

Aus der Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité- Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Charakterisierung von TIRC7+ T regulatorischen Zellen in  
Autoimmunerkrankungen am Beispiel der Psoriasis Arthritis**

*Characterization of TIRC7+ regulatory T cells  
in autoimmune diseases, Psoriatic Arthritis as an example*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Aysegül Adam

aus Berlin

Datum der Promotion: 4. März 2022

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>15</b>
3.1 Psoriasis Arthritis .....	15
3.1.1 Epidemiologie .....	15
3.1.2 Pathogenese .....	15
3.1.3 Klinik.....	16
3.1.4 Labor- und Röntgendiagnostik.....	17
3.1.5 Therapie.....	17
3.2 Adoptive Zelltherapien in Autoimmunerkrankungen .....	19
3.3 Das Immunsystem .....	20
3.3.1 Entwicklung der Immuntoleranz .....	21
3.3.2 T regulatorische Zellen.....	22
<b>4. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>27</b>
<b>5. Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
5.1 Patientenkollektiv .....	29
5.1.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs .....	29
5.1.2 Nebendiagnosen und Begleiterscheinungen.....	29
5.1.3 Therapie und Medikation .....	30
5.1.4 Klinische Daten .....	30
5.1.5 Zusammensetzung der Kontrollprobanden .....	30
5.2 Materialien .....	34
5.2.1 Plastikmaterialien und Pipetten .....	34
5.2.2 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Kits .....	34
5.2.3 Antikörper .....	35
5.3 Aufbereitung der Blutproben .....	36
5.3.1 Isolation von peripheren mononukleären Zellen.....	36
5.3.2 Isolation von Zielzellen .....	37

5.3.3 Isolation von Tregs.....	38
5.3.4 Isolation von CD4+CD25- T-Zellen .....	39
5.3.5 Isolation von Dendritischen Zellen des peripheren Blutes.....	39
5.3.6 Isolation von TIRC7+ Tregs .....	39
5.4 Polyklonale Treg-Expansion .....	40
5.5 Funktionelle Assays .....	40
5.5.1 Allogene MLRs-Gemischte Lymphozyten Reaktion .....	40
5.5.2 BrdU Proliferations-Assay ELISA.....	40
5.6 Durchflusszytometrie .....	41
5.6.1 Apoptose Assay auf Tregs.....	42
5.6.2 Phänotypische Analyse frisch isolierter und expandierter Tregs .....	42
5.6.3 Bestimmung der TIRC7 Expression auf PBMCs (CD4+ T-Zellpopulation).....	43
5.6.4 Bestimmung der TIRC7 Expression auf frisch isolierten Tregs (CD4+CD25+CD127low) .....	44
5.6.5 Analyse der Wirkung des selektierten anti-TIRC7 Antikörpers (mAb g) auf Zellsubsets .....	44
5.6.6 Phänotypische Analyse expandierter TIRC7+ Tregs sowie der mit mAb g expandierter Tregs.....	45
<b>6. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
6.1 Evaluierung der anti-TIRC7 mAbs a-j: Allogene MLRs (One-Way) und Apoptose Assays .....	46
6.2 Bindung des anti-TIRC7 Antikörpers auf Lymphozyten.....	48
6.3 Expressionsanalyse von TIRC7 (CD4+CD25+CD127low Tregs) .....	49
6.4 Funktionelle Analyse des anti-TIRC7 Antikörpers auf Zellsubsets.....	51
6.5 Polyklonale Expansion der T regulatorischen Zellen .....	54
6.6 Induktion der IL-10 Expression durch selektierten anti-TIRC7 mAb auf Tregs .....	56
6.7 Erhöhte suppressive Fähigkeit TIRC7+ Tregs in gesunden Spendern und Psoriasis Arthritis Patienten .....	58
6.8 Erhöhte IL-10 Zytokin-Produktion in TIRC7+ Tregs.....	62
6.9 Effekt des anti-TIRC7 Antikörpers mAb g auf die Expansion der Tregs .....	63
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>66</b>
7.1 TIRC7.....	67
7.2 TIRC7+ Tregs .....	67

