

Aus dem Institut/der Klinik für Experimentelle Rheumatologie mit dem  
Schwerpunkt Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

DNA-Methylierungsmuster im *foxp3* Gen in humanen  
CD4<sup>+</sup> FOXP3-exprimierenden T-Zellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katrin Baumann

aus Schwerin

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Hühn.....  
2. Prof. Dr. rer. nat. Th. Schüler .....  
3. Priv.-Doz. Dr. M. Edinger.....

Datum der Promotion: 27.03.2009

Für meine Eltern, meine Schwester und meine Großeltern

## Inhaltsverzeichnis

### Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	8
1.1. Das Immunsystem.....	8
1.2. Das angeborene und das erworbene Immunsystem.....	9
1.3. Die Zellen des erworbenen Immunsystems.....	10
1.3.1. Die B-Lymphozyten.....	10
1.3.2. Die T-Lymphozyten.....	11
1.4. T-Zellentwicklung und Toleranzerzeugung im Thymus.....	12
1.4.1. Toleranzerzeugung in der Peripherie.....	13
1.5. Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen.....	14
1.6. Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen.....	15
1.7. Relevanz regulatorischer T-Zellen bei Erkrankungen.....	17
1.8. FoxP3 – ein neuer Marker für regulatorische T-Zellen.....	17
1.9. Die verschiedenen Subpopulationen regulatorischer T-Zellen.....	18
1.10. Die Transiente FOXP3-Expression in humanen T-Zellen.....	20
1.11. Eigenschaften und Wirkung von FoxP3.....	21
1.12. Die Rolle von Interleukin 2 und Transforming Growth factor-beta bei regulatorischen T-Zellen.....	22
1.13. Epigenetische Regulationsmechanismen von FoxP3 im murinen System.....	23
1.14. Epigenetische Regulationsmechanismen von FOXP3 in humanen Zellen.....	25
1.15. Zielstellung der vorliegenden Arbeit.....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Material.....	28
2.1.1. Geräte.....	28
2.1.2. Material, Chemikalien und Antikörper.....	28
2.1.3. Kulturmedium und Puffer.....	30
2.1.4. Antikörper für Färbungen mithilfe der Durchflußzytometrie.....	30
2.2. Methoden.....	31
2.2.1. Charakterisierung von Zellen mithilfe der Durchflußzytometrie (FACS).....	31
2.2.2. Oberflächenfärbung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	32
2.2.3. Intranukleäre FOXP3-Färbung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	32
2.2.4. Intrazellulärfärbung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	32
2.2.5. Aufreinigung der naiven CD4 <sup>+</sup> T Zellen.....	33
2.2.6. Sortierung der naiven T-Zellen mittels FACS.....	34

## Inhaltsverzeichnis

2.2.7. Zellkulturbedingungen.....	35
2.2.8. Berechnung der Expansionsraten.....	35
2.2.9 Stimulationssysteme .....	35
2.2.9.1. Zellstimulation mit plattengebundenen Antikörpern .....	35
2.2.9.2 Zellstimulation mit löslichen Antikörpern .....	36
2.2.9.3. Zellstimulation mit anti-CD3/ anti-CD28 beschichteten Beads.....	36
2.2.9.3.1. Zellstimulation mit DynaBeads .....	36
2.2.9.3.2. Zellstimulation mit Latex-Beads.....	36
2.2.10. Restimulation der kultivierten T-Zellen.....	37
2.2.11. Messung der FOXP3-Expression und Analyse des DNA-Methylierungsmusters im <i>foxp3</i> Genlocus.....	37
2.2.12. Genomische DNA- Präparation.....	38
2.2.13. DNA-Methylierungsanalyse im <i>foxp3</i> Genlocus .....	38
2.2.14. Blockade des anti-human PE-gekoppelten FOXP3-Antikörpers .....	39
3. Ergebnisse.....	41
3.1. Etablierung eines Stimulationssystems für konventionelle naive CD4 <sup>+</sup> T-Zellen ...	41
3.1.1. Stimulation von magnetisch sortierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen mit plattengebundenen Antikörpern .....	41
3.1.2. Stimulation sortierter naiver T-Zellen mit plattengebundenen Antikörpern.....	44
3.1.3. Stimulation sortierter, naiver T-Zellen mit löslichen Antikörpern .....	45
3.1.4. Stimulation sortierter, naiver T-Zellen mit Antikörper-beschichteten Beads....	46
3.1.5. Expansionsraten bei Stimulation mit Antikörper-beschichteten Beads.....	47
3.2. Der PE-gekoppelte FOXP3 Antikörper bindet teilweise unspezifisch in stimulierten naiven CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	49
3.3. Die FOXP3-Expression im Vergleich mit dem DNA-Methylierungsmuster im <i>foxp3</i> Gen.....	50
3.4. Vergleich der FOXP3-Expression mit dem DNA-Methylierungsmuster von <i>ex vivo</i> sortierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen, naiven CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen .....	51
3.4.1. FOXP3-Induktion in humanen stimulierten naiven CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	53
3.4.2. Stimulation humaner T-Zellen in Anwesenheit von TGF- $\beta$ bewirkt einen sehr starken Anstieg der FOXP3-Expression .....	54
3.4.3. Stimulation humaner naiver CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 bewirkt einen schwachen Anstieg der FOXP3-Expression .....	59
3.4.4. TGF- $\beta$ und IL-2 bewirken keinen synergistischen Effekt .....	61
3.5. Die induzierten FOXP3 <sup>+</sup> T-Zellen exprimieren Effektor-Zytokine .....	63
4. Diskussion .....	65
4.1. Regulatorische T-Lymphozyten und deren Charakterisierung.....	65
4.2. Etablierung eines Stimulationssystems für humane naive T-Zellen.....	65

## Inhaltsverzeichnis

4.3. Was sind transient FOXP3-exprimierende T-Zellen?.....	66
4.4. Epigenetische Modifikationen zur Beschreibung CD4 <sup>+</sup> FOXP3-exprimierender T-Zellen.....	68
4.5. Epigenetische Analysen in transient FOXP3-exprimierenden T-Zellen .....	69
4.6. Können mithilfe von TGF- $\beta$ , IL-2 oder TGF- $\beta$ plus IL-2 induzierte FOXP3 <sup>+</sup> T-Zellen von natürlichen regulatorischen T-Zellen unterschieden werden?.....	69
4.7. Der PE-gekoppelte FOXP3 Antikörper bindet teilweise unspezifisch .....	71
4.8. Einfluss des DNA-Methylierungsmuster im <i>foxp3</i> Gen auf die Stabilität des FOXP3-Expressionsmusters .....	72
4.9. Beurteilung der epigenetischen Messmethoden .....	73
4.10. Wie geeignet ist der Transkriptionsfaktor FOXP3 zur Beschreibung von humanen regulatorischen T-Zellen?.....	75
4.11. Die Relevanz regulatorischer T-Zellen bei Erkrankungen und neue Therapieansätze.....	75
4.12. Anwendungsbereiche epigenetischer Messmethoden.....	77
4.13. Ausblick .....	78
4.14. Zusammenfassung .....	79
5. Literaturverzeichnis.....	81
6. Publikationsliste .....	88
7. Eidesstattliche Erklärung .....	89
8. Danksagung .....	90
9. Curriculum Vitae .....	91

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin (Fluoreszenzfarbstoff)
CD	Cluster of Differentiation (Zellproteinstruktur, die eine Untergruppe von Lymphozyten charakterisiert)
CTLA 4	Cytotoxic lymphocyte antigen-4
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester
CpG-Motiv	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Motiv
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
FoxP3	Murines Forkhead Box Protein 3 (Transkriptionsfaktor)
FOXP3	Humanes Forkhead Box Protein 3 (Transkriptionsfaktor)
<i>foxp3</i>	<i>foxp3</i> Genlocus
GITR	Glukokortikoid- induced TNF rezeptor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL-2/4/10	Interleukin-2/4/10
IFN-gamma	Interferon-gamma
Konz.	Konzentration
MHCI/II	Major Histocompatibility Complex I/II (Histokompatibilitätsantigen)
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells (Lymphozyten und Monozyten)
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SnuPE	Single nucleotide primer extension (Methode zur Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades von einem CpG-Motiv)
TGF- $\beta$	Transforming-Growth-Factor–beta
Th1-Zelle	T-Helferzelle Typ 1 (analog dazu Th2)
Tr1/TH3-Zelle	Subpopulationen der regulatorischen T-Zellen (unter bestimmten Bedingungen induzierte regulatorische T-Zellen)
Tregs	natürliche regulatorische T-Zellen (sortierte CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T-Zellen)
TZR	T-Zellrezeptor

### 1. Einleitung

#### 1.1. Das Immunsystem

Um Überleben und langanhaltende Gesundheit des Organismus zu sichern, besteht die Hauptfunktion des Immunsystems im Schutz des Körpers vor fremden und gefährlichen Substanzen wie pathogenen Mikroorganismen, Viren, Toxinen sowie malignen Zellen. Um wiederholte Angriffe aus der Umwelt möglichst schnell, wirkungsvoll und langanhaltend abzuwehren, haben sich im Laufe der Evolution zwei Hauptgruppen innerhalb des Immunsystems entwickelt: das angeborene Immunsystem und das erworbene Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ermöglicht eine schnelle Immunantwort, die jedoch keinen langfristigen Schutz, in Form einer antigenspezifischen Immunität, bewirkt. Als Immunität bezeichnet man in diesem Zusammenhang die spezifische Unempfindlichkeit des Organismus für eine Infektion mit pathogenen Mikroorganismen beziehungsweise den Schutz vor der Wirkung mikrobieller Stoffwechselprodukte. Eine langanhaltende Immunität kann vielmehr durch das erworbene Immunsystem, zum Beispiel über die Bildung antigenspezifischer Antikörper durch Plasmazellen (humorale Immunantwort) und durch die Wirkung von Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Antigenkontakt ohne Verzögerung antigenspezifisch reagieren, erzeugt werden. Ein Unterschied des erworbenen Immunsystems gegenüber dem angeborenen Immunsystem liegt in der Erkennung antigener Strukturen (Pathogene, Toxine, Viren) und ist durch eine hohe Anzahl von unterschiedlichen, antigenerkennenden Rezeptoren begründet. Diese grosse Vielfalt antigenerkennender Strukturen birgt jedoch gleichfalls das Risiko der Erkennung und Schädigung von körpereigenen Strukturen. Zur Vermeidung von Gewebeerstörung durch autoreaktive Zellen hat das Immunsystem diverse Kontrollmechanismen entwickelt. Diese Kontroll- und Schutzfunktion basiert auf der Unterscheidung körpereigener von körperfremden Antigenen. In diesem Rahmen versteht man unter dem Phänomen der „Toleranz“ jene Mechanismen, welche auf eine nicht-destruktive Reaktivität gegen bestimmte Antigene, beispielsweise körpereigene Antigene, abzielen. Neben der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen werden im Rahmen der „oralen Toleranz“ auch Immunreaktionen gegen täglich aufgenommene Nahrungsmittel unterdrückt.

Als Folge einer Diskriminierungsstörung körpereigener Antigene von Fremd-Antigenen durch Effektorzellen oder Fehlfunktionen innerhalb der „immunologischen Toleranz“ werden die Entstehung und Verschlimmerung von Hyperreaktivitätsreaktionen,



Autoimmunerkrankungen und malignen Erkrankungen diskutiert (1-4). Im Körper existieren diesbezüglich verschiedene Zellpopulationen, die mittels besonderer Fähigkeiten Immunreaktionen modulieren können. Dazu gehören Subpopulationen der Natürlichen Killerzellen, der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und der Dendritischen Zellen (2). Eine wichtige Rolle spielen ausserdem die sogenannten regulatorischen T-Zellen, deren Herkunft und Funktion sowie zellspezifische Charakteristika Bestandteile der vorliegenden Arbeit sein werden.

### 1.2. Das angeborene und das erworbene Immunsystem

Bei höheren Vertebraten besteht das Immunsystem aus zwei Systemen, dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem, welche miteinander interagierend eine schnelle, wirkungsvolle und langfristige Immunabwehr aufbauen können.

Das angeborene Immunsystem besteht neben der physikalischen und biochemischen Barriere (Haut, Schleimhaut, Magensäure) aus löslichen und zellulären Komponenten. Die löslichen Komponenten umfassen vorwiegend das aus komplexen Proteinkaskaden bestehende Komplementsystem. Den zellulären Teil stellen die Phagozyten (Monozyten und Makrophagen) und die natürlichen Killerzellen dar. Die Abwehrstrategie des angeborenen Immunsystems beruht auf der Erkennung molekularer Strukturen von Pathogenen (sogenannter PAMPs: pathogen-associated molecular patterns), wie zum Beispiel bakterielle Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, Peptidoglykane und Lipoproteine, über spezifische pathogenerkennende Rezeptoren (sogenannter PRRs: pathogen-recognition receptors) auf Zellen des Immunsystems. Werden Erreger beziehungsweise infizierte Zellen im Organismus entdeckt, so können beispielsweise natürliche Killerzellen über die Ausschüttung von lytischen Enzymen die infizierten Zellen töten. Abschließend werden infizierte Zellen, Zellreste und virulente Partikel mittels Antikörpern opsoniert, von Makrophagen phagozytiert und in der Zelle enzymatisch neutralisiert.

Die zweite Hauptgruppe des Immunsystems bilden die Abwehrmechanismen des phylogenetisch jüngeren, erworbenen Immunsystems. Dieser Teil des Immunsystems zeichnet sich durch seine Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Neben antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie beispielsweise Dendritischen Zellen, stellen zwei Zellpopulationen die wesentlichen Elemente der erworbenen Immunität dar: die T-Lymphozyten, welche die zellvermittelte Immunantwort gewährleisten (zelluläre Immunität) und die B-Lymphozyten, welche für

die Bildung von antigenspezifischen Antikörpern (humorale Immunität) verantwortlich sind. Die Abwehrstrategie des erworbenen Immunsystems basiert auf der hochspezifischen Erkennung von Epitopen aus pathogenen Erregern durch antigenspezifische Rezeptoren, die zellmembrangebunden (T-Zellrezeptor und B-Zellrezeptor) und als von Plasmazellen (differenzierte B-Zellen) produzierte Immunglobuline (Antikörper) vorkommen. Werden die Zellen über die direkte Bindung des Antigens oder mittels des Antikörper/Antigen-Komplexes sowie interagierender kostimulatorischer Moleküle aktiviert, folgt die klonale Expansion dieser Zellen. Diese besteht aus einer Vermehrung jener Zellen, die einen hochspezifischen Rezeptor gegen das entsprechende Antigen tragen und das Antigen somit zielgerichtet bekämpfen können.

Bei dem Erstkontakt mit einem „Fremd-Antigen“ verzögert die Spezifität des erworbenen Immunsystems die Ausbildung einer wirksamen Immunantwort, da die initiale Bildung von Antikörpern einige Tage benötigen kann. Die angeborene Immunantwort braucht hingegen nur Minuten oder einige Stunden, um den Erreger anzugreifen. Zur schnellen spezifischen und nachhaltigen Immunantwort ist daher die Gedächtnisfunktion des adaptiven Immunsystems von enormer Relevanz. So können zum Beispiel B-Gedächtniszellen bei einem erneuten Eindringen des Pathogens durch eine beschleunigte Ausschüttung von antigenspezifischen Antikörpern effektiv auf das Antigen reagieren.

### 1.3. Die Zellen des erworbenen Immunsystems

#### 1.3.1. Die B-Lymphozyten

Die Vorläufer der B-Lymphozyten sind die pluripotenten Knochenmarkstammzellen. Die B-Zellen vollziehen eine erste Reifung im Knochenmark. Danach erfolgt eine endgültige Reifung in der Milz, aus der sie in die Zirkulation entlassen werden. Die B-Lymphozyten können zu Plasmazellen differenzieren, deren Besonderheit die Produktion von löslichen Immunglobulinen ist, die spezifisch gegen die Epitope von Antigenen gerichtet sind. Neben der Antigenerkennung mittels löslicher Immunglobuline besitzen die B-Zellen ebenfalls antigenerkennende Rezeptoren in ihrer Zellmembran. Durch Bindung des passenden Antigens wird der Antigen/Antikörper-Komplex in die Zelle inkorporiert und das Antigen in viele Fragmente zerlegt. Die Fragmente werden über MHCII-Komplexe (MHC: Major Histocompatibility Complex) auf der Zelloberfläche präsentiert, um beispielsweise von den T-Lymphozyten erkannt zu werden. In diesem

Zusammenhang fungieren die B-Lymphozyten als antigenpräsentierende Zellen, welche zur Initiierung der Immunantwort unter anderem mit den T-Lymphozyten interagieren können.

### 1.3.2. Die T-Lymphozyten

Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit sind jedoch die T-Lymphozyten (T-Zellen).

Das gemeinsame Charakteristikum aller T-Lymphozyten ist der T-Zellrezeptor (TZR), ein aus zwei Glykoproteinketten bestehendes Heterodimer. Bei der Mehrzahl der T-Zellen sind dazu im Rezeptor eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Glykoproteinkette assoziiert ( $\alpha/\beta$ -T-Zellrezeptor). Einige wenige Zellen tragen den  $\gamma/\delta$ -T-Zellrezeptor. Der TZR dient neben der Bindung des MHC-Antigen-Komplexes (MHC: Major Histocompatibility Complex) der Signalübertragung bei der T-Zellaktivierung. Der funktionelle T-Zellrezeptorkomplex, bestehend aus dem T-Zellrezeptor, dem Molekülkomplex CD3 und weiteren signalübertragenden Molekülen, übernimmt dabei den ersten Schritt der Aktivierung. Eine vollständige Aktivierung einer funktionell aktiven T-Zelle wird durch zusätzliche kostimulatorische Signale erreicht. Diese kostimulatorischen Signale beruhen auf der Interaktion bestimmter Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zelle mit spezifischen Liganden auf der antigenpräsentierenden Zelle.

Zur funktionellen Differenzierung von T-Zellen gibt es zusätzlich zum T-Zellrezeptor Ko-Rezeptoren. Auf reifen T-Zellen sind zusätzlich entweder CD4 oder CD8 als Ko-Rezeptoren exprimiert.  $CD8^+$  T-Zellen binden Zellen, die einen MHCI-Komplex (Major Histocompatibility-Komplex I) tragen.  $CD8^+$  T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet, da sie nach Erkennen eines MHCI-Fremdpeptid-Komplexes und kostimulatorischen Signalen die Zielzelle und weitere infizierte Zellen töten können.  $CD4^+$  T-Zellen interagieren mit Zellen, die den MHCII-Antigen-Komplex auf der Oberfläche exprimieren. Das sind insbesondere antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen.

Nach Aktivierung einer naiven  $CD4^+$  T-Zelle kann sich die naive  $CD4^+$  T-Zelle in Anwesenheit von bestimmten Zytokinen wie Interleukin 12 (IL-12) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in eine Th1-Helferzelle, in Anwesenheit von Interleukin 4 (IL-4) in eine Th2-Helferzelle differenzieren. Die Th1-Zellen helfen bei der Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen zur Bekämpfung vorwiegend intrazellulärer Pathogene, während die Th2-Zellen für die Aktivierung von B-Zellen und hauptsächlich für die Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen zuständig ist.

In Anwesenheit von Interleukin 6 und dem Transforming Growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) können sich naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch in IL-17-produzierende Th17-Zellen differenzieren, welche bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen (5, 6). Interessanterweise exprimieren Th17-Zellen nicht die Th1- und Th2-Zellen definierenden Transkriptionsfaktoren Tbet oder GATA3 und deuten damit auf separat entwickeltes CD4<sup>+</sup> T-Zellsubset hin.

### 1.4. T-Zellentwicklung und Toleranzerzeugung im Thymus

Die Vorläufer der T-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet und wandern nach ihrer Entstehung aus dem Knochenmark in den Thymus aus, um dort zu Thymozyten zu reifen und anschließend in die Peripherie entlassen zu werden. Während der Reifung erhalten die Thymozyten einen T-Zellrezeptor (TZR), welcher ein Antigen hochspezifisch erkennt. Die grosse Anzahl an TZR mit verschiedenen Antigenespezifitäten entsteht durch einen zufälligen Prozess der Gensegmentzusammenlagerung der kodierenden Segmente, sodass eine grosse Anzahl von TZR mit unterschiedlicher Antigenespezifitäten entstehen.

Als einen ersten Schutzmechanismus von autoreaktiven Zellen durchlaufen die heranreifenden Thymozyten im Rahmen der „zentralen Toleranz“ einen aus zwei Schritten bestehenden Selektionsprozess, aus welchem nur 1-2% der eingewanderten Zellen als funktionstüchtige, nicht-selbstreaktive T-Zellen hervorgehen und den Thymus verlassen. Während die T-Zellen aus der Thymusrinde in die Markregion wandern, werden im Rahmen der „zentralen Toleranz“ durch den Kontakt mit verschiedenen Zelltypen die Spezifität und Bindungseigenschaften der T-Zellen für MHC-Selbstantigen-Komplexe getestet und die T-Zellen entsprechend selektioniert. Aus der „positiven Selektion“ gehen jene Thymozyten hervor, die den Selbstantigen-MHC-Komplex auf epithelialen Zellen erkennen und binden. In einem nächsten Schritt werden die Zellen der „negativen Selektion“ unterzogen und auf ihre Reaktivität gegenüber einem körpereigenen Antigen in Kombination mit einem MHC-Komplex auf antigenpräsentierenden Zellen (Dendritischen Zellen, Makrophagen) getestet. Zellen, die den MHCII-Selbstantigen-Komplex mit einer sehr starken Affinität erkennen und somit selbstreaktiv sind, werden negativ selektioniert und gehen in Apoptose („aktivierungs-induzierte Apoptose“). Die aus dem Selektionsprozess hervorgehenden Thymozyten verlassen nach der abgeschlossenen Reifung den Thymus, wandern in die

Peripherie und können dort entsprechend ihrem Stimulus und dem umgebenden Zytokinmilieu weiter differenzieren.

### 1.4.1. Toleranzerzeugung in der Peripherie

Die „zentrale Toleranz“ wird im Thymus durch die genannten Selektionsprozesse repräsentiert und bewirkt eine Entlassung von hauptsächlich funktionstüchtigen, nicht-selbstreaktiven T-Zellen aus dem Thymus. Theoretisch wären alle T-Zellen selektioniert, um MHC/Selbstantigen-Komplexe zu erkennen, ohne dass eine T-Zellaktivierung erfolgt. Tatsächlich geht man aber davon aus, dass einzelne, selbstreaktive Zellen der negativen Selektion entkommen, durch die Erkennung von körpereigenen Antigenen in der Peripherie aktiviert werden und Gewebe zerstören können. Zum Schutz vor der Erkennung und Zerstörung körpereigenen Gewebes durch autoreaktive Zellen in der Peripherie wird die „zentrale Toleranz“ im Thymus durch drei Mechanismen der „peripheren Toleranz“ unterstützt.

Der erste Mechanismus beruht auf der Anergie der T-Zelle bei alleiniger Stimulation des TZR ohne die Beteiligung von kostimulatorischen Signalen. Aufgrund der inkompletten T-Zellaktivierung bleibt eine Immunantwort auf das spezifische Antigen aus. Bei einem weiteren Mechanismus kommt es in Anwesenheit einer fortwährend starken Antigenexposition als Schutzmaßnahme des Körpers zu einer Deletion dieser antigenspezifischen T-Zellen. Gleiches geschieht, wenn eine T-Zelle kurz nach ihrer Aktivierung erneut aktiviert wird.

Ein dritter Mechanismus besteht in der Suppression von Immunreaktionen durch Zellen mit besonderen immunregulatorischen, suppressorischen Fähigkeiten. Dazu gehören neben Subpopulationen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der natürlichen Killerzellen und der dendritischen Zellen vor allem die regulatorischen T-Zellen, die früher aufgrund dieser Eigenschaft auch Suppressorzellen genannt wurden (1-3). Hinsichtlich ihrer Herkunft stellen die regulatorischen T-Zellen neben den Th1-, Th2- und Th17-Zellen eine weitere Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar, welche spenderabhängig circa 5-10% der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten umfasst. Den Ursprung der regulatorischen T-Zellen vermutet man im Thymus, da kurz nach der Geburt thymektomierte Mäuse schnell schwerwiegende Autoimmunerkrankungen entwickeln, wenn sie nicht mit regulatorischen T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen substituiert werden (1-3). Hinsichtlich ihrer Entstehung werden verschiedene Theorien diskutiert. Laut des Aviditätsmodells entwickeln sich im Rahmen der negativen Selektion jene Thymozyten zu regulatorischen T-Zellen, die trotz einer

starken Bindung des MHC/Selbstantigen-Komplexes noch keine „aktivierungs-induzierte Apoptose“ bewirken, somit der negativen Selektion entkommen und in die Peripherie gelangen (1). Andere Theorien besagen, dass diese Zellen während ihrer Entwicklung im Thymus in Anwesenheit von bestimmten Zytokinen gezielte Signale beispielsweise zur Ausbildung von Oberflächenrezeptoren oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erhalten, die eine Entwicklung zu regulatorischen T-Zellen determinieren (1). Zusätzlich zu den im Thymus generierten sogenannten natürlichen regulatorischen T-Zellen existieren ebenso regulatorische T-Zellen peripheren Ursprungs. Unter welchen Bedingungen diese vermutlich Zellen entstehen wird im weiteren Verlauf noch erläutert.

### 1.5. Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen

Das Konzept von spezialisierten „Suppressorzellen“, die Immunreaktionen unterdrücken und das Gewebe vor Zerstörung durch Selbstreaktivität schützen können, wurde von unter anderem von Sakaguchi et al. wiederentdeckt, nachdem schon in den 70iger Jahren die Existenz von Zellen beschrieben wurde, die Immunreaktionen über die Sekretion von bestimmten Faktoren supprimieren konnten (1-3). Versuche, diese Faktoren zu finden, waren erfolglos und bewirkten zunächst eine Skepsis gegenüber dieser Thematik. Erst 1995 beobachteten Sakaguchi et al. erneut, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) exprimieren, Autoimmunerkrankungen durch Suppression von Effektorzellen vermeiden können (8). Bei der weiteren Charakterisierung *in vitro* waren diese Zellen anerg und hyporesponsiv gegenüber einem weiteren TZR-Stimulus (8). Mittlerweile hat sich bestätigt, dass regulatorische T-Zellen CD25 konstitutiv und sehr stark exprimieren (1-3). Daher werden zur Isolation regulatorischer T-Zellen die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-Zellen einer Zellpopulation sortiert. Dennoch ist die Differenzierung der Zellen anhand dieses Oberflächenmarkers schwierig, da dieser auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird (1-4). Die Entdeckung spezifischer extrazellulärer Marker zur Unterscheidung und Isolation von regulatorischen T-Zellen blieb von enormer Wichtigkeit. Als aussagekräftig galten zunächst das Zytotoxische Lymphozyten Antigen-4 (CTLA-4) und der Glukokortikoid-induzierte TNF-Rezeptor (GITR), da man beiden Molekülen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung suppressorischer Eigenschaften zuschrieb (2, 9-11). Aufgrund der Tatsache, dass auch aktivierte T-Zellen diese Moleküle hochregulieren, schienen die Moleküle CTLA-4 und GITR zur alleinigen Identifizierung von regulatorischen T-Zellen

jedoch nicht geeignet. Zur weiteren Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen wurden die Moleküle CD45RB, CD62L, Nrp1, CD103 und LAG-3 diskutiert (1-4,12,13). Aber wie in den vorherigen Fällen definieren diese Strukturen nicht ausschließlich regulatorische T-Zellen.

Ein viel versprechender Oberflächenmarker ist CD127, der von verschiedenen Gruppen vorgeschlagen wurde (14-16). CD127 ist die  $\alpha$ -Kette des Interleukin 7 (IL-7)-Rezeptors und wird von nahezu allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. Ein Subset innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation zeigt nur eine geringe Expression dieses Markers. Unabhängig von ihrer CD25 Expression waren diese Zellen hyporesponsiv gegenüber einem TZR-Simulus, proliferierten nur zu einem geringen Ausmass und zeigten *in vitro* suppressorische Fähigkeiten gegenüber Effektorzellen. T-Zellen mit einer sehr hohen CD127-Expression (CD4<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>T-Zellen) waren in Proliferationsassays nicht suppressiv wirksam. Aufgrund dieser Ergebnisse wird zur Isolation einer reinen Population regulatorischer T-Zellen eine Sortierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> T-Zellen angeraten (14-16). Zusätzlich wurde die selektive Expression von IL-35, einem Fusionsprotein des Epstein-Barr-virus-induzierten Gens 3 und Interleukin 12-alpha, in regulatorischen T-Zellen belegt (17). Die ektopische Expression des inhibitorischen Zytokins IL-35 verschafft der transduzierten Zelle unter anderem suppressorische Fähigkeiten und wird daher als aussagekräftiger Parameter funktioneller, regulatorischer T-Zellen dargestellt.

