifo,N.P.,** Interleukin 2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *Journal of Immunology* 2006. **176**: 5255-5266.
116. **Kovanen,P.E., Rosenwald,A., Fu,J., Hurt,E.M., Lam,L.T., Giltneane,J.M., Wright,G., Staudt,L.M., and Leonard,W.J.,** Analysis of gamma(c)-family cytokine target genes - Identification of dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a regulator of mitogen-activated protein kinase activity in interleukin-2 signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2003. **278**: 5205-5213.
117. **Dardalhon,V., Awasthi,A., Kwon,H., Galileos,G., Gao,W., Sobel,R.A., Mitsdoerffer,M., Strom,T.B., Elyaman,W., Ho,I.C., Khoury,S., Oukka,M., and Kuchroo,V.K.,** IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3(+) T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9(+) IL-10(+) Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology* 2008. **9**: 1347-1355.
118. **Zheng,Y., Chaudhry,A., Kas,A., deRoos,P., Kim,J.M., Chu,T.T., Corcoran,L., Treuting,P., Klein,U., and Rudensky,A.Y.,** Regulatory T-cell suppressor program coopts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 2009. **458**: 351-U116.
119. **Monti,P., Scirpoli,M., Maffi,P., Piemonti,L., Secchi,A., Bonifacio,E., Roncarolo,M.G., and Battaglia,M.,** Rapamycin monotherapy in patients with type 1 diabetes modifies CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T-Cells. *Diabetes* 2008. **57**: 2341-2347.
120. **Chang,H.D., Helbig,C., Tykocinski,L., Kreher,S., Koeck,J., Niesner,U., and Radbruch,A.,** Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. *European Journal of Immunology* 2007. **37**: 807-817.
121. **Bergmann,C., Strauss,L., Zeidler,R., Lang,S., and Whiteside,T.L.,** Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment. *Cancer Immunology Immunotherapy* 2007. **56**: 1429-1442.
122. **Sumida,Y., Nakamura,K., Kanayama,K., Akiho,H., Teshima,T., and Takayanagi,R.,** Preparation of functionally preserved CD4+CD25high regulatory T cells from leukapheresis products from ulcerative colitis patients, applicable to regulatory T-cell transfer therapy. *Cytotherapy* 2008. **10**: 698-710.
123. **Edinger,M.,** CD4+CD25+regulatory T cells approach the clinic. *Cytotherapy* 2008. **10**: 655-656.
124. **Kleinewietfeld,M., Starke,M., Di Mitri,D., Borsellino,G., Battistini,L., Rotzschke,O., and Falk,K.,** CD49d provides access to "untouched" human Foxp3(+) Treg free of contaminating effector cells. *Blood* 2009. **113**: 827-836.