7.3 Anti-TIRC7 mAb inhibiert Effektorfunktionen der CD4+CD25- T-Zellen und induziert Treg-Funktion.....	68
7.4 TIRC7+ Tregs zeigen höhere suppressive Kapazität .....	69
7.5 Treg-basierte adoptive T-Zelltherapien: Hindernisse und Lösungsansätze .....	70
7.6 IL-10, Tr1 regulatorische T-Zellen und TIRC7+ Tregs .....	72
7.7 Zusammenfassung .....	74
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>84</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>85</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>87</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>ACPA</b>	anti-citrullinierte Protein/Peptid-Antikörper
<b>AID</b>	Autoimmunerkrankung/ Autoimmune Disease
<b>AIRE</b>	Autoimmune Regulator
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>APC</b>	antigenpräsentierende Zelle/ Antigen Presenting Cell
<b>APC-Cy7</b>	Allophycocyanin-Cy7
<b>APECED</b>	Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy
<b>APS II</b>	Autoimmune Polyglandular Syndrome Type II
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>aTreg</b>	activated Treg
<b>BASDAI</b>	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
<b>BD</b>	Becton Dickinson
<b>bDMARDs</b>	biological DMARDs
<b>BrdU</b>	5-Bromo-2'-desoxyuridin
<b>BrdU-POD</b>	5-Bromo-2'-desoxyuridin konjugiert mit Peroxidase
<b>bsDMARDs</b>	biosimilar DMARDs
<b>Cat</b>	Catalogue
<b>CCM</b>	Charité Campus Mitte
<b>CCR</b>	Chemokinrezeptor/ Chemokine Receptor
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CED</b>	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>conc</b>	Konzentration/concentration
<b>COPD</b>	chronisch obstruktive Lungenerkrankung/ chronic obstructive pulmonary disease
<b>CNS2</b>	Conserved Non-Coding Sequence 2
<b>csDMARDs</b>	conventional synthetic DMARDs
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
<b>Cy5.5</b>	Cyanine 5.5
<b>Cy7</b>	Cyanine 7
<b>D</b>	<i>hier</i> Dendritische Zellen
<b>DAPI</b>	4',6-diamidiono2-phenylindole

<b>DAS</b>	Disease Activity Score
<b>DAS 28</b>	Disease Activity Score 28
<b>DC</b>	Dendritische Zelle/ Dendritic Cell
<b>DMARDs</b>	Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DRFZ</b>	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
<b>ELB</b>	Erythrozyten Lysis Puffer/ Erythrocyte Lysis Buffer
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>et al.</b>	und andere
<b>eTreg</b>	effector Treg
<b>EULAR</b>	European League Against Rheumatism
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting
<b>FcR</b>	Membranrezeptor/ Fc-Receptor
<b>FcγR</b>	Membranrezeptor/ Fcγ-Receptor
<b>FITC</b>	Florescein isothiocyanate
<b>FMO</b>	Fluorescence Minus One
<b>FoxP3</b>	Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-P3 aus der Familie der Fox Proteine
<b>FSC</b>	Forward scatter
<b>GITR</b>	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
<b>GMP</b>	Good Manufacturing Practice
<b>GRAPPA</b>	Group for Research and Assessment of Psoriasis Arthritis
<b>GVHD</b>	Graft versus Host Disease
<b>HLA</b>	Humanes Leukozyten Antigen/ Human Leucocyte Antigen
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>ICOS</b>	Inducible Co-Stimulator
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>INF</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IL-R</b>	Interleukin-Rezeptor
<b>IPEX</b>	Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome
<b>iTregs</b>	induced Tregs
<b>IU</b>	International Unit

<b>JAK</b>	Januskinase
<b>Ki-67</b>	Proliferationsmarker
<b>LD</b>	Live/Dead
<b>LH</b>	Lithium Heparin
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>mAb</b>	monoklonaler Antikörper/ monoclonal Antibody
<b>MACS</b>	magnet-aktivierte Zellsortierung/ Magnetic Activated Cell Sorting
<b>MHC</b>	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex/ Major Histocompatibility Complex
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MLR</b>	Gemischte Lymphozyten Reaktion/ Mixed Lymphocyte Reaction
<b>MMPs</b>	Matrix-Metalloproteasen
<b>MS</b>	Multiple Sclerosis
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>MTX</b>	Methotrexat
<b>N</b>	Anzahl
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Transkriptionsfaktor/ Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B Cells
<b>Ng</b>	Nanogramm
<b>NK</b>	Natürliche Killerzellen
<b>no.</b>	Nummer/ number
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>NSARs</b>	Nichtsteroidale Antirheumatika
<b>nTregs</b>	„natürliche“ thymus-generierte Tregs/ natural Tregs
<b>PBE</b>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung+ EDTA+ Proteine
<b>PBL</b>	Lymphozyten des peripheren Blutes/ Peripheral Blood Lymphocytes
<b>PBMCs</b>	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes/ Peripheral Blood mononuclear cells
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
<b>PDE-4</b>	Phosphodiesterase-4
<b>PE</b>	Phycocerythrin
<b>PerCP</b>	Peridinin chlorophyll protein
<b>Pg</b>	Picogramm
<b>PHA</b>	Phytohämagglutinin
<b>PMA</b>	Phorbol Myristate Acetate