### 1.6. Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen

Im Rahmen ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten können regulatorische T-Zellen sowohl einzelne Zellen als auch gesamte Immunreaktionen beeinflussen. In Ko-Kultur mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen supprimieren regulatorische T-Zellen sowohl die Proliferation als auch die Zytokinproduktion der Zielzellen (1-3). Dabei geht in *in vitro* Suppressionsassays ein Anstieg der regulatorischen T-Zellen mit einer verminderten Proliferation der Zielzellen einher (2). Aufgrund der Fähigkeit von regulatorischen T-Zellen, Zellen und Immunreaktionen zu supprimieren hat man verschiedene *in vitro* und *in vivo* Modelle entwickelt, um die möglichen Suppressionsmechanismen genauer zu untersuchen (26). So wurde die Suppression mithilfe von löslichen Faktoren wie zum Beispiel dem immunsupprimierenden Zytokin Interleukin 10 (IL-10) und dem Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) diskutiert, welche von regulatorischen T-Zellen nach Aktivierung sezerniert werden. *In vitro* Experimente zeigten diesbezüglich, dass die Suppression durch regulatorische T-Zellen

auch unabhängig von IL-10 und TGF- $\beta$  ablaufen kann, da regulatorische T-Zellen aus IL-10-defizienten und TGF- $\beta$ -defizienten Mäusen die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen effektiv supprimieren konnten. Hingegen können *in vivo* IL-10 produzierende regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen) generiert werden, die wiederum Effektorzellen über die Sekretion von IL-10 supprimieren (27).

Neben der Suppression durch lösliche Faktoren wurden ebenso zellkontaktabhängige Mechanismen diskutiert (26). Diesbezüglich wurde *in vitro* gezeigt, dass die Suppression der Zielzellen über einen direkten Zellkontakt ablaufen muss, da eine Separation der Zellpopulationen durch eine semipermeable Membran die Zielzellen in ihrer Proliferation unbeeinflusst lässt. Eine zellkontaktabhängige Suppression wird zudem durch die Interaktion des Oberflächenmoleküls CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen und mit dessen Liganden CD80 und CD86 auf aktivierten T-Zellen gestützt. *In vitro* Versuche zeigten, dass die Interaktion dieser Moleküle eine Suppression der Proliferation und Zytokinproduktion der Zielzelle bewirkte, während die Abwesenheit von CD80 oder CD86 hingegen eine abgeschwächte Suppression verursachte. Jedoch konnten diese Ergebnisse bislang *in vivo* nicht belegt werden.

Zytolytische Mechanismen und Zelltod durch Granzym A und Perforine als Grund der mangelnden Proliferation der Effektorzellen, wurden mithilfe eines zahlenmässigen Vergleich der Suppressorzellen mit den supprimierten T-Zellen zunächst ausgeschlossen (26).

Ein weiterer Suppressionsmechanismus beruht auf der Indolamin-2,3-Desoxygenase (IDO), welche bei der Interaktion von CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen mit CD80 oder CD86 auf APCs aktiviert wird (26). Aus der Induktion von IDO folgen geringere Mengen der essentiellen Aminosäure Tryptophan, was wiederum mit einer verminderten T-Zellaktivierung assoziiert wird. Jedoch scheint es sich auch hierbei nicht um einen allgemeingültigen Mechanismus zu handeln, da eine Suppression von Zielzellen auch in APC-freien Kulturen stattfindet.

Bopp et al. beschrieben die Relevanz des zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP), welcher als Proliferationshemmer und Inhibitor der IL-2-Produktion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen bekannt ist (28). In Ko-Kultur mit regulatorischen T-Zellen stieg cAMP in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen an und korrelierte massgeblich mit der abnehmenden IL-2-Produktion und der ausbleibenden Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.



### 1.7. Relevanz regulatorischer T-Zellen bei Erkrankungen

Im klinischen Zusammenhang konnte die Relevanz von regulatorischen T-Zellen in klinischen Studien und *in vitro* Experimenten in der Transplantationsmedizin, in der Onkologie, bei Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen (Hepatitis B und C, HIV) belegt werden (18-25). Diesbezüglich wird ein Mangel an funktionierenden regulatorischen T-Zellen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung assoziiert, während ein Anstieg der regulatorischen T-Zellen ein Tumorwachstum begünstigen und den Verlauf von Infektionen durch Unterdrückung antigenspezifischer Zellen stark beeinträchtigen kann (Hepatitis B und C, HIV).

### 1.8. FoxP3 – ein neuer Marker für regulatorische T-Zellen

Ein großer Fortschritt für die Charakterisierung regulatorischer T-Zellen war die Entdeckung des Forkhead Box Proteins P3 (*foxp3*)-Gens. Die Betrachtung der immundefizienten „scurfy“ Maus führte zur Identifizierung des FoxP3-Transkriptionsfaktors und des *foxp3* Gens, welches auf dem X-Chromosom an der Stelle Xp11.23 lokalisiert ist (4, 29).

Männliche Tiere dieses Mausstammes starben im Alter von 3–4 Wochen an einer schweren Autoimmunerkrankung. Bei detaillierter Analyse der Lymphozytenpopulation fielen die Tiere durch eine Überproliferation der CD4<sup>+</sup> Effektorzellen sowie einen absoluten Mangel an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen auf. Eine Verschlechterung der Autoimmunerkrankung konnte durch einen adaptiven Transfer von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtyp-Tieren verhindert werden. In folgenden Analysen entdeckte man den Transkriptionsfaktor FOXP3 und das *foxp3* Gen, mit dessen Deletion das Fehlen von regulatorischen T-Zellen belegt werden konnte (4, 30, 31). In Vergleichsanalysen von Lymphozyten aus Wildtyp-Mäusen exprimierten bis zu 90% der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-Zellen FoxP3, während in ruhenden und aktivierten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen kein FoxP3 messbar war. Zusätzlich liessen sich durch eine Deletion der FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen autoimmune Erkrankungen wie in der „scurfy“ Maus provozieren (81).

In weiteren Studien wurde daraufhin die Notwendigkeit des Transkriptionsfaktors FoxP3 für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von regulatorischen Fähigkeiten in murinen T-Zellen belegt (30-32). Dazu wurden naive T-Zellen mit dem *foxp3* Gen retroviral transduziert und hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Fähigkeiten untersucht (30-32). Die gewonnenen FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen waren suppressiv gegenüber CD4<sup>+</sup> Effektorzellen

und zeigten das Expressionsprofil natürlicher regulatorischer T-Zellen ( $CD4^+CD25^+$ ,  $CTLA4^+$ ,  $GITR^+$ ).

Analog zur Maus exprimieren auch beim Menschen ein Großteil der *ex vivo* sortierten  $CD4^+CD25^{high}$  regulatorischen T-Zellen FOXP3. Mutationen im *foxp3* Gen äussern sich beim Menschen ebenfalls in Form einer schweren Autoimmunerkrankung, welche unter dem IPEX-Syndrom (Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X-linked Syndrome) zusammengefasst wird. Aufgrund der massiven entzündlichen Prozesse wird diese Erkrankung mit starken Immunsuppressiva behandelt oder macht bei schweren Verläufen eine Knochmarkstransplantation notwendig (33). Bis zum derzeitigen Zeitpunkt konnten 20 Mutationen im *foxp3* Gen für das IPEX-Syndrom verantwortlich gemacht werden (34). Meistens besitzen die Patienten eine geringe Anzahl von  $CD4^+CD25^{high}$  regulatorischen T-Zellen, die darüberhinaus in *in vitro*-Analysen ein funktionelles Defizit hinsichtlich ihrer suppressorischen Fähigkeiten und der FOXP3-Expression aufweisen. Somit kommt es nicht auf die absolute Anzahl, sondern auch auf die Funktionalität der  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen an. Gleichfalls unterstützen diese Ergebnisse die Theorie, dass FOXP3 bei der Entwicklung funktionstüchtiger  $CD4^+CD25^+$  regulatorischer T-Zellen eine wichtige Rolle spielt.

### 1.9. Die verschiedenen Subpopulationen regulatorischer T-Zellen

Toleranz gegenüber Selbstantigenen wird von regulatorischen T-Zellen vermittelt, welche in ihrer Gesamtheit verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen Charakteristika umfassen (35). Den prozentual größten Anteil machen die im Thymus generierten, sogenannten natürlichen regulatorischen T-Zellen aus. Diese zeichnen sich durch eine stabile FoxP3-Expression, sowie stabile suppressorische Fähigkeiten aus. Von den natürlichen regulatorischen T-Zellen unterscheidet man die induzierten Foxp3+ regulatorischen T-Zellen, welche in der Peripherie nach TZR-Stimulus in Anwesenheit eines bestimmten Zytokinmilieus FOXP3 exprimieren und regulatorische Fähigkeiten besitzen können. Des Weiteren existieren T-Zellen, welche auch ohne FoxP3 zu exprimieren, Zielzellen supprimieren können.

Wie bei der Suppression von Zielzellen scheint TGF- $\beta$  eine ebenfalls wichtige Rolle bei der Induktion peripherer regulatorischer T-Zellen zu spielen. Sowohl in murinen als auch in humanen T-Zellen konnte *in vitro* festgestellt werden, dass in naiven T-Zellen durch die Zugabe von TGF- $\beta$ , welches ubiquitär im Körper vorkommt, FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen induziert werden können (36-39). Während die murinen  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  T-Zellen

einen stabilen regulatorischen Phänotyp mit *in vitro* belegbaren suppressorischen Eigenschaften aufweisen, existieren kontroverse Daten hinsichtlich der peripheren Induktion funktioneller humaner regulatorischer T-Zellen durch TGF- $\beta$ . So konnten Fantini und Kollegen suppressorische Eigenschaften der induzierten FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen belegen (33, 34), während in anderen Studien bei der Induktion eines regulatorischen Phänotyps mithilfe von TGF- $\beta$  (CTLA-4<sup>+</sup>, CD25<sup>high</sup>, GITR<sup>+</sup>) keine Suppressoreigenschaften der regulatorischen T-Zellen erkennbar sind (48).

Neben TGF- $\beta$  spielen auch andere Zytokine bei der peripheren Induktion eine wichtige Rolle. So sind die adaptiven Typ 1 regulatorischen T-Zellen (Tr1-Zellen) aus naiven T-Zellen in der Anwesenheit von hohen Mengen an IL-10 und einem Antigenstimulus induzierbar und produzieren große Mengen an IL-10, TGF- $\beta$  sowie geringe Mengen an IFN- $\gamma$  und IL-5 (27, 35). Interessanterweise exprimieren Tr1-Zellen kein FoxP3, können jedoch, wie die natürlichen regulatorischen T-Zellen, Effektorzellen inhibieren. Die antigenspezifische Suppression scheint sowohl *in vitro* als auch im *in vivo* EAE-Modell (Experimentelles Autoimmun-Enzephalomyelitis-Modell) der Maus IL-10-vermittelt abzulaufen (40).

Neben dem Zytokinmilieu ist ebenso die Art der Antigenstimulation bei der Generierung von FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen ausschlaggebend, da Apostolou et al. mittels der subkutanen Darreichung geringer Mengen an Antigen über 2 Wochen antigenspezifische FoxP3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen generieren konnten, die *in vivo* sowohl die Proliferation als auch die Zytokinproduktion der Effektorzellen inhibieren konnten (41).

Eine weitere Subpopulation der regulatorischen T-Zellen, die antigenspezifischen FoxP3-exprimierenden Th3-Zellen, können im Rahmen der oralen Toleranz durch Applikation von Antigen per os *in vivo* induziert werden (42). *In vitro* erfolgt die Generierung der Zellen durch den Zusatz von TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10 and anti-IL-12 zum Kulturmedium. Die FoxP3-exprimierenden Th3-Zellen sezernieren signifikante Mengen an TGF- $\beta$  sowie geringe Mengen an IL-4 und IL-10 und können antigenspezifische Effektorzellen inhibieren. Diesbezüglich könnte man schlußfolgern, dass die Th3-Zellen mittels der Produktion von TGF- $\beta$  sowohl einen direkten (durch „eigene“ regulatorische Fähigkeiten) als auch einen indirekten Einfluss (Induktion von FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen) auf die periphere Toleranz haben.

### 1.10. Die Transiente FOXP3-Expression in humanen T-Zellen

Untersuchungen in der Maus zeigen, dass eine FoxP3-Expression in T-Zellen mit der Ausbildung von suppressorischen Fähigkeiten korreliert und somit dem Phänotyp einer regulatorischen T-Zelle entspricht (1-4). Hingegen belegen Studien mit humanen T-Zellen, dass die Expression des Transkriptionsfaktors nicht nur auf regulatorische T-Zellen beschränkt bleibt (43-47). Im Rahmen der transienten FOXP3-Expression können humane naive T-Zellen, die am Tag 0 kein FOXP3 exprimierten, nach Aktivierung den Transkriptionsfaktor FOXP3 transient hochregulieren und nach einer maximalen Expression an Tag 3 und Tag 4 den Faktor wieder verlieren.

Darüberhinaus beobachteten Gavin et al., dass die induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen aufgrund einer Zytokinproduktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  Effektorzell-Eigenschaften aufweisen und es sich bei diesen Zellen daher um keine regulatorischen T-Zellen, sondern transient FOXP3-exprimierende Effektorzellen handelt (44).

In einer ähnlichen Studie zeigten Wang et al., dass die transient FOXP3-exprimierenden T-Zellen zwar hyporesponsiv gegenüber einem TZR-Stimulus waren, aber die FOXP3-Induktion nicht zwingend mit der Ausbildung von suppressorischen Fähigkeiten einherging (46). In Suppressionsassays supprimierten ebenso aktivierte, FOXP3<sup>-</sup> T-Zellen autologe CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Morgan et al. behaupten, dass die transiente FOXP3-Expression ein Zustand sei, der gleichermassen von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen erreicht werden kann (47). Ebenso zeigten Pillai et al., dass die induzierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen die Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion autologer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen inhibieren und signifikante Mengen an Tumornekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und dem immunsupprimierenden Zytokin IL-10 produzieren (45). Eine über die Zeit der Kultivierung abnehmende FOXP3-Expression konnte zusätzlich mit einer abnehmenden Suppressionsfähigkeit gegenüber autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen korreliert werden. Hinsichtlich der zugrundeliegenden Mechanismen für die transiente FOXP3-Expression begründen Tran et al. die FOXP3-Induktion mit der Anwesenheit von TGF- $\beta$  in dem Kulturmedium, da bei Stimulation von naiven FOXP3<sup>-</sup> T-Zellen in TGF- $\beta$  freien Serum nahezu keine FOXP3-Expression gemessen werden konnte (48).

### 1.11. Eigenschaften und Wirkung von FoxP3

Das *foxp3* Gen codiert ein Protein mit 431 Aminosäuren, welches zur Familie der forkhead (FKH) Transkriptionsfaktoren gehört. Zusätzlich zu einer FKH-DNA Bindungsdomäne und einer Repressordomäne besitzt FoxP3 einen Leuzin-Zipper und einen Zinkfinger (4).

#### Der Transkriptionsfaktor FoxP3

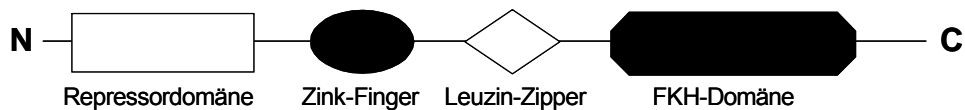


Abb. 1: Der Transkriptionsfaktor FOXP3  
Darstellung des FOXP3 Proteins mit den entsprechenden Bindedomänen (4)

Als intranukleärer Transkriptionsfaktor wandert FoxP3 in den Nukleus, bindet die DNA und kann als Repressor die Genregulation und die Transkription von Genen, wie zum Beispiel durch die Interaktion mit den zentralen Transkriptionsfaktoren NFAT oder NF $\kappa$ B, modulieren (4, 49-51). Darüberhinaus konnten in zwei Arbeiten mittels ChiP-Analysen (Chromatin-Immunopräzipitation) Bindestellen von FoxP3 im Mausgenom identifiziert werden, wobei die Bindung von FoxP3 mit seiner FKH-DNA Bindungsdomäne in der Nähe von Promotern oder ersten Introns eines Gens die regulatorischen Fähigkeiten dieses Transkriptionsfaktors bestätigen (52, 53). In diesen Arbeiten zeigte sich darüberhinaus, dass der Transkriptionsfaktor neben seiner repressorischen Komponente ebenso als Aktivator agieren kann. In diesem Rahmen kommt es beispielsweise zur Aktivierung der Gene für CD25, CD103 und CTLA-4, während durch die Bindung an bestimmte Promotoren oder Transkriptionsfaktoren die Genexpression von IL-2 und IFN- $\gamma$  hemmend beeinflusst wird (52, 53). Die von FoxP3 regulierten Zielgene sind vorwiegend Schlüsselemente in der T-Zellaktivierung und betreffen TZR-Signalkaskaden, Zellkommunikation, transkriptionelle Regulatoren sowie Zielgene, welche den regulatorischen Phänotyp definieren (IL-2, CTLA-4, Nrp-1, ICOS) (52, 53).

Bei der Identifizierung von FoxP3 abhängig- und FoxP3 unabhängig-regulierten Molekülen beschreiben Sugimoto und Kollegen Kandidaten, die der zukünftigen Charakterisierung regulatorischer T-Zellen dienen könnten. In *ex vivo* sortierten und über ein retrovirales FoxP3 Konstrukt transduzierten FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen kristallisierten

sich Gpr83 (G-coupled protein 83) und Emc1 als stark FoxP3 abhängig-regulierte Moleküle heraus, deren Expression in der Maus ausschließlich auf regulatorischen T-Zellen bestätigt werden konnte und die somit Kandidaten zur Beschreibung regulatorischer T-Zellen darstellen (54). Hansen et al. konnten sowohl in murinen als auch humanen T-Zellen nach FoxP3-Überexpression eine Gpr83-Induktion beobachten (55). Darüberhinaus waren Gpr83-transduzierte T-Zellen in der Lage *in vivo* die Effektorphase einer Hypersensitivitätsreaktion zu inhibieren, wobei der Erwerb der Suppressionsfähigkeit mit einer parallelen FoxP3-Induktion einherging (55).

### 1.12. Die Rolle von Interleukin 2 und Transforming Growth factor-beta bei regulatorischen T-Zellen

Bei der Toleranzerzeugung durch regulatorische T-Zellen wird zwei Mediatoren eine wichtige Rolle beigemessen: Interleukin 2 (IL-2) und Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

IL-2 wird von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausgeschüttet und stimuliert über autokrin- und parakrin-gerichtete Signalkaskaden die Aktivierung, das Wachstum und die Expansion von T-Zellen. Natürliche CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen benötigen IL-2 zum Überleben und zur Expansion, können dies, im Gegensatz zu konventionellen T-Helferzellen, selbst nicht produzieren (1-3, 56). Eine erfolgreiche Kultivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen muss daher in Gegenwart von IL-2-Produzenten oder unter Zusatz von exogenem IL-2 erfolgen. Ursprünglich ging man davon aus, dass IL-2 für die Generierung von regulatorischen T-Zellen essentiell ist. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch IL-2-defiziente Mäuse eine funktionelle Treg-Population besitzen, wobei diese Population jedoch sehr viel kleiner als die in Wildtyp-Mäusen ist (1, 57). Aufgrund dieser Beobachtungen wird IL-2 keine Notwendigkeit bei der Generierung von regulatorischen T-Zellen, jedoch bei der Homöostase und Aufrechterhaltung der Funktion von regulatorischen T-Zellen zugesprochen (56, 58, 59). Darüberhinaus scheint IL-2 als Schlüsselement bei der Suppression von konventionellen T-Zellen durch regulatorische T-Zellen eine Rolle zu spielen. Eine These lautet diesbezüglich, dass die regulatorischen Zellen in Ko-Kultur mit IL-2 produzierenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen erfolgreicher um das IL-2 kompetitieren und somit die Zielzellen über den Abbruch der IL-2 Produktion auf mRNA Ebene inhibieren (56).

Neben IL-2 hat TGF- $\beta$  einen wichtigen Stellenwert bei der peripheren Toleranz (1-4, 60). TGF- $\beta$  wird unter anderem von Makrophagen nach der Phagozytose von Zellresten produziert und kann über intrazelluläre Signalkaskaden die Zellaktivierung, das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Apoptose beeinflussen. Diesbezüglich wurde beobachtet, daß TGF- $\beta$  einen wachstumshemmenden Einfluß auf die umgebenden Zellen hat. Ein Abbruch der TGF- $\beta$  Signaltransduktion führt hingegen zu einer spontanen Zellproliferation und Zelldifferenzierung und endet in einer inflammatorischen Autoimmunität (61). In homozygoten TGF- $\beta^{-/-}$  Mäusen wird durch eine überhöhte Aktivierung der Zellen und einem folgenden Anstieg der Apoptoserate die positive und negative Selektion der T-Zellen im Thymus aus dem Gleichgewicht gebracht (62). In der Peripherie besteht als Folge einer permanente Aktivierung der T-Zellen ebenso eine erhöhte Apoptoserate, welche jedoch die Entzündung des Gewebes weiter verstärkt anstatt sie zu reduzieren. Im Rahmen einer starken Immundysregulation versterben die TGF- $\beta^{-/-}$  Mäuse schon intrauterin oder bis zu 3 Wochen nach der Geburt an einer schweren Autoimmunerkrankung (63). Dennoch kann der Phänotyp der TGF- $\beta$  null mouse nur teilweise durch die funktionellen Defekte der regulatorischen T-Zellen erklärt werden. Neben der eingeschränkten Funktion von regulatorischen kommt es zu einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und TH1-Zellen (64). Eine verstärkte Bildung von pathologischen T-Zellsubpopulationen, die das Profil von natürlichen Killerzellen mit grossen Mengen Perforinen, Granzymen und IFN- $\gamma$  beinhalten, können Autoreaktivität Autoimmunerkrankungen verursachen und verstärken (64). Während also die Abwesenheit von TGF- $\beta$  eine verstärkte Entzündungsreaktion bewirkt, lassen sich durch Zugabe von TGF- $\beta$  murine und humane naive T-Zellen in FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen konvertieren (36-39). Diese weisen zumindestens in der Maus den Phänoyp und die suppressorischen Fähigkeiten einer regulatorischen T-Zelle auf und können Autoimmunerkrankungen entgegen wirken.

### 1.13. Epigenetische Regulationsmechanismen von FoxP3 im murinen System

Bezüglich der Herkunft von regulatorischen T-Zellen vermutet man, dass es sich bei den im Thymus generierten natürlichen regulatorischen T-Zellen um eine stabile Zelllinie handelt, die durch eine permanente und somit stabile FoxP3-Expression charakterisiert ist (32, 35, 66). Diese Annahme konnte durch Arbeiten aus unserer Gruppe bestätigt werden, in denen Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)

markierte  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen in Empfängermäuse gespritzt wurden (67). Nach 14 Tagen wurden die proliferierten regulatorischen T-Zellen hinsichtlich der FoxP3-Expression analysiert. Nach der Analyse exprimierten die markierten, transferierten regulatorischen T-Zellen weiterhin zu 97 % FoxP3.

Auf der Suche nach Mechanismen, welche die stabile FoxP3-Expression beeinflussen, war eine Frage, inwieweit epigenetische Mechanismen zur Aufrechterhaltung einer stabilen FoxP3 Expression  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  T-Zellen beitragen können. Unter der Epigenetik versteht man vererbare Mechanismen, welche die Ausbildung des Phänotyps beeinflussen, ohne die DNA-Sequenzabfolge zu verändern. Dazu zählt man die Genregulation über Histonmodifikationen wie Azetylierungen und Methylierungen, kleine RNA-Spezies (zum Beispiel anti-sense RNA) und die Methylierung von Cytosin innerhalb von Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Motiven (CpG-Motive). Diesbezüglich geht man davon aus, dass in CpG-reichen Regionen eine größere Wahrscheinlichkeit für epigenetische Einflüsse mittels einer selektiven DNA-Methylierung besteht als in anderen Regionen des Genoms. Bei örtlicher Methylierung ist die DNA in ihrer Struktur an dieser Stelle kondensiert und unzugänglich für Transkriptionsfaktoren (Gene Silencing). Daher spricht ein hohes Maß an Methylierung für eine Inaktivierung des Gens, während eine Demethylierung des Gens mit einer Genaktivität korreliert wird. In der Vergangenheit wurde in T-Zellen die Rolle epigenetischer Mechanismen bei der Genexpression von Zytokinen (IFN- $\gamma$  und IL-4) und der Differenzierung von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen beschrieben und gibt somit Grund zur Annahme, dass weitere Gene epigenetisch reguliert werden (68).

In Vorbereitung zur DNA-Methylierungsanalyse wurde in unserer Arbeitsgruppe ein 30.8 kb großes Fragment, welches das *foxp3* Gen enthielt, aufgrund der Dichte an CpG-Motiven in verschiedene Abschnitte unterteilt. Diese CpG-reichen Abschnitte wurden Amplikons genannt, da sie nach Bisulfitbehandlung über eine Polymerase-Chain-Reaction (PCR) vervielfältigt, anschließend sequenziert und ausgewertet wurden (siehe Material und Methoden, 69).

Bei der DNA-Methylierungsanalyse von vier Amplikons stellte sich heraus, dass zwei der gewählten Amplikons eine genetisch konservierte Region enthalten (67). Bei der Analyse *ex vivo* sortierter  $CD4^+CD25^+$  regulatorischer T-Zellen, die zu 95 % Foxp3 exprimierten, zeigte sich, dass die konservierte Region nahezu komplett demethyliert war. Im Gegensatz dazu waren konventionelle naive T-Zellen, die kein Foxp3 exprimierten, in der konservierten Region komplett methyliert, was mit einer Inaktivität



des *foxp3* Gens korreliert wird. In den anderen analysierten Amplikons waren keine Unterschiede zwischen den Zellpopulationen messbar, was auf eine selektive Methylierung der konservierten Region im *foxp3* Genlocus hindeutet.

Aufgrund der selektiven DNA-Demethylierung der konservierten Region in natürlichen regulatorischen T-Zellen und molekulargenetischen Daten zur transkriptionellen Fähigkeit dieser Region wurde diese konservierte Region im *foxp3* Gen als „T-reg specific demethylation region-(TSDR)“ bezeichnet.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Versuche zeigten, dass es in Anwesenheit von TGF- $\beta$  möglich ist, in peripheren CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen FoxP3 zu induzieren (36-39). Dazu wurde das DNA-Methylierungsmuster der mithilfe von TGF- $\beta$  induzierten Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen analysiert (67). Dabei zeigte sich in der DNA-Methylierungsanalyse dieser T-Zellen keine 100%ige Demethylierung wie bei natürlichen *ex vivo* sortierten regulatorischen T-Zellen. Darüberhinaus regulieren zunächst unter TGF- $\beta$  Zugabe induzierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen den Transkriptionsfaktor FoxP3 in Abwesenheit von TGF- $\beta$  wieder herunter. Aufgrund dieser Ereignisse werden die in den genannten Untersuchungen mithilfe von TGF- $\beta$  induzierten Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen mit einer instabilen Foxp3-Expression korreliert, da eine komplette Demethylierung in der TSDR im *foxp3* Gen für eine stabile FoxP3-Expression notwendig ist.

### 1.14. Epigenetische Regulationsmechanismen von FOXP3 in humanen Zellen

Analog zur Maus befindet sich das *foxp3* Gen beim Menschen ebenso auf dem X-Chromosom, ist auf dem DNA-Strang in seiner Orientierung invertiert. Nach der Analyse des DNA-Methylierungsstatus im *foxp3* Gen von sortierten murinen T-Zellen, wurden humane *ex vivo* sortierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> naive T-Zellen hinsichtlich ihres DNA-Methylierungsmusters im *foxp3* Genlocus und ihrer FOXP3-Expression untersucht (70). In Abbildung 2 ist das auf dem X-Chromosom lokalisierte *foxp3* Gen mit den verschiedenen Amplikons und den Methylierungsanalysen für *ex vivo* sortierten naive T-Zellen und *ex vivo* sortierte regulatorische T-Zellen anhand von verschiedenen Farbschattierungen dargestellt. Die *ex vivo* sortierten regulatorischen Zellen waren in der TSDR (Amplikon 5) komplett demethyliert (gelbe Schattierung der CpG-Motive), während die *ex vivo* naiven T-Zellen in dem analysierten Amplikon eine komplette DNA-Methylierung der TSDR zeigten (blaue Schattierung der CpG-Motive). Bei Untersuchung der FOXP3-Expression

## Einleitung

derselben Zellpopulationen exprimierten 84 % der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen FOXP3, während nur 0,75 % FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen in der naiven T-Zellpopulation gemessen wurden.