125. **Figueroa-Tentori,D., Querol,S., Dodi,I.A., Madrigal,A., and Duggleby,R.,** High purity and yield of natural Tregs from cord blood using a single step selection method. *Journal of Immunological Methods* 2008. **339**: 228-235.
126. **Masteller,E.L., Warner,M.R., Tang,Q.Z., Tarbell,K.V., McDevitt,H., and Bluestone,J.A.,** Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *Journal of Immunology* 2005. **175**: 3053-3059.
127. **Tang,Q.Z., Henriksen,K.J., Bi,M.Y., Finger,E.B., Szot,G., Ye,J.Q., Masteller,E.L., McDevitt,H., Bonyhadi,M., and Bluestone,J.A.,** In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *Journal of Experimental Medicine* 2004. **199**: 1455-1465.
128. **Tarbell,K.V., Petit,L., Zuo,X.P., Toy,P., Luo,X.R., Mqadmi,A., Yang,H., Suthanthiran,M., Mojsov,S., and Steinman,R.M.,** Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4(+) CD25(+) CD62L(+) regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *Journal of Experimental Medicine* 2007. **204**: 191-201.
129. **Koehn,B., Gangappa,S., Miller,J.D., Ahmed,R., and Larsen,C.P.,** Patients, pathogens, and protective immunity: The relevance of virus-induced alloreactivity in transplantation. *Journal of Immunology* 2006. **176**: 2691-2696.
130. **Jiang,S.P., Tsang,J., Game,D.S., Stevenson,S., Lombardi,G., and Lechler,R.I.,** Generation and expansion of human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with indirect allospecificity: Potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance. *Transplantation* 2006. **82**: 1738-1743.
131. **Mekala,D.J., Alli,R.S., and Geiger,T.L.,** IL-10-dependent infectious tolerance after the treatment of experimental allergic encephalomyelitis with redirected CD4(+) CD25(+) T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005. **102**: 11817-11822.
132. **Winstead,C.J., Fraser,J.M., and Khoruts,A.,** Regulatory CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells selectively inhibit the spontaneous form of lymphopenia-induced proliferation of naive T cells. *Journal of Immunology* 2008. **180**: 7305-7317.
133. **Nitschke,C., Garin,A., Kosco-Vilbois,M., and Gunzer,M.,** 3D and 4D imaging of immune cells in vitro and in vivo. *Histochemistry and Cell Biology* 2008. **130**: 1053-1062.
134. **Hoffmann,P., Boeld,T.J., Eder,R., Albrecht,J., Doser,K., Pieshka,B., Dada,A., Niemand,C., Assenmacher,M., Orso,E., Andreesen,R., Holler,E., and Edinger,M.,** Isolation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells for clinical trials. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2006. **12**: 267-274.
135. **Rubtsov,Y.P., Rasmussen,J.P., Chi,E.Y., Fontenot,J., Castelli,L., Ye,X., Treuting,P., Siewe,L., Roers,A., Henderson,W.R., Muller,W., and Rudensky,A.Y.,** Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008. **28**: 546-558.
136. **Kearley,J., Barker,J.E., Robinson,D.S., and Lloyd,C.M.,** Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *Journal of Experimental Medicine* 2005. **202**: 1539-1547.

137. **Annacker,O., Pimenta-Araujo,R., Burlen-Defranoux,O., Barbosa,T.C., Cumano,A., and Bandeira,A.**, CD25(+) CD4(+) T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *Journal of Immunology* 2001. **166**: 3008-3018.
138. **Bresson,D., Togher,L., Rodrigo,E., Chen,Y.L., Bluestone,J.A., Herold,K.C., and von Herrath,M.**, Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. *Journal of Clinical Investigation* 2006. **116**: 1371-1381.
139. **Henry,E., Desmet,C.J., Garze,V., Fievez,L., Bedoret,D., Heirman,C., Faisca,P., Jaspar,F.J., Gosset,P., Jacquet,A.P.A., Desmecht,D., Thielemans,K., Lekeux,P., Moser,M., and Bureau,F.**, Dendritic Cells Genetically Engineered to Express IL-10 Induce Long-Lasting Antigen-Specific Tolerance in Experimental Asthma. *Journal of Immunology* 2008. **181**: 7230-7242.
140. **Battaglia,M., Stabilini,A., Migliavacca,B., Horejs-Hoeck,J., Kaupper,T., and Roncarolo,M.G.**, Rapamycin promotes expansion of functional CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *Journal of Immunology* 2006. **177**: 8338-8347.
141. **Kieback,E., Charo,J., Sommermeyer,D., Blankenstein,T., and Uckert,W.**, A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008. **105**: 623-628.

8. Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BD	Becton Dickinson
BSA	Bovine Serum Albumin – Rinderserumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidylester
Cy5	Cyanin 5
DZ	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	Delayed type hypersensitivity
EDTA	Ethylenediamine tetra-acetic acid
FACS	Fuorescence activated cell sorter
FCS	Fetal calf serum - fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
GSI	γ -Sekretase Inhibitor
i. p.	Intraperitoneal
i. v.	Intravenös
ICOS	Inducible costimulator
IFA	Incomplete Freund`s Adjuvants
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iT _{Reg}	induzierte Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische Zellen
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	magnetic activated cell sort
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> – Haupthistokompatibilitätskomplex
NK	Natürliche Killer Zellen
OVA	Ovalbumin Peptid 323-339
PBS	phosphate buffered saline - phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PMA	Phorbolmyristataacetat
PE	Phycoerythrin

PI	Propidiumiodid
RA	Rheumatoide Arthritis
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
SA	Streptavidin
SSC	Seitwärtsstreulicht
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SPC	Specific pathogen free
TGF- β	Transforming Growth Factor - β
T _H	T – Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T _{Reg}	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische Zellen
T _{resp}	CD4 ⁺ CD25 ⁻ Zellen
TZR	T-Zellrezeptor

9. Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

10. Danksagung

„In einer so unmittelbar praktischen Wissenschaft, wie die Medizin, in einer Zeit so schnellen Wachsens der Erfahrungen, wie der unsrige, haben wir doppelt die Verpflichtung, unsere Kenntniss der Gesamtheit der Fachgenossen zugänglich zu machen“

Rudolf Virchow, 1858 in Berlin

Ich möchte mich bei **Andreas Radbruch** für die Möglichkeit am Deutschen Rheumaforschungszentrum meine Doktorarbeit anfertigen zu können recht herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang **Alexander Scheffold** für die langjährige Betreuung, für die produktiven Diskussionen und für die Unterstützung meiner Entscheidung das Zweitstudium Medizin aufzunehmen. Darüber hinaus möchte ich den **Gutachtern**, welche diese Arbeit beurteilen werden, dafür danken.

Der gesamten **Arbeitsgruppe Immunmodulation** möchte ich für die Hilfsbereitschaft, die familiäre Arbeitsatmosphäre und für drei wunderschöne Jahre danken, die ich nicht missen möchte. **Susan Brandenburg** möchte ich für die Unterstützung bei Planung und Durchführung der Vakzinierungs-Experimente und für die Korrektur des Manuskripts danken. **Thordis Hohenstein** möchte ich für die Unterstützung bei zahlreichen Experimenten danken, die dafür oft zu sehr früher Stunde für mich ins Labor kam. Nachdem **Marko Janke** bereits meine biochemische Diplomarbeit betreut hat, hat er mich im Rahmen dieser Arbeit bei der Planung und Messung der DTH-Experimente unterstützt, wofür ich ihm recht herzlich danken möchte. Für die Unterstützung bei der Planung der Notch-Experimente und für viele Erklärungen, möchte ich **Sascha Rutz** danken.

Ferner möchte ich mich bei den **Labor-Managerinnen** und den **Mitarbeitern der Service-Einrichtungen** bedanken. **Dörte Huscher** aus der AG Epidemiologie des DRFZ hat mit ihrer geduldigen Art bei der Beratung zur statistischen Auswertung mein Verständnis auf diesem Gebiet deutlich erweitert, wofür ich ihr sehr dankbar bin. Ferner möchte ich **Andreas Hutloff** vom Robert-Koch-Institut (jetzt DRFZ) für die Beratung und die Bereitstellung von Materialien für die ICOS Experimente danken. Gerade weil sie die einzige Fachfremde ist, welche das Manuskript gelesen hat, möchte ich insbesondere **Christine Schipke** für die Korrekturen danken.

Meinen **Eltern** und meiner Schwester **Mona** möchte ich aufs herzlichste danken, da sie meine beiden Studien und diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben. Gerade die wichtige Entscheidung noch ein Medizinstudium zu beginnen wurde von meiner Familie stets respektiert und tatkräftig unterstützt.

11. Erklärung

„Ich, Lasse Köhler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Induktion und Funktion von Interleukin-10 in CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den

.....

Lasse Köhler