<b>PsA</b>	Psoriasis Arthritis
<b>RA</b>	Rheumatoide Arthritis
<b>RANKL</b>	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
<b>REF</b>	Referenz/ Reference
<b>RF</b>	Rheumafaktor
<b>rHU</b>	rekombinant Human
<b>Rpm</b>	Umdrehungen pro Minute/ rounds per minute
<b>rTregs</b>	resting Tregs
<b>SD</b>	Standarddeviation
<b>SpA</b>	Spondylitis ankylosans
<b>SSC</b>	Sideward scatter
<b>T</b>	hier, CD4+CD25- T-Zellen
<b>TCR</b>	T-Zellrezeptor/ T cell receptor
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TH</b>	T-Helferzelle
<b>TIRC7</b>	T Cell Immuneresponse cDNA7
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>Tr</b>	T regulatorische Zelle
<b>Tr1</b>	Typ1 T regulatorische Zellen
<b>TR</b>	<i>hier</i> Gesamt-Treg-Population
<b>TR(TIRC7+)</b>	<i>hier</i> TIRC7+ T regulatorische Zellen
<b>TR(TIRC7-)</b>	<i>hier</i> TIRC7- T regulatorische Zellen
<b>Tregs</b>	T regulatorische Zellen
<b>tsDMARDs</b>	target-specific DMARDs
<b>TSDR</b>	Treg-specific demethylated region
<b>tTreg</b>	thymically-derived Tregs
<b>VitD3</b>	Vitamin D3
<b>7-AAD</b>	7-Aminoactinomycin D
<b><math>\alpha</math></b>	alpha
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramm
<b><math>^{\circ}</math>C</b>	Grad Celsius
<b>%</b>	Prozent
<b>X</b>	Konzentration
<b>g</b>	Physikalische Größe; Beschleunigung



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Evaluierung der anti-TIRC7 mAbs auf Tregs: Apoptose Assay .....	47
<b>Abbildung 2:</b> Bestimmung der TIRC7 Expression auf CD4+ T-Zellen „ <i>Gating Strategie</i> “ .....	48
<b>Abbildung 3:</b> Bestimmung der TIRC7 Expression auf CD4+ T-Zellen „ <i>Expressionsanalyse</i> “ ..	49
<b>Abbildung 4:</b> Bestimmung der TIRC7 Expression auf frisch isolierten Tregs „ <i>Expressionsanalyse</i> “ .....	50
<b>Abbildung 5:</b> Effekt des anti-TIRC7 mAb g auf Lymphozyten-Population nach Inkubation.....	52
<b>Abbildung 6:</b> Effekt des anti-TIRC7 mAb g auf Treg-Subsets .....	53
<b>Abbildung 7:</b> Zusammenfassung der Treg-Zellexpansion für gesunde Spender und PsA Patienten .....	54
<b>Abbildung 8:</b> Qualitätskontrolle der frisch isolierten Tregs „ <i>MACS-Check</i> “ .....	55
<b>Abbildung 9:</b> Qualitätskontrolle der <i>in vitro</i> expandierten Tregs .....	55
<b>Abbildung 10:</b> Induktion der IL-10 Expression in expandierten Tregs „ <i>nach 2-stündiger Ko- Inkubation mit dem anti-TIRC7 mAb g</i> “ .....	57
<b>Abbildung 11:</b> Phänotypische Charakterisierung TIRC7+, TIRC7- und expandierter Tregs (ges.) „ <i>Vergleich IL-10 und TIRC7</i> “ .....	59
<b>Abbildung 12:</b> Funktionelle Analyse TIRC7+ Tregs „ <i>Vergleich der relativen Proliferation</i> “ ..	60
<b>Abbildung 13:</b> Funktionelle Analyse TIRC7- Tregs „ <i>Vergleich der relativen Proliferation</i> “ ..	61
<b>Abbildung 14:</b> Funktionelle Analyse TIRC7+ Tregs „ <i>Vergleich der IL-10 Sekretion</i> “ .....	62
<b>Abbildung 15:</b> Funktionelle Analyse TIRC7- Tregs „ <i>Vergleich der IL-10 Sekretion</i> “ .....	63
<b>Abbildung 16:</b> Säulendiagramm „ <i>Vergleich der Ko-Inkubation mit mAb g und mAb i für die Treg-Expansion/ Ausbeute</i> “ .....	64
<b>Abbildung 17:</b> Effekt der anti-TIRC7 mAb g und i „ <i>auf die in vitro Expansion der Tregs</i> “ .....	65