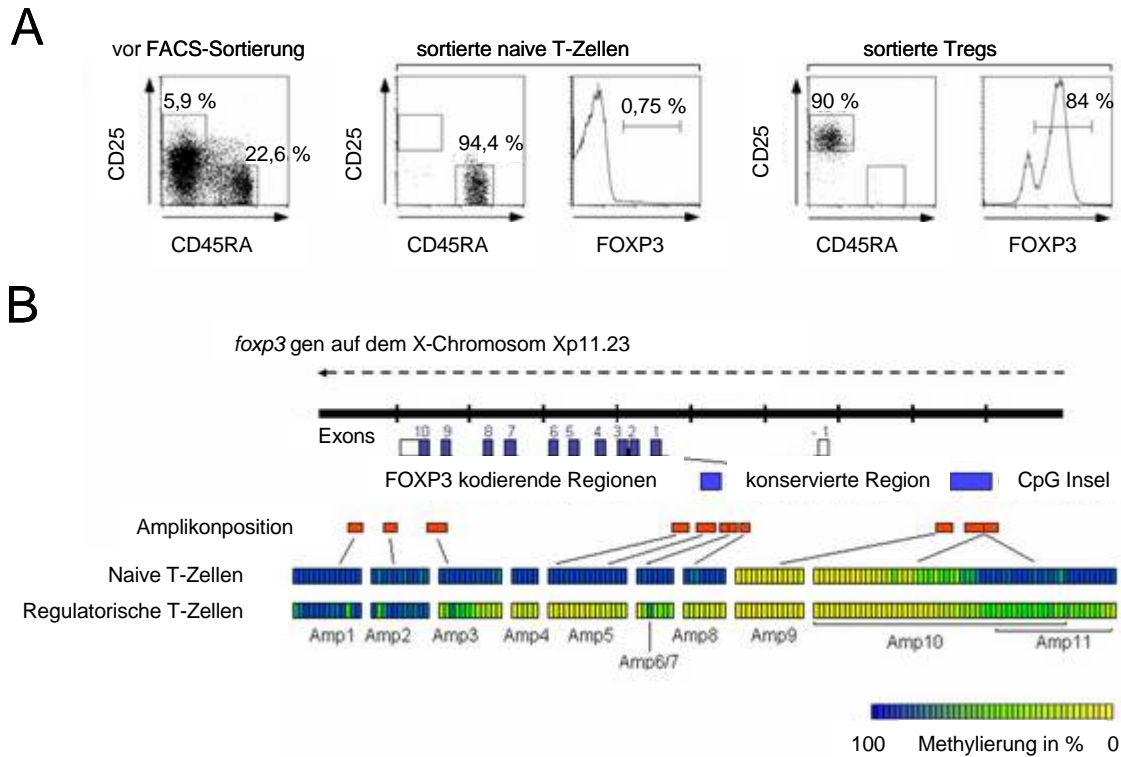


Abb. 2: Die FOXP3-Expression und DNA-Methylierungsanalyse des humanen *foxp3* Genlocus in sortierten T-Zellpopulationen

A: Darstellung der naiven T-Zellen und regulatorischen T-Zellen in der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Gesamtpopulation (vor Sortierung) sowie die Bestimmung der FOXP3-Expression der beiden sortierten Zellpopulationen.

B: Dargestellt ist der *foxp3* Genlocus mit den entsprechenden Amplikons (Amp1-Amp11), wobei die TSDR durch das Amplikon 5 repräsentiert wird. Im unteren Teil findet sich die DNA-Methylierungsanalyse des *foxp3* Genortes für *ex vivo* sortierte naive T-Zellen und *ex vivo* sortierte regulatorische T-Zellen. Dabei entsprechen die unterschiedlichen Farbschattierung der unterschiedlich prozentualen Demethylierung in den untersuchten Amplikons.

### 1.15. Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Regulatorische T-Zellen vermitteln Toleranz gegenüber Selbstantigenen, können Immunreaktionen modulieren und spielen eine zentrale Rolle bei Autoimmunerkrankungen, Krebserkrankungen und in der Transplantationsmedizin. Aufgrund der zunehmenden klinisch-diagnostischen und klinisch-therapeutischen Relevanz ist eine Charakterisierung dieser spezifischen T-Zellpopulation von enormer Wichtigkeit. Das Forkhead Box Protein P3 (FoxP3) ist ein Transkriptionsfaktor für die Charakterisierung muriner regulatorischer T-Zellen und wurde mittlerweile auch beim Menschen identifiziert. Hinsichtlich der Stabilität von FoxP3 geht man von einer im Thymus generierten FoxP3<sup>+</sup> T-Zelllinie aus, die von induzierten FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen in der Peripherie unterstützt wird (4, 30-32, 66). Zusätzlich korreliert in murinen Zellen eine FoxP3-Expression mit der Entwicklung von regulatorischen Fähigkeiten, während Studien in humanen Zellen zur transienten FOXP3-Expression eine ausschließliche Expression von FOXP3 in regulatorischen T-Zellen und damit dessen Spezifität für funktionelle regulatorische T-Zellen in Frage stellen (43-47).

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals epigenetische Messmethoden im *foxp3* Gen in unterschiedlichen FOXP3-exprimierenden T-Zellen angewandt, welche weitere Erkenntnisse über die FOXP3-Expression in regulatorischen T-Zellen liefern sollten. Dazu wurde in stimulierten T-Zellen das DNA-Methylierungsmuster in der „Treg-specific-demethylation-region“ (TSDR) des humanen *foxp3* Gens untersucht. Diese im *foxp3* Gen konservierte Region stellte sich für eine Charakterisierung von murinen und humanen T-Zellen als besonders geeignet dar (67, 70). Nach Etablierung eines geeigneten Stimulationssystems wurde die FOXP3-Expression unterschiedlich stimulierter T-Zellen gemessen und miteinander verglichen. Darüberhinaus war es das Ziel, anhand des DNA-Methylierungsmuster in der TSDR natürliche regulatorische T-Zellen von induzierten regulatorischen T-Zellen unterscheiden zu können und damit Aussagen über das FOXP3-Expressionsmuster in den Zellen zu gewinnen. In Anbetracht der transienten FOXP3-Expression in humanen T-Zellen sollte weiterhin untersucht werden, inwieweit die Erfassung des DNA-Methylierungsstatus in der TSDR im *foxp3* Gen verglichen mit der üblichen Messung der FOXP3-Expression auf Proteinebene einen aussagekräftigeren Marker zur Beschreibungen regulatorischer T-Zellen darstellt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Geräte	Hersteller
Durchflusszytometer:	
FACS Aria Cell-Sorting System™	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Diva Cell-Sorting System™	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Calibur™	Becton Dickinson, Heidelberg
AUTOMacs™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder, Tuttlingen
Dynal Magnet	Invitrogen, Karlsruhe
MACS-Mix	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Reinluftarbeitsbank	Heraeus Instruments, Hanau
Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen (Biofuge fresco, Biofuge 28 RS, Megafuge 1.0 R)	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.2. Material, Chemikalien und Antikörper

Anti-human CD3 AK (Klon: UCHT1)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-human CD3 AK (Klon: OKT3)	DRFZ
Anti-human CD28.1 AK	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-human FOXP3 Staining Kit (Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer)	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Ratte Immunglobulin (IgG)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
Beriglobin	ZLB Behring GmbH, Marburg

## Material und Methoden

Beta-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Taufkirch
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fluka BioChemika, Buchs, Schwitzerland
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Dynabeads CD3/CD28 T cell Expander	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol (96-98%)	J.T.Baker, Deventer, Holland
Ethylendiamintetraacetylsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirch
Fetales Kälberserum (FCS) für 30 min bei 56°C inaktiviert	Sigma-Aldrich, Taufkirch
Ficoll-Paque™ Plus	GE HealthCare Bio-Science, Uppsala, Schweden
Gentamycin	Biochrome AG, Berlin
Hydroxyethylpiperanzinethansulfonsäure (HEPES)	Biochrome AG, Berlin
Ionomycin (in Dimethylsulfoxid gelöst)	Sigma-Aldrich, Taufkirch
Kulturplatten (12-Loch-, 24-Loch- und 48-Loch-Platten)	Greiner, Nürtingen Nunc, Nunc GmbH & CO KG, Wiesbaden
Latex Beads	Polyscience, Inc. Warrington, PA, USA
MACS Microbeads (anti-CD4 Microbeads)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS LS und MS Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Neubauer Hämocytometer	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda
Paraformaldehyd (PFA), 2%ig	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	Biochrome AG, Berlin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Oesterreich
Phorbolmyristatacetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirch
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorff, Hamburg Biochrome AG, Berlin
Propidium Iodid (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirch
Rekombinantes humanes Interleukin-2	R & D Systems Inc., Minneapolis, USA

## Material und Methoden

Rosewell park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) mit GlutamaxX	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirch
Sodium Pyruvate	Gibco, Karlsruhe
Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	R & D Systems Inc., Minneapolis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirch
Zentrifugen-Röhrchen (Falcontyp), verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht BD Pharmingen, Heidelberg

### 2.1.3. Kulturmedium und Puffer

Medium komplett	RPMI 1640, 25 mM HEPES, 10% FCS, 50 $\mu$ M beta-Mercaptoethanol, 1 mM Sodium-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 50 $\mu$ g/ml Gentamycin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	8 g/L NaCl, 0.2 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.4 g/L $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
PBS/BSA (10%)	PBS, 2 g/L BSA
PBS/BSA (10%)/ EDTA	PBS, 2g/L BSA, 2 mM EDTA
Saponin 0.5% in PBS/BSA	PBS, 2g/L BSA, 5g/L Saponin

### 2.1.4. Antikörper für Färbungen mithilfe der Durchflußzytometrie

Antikörper und deren Klone	Fluorochrom	Absorptionsspektren	Emissionsspektren	Anbieter
anti-human CD4 Klon: TT1	FITC	492 nm	520-530 nm	DRFZ
anti-human CD25 Klon: M-A251	APC	633 nm	660 nm	BD Pharmingen
anti-human CD45RA Klon: HI100	FITC	492 nm	520-530 nm	BD Pharmingen

anti-human FOXP3 Klon: PCH101	PE	488 nm	580 nm	eBioscience
anti-human FOXP3 Klon: PCH101	unge- koppelt			eBioscience
anti-human Interferon- $\gamma$ Klon: 4SB3	FITC Cy5	492 nm 650 nm	520-530 nm/ 670 nm	DRFZ
anti-human IL-2 Klon: 5344.111	APC	633 nm	660 nm	BD Pharmingen

Tabelle 1

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Charakterisierung von Zellen mithilfe der Durchflußzytometrie (FACS)

Die Zellen wurden zur Charakterisierung mit Antikörper/Fluorochrom-Komplexen, welche gegen bestimmte Moleküle gerichtet sind, gefärbt und am FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) analysiert.

Dazu werden die Zellen durch das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung in einem laminären Strom aus Spülflüssigkeit so ausgerichtet, daß an der Messzelle zu jedem Messzeitpunkt nur eine einzige Zelle vorbeiströmt. In der Meßkammer werden die Zellen mit monochromatischem Licht eines Laserstrahls beleuchtet. So können Informationen über Zellgröße, Granularität des Zytoplasmas und Zellkerngröße gewonnen werden (FSC=Forward scatter: Zellgröße, SCC=Sideward scatter: Granularität, Zellkerngröße). Strömt eine mit einem Antikörper/Fluoreszenz-Farbstoff markierte Zelle an der Detektionskammer vorbei, wird der Fluoreszenz-Farbstoff durch die über den Laserstrahl zugeführte Energie angeregt. Beim spontanen Rückgang der Elektronen aus einem höheren Energieniveau auf das Ausgangsniveau wird diese Energie in Form von Photonen wieder freigesetzt. Diese Emissionsspektren sind spezifisch für das jeweilige Fluoreszenzmolekül. Man verwendet Farbstoffe, die durch eine gemeinsame Wellenlänge angeregt werden können, sich aber hinsichtlich ihrer spezifischen Emissionsspektren voneinander unterscheiden (Tabelle 1). Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind bis auf den ungekoppelten FOXP3-Antikörper

(siehe Tabelle 1) und den anti-Ratte IgG-Antikörper an Fluorochrome gekoppelt und wurden nach der Zellfärbung an FACS Calibur Geräten analysiert. Die Rohdaten wurden mit der Software FlowJo (Treestar Inc.) ausgewertet.

### 2.2.2. Oberflächenfärbung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Oberflächenfärbung wurde bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml mit den anti-human CD4-, anti-human CD45RA- und anti-human CD25-Antikörpern (siehe Tabelle 1) durchgeführt und die Zellsuspension mit den Antikörpern für 15-20 min bei 4°C inkubiert. Zusätzlich zum Antikörper/Fluorochrom-Komplex wurde Beriglobin hinzugefügt, um die vorhandenen F<sub>c</sub>-Rezeptoren abzusättigen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS/BSA gewaschen und entweder für die FACS-Analyse in 300-400 µl PBS/BSA aufgenommen oder für intrazelluläre und intranukleäre Färbungen mit den entsprechenden Puffern fixiert.

### 2.2.3. Intranukleäre FOXP3-Färbung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Entsprechend den Angaben des Herstellers des FOXP3-Staining Kits (eBioscience) folgte auf die Oberflächenfärbung eine Fixierung der Zellen für 30–60 min in dem mitgelieferten Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer. Nach zweimaligem Waschen mit dem Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen zunächst mit anti-Ratte IgG zur Absättigung von F<sub>c</sub>-Rezeptoren und unspezifischen Bindungen für 15 min bei 4 °C inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit dem PE-gekoppelten FOXP3 Antikörper (Klon: PCH101) in einem Gesamtvolumen von 100 µl in PBS/BSA für 30 Minuten bei 4°C. Nach zwei erneuten Waschschritten mit je 1 ml Permeabilisierungspuffer und Resuspension des Zellpellets in PBS/BSA wurden die T-Zellen am FACS Calibur hinsichtlich ihrer FOXP3-Expression analysiert.

### 2.2.4. Intrazellulärfärbung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Bei der isolierten Intrazellulärfärbung wurden die Zellen zunächst mit 2%igem Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei 4°C fixiert ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml). Dann wurden die Zellen entsprechend aliquotiert und mit einer 0,5%igen Saponin/PBS/BSA-Lösung für fünf min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach einem Waschschriff wurden zunächst F<sub>c</sub>-Rezeptoren und unspezifische Bindungen mit anti-Ratte IgG abgesättigt und der gewünschte Antikörper (Interferon- $\gamma$ , Interleukin 2) in einem Gesamtvolumen von 100 µl hinzugefügt. Dieses Zell-Antikörpergemisch inkubierte für 30 min bei



Raumtemperatur im Dunkeln, bevor es erneut mit 1 ml der 0,5% Saponin/PBS/BSA-Lösung gewaschen und zur FACS-Analyse in 400 µl PBS/BSA resuspendiert wurde. Bei einer Doppelfärbung von Interferon-γ oder Interleukin 2 mit FOXP3 wurde entsprechend dem FOXP3-Färbeprotokoll (eBioscience) gearbeitet. Dafür erfolgte die gleichzeitige Zellfärbung mit dem FOXP3 Antikörper und dem intrazellulären Antikörper in dem FOXP3-Permeabilisierungspuffer. Nach zwei weiteren Waschschritten mit dem Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen in 400 µl PBS/BSA aufgenommen und am FACS Calibur analysiert

### 2.2.5. Aufreinigung der naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen

Humane naive T-Zellen wurden aus Buffy coats aufgereinigt, welche vom DRK Wannsee (Deutsches Rotes Kreuz Wannsee) bezogen wurden. Diese Buffy coats fallen nach der Gewinnung von Erythrozyten-Konzentraten bei der Blutspende von freiwilligen Spendern an.

Die Zellsuspension wurde aus den Buffy coats isoliert, auf vier Zentrifugenröhrchen (Grösse: 50 ml) verteilt und auf ein Gesamtvolumen von 35 ml je Zentrifugenröhrchen mit PBS verdünnt. Anschließend wurde die Suspension mit 15 ml Ficoll-Hypaque™ Plus unterschichtet. Während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund einer höheren Dichte den Gradienten passieren können, sammeln sich Lymphozyten, Monozyten (zusammen PBMC) und Thrombozyten aufgrund ihrer geringeren Dichte an der Plasma-Ficoll-Gradientengrenze an. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 2000 rpm (Umdrehungen pro Minute) und Raumtemperatur wurde die durch einen weißen Leukozytenring (PBMCs) charakterisierte Interphase vorsichtig abgenommen und zweimal mit PBS/BSA gewaschen (1. Waschschrift: 1600 rpm, 10 min, 4°C; 2. Waschschrift: 900 rpm, 15 min, 4°C). Die Zellen wurden danach in PBS/BSA/EDTA aufgenommen, zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen mit Trypanblau gefärbt und anschließend in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

Zur Isolation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde die PBMC-Zellsuspension auf 5x10<sup>8</sup> Zellen/ml eingestellt und mit 200 µl CD4 Microbeads je 1 ml Zellsuspension in PBS/BSA/EDTA für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen und Filtern der Zellen diente ein Positiv-Selektionsprogramm (Posseld2) am AUTOMacs zur Separation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>-</sup> T-Zellen. Nach dem Selektionsprogramm wurde eine Färbung mit anti-human CD4 FITC zur Überprüfung der Reinheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellfraktion durchgeführt (Abb. 3B). In Abbildung 3 sind die Analysen der sortierten CD4<sup>+</sup> und CD4<sup>-</sup> T-

Zellpopulation dargestellt. Nach der magnetischen Trennung der PBMCs lag die Reinheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellfraktion bei 99,3 % (Abb. 3A). In den Analysen der restlichen Spendern exprimierten zwischen 97 % und 99 % der sortierten Zellen den Oberflächenmarker. Innerhalb der sortierten CD4<sup>-</sup> T-Zellfraktion konnte jedoch eine Population CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfasst werden, die bei dem dargestellten Spender 20.4 % betrug (Abb. 3B), bei anderen Spendern zwischen 5 % und 20 % lag.

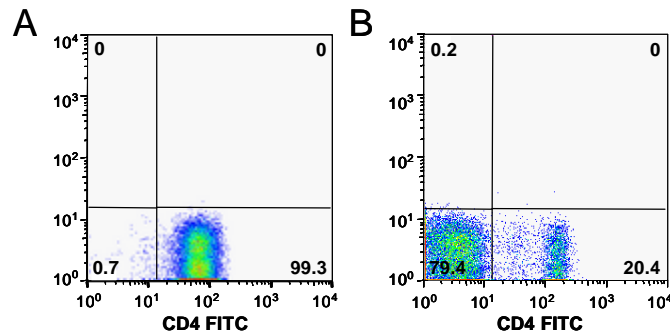


Abb. 3: Anreicherung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb verschiedener Zellpopulationen  
Bestimmung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in magnetisch sortierten CD4<sup>-</sup> T-Zellen (Abb. 3A) und magnetisch sortierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3B). Die Analysen entstammen dem Spender #543.

#### 2.2.6. Sortierung der naiven T-Zellen mittels FACS

Zur Isolation der naiven T-Zellen aus der Gesamtpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker am FACS-Gerät (FACS Aria, FACS Diva) sortiert. Dazu wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen zunächst mit Beriglobin, anti-human CD45RA FITC Antikörper und anti-human CD25 APC Antikörpern gefärbt, gewaschen und in einem Gesamtvolumen von 3 ml in PBS/BSA/EDTA aufgenommen. Als Ausgangszellen für die weiteren Versuche wurden die naiven CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen anschließend am FACS (FACS Aria, FACS Diva) sortiert. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen dienten bei den weiteren Untersuchungen (FOXP3-Messungen, DNA-Methylierungsanalysen) als Positiv-Kontrolle (Abb. 4).

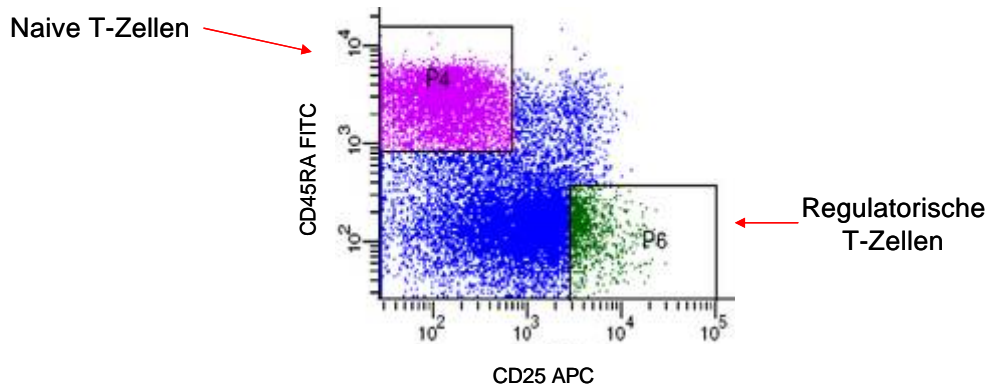


Abb. 4: Sortierung von naiven T-Zellen und regulatorischen T-Zellen aus der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation

Die magnetisch sortierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit anti-human CD45RA Antikörper und anti-human CD25 Antikörper (Gesamtpopulation blau) gefärbt. Am FACS wurden die naiven T-Zellen (P4) und die regulatorischen T-Zellen (P6) sortiert. Dargestellt sind die entsprechenden Populationen für einen Spender (#540).

### 2.2.7. Zellkulturbedingungen

Nach der Aufreinigung wurden die Zellen im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kulturplatten für die Zellstimulation dienten 12- und 24-Loch-Kulturplatten der Firma NUNC und Greiner. Für einige Untersuchungen wurden den Zellkulturen neben dem anti-CD3/anti-CD28 Stimulus zusätzlich TGF-β (Konzentrationen: 0,5 ng/ml und 5 ng/ml) oder humanes rekombinates Interleukin 2 (Konzentration: 5 ng/ml) zugesetzt.

### 2.2.8. Berechnung der Expansionsraten

Zur Berechnung der Expansionsraten wurden die Zellen an verschiedenen Zeitpunkten geerntet und mittels einer Neubauer Zählkammer gezählt. Anschließend wurden die Zellzahlen durch die Ausgangszellzahl am Tag 0 der Kultur dividiert. Die graphische Aufarbeitung der Expansionsraten erfolgte mit Excel (Microsoft Office).

### 2.2.9 Stimulationssysteme

#### 2.2.9.1. Zellstimulation mit plattengebundenen Antikörpern

Zur plattengebundenen Zellstimulation wurden am Vortag der Kultur Kulturplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen an anti-human CD3 Antikörper (Klon: UCHT1, BD Pharmingen) und anti-human CD28 Antikörper (BD Pharmingen) in PBS bei 4°C über Nacht beschichtet. Kurz vor der Zellstimulation wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluß wurden die im Kulturmedium aufgenommenen Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer Zelldichte von 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml (bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen) oder 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml (bei

den naïven T-Zellen) ausgesät. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte die Zellzahlbestimmung mithilfe einer Neubauer Zählkammer und die Analyse der Zellaktivierung über die Messung des Aktivierungsmarkers CD25 am FACS.

### 2.2.9.2 Zellstimulation mit löslichen Antikörpern

Bei der Zellstimulation mit löslichen Antikörpern wurden der anti-human CD3 Antikörper (Klon UCHT1 oder Klon OKT3) und der anti-human CD28 Antikörper direkt ins Kulturmedium gegeben, bevor die naïven T-Zellen mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in die Kulturplatten ausgesät wurden. Zu definierten Zeitpunkten (Tag 1, Tag 2) wurden die Zellen geerntet, gezählt und hinsichtlich der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 am FACS untersucht.

### 2.2.9.3. Zellstimulation mit anti-CD3/ anti-CD28 beschichteten Beads

#### 2.2.9.3.1. Zellstimulation mit DynaBeads

Vor Zellstimulation wurden die DynaBeads laut Anweisungen des Herstellers in PBS/BSA gewaschen und in dem Originalvolumen in PBS wieder aufgenommen. Die Zellstimulation erfolgte bei einem Verhältnis von einem Bead pro Zelle bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 24-Loch-Platten bei 37°C im Inkubator. Bei sichtbarem Verbrauch des Kulturmediums wurden die Zellen an Tag 2 oder 3 mit frischem Kulturmedium bedeckt. Bei einer Zellkultur über sieben Tage wurde den Zellen an Tag 4 oder Tag 5 neues Medium zugeführt. Am Tag der Zellernte wurde die Zellpopulation anhand eines Magneten und sorgfältigem Resuspendieren von den Beads getrennt und auf Expansionsraten, den Aktivierungsmarker CD25, die FOXP3-Expression und das DNA-Methylierungsmuster in der TSDR (Amplikon 5) hin untersucht. Die Trennung der Beads von den stimulierten T-Zellen war notwendig, da die paramagnetischen DynaBeads in den anstehenden FACS-Analysen das Gerät verstopfen könnten.

#### 2.2.9.3.2. Zellstimulation mit Latex-Beads

Zur Vorbereitung für die Zellstimulation wurden die Latex-Beads mit anti-human CD3 Antikörper (Klon: UCHT1) und anti-human CD28 Antikörper beschichtet. Dazu inkubierten die Beads mit den Antikörpern zunächst in PBS für 90 min bei 37°C und nach einem Waschschrift für weitere 60 min bei Raumtemperatur in RPMI Medium. Zur gründlichen Durchmischung und für eine optimale Beschichtung wurde die Beads/PBS/Medium-Suspension während der gesamten Inkubationszeit mit einem

MACS-Mix geschüttelt. Nach Beendigung der Beschichtung wurden die Beads entsprechend ihrer Ausgangszahl in der Originalverpackung auf  $1 \times 10^8$  Beads/ml eingestellt und in Kulturmedium bei 4°C aufbewahrt.

Die Zellstimulation und Kultivierung erfolgte bei einem Verhältnis von 1,5 Beads/Zelle und bei einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 24-Loch-Kulturplatten bei 37°C im Inkubator. Entsprechend ihrem Aussehen und dem Verbrauch des Mediums erfolgte eine Zufuhr von frischem Medium an Tag 2 bis 3 und bei längerer Zellkultur an Tag 4 bis 5. An definierten Zeitpunkten (Tag 3, Tag 4, Tag 7) wurden die Zellen geerntet, gezählt und hinsichtlich des Aktivierungsmarkers CD25, der FOXP3-Expression und des DNA-Methylierungsmusters in der TSDR des *foxp3* Gens untersucht.

### 2.2.10. Restimulation der kultivierten T-Zellen

Für die Intrazellulärfärbungen wurden die Zellen zunächst restimuliert, um die produzierten Zytokine messen zu können. Dazu wurden die kultivierten T-Zellen geerntet, gezählt und auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt, in Kulturmedium aufgenommen und in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät. Als Stimulus wurden PMA (Phorbolmyristataacetat) und Ionomycin der Zellkultur zusetzt und die Zellen für zwei Stunden bei 37°C im Inkubator kultiviert. Durch diesen Stimulus wurde die Zytokinproduktion der Zellen gesteigert. Nach zwei Stunden wurde die Sekretion von Proteinen durch Zugabe von Brefeldin A blockiert und nach weiteren zwei Stunden im Inkubator wurden die Zellen geerntet, gezählt und für die folgenden Färbungen vorbereitet.

### 2.2.11. Messung der FOXP3-Expression und Analyse des DNA-Methylierungsmusters im *foxp3* Genlocus

Von allen während der Aufreinigung anfallenden Zellpopulationen wurden Zellproben à  $2 \times 10^6$  Zellen für die Messung der FOXP3-Expression und für die DNA-Methylierungsanalyse entnommen. Somit lagen von den PBMCs, den CD4<sup>+</sup> T-Zellen, den CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> naiven T-Zellen und von den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen Aliquots für die Analysen vor. Die unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und ebenso für die FOXP3-Färbung und die DNA-Methylierungsanalyse aliquotiert.

Die Zellen für die DNA-Methylierungsanalyse wurden zentrifugiert und das Zellpellet bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingeforen. Die Proben für die FOXP3-Färbung

wurden mit Beriglobin, anti-human CD4 FITC Antikörper und anti-human CD25 APC Antikörper inkubiert (20 min bei 4 °C) und für die anschließende FOXP3-Färbung fixiert.

### 2.2.12. Genomische DNA- Präparation

Für die DNA-Methylierungsanalyse wurde die DNA entsprechend dem Protokoll "DNA preparation for cultured animal cells" aus dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen) aus den Proben aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Zelllyse über eine Affinitätschromatografie mittels sogenannter „spin columns“, aus welchen die DNA in einem letzten Schritt mit einem Elutionspuffer gelöst wurde. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten DNA spektrometrisch (Nanodrop) gemessen und erneut bei –20 °C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

### 2.2.13. DNA-Methylierungsanalyse im *foxp3* Genlocus

Diese Untersuchungen wurden als Auftragsarbeit von der Firma Epiontis (Berlin) durchgeführt.

Zur Analyse des Methylierungsmusters wurde das humane *foxp3* Gen anhand der Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Motiv (CpG)-reichen Regionen in Amplikons unterteilt. In Abbildung 2 ist der humane *foxp3* Genlocus mit den entsprechenden Amplikons dargestellt, wobei die zunächst in der Maus entdeckte TSDR („Treg-specific-demethylation-region“) durch das Amplikon 5 repräsentiert wird (67, 70).

Vorraussetzung für die Analyse des DNA-Methylierungsstatus des gesamten Amplikon 5 ist eine Bisulfitierungsreaktion (69). Dabei wird das unmethylierte Cytosin zu Uracil deaminiert, während das methylierte Cytosin unverändert bleibt. In der folgenden PCR des gewünschten DNA-Abschnittes wird das Uracil als Thymidin amplifiziert. In der Sequenzierung der durch Bisulfitierung und PCR umgewandelten Sequenz reflektiert nun ein „C“ (Cytosin) eine Methylierung der genomischen DNA an dieser Stelle, während ein „T“ (Thymidin) die Abwesenheit einer Methylgruppe darstellt. Im Vergleich mit der unbehandelten, ursprünglichen Sequenz werden je nach Methylierung die ursprünglichen Cytosin-Guanin-Motife entweder als Cytosin-Guanin (methyliertes Cytosin) oder als Thymidin-Guanin (nicht methyliertes Cytosin) gelesen. Ein Rechenprogramm („ESME“, Schmitt et al., 2004) berechnet nach einem bestimmten Algorithmus anhand des Verhältnisses von Cytosin zu Thymidin die Methylierungsrate der in der Sequenz enthaltenen CpGs.

Ergänzend zu den Amplikonanalysen wurde in einer separaten MS-SNuPE-Analyse (single nucleotide primer extension-Analyse) der DNA-Methylierungsstatus des CpG-Motivs Nr. 41 in der TSDR untersucht. Dazu wird bei der MS-SNuPE nach der Bisulfitierungsreaktion eine methylierungsunabhängige PCR von der gewünschten Region durchgeführt. In einer folgenden Reaktion lagert sich ein spezifischer Primer an die amplifizierte DNA-Region, welcher vor dem zu analysierenden CpG-Motiv Nr. 41 endet. Um zwischen den vorliegenden CG-Motiven (methyliertes Cytosin) und den TG-Motiven (unmethyliertes Cytosin) zu unterscheiden, werden fluoreszenzmarkierte Basen hinzugefügt, die komplementär an das CG (Cytosin-Guanin) oder TG (Thymin-Guanin) des Originalstranges binden. Durch diese Basenverlängerung des Primers kann über die Fluoreszenzmessung der gebundenen Base die ursprüngliche An- oder Abwesenheit einer Methylgruppe am Cytosin festgestellt werden. Bei reinen Populationen findet sich nur unmethyliertes oder methyliertes Cytosin. In Mischpopulationen wird jedoch das Vorkommen von methyliertem gegenüber unmethyliertem Cytosin miteinander verrechnet und somit ein Zahlenwert für die prozentuale Demethylierung in diesem bestimmten CpG-Motiv errechnet. Während die MS-SNuPE auf der Analyse von einem CpG-Motiv beruht, können bei der Analyse des Amplikons beliebig viele CpG-Motive über einen Algorithmus hinsichtlich ihres DNA-Methylierungsmusters untersucht werden.

### 2.2.14. Blockade des anti-human PE-gekoppelten FOXP3-Antikörpers

Bei der Bestimmung der FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen mittels des PE-gekoppelten FOXP3 Antikörpers (Klon: PCH101) zeigte sich wiederholbar eine Verschiebung der Gesamtpopulation in der FACS-Darstellung. Dadurch kam es in der Zellpopulationen zu einem sehr hohen Anteil FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen. Zum Ausschluß unspezifischer Bindungen des PE-gekoppelten FOXP3 Antikörpers PCH101 wurde ein FOXP3 Spezifitäts-Experiment durchgeführt. Zunächst wurden die Proben nach der Kultivierung mit anti-human CD4 FITC Antikörper gefärbt und zweimal mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen. Dann wurde vor dem bisher verwendeten PE-gekoppelten FOXP3-Antikörper zunächst ein ungekoppelter FOXP3-Antikörper der gleichen Spezifität im 50fachen Überschuß in die Probe gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Erst darauf erfolgte die Zugabe des PE-gekoppelten FOXP3-Antikörpers PCH101 für weitere 30 min bei 4°C. Zusätzlich wurden Kontrollproben mit jeweils nur einem Antikörper und keinem Antikörper angefertigt. Nach der abgeschlossenen Inkubation folgten erneut

## Material und Methoden

zwei Waschschritte mit dem Permeabilisierungspuffer, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Nach Abschluß der Färbung wurden die Zellen in 400 µl PBS/BSA aufgenommen und hinsichtlich der FOXP3-Expression am FACS Calibur analysiert.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Etablierung eines Stimulationssystems für konventionelle naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von unter verschiedenen Bedingungen stimulierten, humanen naiven T-Zellen. Erste Voraussetzung für diese Studien war die Etablierung eines geeigneten T-Zellrezeptor-abhängigen Stimulationssystems. Um eine möglichst umfassende, gleichmäßige und Antigen-unspezifische Aktivierung zu induzieren, wurden die T-Zellen mit einem anti-human CD3 Antikörper (Klon UCHT1 oder Klon OKT3) und einem anti-human CD28 Antikörper (Klon 28.8) inkubiert. Im Rahmen dieser Etablierungsarbeiten wurden die Stimuli den sortierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und den naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zunächst plattengebunden, dann als lösliche Antikörper im Kulturmedium und zuletzt auf Antikörper-beschichteten paramagnetischen Beads oder Latex Beads angeboten.

##### 3.1.1. Stimulation von magnetisch sortierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit plattengebundenen Antikörpern

Die Aktivierung von T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor mit plattengebundenen Antikörpern gilt als etablierte und zuverlässige Stimulationsmethode. In dieser Arbeit wurden in einem Titrationsversuch 24-Loch-Kulturplatten mit drei aufsteigenden Konzentrationen an anti-human CD3 Antikörper (Klon UCHT1, Konz. in µg/ml: 0,1; 1; 5) allein und zusammen mit einer konstanten Konzentration an anti-human CD28 Antikörper (Konz. in µg/ml: 5) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden magnetisch sortierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in die Kulturplatten ausgesät und an Tag 3 und 6 die Zellzahlen als Zeichen der Zellaktivierung bestimmt.

In einem ersten Versuch zeigte sich, dass mit steigender Konzentration an anti-human CD3 Antikörper ein über sechs Tage ansteigendes Zellwachstum gemessen wurde (Abb. 5). Die Zugabe von anti-human CD28 Antikörper führte nur bei einem Teil der Ansätze zu einem leichten Anstieg der Expansionsrate. Die beste Expansion wurde bei dem Ansatz erzielt, in dem die beiden Antikörper mit maximaler Konzentration (anti-human CD3 Antikörper: 5 µg/ml, anti-human CD28 Antikörper: 5 µg/ml) eingesetzt wurden (Expansionsrate: 4,71).

## Ergebnisse

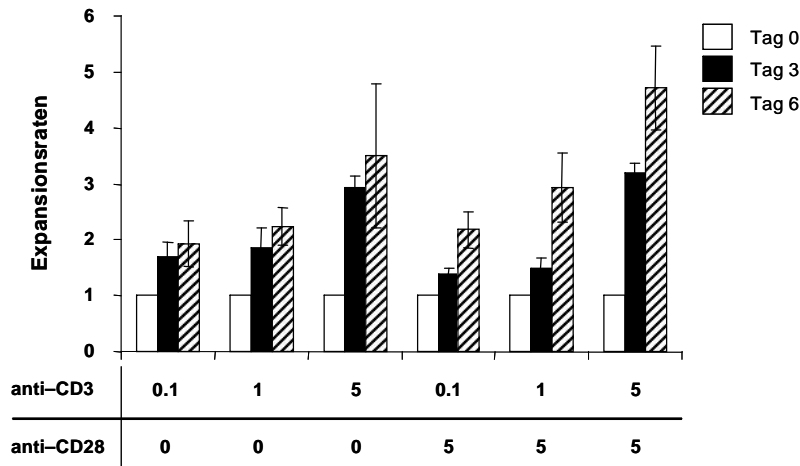


Abb. 5: Expansion von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit anti-human CD3- und anti-human CD28 Antikörpern

Bestimmung der Expansionsraten von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an anti-human CD3 Antikörper und anti-human CD28 Antikörper (Konzentrationsangaben in µg/ml) stimuliert wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte am Tag 0 (weiß), Tag 3 (schwarz) und am Tag 6 (gestreift), (MW +/- SD, n=3).

Im folgenden Schritt wurde die optimale Konzentration des anti-human CD28 Antikörpers über die Erfassung der Expansionsraten als Zeichen der Zellaktivierung bestimmt. Dazu wurden magnetisch sortierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Kulturplatten ausgesät, die mit 5 µg/ml anti-human CD3 Antikörper und aufsteigenden Konzentrationen an anti-human CD28 Antikörper beschichtet wurden. Die Auswertung der Zellzahlen zeigt, dass die höchste Expansionsrate bei 5 µg/ml anti-human CD3 Antikörper und 1 µg/ml anti-human CD28 Antikörper errechnet wurde (Abb. 6). Bei dieser Kombination proliferierten die Ausgangszellen über einen Zeitraum von sechs Tagen mit einer Expansionsrate von 4,13 gegenüber der Kontrollkultur ohne anti-human CD28 Antikörper mit einer Expansionsrate von 2,64. Die Stimulation mit einer sehr hohen Konzentration an anti-human CD28 Antikörper (10 µg/ml) führte hingegen zu einem verminderten Zellwachstum mit einer Expansionsrate von 2,78.

Zusammenfassend stellte sich unter diesen Bedingungen die Kombination von 5 µg/ml anti-human CD3 Antikörper und 1 µg/ml anti-human CD28 Antikörper als geeignete Kombination zur optimalen Zellstimulation heraus.

## Ergebnisse

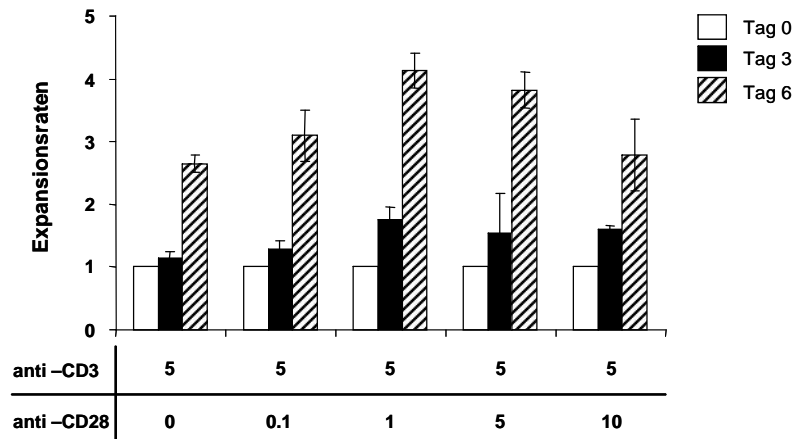


Abb. 6: Expansion von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit anti-human CD3- und anti-human CD28 Antikörpern

Bestimmung der Expansionsraten von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit einer konstanten Konzentration an anti-human CD3 Antikörper und unterschiedlichen anti-human CD28 Antikörperkonzentrationen (Konzentrationsangaben in µg/ml) stimuliert wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte am Tag 0 (weiß), Tag 3 (schwarz) und am Tag 6 (gestreift), (MW +/- SD, n=3).

Zur Optimierung der unterschiedlichen in Abbildung 5 und Abbildung 6 festgestellten Antikörperkonzentrationen wurden für die Kultur eines weiteren Spenders erneut unterschiedliche Konzentrationen an anti-human CD3 Antikörper (1 µg/ml, 5 µg/ml) und anti-human CD28 Antikörper (kein Antikörper, 1 µg/ml, 5 µg/ml) miteinander kombiniert und magnetisch sortierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen über einen Zeitraum von sechs Tagen mit diesen Antikörperkonzentrationen stimuliert (Abb. 7). Die höchste Expansionsrate von 4,09 zeigte sich bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit einer Konzentration von 5 µg/ml anti-human CD3 Antikörper und 1 µg/ml anti-human CD28 Antikörper stimuliert wurden. Jedoch verzeichnete auch die Kontrollkultur ohne anti-human CD28 Antikörperstimulus einen signifikanten Anstieg der Zellzahlen (Expansionsrate: 3,5). Aufgrund der Steigerung der Expansionsraten in zwei unterschiedlichen Experimenten (Abb. 6 und 7) wurde die Kombination von 5 µg/ml anti-human CD3 Antikörper (Klon: UCHT1) und 1 µg/ml anti-human CD28 Antikörper für die Stimulation naiver T-Zellen gewählt.

## Ergebnisse

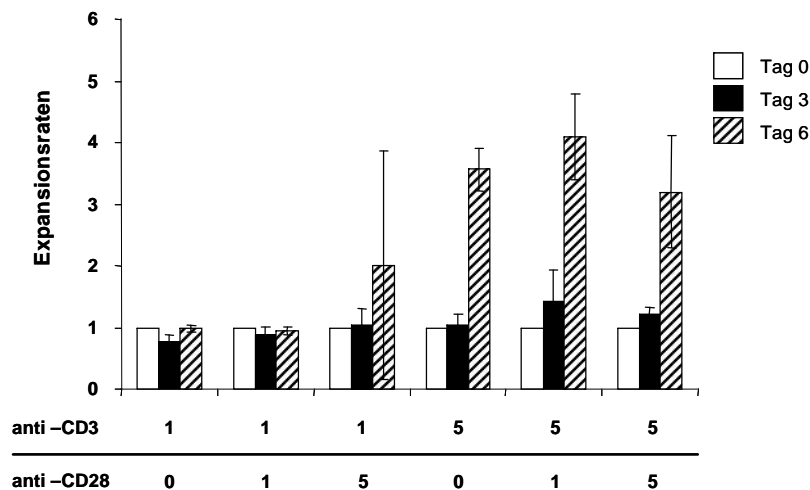


Abb. 7: Expansion von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit anti-human CD3- und anti-human CD28 Antikörpern

Bestimmung der Expansionsraten von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an anti-human CD3 Antikörper und anti-human CD28 Antikörper (Konzentrationen in µg/ml) stimuliert wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte am Tag 0 (weiß), Tag 3 (schwarz) und am Tag 6 (gestreift), (MW +/- SD, n=3).

### 3.1.2. Stimulation sortierter naiver T-Zellen mit plattengebundenen Antikörpern

Um die Stimulationsmethoden an naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu etablieren, wurden CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen mithilfe des FACS sortiert und in die mit Antikörpern beschichteten Kulturplatten (anti-CD3 Antikörper: 5 µg/ml, anti-CD28 Antikörper: 1 µg/ml) ausgesät. Die Zellaktivierung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten über die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 am FACS analysiert (Abb. 8).

Entgegen der Vermutungen aus den Vorversuchen mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte über einen Zeitraum von sechs Tagen keine signifikante Zellaktivierung erfasst werden. Für den dargestellten Spender zeigte sich lediglich an Tag 6 eine Zellaktivierung bei 2,3 % der T-Zellen in der Gesamtpopulation (Abb. 8C). In hier nicht dargestellten Daten konnten bei einem einzigen Spender (#191) am Tag 4 14 % CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden. Die restlichen Spender zeigten hingegen unabhängig vom Messzeitpunkt (Tag 1 – Tag 6) eine Zellaktivierung bei maximal 2,3 % der T-Zellen. Somit konnte in diesem Stimulationssystem unter Verwendung von plattengebundenen Antikörpern keine ausreichende Aktivierung naiver T-Zellen erreicht werden.

## Ergebnisse

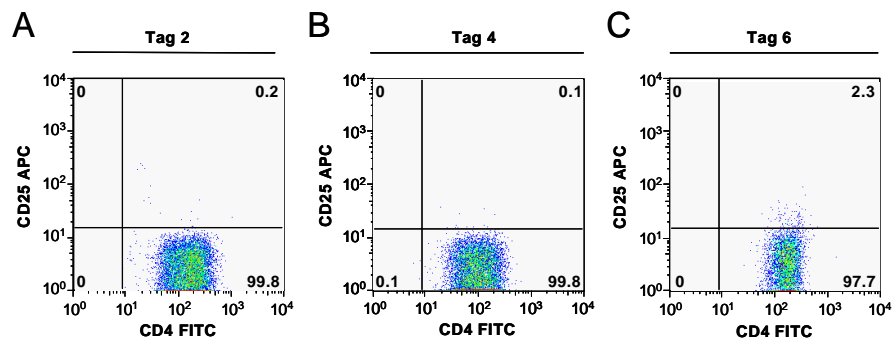


Abb. 8: Stimulation naïver T-Zellen mit plattengebundenen anti-human CD3- und anti-human CD28 Antikörpern

Bestimmung der CD25-Expression nach Stimulation der CD4<sup>+</sup> naïven T-Zellen mit plattengebundenen anti-human CD3 Antikörper (5 µg/ml) und anti-human CD28 Antikörper (1 µg/ml). Gezeigt sind die durchflußzytometrischen Analysen einer Zellkultur an Tag 2 (A), Tag 4 (B) und an Tag 6 (C) (Spender # 510).

### 3.1.3. Stimulation sortierter, naïver T-Zellen mit löslichen Antikörpern

Nach der Zellstimulation mit plattengebundenen Antikörpern basierte eine weitere Stimulationsmethode auf der Zellaktivierung mithilfe löslicher Antikörper. Dazu wurden der anti-human CD3 Antikörper und anti-human CD28 Antikörper in geringeren Konzentrationen (anti-human CD3 AK: 1 µg/ml, anti-human CD28 AK: 2 µg/ml) eingesetzt und direkt ins Kulturmedium gegeben. Zusätzlich wurden zwei unterschiedliche anti-human CD3 Antikörperklone (Klon UCHT1 und Klon OKT3) eingesetzt und hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Zellaktivierung miteinander verglichen. Analog zur plattengebundenen Stimulation wurden am Tag 1 und Tag 2 der Kultur die naïven, stimulierten T-Zellen hinsichtlich der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 untersucht.

Verglichen mit der plattengebundenen Stimulation konnten bei der Zellstimulation mit löslichen Antikörpern schon an Tag 1 signifikant mehr CD25<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden (7 % bei Spender #553, 14 % bei Spender #212, nicht dargestellt).

Für zwei Spenderkulturen (Spender #485, Spender #316) wurde die Zellaktivierung über die Zugabe von unterschiedlichen anti-human CD3 Antikörperklonen plus einem anti-human CD28 Antikörper überprüft (Abb. 9). Bei Kultivierung der Zellen mit dem anti-human CD3 Klon UCHT1 plus anti-human CD28 Antikörper konnte am Tag 2 der Kultur eine CD25-Expression von 31,7 % (Spender #485) beziehungsweise 34,8 % (Spender #316) der stimulierten naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfasst werden (Abb. 9A). Der Einsatz des anti-human CD3 Klons OKT3 führte bei der Spenderkultur #485 gegenüber der UCHT1-Klon Kultur zu einem Anstieg der CD25-Expression von 31,7 % auf 44,2 %

## Ergebnisse

(Abb. 9B). Hingegen hatte der Einsatz des anti-human CD3 OKT3-Klons bei dem Spender #316 gegenüber der UCHT1-Klon Kultur eine verminderte Zellaktivierung von nur 30,8 % CD25<sup>+</sup> T-Zellen zur Folge (Abb. 9B).

Zusammenfassend bewirkte der Einsatz löslicher Antikörper, verglichen mit der plattengebundenen Stimulation, eine signifikante Steigerung der CD25-Expression an Tag 1 und Tag 2 der analysierten Kulturen. Am Tag 2 der Kultur konnte, abhängig vom eingesetzten anti-human CD3 Antikörperklon, eine CD25-Expression und damit Zellaktivierung bei 30,8 % - 44,2 % der stimulierten naiven T-Zellen erfasst werden (Abb. 9).

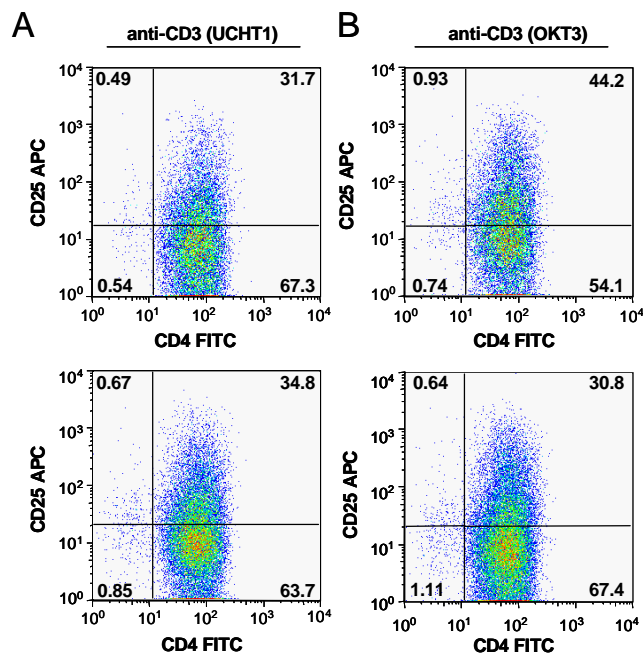


Abb. 9: Stimulation naiver T-Zellen mit löslichen anti-human CD3- und anti-human CD28 Antikörpern

Bestimmung der CD4<sup>+</sup>- und CD25<sup>+</sup>-Expression am Tag 2 der Kultur nach Stimulation naiver T-Zellen mit löslichem anti-human CD3 Antikörper (Klon UCHT und Klon OKT 3, Konz.: 1 µg/ml) und anti-human CD28 Antikörper (Konz.: 2 µg/ml). Dargestellt sind die Analysen für Klon UCHT1 (A) und den Klon OKT3 (B) für zwei unterschiedliche Spender (# 485: obere Reihe, # 316: untere Reihe).

### 3.1.4. Stimulation sortierter, naiver T-Zellen mit Antikörper-beschichteten Beads

Ein weiterer Ansatz zur Stimulierung CD4<sup>+</sup> naiver T-Zellen war der Einsatz von Antikörper-beschichteten paramagnetischen Beads (Dyna) oder Antikörper-beschichteten Latex Beads (Polyscience Inc.) (Abb. 10). Dabei wurden die am FACS-sortierten naiven T-Zellen bei einem Bead pro Zelle-Verhältnis von 1:1 mit den paramagnetischen Beads beziehungsweise von 1,5:1 mit den beschichteten Latex-Beads kultiviert. Sowohl an Tag 2 der Kultur als auch unter längeren Kulturbedingungen

## Ergebnisse

(Tag 3, Tag 7) zeigten die stimulierten naiven T-Zellen spenderunabhängig und unabhängig vom Einsatz der paramagnetischen Beads oder Latex Beads eine nahezu komplette Aktivierung von 95-98 % der Zellen.

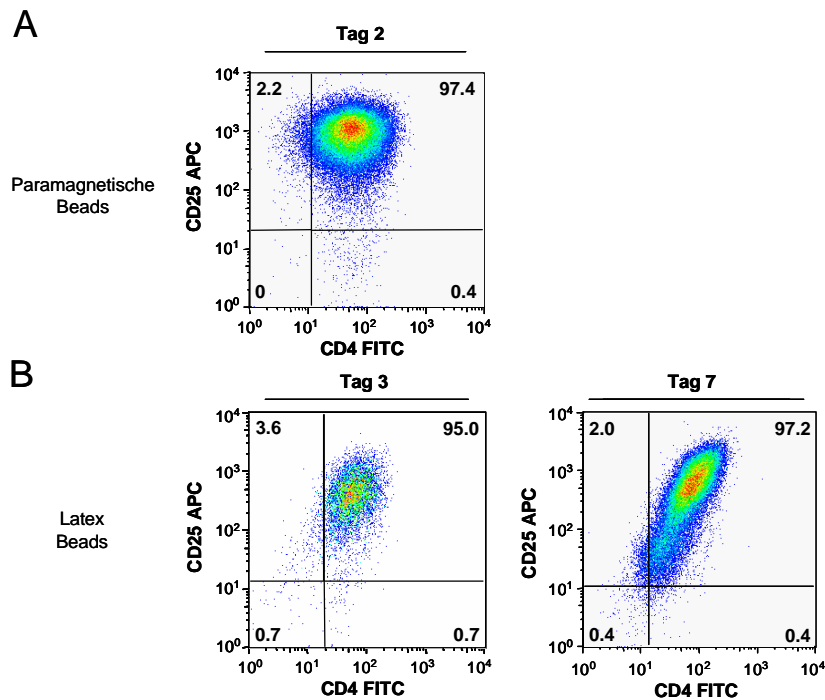


Abb. 10: Stimulation naiver T-Zellen mit Antikörperbeschichteten paramagnetischen Beads oder Latex Beads

Bestimmung der CD4- und CD25-Expression nach Stimulation der naiven T-Zellen mit anti-human CD3- und anti-human CD28 Antikörper-beschichteten paramagnetischen Beads (A) oder anti-human CD3/ anti-human CD28 Antikörper-beschichteten Latex Beads (B). Spender in Abb. A: #485, in Abb. B: #126 und #543.

### 3.1.5. Expansionsraten bei Stimulation mit Antikörper-beschichteten Beads

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Transforming Growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) in höheren Konzentrationen einen wachstumshemmenden Einfluß auf Zellen hat, während bei geringen Konzentrationen ein gesteigertes Zellwachstum durch den zusätzlichen Stimulus diskutiert wird (71). Um den Einfluß der Beads auf das Zellwachstum zu beobachten, wurden die Zellen unter neutralen Bedingungen sowie in An- und Abwesenheit von TGF- $\beta$  mit den anti-human CD3/anti-human CD28-beschichteten Beads kultiviert. In Abbildung 11 sind in zwei Balkendiagrammen die Expansionsraten für jeweils zwei Spender bei Stimulation mit Antikörper-beschichteten Dynal Beads oder Antikörper-beschichteten Latex Beads unter neutralen Bedingungen und unter Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an TGF- $\beta$  (0.5 ng/ml, 5 ng/ml) dargestellt.

Bei zwei Spenderkulturen führten die Antikörper-beschichteten Latex Beads unter neutralen Stimulationsbedingungen über einen Zeitraum von sieben Tagen zu einem

## Ergebnisse

kontinuierlichem Anstieg des Zellwachstums (Abb. 11A). In Anwesenheit von TGF- $\beta$  wurden jedoch unterschiedliche Expansionsraten in beiden Kulturen erfasst. Beim Spender #634 führte TGF- $\beta$  über einen Zeitraum von vier Tagen zu einer deutlichen Steigerung der Expansionsraten. An Tag 7 liess sich jedoch im Vergleich mit den neutralen Kulturbedingungen nahezu kein Unterschied in den Expansionsraten mehr feststellen. Beim Spender #637 war unter Zugabe von 5 ng/ml TGF- $\beta$  im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 7 eine Abnahme des Zellwachstums zu beobachten.

Die Stimulation mit Antikörper-beschichteten paramagnetischen Beads führte zu einem sehr unterschiedlichen Proliferationsverhalten der untersuchten Zellkulturen (Abb. 11B). Die Zellkultur des Spenders #1 zeigte unter neutralen Bedingungen gegenüber der Ausgangszellzahl ein ansteigendes Zellwachstum. Unter Zugabe unterschiedlicher Mengen an TGF- $\beta$  blieben die Expansionsraten der Spenderkultur #1 gegenüber der Kontrollkultur ohne TGF- $\beta$  nahezu unverändert. Beim Spender #5 konnte unter neutralen Bedingungen eine verringerte Zellzahl gegenüber der Ausgangszellzahl mit einer Expansionsrate kleiner 1 erfasst werden. Unter Zugabe einer hohen Menge an TGF- $\beta$  war die Expansionsrate gleichbleibend, während der Zusatz einer sehr geringen Menge an TGF- $\beta$  (0.5 ng/ml) zu einer leichten Wachstumssteigerung gegenüber der Kontrollkultur führte.