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1</b>	Klinische Formen der Psoriasis Arthritis (Moll und Wright, 1973).....	17
<b>Tabelle 2</b>	Übersicht über das Patientenkollektiv .....	31
<b>Tabelle 3</b>	Pipetten, Pipettenspitzen und Plastikbehälter .....	34
<b>Tabelle 4</b>	Reagenzien und Kits .....	34
<b>Tabelle 5</b>	Antikörper für FACS .....	35

## 2. Abstract

### Charakterisierung von TIRC7+ T regulatorischen Zellen in Autoimmunerkrankungen am Beispiel der Psoriasis Arthritis

#### Einleitung:

Im Rahmen dieser Dissertation wurden erstmalig humane TIRC7+ T regulatorische Zellen (Tregs) bei Psoriasis Arthritis (PsA) Patienten isoliert, expandiert und funktionell im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe untersucht. Um die TIRC7+ Treg aus den polyklonal expandierten Treg-Zellkulturen zu isolieren, erfolgte eine Evaluierung von verschiedenen monoklonalen anti-TIRC7 Antikörpern (mAbs) bezüglich der Bindung und funktionellen Eigenschaften in Proliferations- und Apoptose Assays auf Lymphozyten.

#### Methodik:

TIRC7+ Tregs wurden nach Expansion mittels magnet-aktivierter Zellsortierung (MACS) isoliert und mit Hilfe der Multicolor-Durchflusszytometrie phänotypisch charakterisiert. Die funktionelle Analyse der TIRC7+ Tregs erfolgte nach allogener Stimulation mittels Proliferations-Assays sowie der Bestimmung der IL-10 Zytokinproduktion anhand der ELISA Methode. Die Expressionsanalysen des TIRC7 auf Lymphozyten erfolgte mit Hilfe der Multicolor-Durchflusszytometrie. Analysen zur Wirkung der anti-TIRC7 Antikörper wurden in Form von gemischten Lymphozyten Reaktionen (MLRs) und Apoptose Assays durchgeführt.

#### Ergebnisse:

Die Ko-Inkubation des anti-TIRC7 mAb mit alloantigen-stimulierten T-Zellen zeigte eine Inhibierung der Proliferation der T-Zellen, jedoch keine antiproliferative Wirkung auf den Tregs. Dieser Antikörper eignete sich daher, um die TIRC7+ Tregs zu isolieren und funktionell zu analysieren. Die Gesamt-Treg-Population bei PsA Patienten war im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden nicht in der Lage die Proliferation und Effektorfunktionen der CD4+CD25- T-Zellen zu unterdrücken. TIRC7+ Tregs hingegen zeigten sowohl bei PsA Patienten als auch bei gesunden Probanden eine gesteigerte Suppressorfähigkeit. Phänotypische und auch funktionelle Analysen der TIRC7+ Tregs zeigten eine Korrelation der erhöhten suppressiven Kapazität mit der Produktion des IL-10. Dies konnte sowohl anhand durchflusszytometrischer Messungen als auch durch die Zytokinmessungen des IL-10 bestätigt werden.

### Schlussfolgerung:

Im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden war bei PsA Patienten die Anzahl zirkulierender Tregs des peripheren Blutes erniedrigt. Ebenso war eine verminderte Suppressorfähigkeit dieser zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten TIRC7+ Tregs eine substantielle Inhibition der Proliferation der Lymphozyten. Basierend auf unseren Ergebnissen, könnten sowohl TIRC7+ Tregs als auch der Einsatz des anti-TIRC7 (mAb), mit seiner selektiven proliferationshemmenden Wirkung auf den CD4+CD25- T-Zellen eine Alternative zu den bisherigen Therapiemöglichkeiten bei PsA Patienten darstellen. Um eindeutigere Aussagen über die bisher gemachten Beobachtungen zu treffen und um diese zu unterstützen, sind jedoch weiterführende Untersuchungen erforderlich.