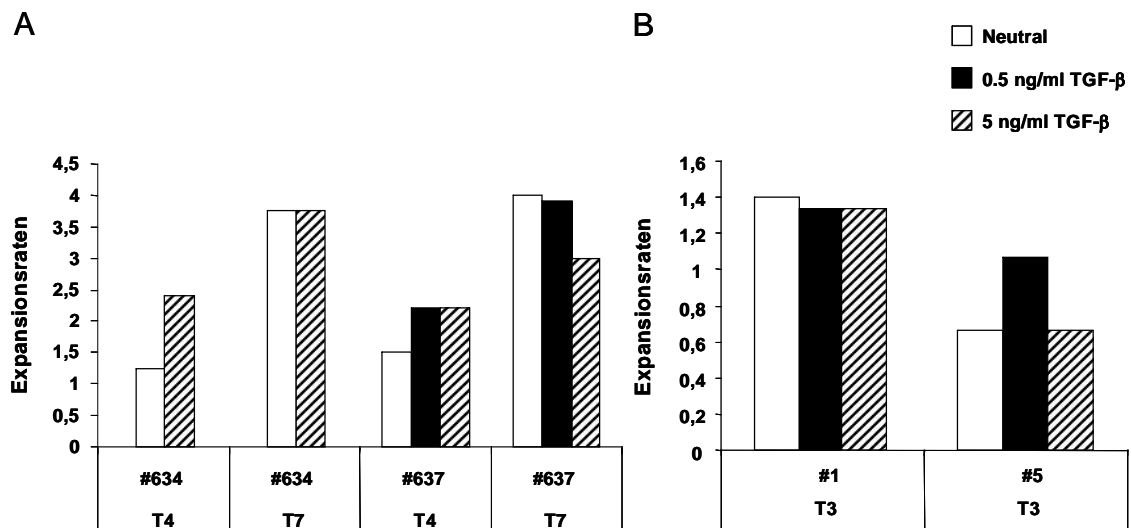


Abb. 11: Expansionsraten nach Zellstimulation mit Antikörper-beschichteten Beads. Stimulation sortierter, naiver T-Zellen mit anti-human CD3/anti-human CD28-beschichteten Latex-Beads (A) oder paramagnetischen Beads (B) in An- und Abwesenheit von TGF- $\beta$ . Die Zellzählung erfolgte an den Tagen 4 und 7 (A) und Tag 3 (B). Spender in Abb. A: #634, #637; Abb. B: #1, #5.



### 3.2. Der PE-gekoppelte FOXP3 Antikörper bindet teilweise unspezifisch in stimulierten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Im Vergleich mit der Isotypkontrolle stellte sich in allen FOXP3-Messungen der kultivierten, stimulierten Zellen, unabhängig von den Stimulationsbedingungen, eine Verschiebung der Gesamtpopulation in der FACS-Analyse als eine Expression des Faktors in der gesamten Zellpopulation dar (Abb. 12 A). Um zu unterscheiden, ob es sich bei dieser Verschiebung um ein artifizielles Phänomen oder um eine Hochregulation des Transkriptionsfaktors FOXP3 in der Gesamtpopulation handelt, wurde ein Spezifitätsexperiment durchgeführt. In diesem Versuch wurde vor Zugabe des PE-gekoppelten FOXP3 Antikörpers (Klon PCH101) ein ungekoppelter FOXP3 Antikörper der gleichen Spezifität im Überschuss in die Probe gegeben. In Abbildung 12 sind die FACS-Darstellungen des PE-gekoppelten FOXP3 Antikörpers (Abb. 12A), des ungekoppelten FOXP3 Antikörpers (Abb. 12B) und die Probe mit beiden FOXP3 Antikörpern (Abb. 12C) für einen Spender dargestellt. Im Gegensatz zu den anderen Proben war in dem Ansatz mit dem ungekoppelten FOXP3 Antikörper die Oberflächenfärbung mit dem anti-human CD4 FITC Antikörper nicht erfolgreich (Abb. 12B). Während die Gesamtpopulation der Probe mit dem PE-gekoppelten FOXP3 Antikörper sich hoch positiv darstellt und unter Verwendung des ungekoppelten FOXP3 Antikörpers erwartungsgemäß keine FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen messbar sind, ist bei Kombination von gekoppeltem und ungekoppeltem Antikörper eine kleine Verschiebung der Gesamtpopulation festzustellen. Das Experiment basiert auf der Annahme, dass der ungekoppelte, im Überschuss vorliegende FOXP3 Antikörper alle spezifischen Bindungen abdeckt und der gekoppelte Antikörper, aufgrund der abgesättigten spezifischen Bindungen, bei einer Bindung nur noch unspezifisch binden kann. Da bei Einsatz beider Antikörper in der durchflußzytometrischen Analyse eine kleine Verschiebung erfasst werden konnte (Abb. 12C), lassen diese Daten vermuten, dass der PE-gekoppelte FOXP3 Antikörper zum Teil unspezifisch bindet. In der ursprünglichen FACS-Darstellung mit dem PE-gekoppeltem FOXP3 Antikörper stellen sich innerhalb der Gesamtzellpopulation zwei Subpopulationen dar. Mit dem Fokus auf diesen FOXP3<sup>high</sup> T-Zellen, die den Antikörper spezifisch exprimieren, wurde der Quadrant an den Übergang zur hochpositiven Population gelegt (Abb. 12D). Inwieweit man anhand dieser unspezifischen Bindungen des Antikörpers die FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen messen kann, wird in der Diskussion näher erläutert.

## Ergebnisse

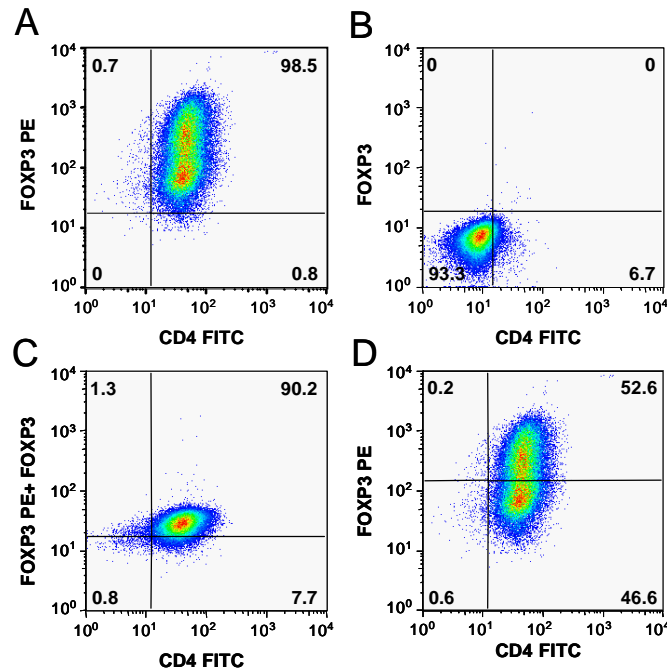


Abb. 12: Spezifitätsexperiment des PE-gekoppelten FOXP3 Antikörpers

Mit für vier Tagen neutral stimulierten naiven T-Zellen wurde ein Spezifitätsexperiment durchgeführt. Dazu wurden die Zellen hinsichtlich der Fluoreszenz in PE (FOXP3) und FITC (CD4) analysiert. Dargestellt sind die Proben des PE-gekoppelten FOXP3 Antikörpers (A), des ungekoppelten FOXP3 Antikörpers (B) und der Kombination beider FOXP3 Antikörper (C) zur Überprüfung unspezifischer Bindungsfähigkeiten. Nach der Auswertung sind anhand der beiden Populationen in D die Quadranten zur Bestimmung der FOXP3<sup>high</sup> T-Zellen eingefügt.

### 3.3. Die FOXP3-Expression im Vergleich mit dem DNA-Methylierungsmuster im *foxp3* Gen

Nachdem in dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit Stimulationsbedingungen für die naiven CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen etabliert wurden, folgte daraufhin der Vergleich der FOXP3-Expression mit dem DNA-Methylierungsmuster im *foxp3* Gen zunächst in sortierten und dann in stimulierten naiven T-Zellen. Aus vorherigen Untersuchungen in murinen Zellen und humanen Zellen erwies sich die zwischen verschiedenen Spezies konservierte Region, die „Treg-specific-demethylation region“ (TSDR), durch den Nachweis einer selektiven Demethylierung als besonders aussagekräftig hinsichtlich der Unterscheidung natürlicher regulatorischer T-Zellen von naiven T-Zellen (67, 70). Beim Menschen wird die TSDR im *foxp3* Gen durch das Amplikon 5 repräsentiert (Abb. 2, Seite 24). Ergänzend zu der Amplikonanalyse wurde der DNA-Methylierungsstatus eines einzelnen CpG-Motivs (Nr. 41) als repräsentatives Motiv der TSDR mit einer MS-SNuPE Methode (Methylation sensitive-single nucleotide primer extension, Seite 36) analysiert.

### 3.4. Vergleich der FOXP3-Expression mit dem DNA-Methylierungsmuster von *ex vivo* sortierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen

Nach der Isolation von PBMCs aus Buffy coats wurden zunächst Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellen magnetisch sortiert. Anschließend wurden naive CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen mithilfe des FACS sortiert. Von allen drei Populationen wurden die FOXP3-Expression mittels FACS und das DNA-Methylierungsmuster der TSDR durch Bisulfitsequenzierung analysiert.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse für einen männlichen Spender (#126) dargestellt, während Abbildung 14 die Ergebnisse eines weiblichen Spenders (#1) zeigt. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen des männlichen Spenders wiesen eine FOXP3-Expression von 10,5 % auf, hingegen waren durch die FACS-Sortierung nur 0,78 % FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen in der naiven T-Zellpopulation messbar (Abb. 13A). Die sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen dienten als Positiv-Kontrolle und exprimierten zu 78,4 % den Transkriptionsfaktor FOXP3.

Beim weiblichen Spender exprimierten 7,93 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen FOXP3 (Abb. 14A). Nach der Sortierung am FACS konnten in den naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur 0,83 % FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden. Die sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen exprimierten hingegen zu 91 % FOXP3.

Bei der Auswertung der DNA-Demethylierungsanalyse wurden die Werte der CpG-Motife in Farbschattierungen übertragen. Die Farbskalierung stellt mit einer gelben Farbe eine komplette Demethylierung dar, während blaue Abschnitte auf eine komplette Methylierung des entsprechenden CpG-Motivs hinweisen. Grüne Felder repräsentieren mit den entsprechenden Schattierung eine partielle Demethylierung. In der DNA-Methylierungsanalyse der TSDR des männlichen Spenders #126 waren die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen als Positivkontrolle stark demethyliert, während die CD4<sup>+</sup> T-Zellen und naiven T-Zellen in der konservierten Region eine nahezu komplette Methylierung zeigten (Abb. 13B).

Die zufällige Inaktivierung eines X-Chromosoms kann in der DNA-Methylierungsanalyse des weiblichen Spenders eine Verminderung der Demethylierung bis zu 50 % bewirken (Abb. 14B). Diese zeigt sich im Vergleich mit den Analysen des männlichen Spenders durch eine stärkere Blauschattierung. Die *ex vivo* sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen wiesen eine starke Demethylierung in der TSDR auf, die jedoch im Vergleich mit dem männlichen Spender nicht so ausgeprägt war (Abb. 14B). Jedoch waren,

## Ergebnisse

analog zum männlichen Spender, die CD4<sup>+</sup> T-Zellen und naiven T-Zellen beim weiblichen Spender stark methyliert.

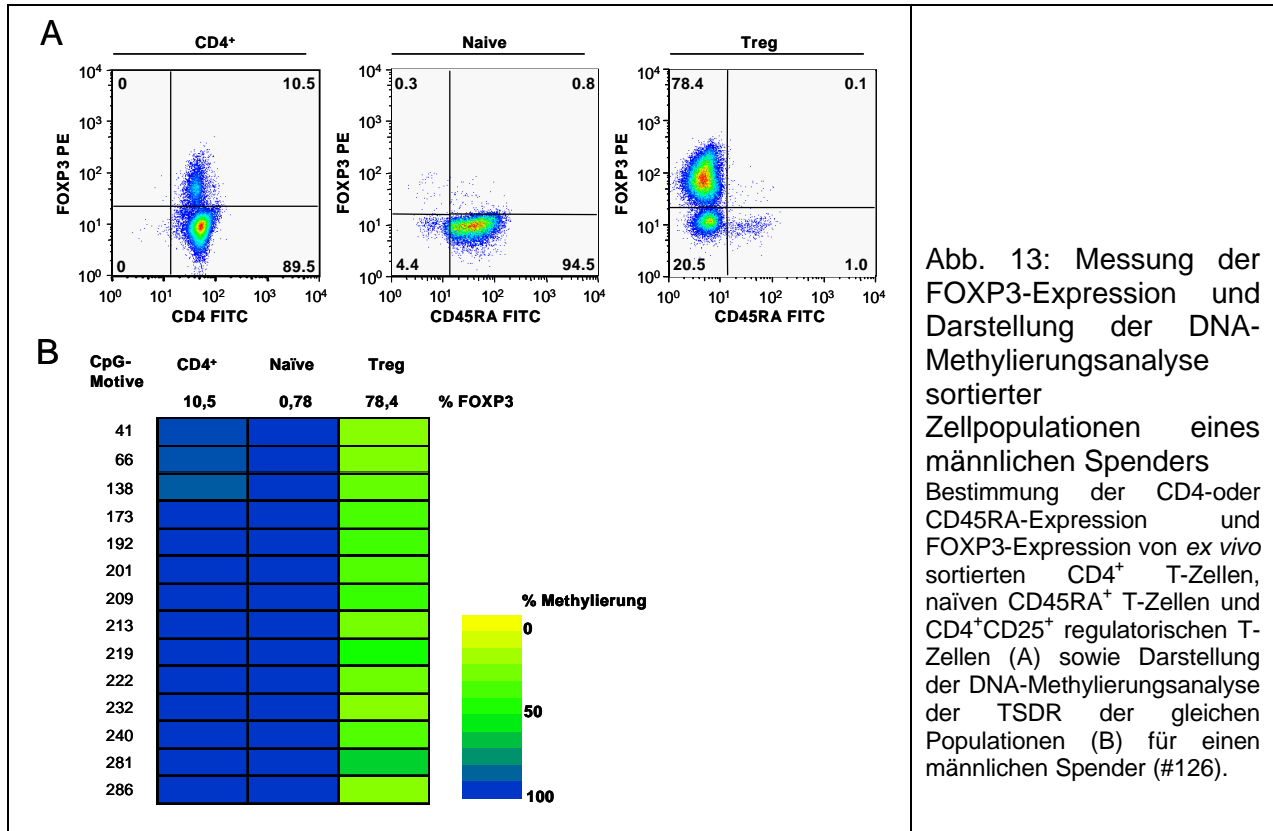


Abb. 13: Messung der FOXP3-Expression und Darstellung der DNA-Methylierungsanalyse sortierter Zellpopulationen eines männlichen Spenders. Bestimmung der CD4- oder CD45RA-Expression und FOXP3-Expression von *ex vivo* sortierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, naiven CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (A) sowie Darstellung der DNA-Methylierungsanalyse der TSDR der gleichen Populationen (B) für einen männlichen Spender (#126).

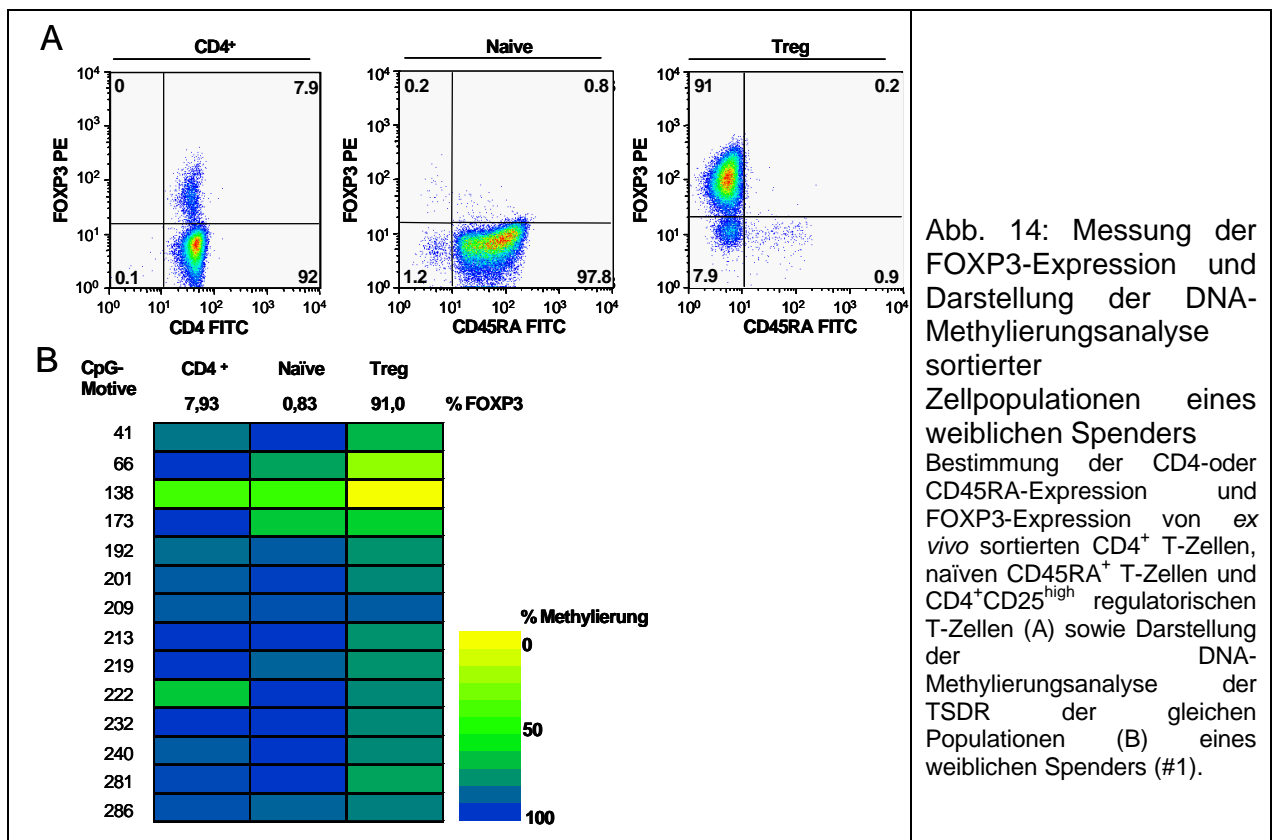


Abb. 14: Messung der FOXP3-Expression und Darstellung der DNA-Methylierungsanalyse sortierter Zellpopulationen eines weiblichen Spenders. Bestimmung der CD4- oder CD45RA-Expression und FOXP3-Expression von *ex vivo* sortierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, naiven CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen (A) sowie Darstellung der DNA-Methylierungsanalyse der TSDR der gleichen Populationen (B) eines weiblichen Spenders (#1).

### 3.4.1. FOXP3-Induktion in humanen stimulierten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen

In mehreren Arbeiten wurde bei humanen Zellen das Phänomen der transienten FOXP3-Expression beschrieben (43-47). Im April 2006 konnten Gavin und Kollegen zeigen, dass unter neutralen Bedingungen mit anti-human CD3/anti-human CD28 Antikörpern stimulierte CD25-depletierte T-Zellen den Transkriptionsfaktor FOXP3 mit einem Maximum an Tag 3 und Tag 4 transient exprimieren (44).

In der vorliegenden Arbeit wurden CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T-Zellen mit anti-human CD3/anti-human CD28 Antikörper-beschichteten Beads über einen Zeitraum von sieben Tagen stimuliert und die Zellen auf ihre FOXP3-Expression und den Anteil unmethylierter Motive in der TSDR des *foxp3* Gens hin untersucht. Auffällig war, dass in allen Spenderkulturen unter neutralen Bedingungen ein klarer Anstieg der FOXP3-Expression messbar war. In der in Abbildung 15 dargestellten durchflußzytometrischen Analyse eines weiblichen Spenders fiel die FOXP3-Expression, aufgetragen gegen die CD25 Expression, am Tag 7 jedoch nicht wie vermutet ab, sondern stieg im Vergleich zum Tag 4 von 28,1 % auf 55,5 % CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen an (Abb. 15A). Die Analyse des DNA-Methylierungsmusters der stimulierten T-Zellen zeigte im Vergleich zu den sortierten Ausgangszellen nur geringe Veränderungen. Einzig die sortierten regulatorischen T-Zellen wiesen eine klare DNA-Demethylierung in der TSDR auf (Abb. 15B).

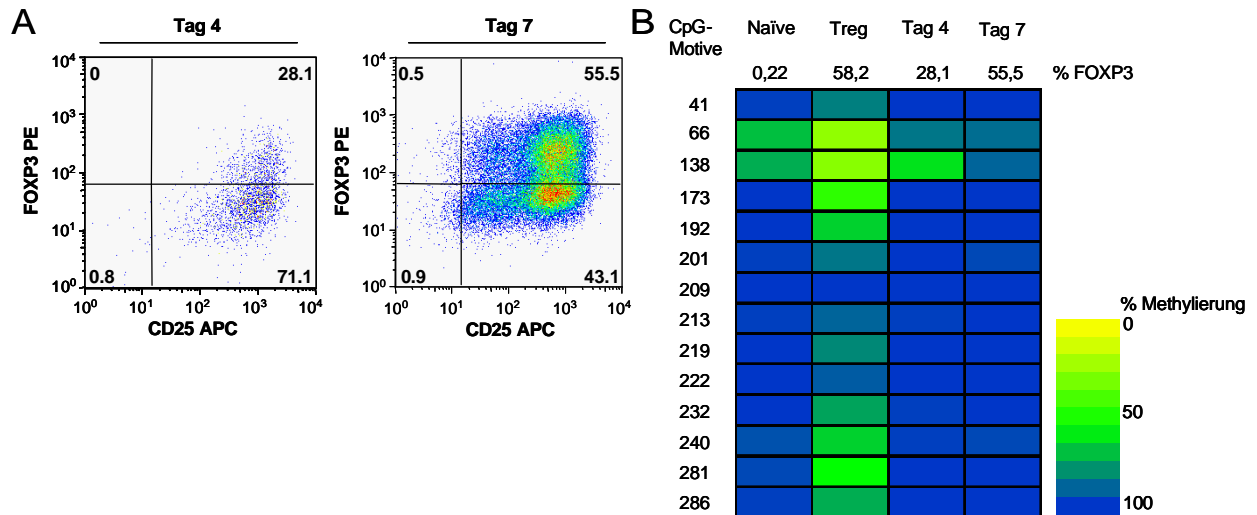


Abb. 15: Messung der FOXP3-Expression und Darstellung der DNA-Methylierungsanalyse stimulierter naiver T-Zellen

Durchflußzytometrische Analyse der CD25-Expression und der FOXP3-Expression der für vier und sieben Tage stimulierten naiven T-Zellen (A). Dargestellt sind ebenso die DNA-Methylierungsanalysen dieser Zellpopulationen (B) und der *ex vivo* sortierten Vergleichspopulationen (naive T-Zellen, regulatorische T-Zellen) sowie deren FOXP3-Expressionsdaten für einen Spender (#543, weiblich).

## Ergebnisse

In Abbildung 16 sind die FOXP3-Expressionsdaten sowie die Methylierungsanalysen des CpG-Motivs Nr. 41 für diverse Spender zusammengefasst dargestellt. Der Methylierungszustand CpG-Motivs Nr. 41, welches hier repräsentativ für das *foxp3* Gen dargestellt ist, wurde mithilfe der MS-SnuPE Methode bestimmt. Gezeigt sind Daten unter neutralen Bedingungen stimulierter naiver T-Zellen von zwei verschiedenen Zeitpunkten, Tag 3 (Abb. 16A) und Tag 4 (Abb. 16 B). Während die FOXP3-Expression am Tag 3 und Tag 4 spenderabhängig Werte zwischen 12 % und 40 % annimmt, ist das CpG-Motiv Nr. 41 kaum demethyliert. Einzig beim Spender #700 am Tag 4 ist gegenüber den anderen Spendern eine relativ starke Demethylierung im Verhältnis zur gemessenen FOXP3-Expression zu erkennen (Abb. 16 B).

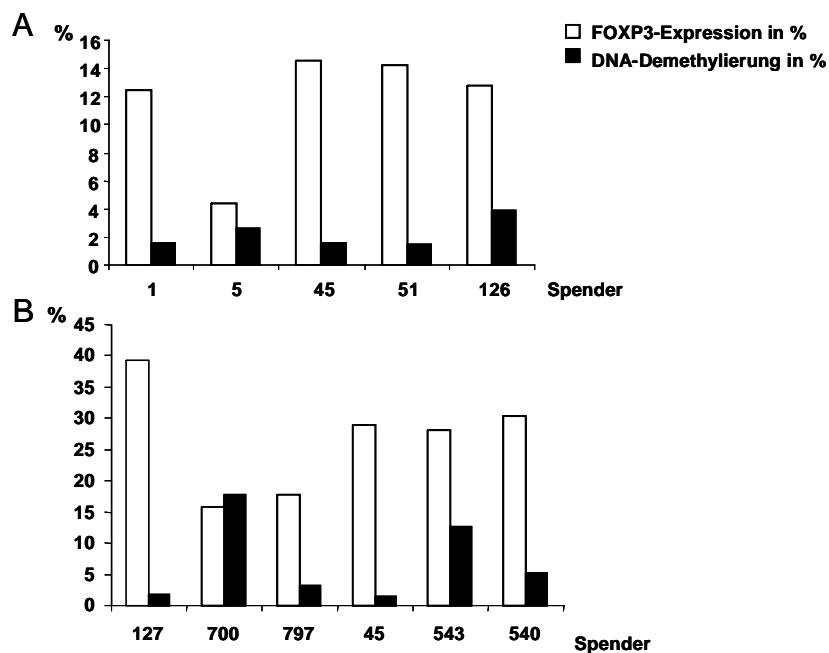


Abb.16: Transiente FOXP3-Expression und DNA-Methylierungsanalyse des CpG-Motives Nr.41 für verschiedene Spender

Darstellung der prozentualen transienten FOXP3-Expression (weiß) und DNA-Demethylierung des CpG-Motives Nr. 41 in der TSDR (schwarz) am Tag 3 (A) und Tag 4 (B) für verschiedene Spender.

### 3.4.2. Stimulation humaner T-Zellen in Anwesenheit von TGF- $\beta$ bewirkt einen sehr starken Anstieg der FOXP3-Expression

Sowohl in murinen Zellen als auch in humanen Zellen konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass unter Zugabe von TGF- $\beta$  naiven T-Zellen durch die Induktion des Transkriptionsfaktors FOXP3 T-Zellen mit einem regulatorischen Phänotyp aus generiert werden können (36-39).

Um die Frage zu beantworten, ob TGF- $\beta$  einen Einfluß auf das DNA-Methylierungsmuster des *foxp3* Gens hat, wurden in der vorliegenden Arbeit Kulturen

## Ergebnisse

über 3 Tage angelegt, denen kein TGF- $\beta$ , eine geringe Konzentration TGF- $\beta$  (0,5 ug/ml) oder eine hohe Konzentration TGF- $\beta$  (5 ug/ml) zusätzlich zum Stimulus zugefügt (Abb. 21). Aus den Daten zur Expression des Aktivierungsmarkers CD25 ist erkennbar, dass TGF- $\beta$  keinen hemmenden Einfluss auf die Aktivierung hatte, da unabhängig von der An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  zwischen 98,5–99,6 % der Zellen am Tag 3 den Aktivierungsmarker CD25 exprimierten (Abb. 17A, vordere Spalte).

Hinsichtlich der FOXP3-Expression ist zu beobachten, dass die Zugabe von TGF- $\beta$  die FOXP3-Expression dosisabhängig steigern konnte. Exemplarisch für die Zellen des Spenders #51 dargestellt, bewirkte die Stimulation der naiven T-Zellen unter neutralen Bedingungen eine FOXP3-Expression bei 13 % der stimulierten T-Zellen (Abb. 17A, hintere Spalte). Bei Zugabe einer geringen Konzentration an TGF- $\beta$  (0.5 ug/ml) konnte die FOXP3-Expression auf 55,4 % gesteigert werden. Bei Zugabe der hohen Konzentration an TGF- $\beta$  (5 ng/ml) exprimierten 63,6 % der Zellen den Transkriptionsfaktor FOXP3 (Abb. 17A, hintere Spalte).

In den DNA-Methylierungsanalysen konnte trotz eines starken Anstiegs der FOXP3-Expression in den stimulierten naiven T-Zellen durch TGF- $\beta$  Zugabe keine Demethylierung in der konservierten Region des *foxp3* Gens in den kultivierten T-Zellen nachgewiesen werden. Die über 3 Tage unter TGF- $\beta$ -Zugabe kultivierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen blieben gegenüber den Ausgangszellen unverändert methyliert (Abb. 21B).

## Ergebnisse

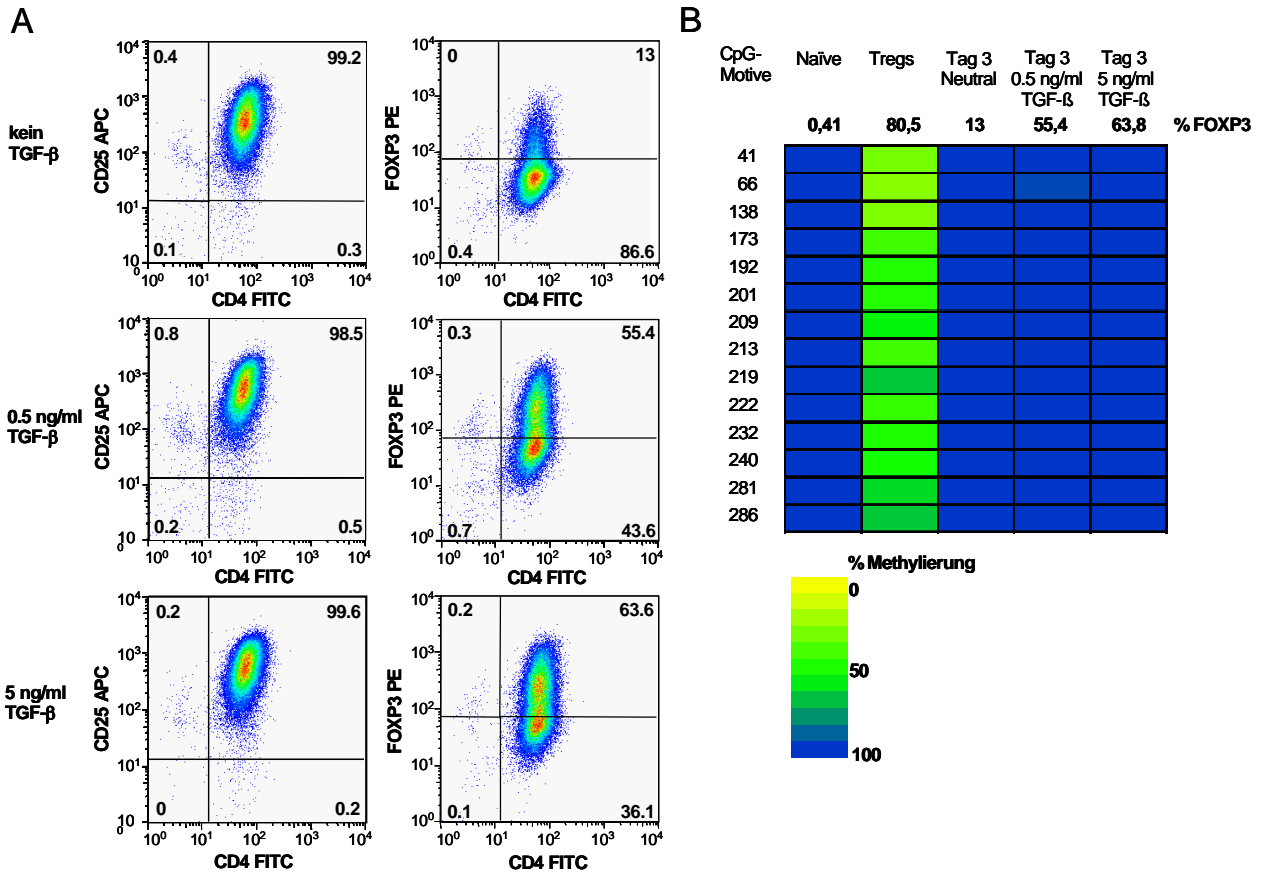


Abb. 17: Bestimmung der Zellaktivierung, FOXP3-Expression und Analyse des DNA-Methylierungsmusters der TSDR bei über 3 Tage in An- oder Abwesenheit von TGF-β kultivierten naiven T-Zellen

Bestimmung der CD4- und CD25-Expression (vordere Spalte) und CD4- und FOXP3-Expression (hintere Spalte) von neutral stimulierten, unter Zugabe von 0.5 ng/ml TGF-β oder 5 ng/ml TGF-β kultivierten naiven T-Zellen. Die Zellen wurden über drei Tage kultiviert und dann durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt in B ist die DNA-Methylierungsanalyse der TSDR der unterschiedlich kultivierten T-Zellen und deren Vergleichspopulationen sowie die FOXP3-Expressionsdaten eines Spenders (#51, männlich).

Die Kultur eines anderen Spenders (#540), die an Tag 4 der Kultur hinsichtlich der FOXP3-Expression und dem DNA-Methylierungsmuster analysiert wurde, zeigte im Vergleich zu den Ergebnissen an Tag 3 ähnliche Resultate. Die in Ab- und Anwesenheit von 5 ng/ml TGF-β kultivierten T-Zellen waren zu 99,5 % und 97,7 % aktiviert (Abb. 18A, obere Reihe).

Unter neutralen Bedingungen kultivierte naive T-Zellen exprimierten an Tag 4 zu 30,3 % FOXP3, was durch Zugabe von 5 ng/ml TGF-β auf 50,5 % FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen gesteigert werden konnte (Abb. 18A, untere Reihe).

Analog zur DNA-Methylierungsanalyse der TSDR am Tag 3 bewirkte die TGF-β Zugabe und der resultierende Anstieg der FOXP3-Expression in den kultivierten T-Zellen auch am Tag 4 keine Änderung des DNA-Methylierungsmusters gegenüber den naiven T-Zellen (Abb. 18B).



## Ergebnisse

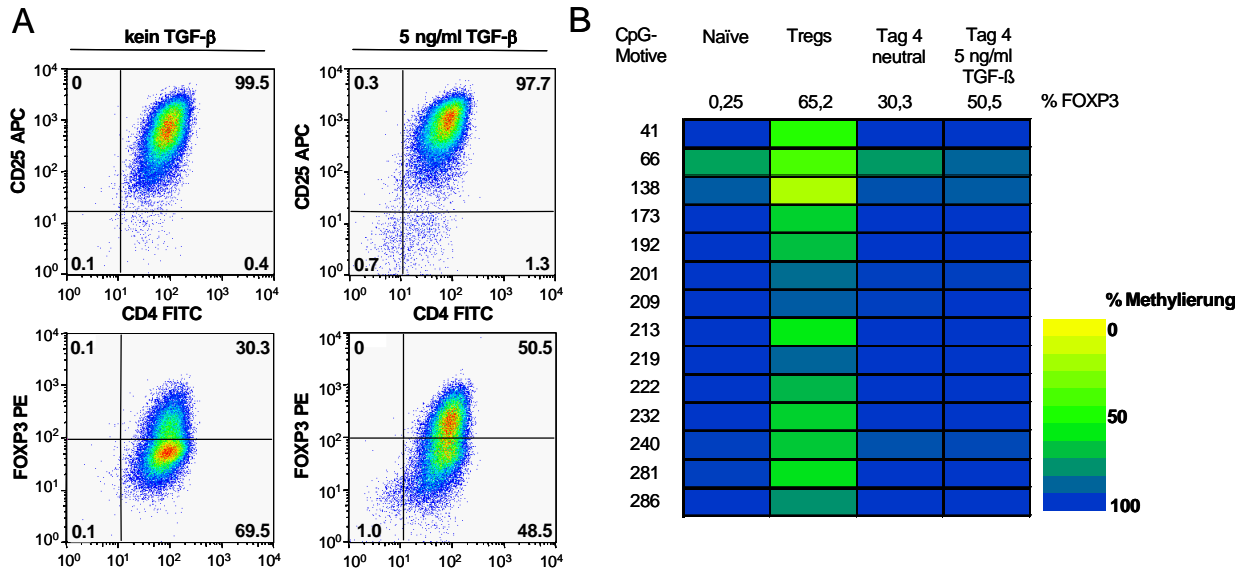


Abb. 18: Bestimmung der Zellaktivierung, FOXP3-Expression und Analyse des DNA-Methylierungsmusters in der TSDR der für vier Tage in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  kultivierten naiven T-Zellen

Bestimmung der CD4- und CD25-Expression (A, obere Reihe) und CD4- und FOXP3-Expression (A, untere Reihe) der für vier Tage neutral stimulierten oder unter Zugabe von 5 ng/ml TGF- $\beta$  kultivierten naiven T-Zellen (A). Die Analyse des DNA-Methylierungsmusters der TSDR der kultivierten T-Zellen ist im Vergleich mit den naiven T-Zellen und regulatorischen T-Zellen sowie den FOXP3-Expressionsdaten für einen Spender in B dargestellt (#540, männlich).

Um zu untersuchen, ob eine etwas längere Kultur in Anwesenheit von TGF- $\beta$  einen Einfluß auf den DNA-Methylierungsstatus hat, wurden Zellen am Tag 7 auf den Aktivierungsmarker CD25, die FOXP3-Expression und das DNA-Methylierungsmuster in der TSDR hin untersucht. Dabei zeigte sich eine nahezu komplette Zellaktivierung von 98,6 % unter neutralen Bedingungen beziehungsweise 99,9 % bei Zugabe von TGF- $\beta$  kultivierten T-Zellen (Abb. 19A). Analog zu den Kulturen am Tag 3 und Tag 4 konnte die FOXP3-Expression am Tag 7 von 55,5 % FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen in der Kontrollkultur bei TGF- $\beta$  Zugabe auf 86,9 % FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen erhöht werden (Abb. 19A). Dennoch zeigte sich bei der DNA-Methylierungsanalyse der TSDR, trotz der hohen FOXP3-Expression, im Vergleich zu den ex vivo isolierten naiven T-Zellen keine Änderung im DNA-Methylierungsmuster. Sowohl die naiven T-Zellen als auch die induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen waren in der TSDR nahezu komplett methyliert (Abb. 19B).

## Ergebnisse

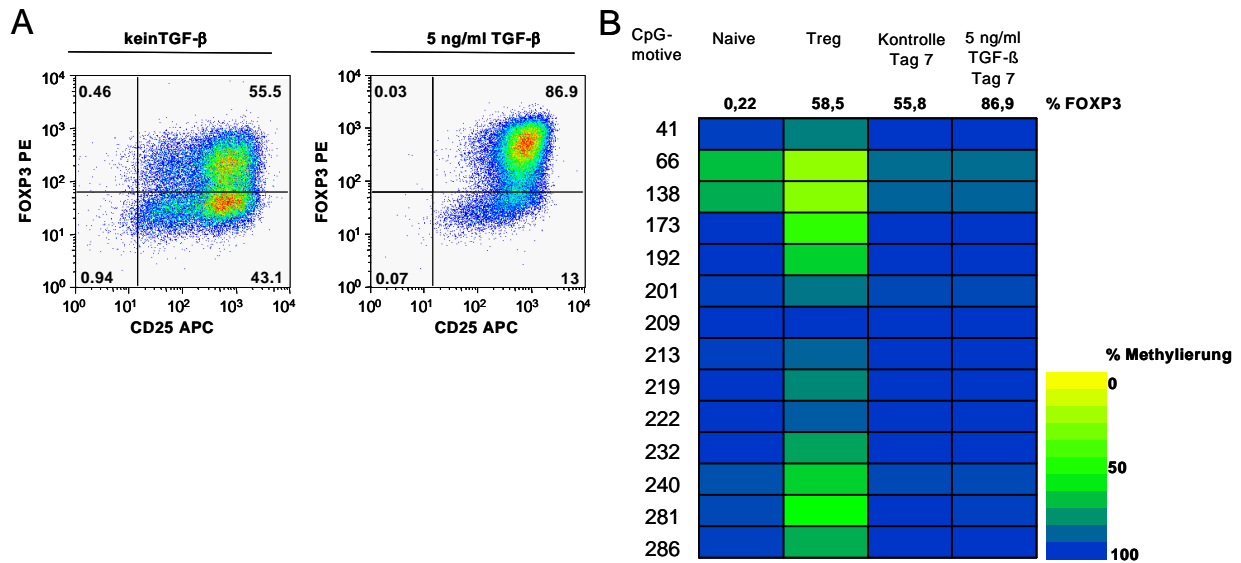


Abb. 19: Bestimmung der Zellaktivierung und FOXP3-Expression sowie Analyse des DNA-Methylierungsmusters der TSDR nach Kultivierung naiver T-Zellen in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$

Bestimmung der CD4- und CD25-Expression oder FOXP3-Expression bei über sieben Tage neutral stimulierten oder unter Zugabe von TGF- $\beta$  (5 ng/ml) kultivierten naiven T-Zellen (A). Die Analyse des DNA-Methylierungsmusters im Amplikon 5 der kultivierten T-Zellen ist im Vergleich zu den naiven T-Zellen und regulatorischen T-Zellen für einen Spender sowie die entsprechenden FOXP3-Expressionsdaten in B dargestellt (#543, weiblich).

Zum Vergleich mit den DNA-Methylierungsanalysen der TSDR sind in Abbildung 20 die FOXP3-Expression der sortierten Zellpopulationen und der mit TGF- $\beta$  kultivierten T-Zellen mit den Ergebnissen der MS-SNuPE-Analyse des CpG-Motivs Nr. 41 für einen Spender zusammengefasst. Bei einer über 3 Tage andauernden Kultur konnte an Tag 3 mit steigenden TGF- $\beta$  Konzentrationen ein Anstieg der FOXP3-Expression (Kontrollkultur: 4,42 % FOXP3, 0,5 ng/ml TGF- $\beta$ : 13,5 % FOXP3, 5 ng/ml TGF- $\beta$ : 35,5 % FOXP3) beobachtet werden, der jedoch nicht mit einer ansteigenden DNA-Demethylierung im CpG-Motiv korrelierte. Einzig die sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen zeigten in dem analysierten CpG-Motiv eine starke DNA-Demethylierung, wobei es sich hier um einen weiblichen Spender handelt (Abb. 20).

## Ergebnisse

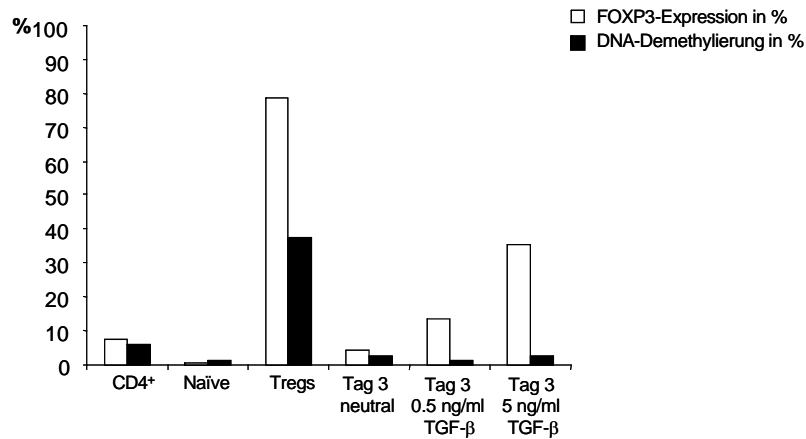


Abb. 20: Messung der FOXP3-Expression und die MS-SNuPE-Analyse für das CpG-Motiv Nr. 41 nach Kultivierung naiver T-Zellen in An- oder Abwesenheit TGF-β. Darstellung der prozentualen FOXP3-Expression (weiß) und DNA-Demethylierung des CpG-Motives Nr. 41 in der TSDR (schwarz) für unterschiedlich *ex vivo* sortierte und für drei Tage in An- und Abwesenheit von TGF-β (Konz.: 0.5 ng/ml; 5 ng/ml) kultivierte Zellpopulationen (Spender #5, weiblich).

### 3.4.3. Stimulation humaner naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 bewirkt einen schwachen Anstieg der FOXP3-Expression

Regulatorische T-Zellen benötigen zum Überleben und zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion Interleukin 2 (IL-2) (1-3, 58, 59). Eine Vermutung war, dass naive T-Zellen neben dem anti-CD3/ anti-CD28 Stimulus IL-2 brauchen, um den Phänotyp einer regulatorischen T-Zelle anzunehmen.

Jedoch zeigten naive T-Zellen, die mit 5 ng/ml IL-2 kultiviert wurden, an Tag 4 nur einen schwachen Anstieg der FOXP3-Expression auf 21,8 % gegenüber der Kontrollkultur mit 15,9 % FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 21A). Bei einem anderen Spender ließ sich die FOXP3-Expression an Tag 4 von 28,1 % auf 44,7 % CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen deutlicher steigern. Bei einer längeren Kultivierung bewirkte die Zugabe von IL-2 gegenüber der Kontrollkultur eine Steigerung der FOXP3-Expression nur um weitere 5 % (Abb. 22A).

Analog zu den Ergebnissen der transienten FOXP3 Expression konnte in der DNA-Methylierungsanalyse der TSDR der IL-2 Kulturen bei beiden Spendern kein Hinweis auf eine DNA-Demethylierung festgestellt werden (Abb. 21B, 22B).

Während jedoch in der Spenderkultur #543 an Tag 4 in dem CpG-Motiv Nr. 138 eine leichte Demethylierung zu erkennen war, zeigten die Analysen an Tag 7 eine klare Methylierung der kultivierten T-Zellen in der TSDR (Abb. 22B). Einzig die sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen zeigten bei beiden Spendern eine signifikante DNA-Demethylierung der TSDR.

## Ergebnisse

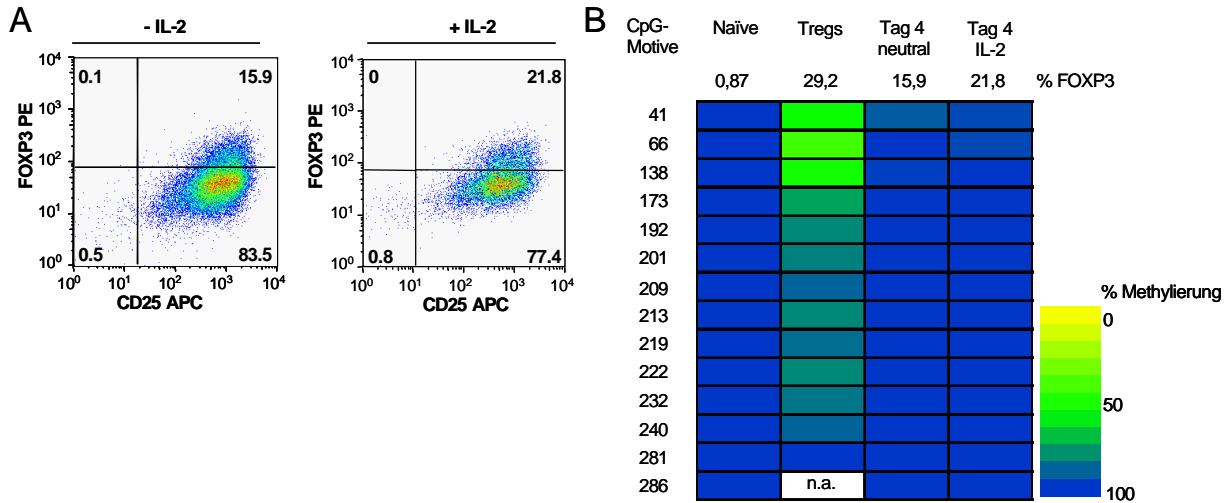


Abb. 21: Messung der FOXP3-Expression und des DNA-Methylierungsmusters bei in An- und Abwesenheit von IL-2 kultivierten naiven T-Zellen

Bestimmung der CD25-Expression und der FOXP3-Expression von vier Tage neutral stimulierten oder in Anwesenheit von 5 ng/ml IL-2 kultivierten naiven T-Zellen (A). Zusätzlich dargestellt ist die Analyse des DNA-Methylierungsmusters der kultivierten T-Zellen und der *ex vivo* sortierten Vergleichspopulationen (naive T-Zellen, regulatorische T-Zellen) und sowie die FOXP3-Expressionsdaten für einen Spender (#700, männlich).

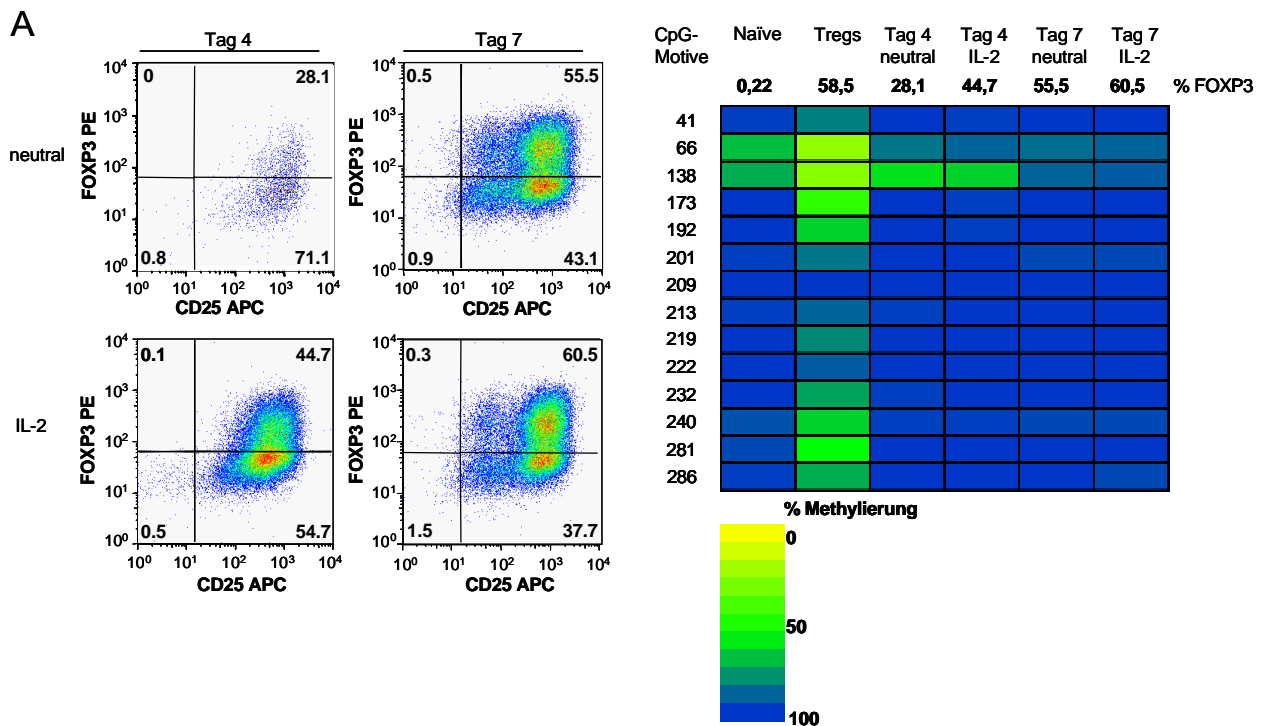


Abb. 22: Messung der FOXP3-Expression und des DNA-Methylierungsmusters bei in An- und Abwesenheit von IL-2 stimulierten naiven T-Zellen

Bestimmung der CD25-Expression und der FOXP3-Expression bei für vier Tage und sieben Tage neutral stimulierten oder mit IL-2 (5 ng/ml) stimulierten naiven T-Zellen (A). Dargestellt ist ebenfalls die Analyse des DNA-Methylierungsmusters der unterschiedlich kultivierten T-Zellen und deren Vergleichspopulationen (naive T-Zellen, regulatorische T-Zellen) sowie die FOXP3-Expressionsdaten für einen Spender (#543, weiblich).

### 3.4.4. TGF- $\beta$ und IL-2 bewirken keinen synergistischen Effekt

Wie aus den vorherigen Versuchen erkennbar ist, konnte die FOXP3-Expression durch alleinige IL-2-Zugabe zu unterschiedlichem Ausmass gesteigert werden (Abb. 21A, 22A). Das Zytokin TGF- $\beta$  als stark polarisierender und FOXP3-induzierender Faktor verursacht hingegen einen deutlichen Anstieg der FOXP3-Expression in allen bisher gezeigten Kulturen (Abb. 17-19). Um die Frage zu beantworten, inwieweit beide Zusätze durch einen synergistischen Effekt die FOXP3-Expression und insbesondere das DNA-Methylierungsmuster der TSDR im *foxp3* Gen beeinflussen könnten, wurden naive T-Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen entweder unter neutralen Bedingungen, mit 5 ng/ml TGF- $\beta$  allein oder mit 5 ng/ml IL-2 plus 5 ng/ml TGF- $\beta$  kultiviert und an Tag 4 und Tag 7 auf den Aktivierungsmarker CD25, die FOXP3-Expression und Änderungen im DNA-Methylierungsmuster im *foxp3* Gen untersucht (Abb. 23). In der Spenderkultur #543 waren an Tag 4 und Tag 7 unter allen genannten Bedingungen nahezu alle Zellen aktiviert, erkennbar durch die starke Expression von CD25 (Abb. 23A). An Tag 4 konnten in der Kontrollgruppe 28,1 % FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen erfasst werden, während der Zusatz von TGF- $\beta$  plus IL-2 einen Anstieg auf 77,4 % FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen bewirkte (Abb. 23A, vordere Spalte). In der Kultur mit alleinigem TGF- $\beta$  wurde mit einer FOXP3-Expression von 84,3 % der höchste Wert erreicht.

Am Tag 7 waren ähnlich Ergebnisse wie an Tag 4 der Kultur messbar (Abb. 23A, hintere Spalte). Die neutral stimulierten T-Zellen exprimierten zu 55,5 % FOXP3. Unter TGF- $\beta$  plus IL-2 Einfluss konnte die FOXP3-Expression auf 80,9 % FOXP3 gesteigert werden, während die alleinige TGF- $\beta$  Kultur einen Anstieg auf 86,9 % FOXP3<sup>+</sup> T Zellen verzeichnen konnte.

Analog zu den Analysen der vorherigen Kulturen konnte in der DNA-Methylierungsanalyse der TSDR bei den mit TGF- $\beta$  und IL-2 kultivierten Zellen bei beiden Zeitpunkten keine Änderung in dem DNA-Methylierungsmuster erfasst werden (Abb. 23B).

## Ergebnisse

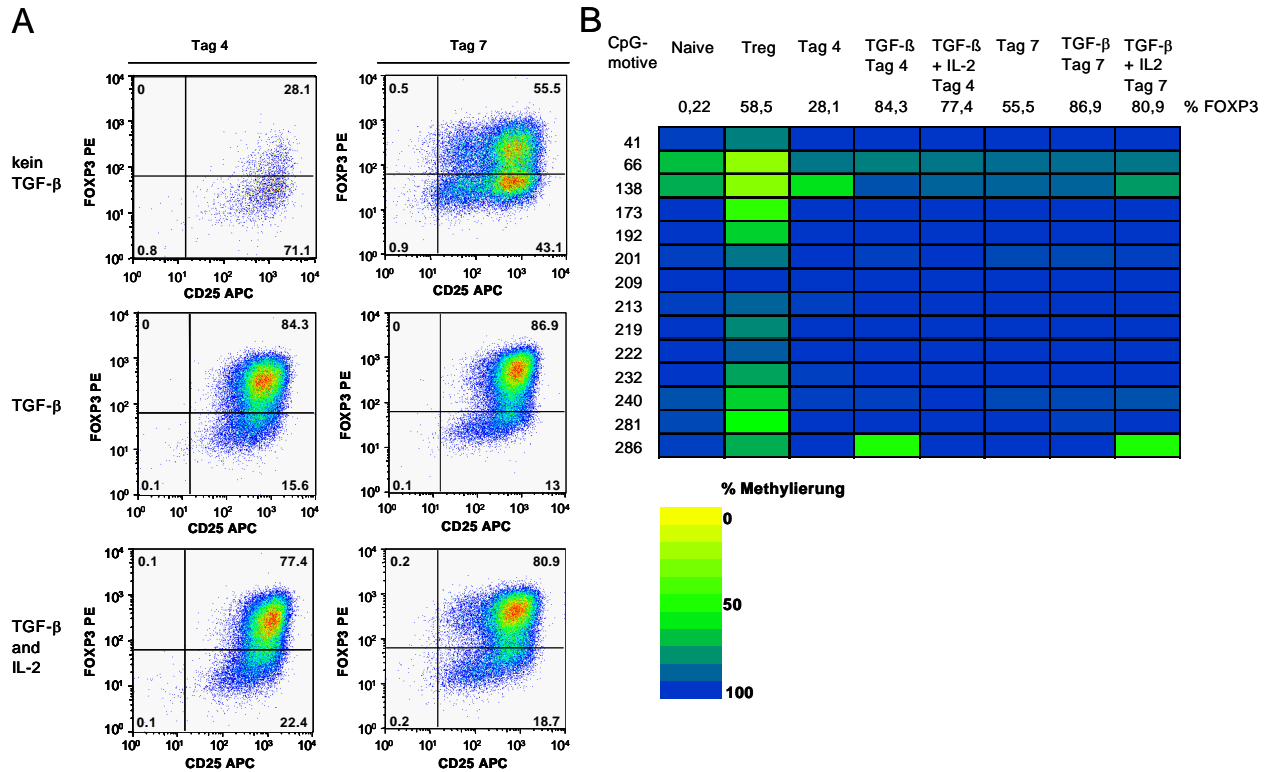


Abb. 23: Bestimmung der Zellaktivierung, FOXP3-Expression und Analyse des DNA-Methylierungsmusters in der TSDR bei in An- oder Abwesenheit von TGF- $\beta$  und IL-2 kultivierten naiven T-Zellen

Bestimmung der CD25-Expression und FOXP3-Expression der für vier Tage (vordere Spalte) und sieben Tagen (hintere Spalte) neutral stimulierten (obere Reihe), unter Zugabe von 5 ng/ml TGF- $\beta$  (mittlere Reihe) oder 5 ng/ml TGF- $\beta$  plus 5 ng/ml IL-2 (untere Reihe) kultivierten naiven T-Zellen. Die Analyse des DNA-Methylierungsmusters der kultivierten T-Zellen ist im Vergleich zu den *ex vivo* sortierten naiven T-Zellen und regulatorischen T-Zellen sowie den FOXP3-Expressionsdaten in B für einen Spender (#543, weiblich) dargestellt.

Ergänzend zur DNA-Methylierungsanalyse der TSDR wurde analog zu den alleinigen TGF- $\beta$ -Kulturen und der transienten FOXP3-Expression das CpG-Motiv Nr. 41 der unter TGF- $\beta$  plus IL-2 Einfluss kultivierten T-Zellen analysiert. In Abbildung 24 sind sowohl die prozentuale FOXP3-Expression als auch die prozentuale DNA-Demethylierung der MS-SNuPE-Analyse für die einzelnen Zellpopulationen und verschiedenen Kulturbedingungen eines Spenders dargestellt. Trotz einer klaren FOXP3-Expression mit Werten von 28 % FOXP3 in neutral stimulierten T-Zellen an Tag 4 bis zu 86,9 % FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen unter TGF- $\beta$  Einfluss an Tag 7, war sich bis auf eine leicht erhöhte Demethylierung in der Kultur der neutral stimulierten T-Zellen (Kontrollkultur) an Tag 4 keine deutliche Demethylierung messbar.

## Ergebnisse

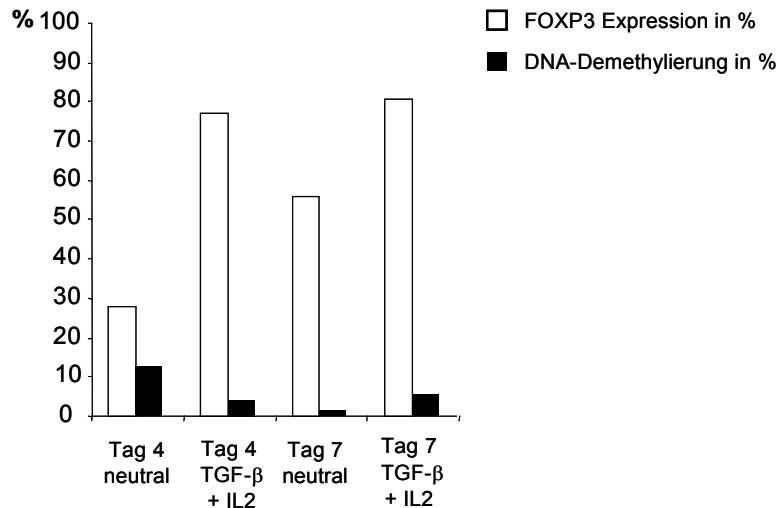


Abb. 24: Messung der FOXP3-Expression und Analyse des CpG-Motives Nr. 41 nach Kultivierung naiver T-Zellen von in An- und Abwesenheit von TGF- $\beta$  und IL-2

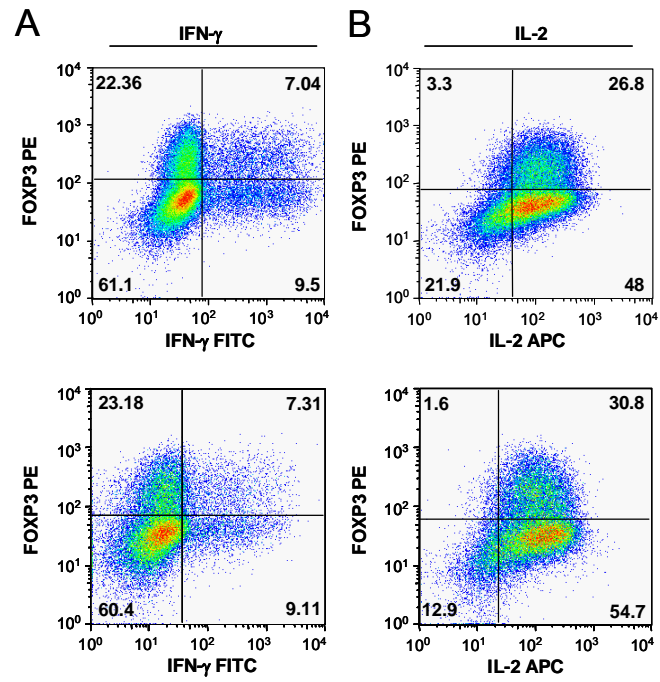
Darstellung der prozentualen FOXP3-Expression (weiß) und DNA-Demethylierung des CpG-Motives Nr. 41 der TSDR (schwarz) der für vier Tage oder sieben Tage in An- und Abwesenheit von TGF- $\beta$  (5 ng/ml) plus IL-2 (5 ng/ml) kultivierten Zellpopulationen eines Spenders (#543, weiblich).

### 3.5. Die induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren Effektor-Zytokine

Um den weiteren Phänotyp der induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen zu bestimmen, wurden diese Zellen nach vier Tagen Kultur unter neutralen Bedingungen mit PMA und Ionomycin restimuliert und die intrazelluläre Expression der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  durchflußzytometrisch bestimmt. Diese Zytokine werden nicht von regulatorischen T-Zellen exprimiert. Daher dient die Analyse der Zytokinexpression herauszufinden, ob es sich bei den induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen um regulatorische T-Zellen oder FOXP3-exprimierende Effektorzellen handelt.

In den in Abbildung 25 dargestellten Parallelfärbungen für FOXP3 und IFN- $\gamma$  oder FOXP3 und IL-2 konnte in zwei unabhängigen Experimenten eine jeweils 7 % große FOXP3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellpopulation gemessen werden (Abb. 25A). Hinsichtlich der Koexpression von IL-2 und FOXP3 exprimierten bei zwei untersuchten Spendern 26,8 % beziehungsweise 30,8 % der Zellen beide Faktoren (Abb. 25B). Somit exprimieren die induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen Effektorzell-Zytokine.

## Ergebnisse



### Abb. 25: Zytokinprofil von stimulierten naiven T-Zellen

Naive T-Zellen wurden für vier Tage stimuliert und hinsichtlich des Zytokinprofils von FOXP3 mit IFN- $\gamma$  (A) oder IL-2 (B) analysiert. Dargestellt sind die durchflußzytometrischen Analysen für den Spender #984 (obere Reihe) und #60 (untere Reihe).



## 4. Diskussion

### 4.1. Regulatorische T-Lymphozyten und deren Charakterisierung

Regulatorische T-Zellen spielen bei der Vermittlung von Toleranz gegenüber Selbst- und Fremdartigen eine entscheidende Rolle und stellen damit ein zentrales Element zur Aufrechterhaltung eines gesunden Organismus dar. Die Relevanz dieser spezifischen T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen, Krebserkrankungen und in der Transplantationsmedizin hat die Bemühungen um die Isolation dieser Zellen anhand spezifischer Charakteristika sowie weitere Erkenntnisse über deren Zielgene und Wirkung erneut in den Vordergrund der Forschung gerückt.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt galt der von Brunkow und Kollegen 2001 entdeckte Transkriptionsfaktor FoxP3 als klares Charakteristikum regulatorischer T-Zellen (29-32, 66). Mit der Beschreibung der transienten FOXP3-Expression in humanen T-Zellen sowie weiteren FOXP3-exprimierenden Zellpopulationen wurde die Spezifität des Transkriptionsfaktors in humanen T-Zellen jedoch angezweifelt (43-47). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Unterscheidung natürlicher  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  regulatorischer T-Zellen von induzierten  $FOXP3^+$  T-Zellen erstmals die Bestimmung des DNA-Methylierungsmusters in der „Treg-specific-demethylation-region“ (TSDR) im *foxp3* Gen untersucht und mit der FACS-basierten Messung des Transkriptionsfaktors FOXP3 verglichen.

### 4.2. Etablierung eines Stimulationssystems für humane naive T-Zellen

Zur Etablierung eines Stimulationssystems für humane naive T-Zellen wurde die Zellstimulation mit plattengebundenen und löslichen anti-human CD3- und anti-human CD28 Antikörpern sowie über die Zugabe von anti-human CD3/ anti-human CD28-Antikörper-beschichteten Beads miteinander verglichen.

Während magnetisch sortierte  $CD4^+$  T-Zellen bei der plattengebundenen Stimulation als Zeichen der Zellaktivierung zunächst gute Expansionsraten zeigten, war bei sortierten naiven T-Zellen keine signifikante Zellaktivierung über einen Zeitraum von sechs Tagen messbar. Diese Ergebnisse könnten durch eine unvollständige Bindung oder ungleichmäßige Verteilung der Antikörper auf der Kulturplatte zustande gekommen sein. Die mangelnde Zellaktivierung ist ebenso durch ein anderes Stimulationsverhalten erklärbar, da naive T-Zellen einen stärkeren Stimulus als Gedächtnis-Zellen zur Zellaktivierung benötigen (72). Diese Zellen sind ebenso in der  $CD4^+$  T-Zellfraktion enthalten und vermutlich für die initial beobachtete Proliferation verantwortlich.

Als eine weitere Stimulationsmethode wurde die Zugabe von löslichen Antikörpern unter Nutzung von zwei anti-human CD3 Antikörperklonen (Klon UCHT1 und Klon OKT3) plus anti-human CD28 Antikörper getestet. Der Einsatz der unterschiedlichen anti-human CD3 Antikörperklone führte zu einer Aktivierung von 30,8 - 44,2 % der stimulierten naiven T-Zellen. Verglichen mit der plattengebundenen Stimulation kann man daher vermuten, dass lösliche Systeme aufgrund der freien Bewegung von Zellen und Antikörpern besser zur Stimulation naiver T-Zellen geeignet sind. Die geplanten Versuche setzten jedoch eine Aktivierung möglichst aller Zellen voraus. Dazu war ein System notwendig, welches spenderunabhängig und zuverlässig reproduzierbare und optimale Daten hinsichtlich der Zellaktivierung liefert. In einem weiteren Ansatz wurde die Zellaktivierung über Antikörper-beschichtete Beads getestet und analog zu den anderen Stimulationssystemen die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 am FACS erfasst. Spenderunabhängig führte die Stimulation mit Antikörper-beschichteten paramagnetischen Beads und Antikörper-beschichteten Latex Beads zu einer nahezu kompletten Aktivierung der stimulierten T-Zellpopulation und stellte damit ein optimales Stimulationssystem für die weiteren Versuche dar.

Hinsichtlich der Expansionsraten unterlag diese Methode jedoch leichten Schwankungen. Während in einigen Spenderkulturen ein ansteigendes Zellwachstum beobachtet wurde, konnte in anderen Kulturen ein Rückgang der Zellzahl gegenüber der Ausgangszellzahl erfasst werden. Gründe dafür könnten einerseits in einer unzureichenden Zellstimulation oder andererseits in einer zu starken Aktivierung und Proliferation begründet liegen, die mit einem starken Zelltod einhergeht und somit die Zellzahl mindert. Da die Zielstellung dieser Etablierungsarbeiten jedoch die Aktivierung möglichst vieler Zellen und nicht die Expansion humaner naiver T-Zellen beinhaltete, wurde die Zellstimulation der naiven T-Zellen mit den Antikörper-beschichteten Beads fortgesetzt.

### 4.3. Was sind transient FOXP3-exprimierende T-Zellen?

Entsprechend den Beobachtungen in murinen T-Zellen ging man ursprünglich in humanen Zellen davon aus, dass natürliche regulatorische T-Zellen den Transkriptionsfaktor FOXP3 konstitutiv exprimieren und dass eine FOXP3-Induktion in naiven T-Zellen in Gegenwart bestimmter Zytokine mit dem Erwerb suppressorischer Fähigkeiten korreliert (1-4).

Nach der Etablierung eines idealen Stimulationssystems konnte in der vorliegenden Arbeit über einen Zeitraum von sieben Tagen eine FOXP3-Expression bei bis zu 55,5 % der mit Antikörper-beschichteten Beads stimulierten T-Zellen beobachtet werden. In der Literatur wird diese Expression als transiente oder aktivierungsabhängige FOXP3-Expression beschrieben, da die Zellen den Transkriptionsfaktor FOXP3 nach einigen Tagen wieder herunterregulieren (43-47). Nach Gavin et al. handelt es sich bei diesen transient FOXP3-exprimierenden T-Zellen aufgrund einer intrazellulären Zytokinproduktion von IFN- $\gamma$  und IL-2 um FOXP3-exprimierende Effektorzellen (44). Analog dazu konnte in der vorliegenden Arbeit bei der Charakterisierung der induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls eine Koexpression von FOXP3 mit den Effektor-Zytokinen IL-2 und IFN- $\gamma$  gemessen werden. Aber während in der vorliegenden die Zytokinexpression auf allen Niveaus der FOXP3-Expression festgestellt werden konnte, erfassten Gavin et al. eine Koexpression von FOXP3 mit IFN- $\gamma$  und IL-2 ausschließlich in Zellen geringer und mittlerer FOXP3 Expression (44). Die FOXP3<sup>high</sup> T-Zellen blieben von der Koexpression ausgeschlossen und wurden von den Autoren als natürliche regulatorische T-Zellen konstatiert. Abgesehen von der ausbleibenden Zytokinexpression in den FOXP3<sup>high</sup> T-Zellen unterstützen die Daten der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass es sich bei den induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen entsprechend ihrer IFN- $\gamma$  und IL-2 Produktion um aktivierte FOXP3-exprimierende Effektorzellen handelt.

Ein Vergleich der verschiedenen Studien zu transient FOXP3-exprimierenden Zellen ist zudem schwierig, da sowohl die Sortierungsmechanismen und die Reinheit der Ausgangszellen als auch die späteren Versuchsbedingungen zur Überprüfung der suppressorischen Eigenschaften eine entscheidende Rolle spielen. In einigen Studien wurde mit CD25-depletierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Ausgangszellfraktion gearbeitet, wobei durch eine CD25-Depletion der gesamten CD4<sup>+</sup> T-Zellfraktion nicht alle regulatorischen T-Zellen entfernt werden können (44). Es ist vorstellbar, daß es FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> exprimierende T-Zellen gibt, die in Kultur in Anwesenheit von IL-2-produzierenden T-Zellen auswachsen. In anderen Untersuchungen wurden spezifische Marker (CD45RA, CD127) zur Sortierung der Ausgangszellpopulation aus Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellen genutzt, welche eine höhere Reinheit FOXP3<sup>-</sup> naiver T-Zellen versprechen (14-16, 48). In der vorliegenden Arbeit wurde mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen gearbeitet, welche von Fritzsching et al. als naive regulatorische T-Zellen bezeichnet wurden (73). Diese Zellen zeichnen sich neben naiver T-Zellmarker durch eine CD95L-induzierte

Apoptoseresistenz aus, während Memory-Tregs besonders sensitiv gegenüber CD95L sind und sehr schnell apoptotisch werden.

Als Ursache der FOXP3-Induktion wird neben der Stimulation des TZR und kostimulatorischen Signalen das Zytokin TGF- $\beta$  diskutiert. So konnten Tran et al. eine Abhängigkeit der FOXP3-Induktion von der TGF- $\beta$ -Anwesenheit in humanen naiven T-Zellen belegen konnten (48). Naive T-Zellen, die in TGF- $\beta$  enthaltenden Kulturmedium stimuliert wurden, exprimierten nach kürzester Zeit signifikante Mengen an FOXP3. Erfolgte hingegen eine Kultivierung in Serum-freiem Medium, welches kein TGF- $\beta$  enthält, oder unter Zugabe von anti-TGF- $\beta$  Antikörpern konnte keine FOXP3-Expression erfasst werden. Diese Ergebnisse deuten auf einen starken Zusammenhang von TGF- $\beta$  bei der FOXP3-Induktion in neutral stimulierten naiven T-Zellen hin und sind auch in der vorliegenden Arbeit als Ursache der FOXP3-Induktion in Betracht zu ziehen.

#### 4.4. Epigenetische Modifikationen zur Beschreibung CD4<sup>+</sup> FOXP3-exprimierender T-Zellen

Als neues Mittel zur Beschreibung von FOXP3-exprimierenden T-Zellen und damit der potentiellen Unterscheidung natürlicher regulatorischer T-Zellen von anderen FOXP3-exprimierenden T-Zellen dienten in der vorliegenden Arbeit erstmalig DNA-Methylierungsanalysen im *foxp3* Gen. In einer vorausgehenden Arbeit zum DNA-Methylierungsmuster in murinen T-Zellen wurde eine im *foxp3* Gen evolutionär konservierte Region entdeckt, die sich aufgrund einer selektiven Demethylierung in natürlichen regulatorischen T-Zellen als besonders aussagekräftig zur Unterscheidung natürlicher regulatorischer T-Zellen von naiven T-Zellen erwies (67). Daraufhin wurde diese konservierte Region als „T-reg-specific-demethylation-region“ bezeichnet. Bei den DNA-Methylierungsanalysen des *foxp3* Gens in humanen T-Zellen wird die TSDR durch das Amplikon 5 repräsentiert (Seite 24, 70). Man verbindet mit einer DNA-Demethylierung im *foxp3* Gen eine epigenetische Aktivität des *foxp3* Gens und versucht darüber Erkenntnisse über das FOXP3-Expressionsmuster in unterschiedlichen FOXP3-exprimierenden T-Zellen zu gewinnen. Ergänzend zur Sequenzierung der TSDR wurden mithilfe der MS-SNuPE-Methode separate Analysen des CpG-Motivs Nr. 41 der TSDR durchgeführt, welches aus Vorarbeiten als besonders diskriminativ und sensitiv zur Unterscheidung FOXP3-exprimierender T-Zellen hervorging.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse von weiblichen Spendern hat die Lage des *foxp3* Gens auf dem X-Chromosom zur Folge, dass vermutlich durch die zufällige Inaktivierung eines X-Chromosoms eine schwächer ausgeprägte DNA-Demethylierung in der untersuchten TSDR gegenüber männlichen Spendern messbar ist.

### 4.5. Epigenetische Analysen in transient FOXP3-exprimierenden T-Zellen

In der DNA-Methylierungsanalyse der transient FOXP3-exprimierenden T-Zellen konnte trotz einer signifikanten FOXP3-Expression der neutral stimulierten naiven T-Zellen im Vergleich mit den *ex vivo* sortierten regulatorischen T-Zellen keine Demethylierung der TSDR gezeigt werden. Ebenso zeigte die Analyse des CpG-Motivs Nr. 41 trotz signifikantem FOXP3-Anstiegs in den stimulierten T-Zellen keine Änderung im Methylierungsgrad. Eine DNA-Demethylierung war einzig in den sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-Zellen erkennbar.

Aufgrund der Relevanz von epigenetischen Modifikationen bei der Regulation von Genaktivitäten und Zellfunktionen sowie Zelldifferenzierung (67), ist daher anzunehmen, dass es sich bei den transient FOXP3-exprimierenden T-Zellen um einen anderen Zelltyp als den der natürlichen regulatorischen T-Zellen handelt. Unterstützt wird diese These von den Daten zur intrazellulären Zytokinproduktion, welche aktivierte Effektorzellen hinter den FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen vermuten lassen.

### 4.6. Können mithilfe von TGF- $\beta$ , IL-2 oder TGF- $\beta$ plus IL-2 induzierte FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen von natürlichen regulatorischen T-Zellen unterschieden werden?

Es ist bekannt, dass TGF- $\beta$  in murinen T-Zellen durch den Transkriptionsfaktors FoxP3 in naiven T-Zellen induzieren kann (36, 37). Laut Fantini und Kollegen spielen bei der FoxP3-Induktion durch TGF- $\beta$  Transkriptionsfaktoren wie SMAD7, SMAD3/4 und STAT5 eine entscheidende Rolle. TGF- $\beta$  induziert neben FoxP3 den inhibitorischen Transkriptionsfaktor SMAD7, welcher TGF- $\beta$  induzierte Signalwege reprimiert und damit die TGF- $\beta$  Wirkung limitiert. FOXP3 kann SMAD7 herunterregulieren und dadurch die TGF- $\beta$  Wirkung durch die Transkriptionsfaktoren SMAD3 oder SMAD4 im Sinne einer FoxP3-Induktion in T-Zellen verstärken (38).

Floess et al. konnten zeigen, dass zunächst mithilfe von TGF- $\beta$  induzierte Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen in der Abwesenheit von TGF- $\beta$  ihre FoxP3-Expression wieder verlieren (67). Untersucht man das DNA-Methylierungsmuster dieser mithilfe von TGF- $\beta$  induzierten

FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen, so ist bei der DNA-Methylierungsanalyse nur eine leichte Demethylierung der TSDR im *foxp3* Gen zu erkennen, während *ex vivo* sortierte und kultivierte regulatorische T-Zellen in der TSDR nahezu komplett demethyliert waren. Diese Ergebnisse belegen erneut trotz der ausgeprägten FoxP3-Expression in beiden Zellpopulationen einen Unterschied der epigenetischen Modifikation im *foxp3* Gen, die das Expressionsmuster von FoxP3 und weitere Zelleigenschaften der T-Zelle beeinflussen können.

In humanen T-Zellen wird die FOXP3-Induktion mithilfe von TGF- $\beta$  und der Ausbildung eines regulatorischen Phänotyps kontrovers diskutiert, da die Zugabe von TGF- $\beta$  eine FOXP3-Induktion in naiven T-Zellen bewirkt, sich jedoch nur in einzelnen Studien bei den induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen suppressorische Eigenschaften nachweisen liessen (38, 39, 48). In vorliegender Arbeit konnte in Gegenwart von TGF- $\beta$  ein starker Anstieg der FOXP3-Expression bei bis zu 80 % der Zellen am Tag 7 in stimulierten naiven T-Zellen erfasst werden. In den meisten TGF- $\beta$  Kulturen konnte die FOXP3-Expression gegenüber der Kontrollgruppe verdoppelt bis verdreifacht werden.

Es stellte sich daraufhin die Frage, welches Methylierungsmuster diese FOXP3-exprimierenden T-Zellen aufweisen und welche Schlüsse sich aus diesen Beobachtungen ziehen lassen. Die DNA-Methylierungsanalyse dieser mithilfe von TGF- $\beta$  induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen ergab keinen Anhalt auf eine DNA-Demethylierung der TSDR und deutet analog zu den transient FOXP3-exprimierenden T-Zellen auf ein anderes FOXP3-Expressionsmuster als in sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen hin. Auch scheint das Ausmaß der FOXP3-Expression keinen Einfluß auf das DNA-Methylierungsmuster des *foxp3* Gen zu haben, da eine vergleichsweise hohe FOXP3-Induktion von 80 % keine Demethylierung in der TSDR nach sich zieht.

Für die Entwicklung und Aufrechterhaltung ihrer Funktion benötigen regulatorische T-Zellen das Zytokin IL-2 (1-3, 58-59). Analog zu der alleinigen TGF- $\beta$ -Kultur sollte die weitere Frage beantwortet werden, ob in Anwesenheit von IL-2 oder IL-2 plus TGF- $\beta$  induzierte FOXP3<sup>+</sup> Zellen sich anhand der FOXP3-Expression oder dem DNA-Methylierungsmuster von *ex vivo* sortierten regulatorischen T-Zellen unterscheiden lassen. Die alleinige IL-2 Zugabe im Kulturmedium bewirkte einen vergleichsweise geringen Anstieg der FOXP3-Expression gegenüber konventionell stimulierten T-Zellen. Unter kombinierter Zugabe von TGF- $\beta$  und IL-2 stieg die FOXP3-Expression stark, aber nicht über das Niveau der alleinigen TGF- $\beta$  Kultur an. Bei der weiteren

Charakterisierung der Zellen mithilfe der DNA-Methylierungsanalyse konnte erneut gezeigt werden, dass die mittels IL-2 oder IL-2 plus TGF- $\beta$  induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen keine Demethylierung in der TSDR aufwiesen und sich daher klar von den *ex vivo* sortierten regulatorischen T-Zellen unterscheiden lassen.

Hinsichtlich des Zusammenspiels von TGF- $\beta$  und IL-2 bei der FOXP3-Induktion konnten Tran et al. in zunächst mithilfe von TGF- $\beta$  induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen die Notwendigkeit von IL-2 zur Aufrechterhaltung einer permanenten FOXP3-Expression (FOXP3-Bestimmung am FACS) feststellen (35). Zheng et al. bewiesen darüberhinaus die Relevanz von IL-2 bei der TGF- $\beta$ -vermittelten FOXP3-Induktion, da in naïven T-Zellen aus IL-2-defizienten Mäusen mithilfe von TGF- $\beta$  der Transkriptionsfaktor FoxP3 nicht induzierbar war (74). Somit spielen sowohl TGF- $\beta$  als auch IL-2 bei der FOXP3-Induktion und der Homöostase peripher induzierter Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen eine entscheidende Rolle. Hingegen scheinen für die Generierung natürlicher regulatorischer T-Zellen im Thymus sowohl TGF- $\beta$  als auch IL-2 nicht ausschlaggebend zu sein (57-59, 82). Somit liefern die vorliegenden Daten aufgrund der unterschiedlichen epigenetischen Genregulation erneut einen Hinweis auf die unterschiedliche Herkunft FOXP3-exprimierender T-Zellen und deren möglicherweise unterschiedlichen Eigenschaften.

#### 4.7. Der PE-gekoppelte FOXP3 Antikörper bindet teilweise unspezifisch

Entgegen den Beschreibungen des Herstellers konnte bei den FOXP3-Färbungen humaner stimulierter T-Zellen mit dem PE-gekoppelten FOXP3 Antikörper PCH101 eine Verschiebung der Gesamtpopulation in der FACS-Analyse festgestellt werden. Im Vergleich mit der Isotypkontrolle könnte man diese unabhängig von den Stimulationsbedingungen bestehende Verschiebung als eine FOXP3-Induktion in fast allen stimulierten T-Zellen werten. In der Literatur zeigen ebenso die FACS-basierten FOXP3-Expressionsdarstellungen von Gavin et al. eine Verschiebung der Gesamtpopulation, welche die Autoren in der Diskussion jedoch nicht erwähnen (44). Pilai et al. deuten in ihrer Arbeit diese Verschiebung als FOXP3-Induktion in den stimulierten T-Zellen (45).

Zum Nachweis, ob der benutzte FOXP3 Antikörper spezifisch mit den Zellen reagiert, wurde in der vorliegenden Arbeit im Rahmen eines Spezifitätsexperimentes eine Blockade der FOXP3-spezifischen Bindungen mit einem ungekoppelten FOXP3 Antikörper durchgeführt. Die Auswertung des Experimentes ergab, dass der

verwendete PE-gekoppelte FOXP3 Antikörper zu einem Teil unspezifisch in stimulierten humanen T-Zellen bindet, da nach der Blockade der spezifischen FOXP3-Bindungen Signale des PE-gekoppelten FOXP3 Antikörpers in der FACS-Analyse erfasst werden konnten. Diese Signale können einerseits tatsächlich unspezifische Bindungen des PE-gekoppelten FOXP3 Antikörpers darstellen oder andererseits auf Bindungen des Fluorochroms PE beruhen.

Bei den ursprünglichen Messungen mit dem PE-gekoppelten FOXP3 Antikörper waren in den FOXP3-Messungen stimulierter T-Zellen in den meisten Fällen zwei Hauptpopulationen erkennbar, höchstwahrscheinlich einer Population von FOXP3<sup>high</sup> T-Zellen und einer Mischpopulation aus FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen und FOXP3<sup>-</sup> T-Zellen. Unter der Annahme, dass es sich bei den FOXP3<sup>high</sup> T-Zellen um spezifische Bindungen handelt und diese im Spezifitätsexperiment durch den ungekoppelten FOXP3 Antikörper blockierbar sind, wurden diese FOXP3<sup>high</sup> T-Zellen als Schwerpunkt der Auswertungen mithilfe eines Quadranten abgegrenzt und unter verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen.

Tran et al. überprüften darüberhinaus verschiedene FOXP3 Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität und konnten über die Blockade der FOXP3-Expression mithilfe einer siRNA (small interfering RNA) wiederum unspezifische Bindungen des PE-gekoppelte FOXP3 Antikörpers PCH101 belegen (48).

Somit ist die Bestimmung der Gesamtanzahl FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen in einer Zellpopulation mit diesem PE-gekoppelten Antikörper ungenau. Aufgrund der teilweise spezifischen Bindungen erlaubt diese FOXP3-Messung dennoch eine Abschätzung des Verhältnisses der FOXP3<sup>high</sup> T-Zellen zur restlichen T-Zellpopulation, wie es in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde.

#### 4.8. Einfluss des DNA-Methylierungsmuster im *foxp3* Gen auf die Stabilität des FOXP3-Expressionsmusters

Hinsichtlich der FOXP3-Expression in den unterschiedlichen FOXP3-exprimierenden T-Zellen geht man davon aus, dass die im Thymus generierten natürlichen regulatorischen T-Zellen eine permanente und somit stabile FOXP3-Expression aufweisen (30-32). Dem gegenüber stehen die in der Peripherie unter verschiedenen Bedingungen induzierten FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen, welche den Transkriptionsfaktor nicht stabil exprimieren müssen (35). Des Weiteren nimmt man an, dass natürliche regulatorische T-Zellen sich unter anderem durch suppressorische



Fähigkeiten auszeichnen, während eine Ausbildung suppressorischer Fähigkeiten in induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen nicht zwingend vorliegt (4,35,43-47). Daten aus DNA-Methylierungsanalysen des *foxp3* Gens geben Grund zur Annahme, dass epigenetische Modifikationen in der TSDR die Stabilität der FOXP3-Expression bestimmen und somit die Eigenschaften (Suppression von Zielzellen, Zytokinproduktion) der Zelle beeinflussen können (67).

In der vorliegenden Arbeit wurden weder die Stabilität der FOXP3-Expression über eine Langzeitkultur in An- und Abwesenheit der bestimmter Zytokine noch das suppressorische Potential der induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. Jedoch ist zu vermuten, dass in der TSDR des *foxp3* Gens demethylierte T-Zellen eine stabile FOXP3-Expression aufweisen und es sich bei diesen Zellen um regulatorische T-Zellen mit den entsprechenden Eigenschaften handelt, während in der TSDR des *foxp3* Gens methylierte T-Zellen, trotz einer signifikanten FOXP3-Expression, keine Zellen regulatorischen Ursprungs darstellen und sich zudem durch ein anderes Expressionsmuster und Eigenschaften auszeichnen. Um diese Annahme zu verifizieren, wäre ein nächster Schritt diese unterschiedlichen FOXP3-exprimierenden Zellen auf ihre suppressorischen Eigenschaften hin zu untersuchen und die Zellen dann mit dem Methylierungsmuster im *foxp3* Gen zu vergleichen.

### 4.9. Beurteilung der epigenetischen Messmethoden

Bei den erstmalig in humanen FOXP3-exprimierenden T-Zellen durchgeführten epigenetischen Methylierungsanalysen lag das Hauptaugenmerk auf der Analyse der TSDR (Amplikon 5). Ergänzend dazu wurde das CpG-Motiv Nr. 41 der TSDR mit einer MS-SNuPE-Methode analysiert. Bei der DNA-Methylierungsanalyse der TSDR werden nach einer Bisulfierung und Amplifizierung des gewünschten Abschnittes viele CpG-Motive über eine mathematische Sequenzierung analysiert, während die MS-SNuPE-Analyse des einzelnen CpG-Motivs über spezielle Primeranlagerungen einen genaueren Wert zur prozentualen Demethylierung des CpG-Motivs liefert (siehe Material und Methoden). Sehr viel genauer zur Bestimmung der prozentualen Demethylierung ist die RT-PCR (Reverse-Transkriptase-PCR), die jedoch zum Zeitpunkt der Arbeiten noch nicht ausreichend etabliert war. Ursprünglich stand daher das CpG-Motiv Nr. 41 der TSDR im Mittelpunkt der Analysen, da die Messmethode (MS-SNuPE) des einzelnen CpG-Motivs in Vorversuchen repräsentative Ergebnisse für die TSDR lieferte. DNA-Methylierungsdaten naiver T-Zellen oder regulatorischer T-

Zellen korrelierten wiederholbar und spenderunabhängig mit den FOXP3-Messungen auf Proteinebene. Jedoch traten nach ursprünglich überzeugenden Ergebnissen vermehrt Schwankungen in den Messungen auf. Die MS-SNuPE-Analyse zeigte für einen Spender eine 80%ige Demethylierung der *ex vivo* sortierten, naiven T-Zellen in dem CpG-Motiv, während bei den *ex vivo* sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen eine nur 60%ige Demethylierung messbar war (Spender #700). In einer anderen Analyse waren keine Unterschiede zwischen den PBMCs, den CD4<sup>+</sup> T-Zellen und den naiven T-Zellen messbar (Spender #543), obwohl man mit zunehmender Aufreinigung der T-Zellen Unterschiede im DNA-Methylierungsmuster erfassen sollte. Daher ist zu diskutieren, inwieweit das CpG-Motiv Nr. 41 tatsächlich repräsentativ für den DNA-Methylierungsstatus der gesamten TSDR ist. Es ist jedoch hinzuzufügen, dass es sich bei diesen Ergebnisse um einmalige Messungen handelte und Messungenauigkeiten das Ergebnis verfälscht haben könnten.

Zudem besitzen sowohl die MS-SNuPE-Methode als auch die DNA-Methylierungsanalyse der gesamten TSDR ein Detektionslimit von +/-5 %. Ergebnisse aus DNA-Methylierungsanalysen des *foxp3* Gens und der FACS-basierten FOXP3-Expression von PBMCs und CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind demnach kritisch zu beurteilen, da aufgrund einer Mehrheit an FOXP3- T-Zellen nur geringe Werte in beiden Messmethoden zu erwarten sind. Der Anteil FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der PBMCs beträgt circa 3-7 %, welcher mit DNA-Demethylierungswerten von 0-12 % korrelieren kann. Naive T-Zellen exprimieren bei guter Sortierung nahezu kein FOXP3. Dennoch wurden in den CpG-Analysen der naiven T-Zellen zwischen 1-6 % Demethylierung erfasst (Daten nicht gezeigt).

Die durchflusszytometrische Erfassung des Transkriptionsfaktors FOXP3 erlaubt die qualitative und quantitative Darstellung des Markers auf Einzelzellebene innerhalb der untersuchten Zellpopulation. Eine Beurteilung der Zellen ist jedoch erschwert, wenn der Zellmarker nicht spezifisch exprimiert wird. Die DNA-Methylierungsanalyse des einzelnen CpG-Motivs als auch der gesamten TSDR basiert hingegen nicht auf Einzelzellebene und kann daher nur einen Mittelwert der untersuchten Zellpopulation widerspiegeln. Damit können bei dieser Messmethode unterschiedliche FOXP3-Expressionslevel innerhalb der Zellpopulation nur bedingt erfasst werden und Verunreinigungen mit FOXP3- T-Zellen das Gesamtergebnis deutlich beeinträchtigen. Diese Tatsache kann möglicherweise auch für die unzureichende DNA-Demethylierung der TSDR (grüne Farbschattierungen) bei den *ex vivo* sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>

regulatorischen T-Zellen verantwortlich sein. Ausserdem korreliert diese DNA-Methylierungsanalyse zum derzeitigen Zeitpunkt mit keinem anderen Zellmarker, weswegen die Aussagekraft oder auch die Spezifität dieser Messmethode angezweifelt werden könnte. Andererseits zeigen Daten aus murinen und humanen Zellen sowie Überlegungen hinsichtlich des Ursprungs dieser Zellpopulationen, dass anhand des DNA-Methylierungsmusters im *foxp3* Gen eine Unterscheidung von ex vivo sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen und induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen möglich ist und dieser Parameter zur Beschreibung von FOXP3-exprimierenden T-Zellen gewertet werden kann.

#### 4.10. Wie geeignet ist der Transkriptionsfaktor FOXP3 zur Beschreibung von humanen regulatorischen T-Zellen?

Entgegen den Beobachtungen in der Maus wird beim Menschen der Transkriptionsfaktor FOXP3 nicht ausschließlich in regulatorischen T-Zellen exprimiert, da unter neutralen Bedingungen, in Anwesenheit von TGF- $\beta$  oder IL-2 stimulierte T-Zellen sowie stimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen diesen Faktor transient exprimieren können (35, 43- 47). Darüberhinaus exprimieren die Tr1-Zellen, ein Subset der regulatorischen T-Zellen, kein FOXP3 und können dennoch über die Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  regulatorische Fähigkeiten ausüben und ihre Zielzellen supprimieren (27, 40).

Während in murinen T-Zellen eine FoxP3-Expression mit Ausblidung einer funktionellen, regulatorischen T-Zelle korreliert, ist die durchflusszytometrische Analyse der FOXP3-Expression in humanen Zellen zur Erfassung von Zellen mit regulatorischen Fähigkeiten nur bedingt aussagekräftig. Somit können vermutlich aktivierte Effektorzellen oder mithilfe von anderen Zytokinen induzierte FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen ohne regulatorische Fähigkeiten erfasst werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DNA-Methylierungsanalyse des *foxp3* Gens, ohne Betrachtung der funktionellen Eigenschaften, ein geeignetes Kriterium zur Unterscheidung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischer T-Zellen von anderen induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen darstellt.

#### 4.11. Die Relevanz regulatorischer T-Zellen bei Erkrankungen und neue Therapieansätze

Beim Menschen stammen die bisherigen Ergebnisse über regulatorische T-Zellen aus retrospektiven Studien und *in vitro* Versuchen aus der Transplantationsmedizin, der Onkologie und dem Monitoring von Autoimmunerkrankungen. Das Graft versus Host

Disease (GvHD) stellt eine massive Komplikation einer Knochenmarkstransplantation dar, bei welcher sich das Knochenmark des Spenders gegen den Organismus des Empfängers richtet. In Studien, in denen die Frequenz der FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen Zellen mit dem Auftreten eines GvHDs korreliert wurde, konnte beobachtet werden, dass Patienten mit einer geringen Frequenz an FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen eine schlechtere Prognose bezüglich der Entwicklung eines GvHD haben als Patienten mit einer höheren Anzahl an FOXP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (18-20).

Zum Einfluß von regulatorischen T-Zellen auf den Verlauf von Krebserkrankungen gibt es mittlerweile eindeutige Ergebnisse. Bei Patienten, die sich in einem fortgeschrittenen Stadium einer malignen Tumorerkrankung (Ovarialkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Kolorektalkarzinom) befanden, war, verglichen mit Patienten eines weniger fortgeschrittenen Stadiums oder gesunden Spendern sowohl das Tumorgewebe mit regulatorischen Zellen infiltriert als auch eine erhöhte Frequenz von regulatorischen Zellen im peripheren Blut messbar (21-23). Regulatorische T-Zellen, die bei fortgeschrittenen Tumoren in Aszitesproben gemessen wurden, deuteten zusätzlich auf einen Zustand starker zellulärer Immunsuppression im gesamten Körper hin. In diesem Zusammenhang vermutet man, dass die regulatorischen T-Zellen die Effektorzellen hemmen und somit der Tumorregression entgegenwirken (75, 76).

Erste therapeutische Ansätze stellen sowohl die Depletion von regulatorischen T-Zellen bei Krebserkrankungen als auch die Behandlung des GvHD mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen dar. Die Depletion regulatorischer T-Zellen über anti-CD25 gerichtete Antikörper konnte in mehreren Studien erste Erfolge verzeichnen (77-79). Bei Simova und Kollegen konnte durch eine Depletion der CD25<sup>+</sup> T-Zellen eine Rezidivverminderung bei HPV16-induzierten Tumoren bewirkt werden (78). In anderen Studien war durch die Behandlung mit anti-CD25 Antikörpern eine funktionelle Inaktivierung der CD25-exprimierenden Zellen die Folge (77). Dennoch ist bei dieser Methode offensichtlich, dass nicht ausschließlich regulatorische T-Zellen von der anti-CD25 gerichteten Depletion betroffen sind und der Eingriff somit mit einer starken Anfälligkeit für Infektionen und selbstgerichtete Immunreaktionen verbunden sein kann. Der mögliche therapeutische Einsatz von regulatorischen T-Zellen zur Behandlung des GvHD setzt die Sortierung und den Transfer funktionell aktiver und damit höchstwahrscheinlich stabil FOXP3-exprimierender regulatorischer T-Zellen voraus, da man annimmt, dass diese Zellen, als natürliche regulatorische T-Zellen, durch ihre Suppressionsfähigkeit Abstoßungsreaktionen beeinflussen können. Ein Transfer von

induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen ohne suppressorische Funktion oder nur transient FOXP3-exprimierenden Effektorzellen birgt durch fehlende Suppressionsfähigkeit dieser Zellen und den möglichen Überschuss an Effektorzellen das Risiko einer verstärkten Immunreaktion gegenüber dem Körper des Empfängers damit einer Verschlechterung der Erkrankung.

#### 4.12. Anwendungsbereiche epigenetischer Messmethoden

In den bisherigen Untersuchungen zu Krebserkrankungen und zum GvHD wurden regulatorische T-Zellen zumeist über die CD4-CD25-FOXP3-Expression am FACS analysiert. Vor dem Hintergrund der FOXP3-Induktion in Zellen ohne regulatorische Fähigkeiten und der transienten FOXP3-Expression in Effektorzellzytokin-produzierenden Zellen, kann die Messung natürlicher regulatorischer T-Zellen anhand der FOXP3-Expression am FACS nur eingeschränkt beurteilt werden. In der vorliegenden Arbeit war es möglich, *in vitro* induzierte FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen von ex vivo sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen anhand ihres DNA-Methylierungsmusters im *foxp3* Gen zu unterscheiden. Damit stellt diese Methode in humanen T-Zellen einen besseren Marker als die übliche Messung des Transkriptionsfaktors FOXP3 zur Unterscheidung verschiedener FOXP3<sup>+</sup> Zellpopulationen dar.

Diese bisher nur im experimentellen Ansatz bei isolierten und kultivierten T-Zellen etablierte Methode könnte auch in der Klinik und Diagnostik ihre Anwendung finden. Im Rahmen von Verlaufsbeobachtungen (Monitoring) bei Krebs-, Virus- und Autoimmunerkrankungen kann man sich anhand der DNA-Methylierungsanalyse der CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellpopulation einen Eindruck über das Vorhandensein von im *foxp3* Gen demethylierter Motive und somit das Vorhandensein vermutlich funktioneller regulatorischer T-Zellen verschaffen. Hinsichtlich der Prognose von Tumorerkrankungen könnte man ebenso über die Analyse von CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen einen Eindruck über den Anteil im *foxp3* Gen demethylierter und somit funktioneller regulatorischer T-Zellen gewinnen. Sinkt der Anteil der in der TSDR demethylierten regulatorischen T-Zellen, könnte man auf eine Bekämpfung des Tumors durch Effektorzellen schließen. Steigt der prozentuale Anteil regulatorischer T-Zellen, könnte diese Situation auf ein Tumorwachstum schließen lassen.

Beim therapeutischen T-Zelltransfer wäre diese Methode zur Reinheitsüberprüfung sortierter CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen von enormer Relevanz, da mit einer starken

Demethylierung in der TSDR ein großer Anteil funktioneller regulatorischer T-Zellen assoziiert wird, die beispielsweise bei der Behandlung des GvHD notwendig wären. Ebenso wäre es von Interesse, bei der *in vitro* Generierung funktioneller regulatorischer T-Zellen das FOXP3-Expressionsmuster dieser Zellen mithilfe der DNA-Methylierungsanalyse zu vergleichen. Bei einer stabilen FOXP3-Expression, welche höchstwahrscheinlich mit einer Demethylierung in der TSDR zu korreliert, könnte man diese Zellen expandieren und gegebenenfalls zur kurativen Anwendung in der Klinik einsetzen.

### 4.13. Ausblick

Bei der Beschreibung des Designs der MS-SNuPE-Methode fiel auf, dass neben einer Verbesserung der Messmethode mit einer Steigerung der Genauigkeit und einer besseren Wahl besonders diskriminatorischer CpG-Motive die Aussagekraft dieser Messmethode optimiert werden kann.

Ausserdem sollte diese Methode, die bisher nur an T-Zellen gesunder Spendern getestet wurde, ebenso in der Klinik zur Verlaufsbeobachtungen von Autoimmun- und Tumorerkrankungen sowie der Reinheitsüberprüfung isolierter T-Zellpopulationen genutzt werden.

Nachdem sich durch den Nachweis von intrazellulärem IL-2 und IFN- $\gamma$  sowie der methylierten TSDR ein Effektorzellprofil der induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen andeutet, wäre das Ziel weiterer Untersuchungen die Überprüfung von Suppressionseigenschaften der induzierten FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Mit diesen Ergebnissen könnte man weiterhin Rückschlüsse auf die Herkunft und die Eigenschaften von FOXP3-induzierter T-Zellen schließen.

#### 4.14. Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen gewinnen aufgrund ihrer Relevanz hinsichtlich der Ursache und prognostischen Aussagekraft bei Autoimmunerkrankungen, Tumorerkrankungen, Transplantationsabstoßungsreaktion und Virusinfektionen zunehmend an Interesse. Zur Charakterisierung dieser spezifischen T-Zellen dienen vornehmlich die  $\alpha$ -Kette des Interleukin 2 Rezeptors (CD25) und der Transkriptionsfaktor FOXP3. CD25 ist allgemein als Aktivierungsmarker bekannt und kann zur Charakterisierung spezieller T-Zellen nur eingeschränkt genutzt werden. Der Transkriptionsfaktor FOXP3 ist in humanen Zellen aufgrund der transienten FOXP3-Expression und der Existenz weiterer FOXP3-exprimierender T-Zellen ohne suppressorische Fähigkeiten nicht ausschließlich regulatorischen T-Zellen zuzuordnen (43-47). Trotz dieser Ergebnisse in humanen T-Zellen wird in der Maus wiederholt die Relevanz von FoxP3 bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung regulatorischer Fähigkeiten erwähnt und die Suche nach Zielgenen von FoxP3 und Regulationsmechanismen von FoxP3 verstärkt (17, 52-54).

Auf der Suche nach einem Regulationsmechanismus des Transkriptionsfaktors wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig die epigenetischen Einflüsse anhand der DNA-Methylierung in der „Treg-specific-demethylation-region“ (TSDR) des *foxp3* Gens mit der FOXP3-Expression in unterschiedlich stimulierten naiven T-Zellen verglichen. Ziel der Untersuchungen war es, herauszufinden, inwieweit Änderungen der FOXP3-Expression auf Proteinebene mit epigenetischen Änderungen im DNA-Methylierungsmuster des *foxp3* Gens korrelieren, und ob durch diese Ergebnisse eine allgemeingültige Unterscheidung der FOXP3-exprimierenden T-Zellen möglich ist.

Zunächst wurden verschiedene Stimulationssysteme miteinander verglichen und die Stimulation mit Antikörper-beschichteten Beads aufgrund einer optimalen Zellaktivierung ausgewählt. Daraufhin konnte mit den Antikörper-beschichteten Beads unter verschiedenen Kulturbedingungen die FOXP3-Expression der stimulierten naiven T-Zellen beeinflusst werden. Jedoch blieb trotz starker FOXP3-Induktion in den unter neutralen Bedingungen, unter Zugabe von TGF- $\beta$  oder unter Zugabe von TGF- $\beta$  plus IL-2 stimulierten T-Zellen eine DNA-Demethylierung in der TSDR des *foxp3* Genortes aus. Ausschließlich die ex vivo sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen waren in der analysierten TSDR stark demethyliert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen daher darauf hin, dass mit der DNA-Methylierungsanalyse eine klare Unterscheidung induzierter FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen von sortierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatorischen T-Zellen möglich ist. Damit stellt diese

## Diskussion

Methode zur Identifizierung von regulatorischen T-Zellen in humanen T-Zellen ein besseres Kriterium als die Messung des Transkriptionsmarkers FOXP3 dar. Unter der weiteren Annahme, dass eine DNA-Demethylierung der TSDR im *foxp3* Gen mit einer stabilen FOXP3-Expression korreliert, wären stabil FOXP3-exprimierende natürliche regulatorische T-Zellen mit suppressorischen Eigenschaften in der TSDR demethyliert. Induzierte FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen und transient FOXP3-exprimierende T-Zellen weisen hingegen eine methylierte TSDR auf. Mit diesem Potential zur Bestimmung humaner funktioneller regulatorischer T-Zellen kann diese in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Analyse des DNA-Methylierungsmusters im *foxp3* Gen in der Diagnostik, bei Verlaufsbeobachtungen sowie als therapeutischer Ansatz in der Onkologie, Transplantationsmedizin, bei Virusinfektionen und bei Autoimmunerkrankungen ihre Anwendung finden.



5. Literaturverzeichnis

1. Shevach EM. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jun;2(6):389-400.
2. Zwar TD, van Driel IR, Gleeson PA. Guarding the immune system: suppression of autoimmunity by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells. *Immunol Cell Biol.* 2006 Dec;84(6):487-501.
3. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005 Apr;6(4):345-52.
4. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:209-26.
5. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol.* 2007 Jun;19(3):281-6.
6. Bi Y, Liu G, Yang R. Th17 cell induction and immune regulatory effects. *J Cell Physiol.* 2007 May;211(2):273-8.
7. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
8. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998 Dec;10(12):1969-80.
9. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 2000;192: 295-302
10. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16: 311-323.
11. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 2002 3: 135-142
12. Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol.* 2006; Nov 36(11):2832-6.

13. Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, et al. Expression of the integrin  $\alpha E\beta 7$  identifies unique subsets of CD25<sup>+</sup> as well as CD25<sup>-</sup> regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):13031-6.
14. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1701-11.
15. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1693-700.
16. Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods*. 2007 Jan 30;319(1-2):41-52.
17. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007 Nov 22;450(7169):566-9
18. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, et al. Mucosal FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1717-23.
19. Zhai Z, Sun Z, Li Q, et al. Correlation of the CD4(+)CD25(high) T-regulatory cells in recipients and their corresponding donors to acute GVHD. *Transpl Int*. 2007 May;20(5):440-6.
20. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1291-7.
21. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):942-9.
22. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, et al. Tumor infiltrating Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*. 2006 Dec 15;107(12):2866-72
23. Ling KL, Pratap SE, Bates GJ, et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immun*. 2007 Mar 28;7:7
24. Kinter A, McNally J, Riggin L, Jackson R, Roby G, Fauci AS. Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3390-5.52.

25. Kinter AL, Horak R, Sion M, et al. CD25+ regulatory T cells isolated from HIV-infected individuals suppress the cytolytic and nonlytic antiviral activity of HIV-specific CD8+ T cells in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Mar;23(3):438-50.
26. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005 Apr;6(4):338-44.
27. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*. 2006 Aug;212:28-50.
28. Bopp T, Becker C, Klein M, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1303-10.
29. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):68-73
30. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.
31. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61
32. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005 Apr;6(4):331-7.
33. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):20-1
34. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest*. 2006 Jun;116(6):1713-22
35. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006 Aug;25(2):195-201.
36. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1875-86
37. Fu S, Zhang N, Yopp AC, et al. TGF- $\beta$  induces Foxp3+ T-regulatory cells from CD4+ CD25- precursors. *Am J Transplant*. 2004 Oct;4(10):1614-27

38. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF- $\beta$  induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* 2004 May 1;172(9):5149-53
39. Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- $\beta$ . *J Immunol.* 2005 Feb 1;174(3):1446-55.
40. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest.* 2004 November 15; 114(10): 1372–1378
41. Apostolou I, von Boehmer H. In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells. *J Exp Med.* 2004 May 17;199(10):1401-8
42. Weiner, HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells, *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:207-14
43. Walker MR, Kasprowitz DJ, Gersuk VH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest.* 2003 Nov;112(9):1437-43.
44. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 25;103(17):6659-64
45. Pillai V, Ortega SB, Wang CK, Karandikar NJ. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol.* 2007 Apr;123(1):18-29.
46. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2007 Jan;37(1):129-38
47. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol.* 2005 Jan;66(1):13-20.
48. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3- T cells by T cell receptor stimulation is TGF $\beta$ -dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood.* 2007 Oct 15;110(8):2983-90.
49. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem.* 2001 Oct 5;276(40):37672-9

50. Bettelli E, Dastrange M, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 5;102(14):5138-43
51. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*. 2006 Jul 28;126(2):375-87
52. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):931-5
53. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):936-40.
54. Sugimoto N, Oida T, Hirota K, et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol*. 2006 Aug;18(8):1197-209.
55. Hansen W, Loser K, Westendorf AM, et al. G protein-coupled receptor 83 overexpression in naive CD4+CD25- T cells leads to the induction of Foxp3+ regulatory T cells in vivo. *J Immunol*. 2006 Jul 1;177(1):209-15
56. Scheffold A, Huhn J, Hofer T. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur J Immunol*. 2005 May;35(5):1336-41.
57. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med*. 2002 Sep 16;196(6):851-7
58. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 2004 Sep;34(9):2480-8.
59. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1142-51.
60. Wan YY, Flavell RA. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev*. 2007 Dec;220:199-213
61. Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 2000 12:171-181
62. Wahl SM, Orenstein JM, Chen W. TGF-β influences the life and death decisions of T lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000 Mar-Jun;11(1-2):71-9
63. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, et al. Transforming Growth Factor β<sub>1</sub> Null Mutation in Mice Causes Excessive Inflammatory Response and Early Death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:770-774

64. Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity*. 2006 Sep;25(3):441-54.
66. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):329-41.
67. Floess S, Freyer J, Siewert C, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007 Jan;5(2):e38.
68. Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2003 Jul;4(7):616-23.
69. Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res*. 1996 Dec 15;24(24):5064-6
70. Baron U, Floess S, Wieczorek G, et al. Specific demethylation of the foxp3 gene in natural human CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2007 Sep;37(9):2378-89.
71. Fox FE, Ford HC, Douglas R, Cherian S, Nowell PC. Evidence that TGF- $\beta$  can inhibit human T-lymphocyte proliferation through paracrine and autocrine mechanisms. *Cell Immunol*. 1993 150: 45–58.
72. Berard M and Tough DF, Qualitative differences between naïve and memory T cells *Immunology*. 2002 June; 106(2): 127–138
73. Fritzsching B, Oberle N, Pauly E, et al. Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3371-8.
74. Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF- $\beta$  to convert naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2018-27.
75. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 2006 Aug 1;108(3):804-11.
76. Beyer M, Kochanek M, Endl E, et al. In vivo peripheral expansion of naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2006 May 15;107(10):3940-9.
77. Kohm AP, McMahon JS, Podojil JR, et al. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol*. 2006 Mar 15;176(6):3301-5

78. Simova J, Bubenik J, Bieblova J, Rosalia RA, Fric J, Reinis M. Depletion of T(reg) cells inhibits minimal residual disease after surgery of HPV16-associated tumours. *Int J Oncol.* 2006 Dec;29(6):1567-71.
79. Barnett B, Kryczek I, Cheng P, Zou W, Curiel TJ. Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol.* 2005 Dec;54(6):369-77.
80. Shull MM, Ormsby I, Kier AB et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 1992 Oct 22;359(6397):693-9
81. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med.* 2007 Jan 22;204(1):57-63.
82. Piccirillo, CA, Letterio JJ, Thornton AM, et al. CD4CD25 regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor-1 production and responsiveness. *J. Exp. Med.* 2002: 196: 237–246.

6. Publikationsliste

Baron U, Floess S, Wieczorek G, **Baumann K**, Dong J, Thiel A, Türbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J. Specific demethylation of the foxp3 gene in natural human CD25<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells, Eur J Immunol. 2007 Sep;37(9):2378-89.



## Eidesstattliche Erklärung

### 7. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation zum „DNA-Methylierungsmuster in humanen CD4+FOXP3-exprimierenden T-Zellen“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich wurde nicht beantragt.

Berlin, den

## Danksagung

### 8. Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Professor A. Hamann recht herzlich für das Thema meiner Doktorarbeit und für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, der Experimentellen Rheumatologie an der Universitätsmedizin Berlin, bedanken. Mein weiterer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor J. Hühn. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, seiner Geduld und Erfahrung und vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben und hatte stets ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester für Ihre Unterstützung während meiner wissenschaftlichen Arbeit und während meines bisherigen Studiums bedanken. Ausserdem danke ich Astrid Menning und Alexia Naß für die tatkräftige Unterstützung, den Kampfgeist und den Optimismus in allen Phasen meiner Arbeit. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden -insbesondere bei Adrian- für die Geduld und Kraft bedanken, die sie mir für diese Arbeit geschenkt haben.

## Curriculum Vitae

### 9. Curriculum Vitae

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