## Characterization of TIRC7<sup>+</sup> regulatory T cells in autoimmune diseases, Psoriatic Arthritis as an example

### Introduction:

The focus of this manuscript was the isolation and phenotypical and functional characterization of TIRC7<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) in patients with “Psoriatic Arthritis“ (PsA) compared with those of “Healthy Volunteers“. To isolate TIRC7<sup>+</sup> Tregs, TIRC7 specific antibodies were evaluated, for capability of binding to TIRC7 and functional effects in T cells and Tregs.

### Methodology:

TIRC7<sup>+</sup> Tregs were sorted after *in vitro* expansion via MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) and phenotypically analyzed for Treg-specific markers and IL-10 using flow cytometry. Functional analysis of TIRC7<sup>+</sup> Tregs were performed after allogeneic stimulation using proliferation assays and determining the IL-10 expression via ELISA. Mixed Lymphocyte Reactions (MLRs) were utilized for the functional analysis of the monoclonal anti-TIRC7 antibodies (mAbs). Flow cytometric analysis were performed to determine the expression pattern of TIRC7 on different cell subsets.

### Results:

The co-incubation with an anti-TIRC7 mAb of alloantigen stimulated T cells resulted in decreased proliferation, but no inhibitory effect of the same mAb on Tregs could be observed. Thus, this antibody was suitable to be used to select TIRC7<sup>+</sup> Tregs in polyclonal expanded Treg cultures. In comparison to “Healthy Volunteers“ Tregs obtained from patients with PsA were not able to suppress the proliferation and effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T cells. Whereas TIRC7<sup>+</sup> Tregs, both of patients with PsA and “Healthy Volunteers“ displayed a higher suppressive capacity. Phenotypical as well as functional analysis of TIRC7<sup>+</sup> Tregs showed that the higher suppressive potential of TIRC7<sup>+</sup> Tregs was linked to their ability of producing IL-10. These results were confirmed through flow cytometric analysis as well as by measurements of IL-10 via ELISA.

### Conclusions:

The number of Tregs in the peripheral blood of patients with PsA was declined compared to “Healthy Volunteers”. We could also observe a substantial difference in terms of their suppressive capacity, which was decreased compared to „Healthy Volunteers”. Whereas TIRC7+ Tregs achieved substantial inhibition of the proliferative response in lymphocytes. Based on our findings, TIRC7+ Tregs as well as the anti-TIRC7 mAb, with its selective antiproliferative effect on CD4+CD25- responder T cells might be promising alternatives for the therapy of PsA. In order to be able to confirm our initial findings further research needs to be done.

### **3. Einleitung**

#### **3.1 Psoriasis Arthritis**

Die Psoriasis Arthritis (PsA) zählt zu den chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen. Sie zeigt eine enge Assoziation mit der Psoriasis (dt. Schuppenflechte) und ist durch ein heterogenes Erscheinungsbild (Gelenkentzündung, Befall des Achsenskeletts, Nageldystrophie, Enthesitis sowie Daktylitis) gekennzeichnet (1). Die PsA ist per definitionem „Rheumafaktor-negativ“. Das bedeutet, dass Autoantikörper wie Rheumafaktoren (RF) sowie anti-citrullinierte-Peptid/Protein-Antikörper (ACPA), die für das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis (RA) charakteristisch sind, bei der PsA kaum nachweisbar sind (2). Obwohl die Ätiologie der PsA nicht hinreichend geklärt ist, werden neben der genetischen Prädisposition auch Umwelteinflüsse wie das Rauchen, Infektionen, Traumata sowie psychischer Stress mit der Entwicklung des Krankheitsbildes in Verbindung gebracht (3). Auf genetischer Ebene zeigt die PsA eine enge Assoziation mit dem humanen Leukozyten Antigen-B (HLA-B\*08, B\*27, B\*38, and B\*39) (4). Des Weiteren scheinen auch Polymorphismen in den Genloci, die unter anderem für den Interleukin-23 Rezeptor (IL-23R) und den Transkriptionsfaktor NF-κB (Nuclear Factor-κappa-light-chain enhancer of activated B cells) kodieren, Risikofaktoren darzustellen, die zur Entstehung des Krankheitsbildes beitragen können (5).

##### 3.1.1 Epidemiologie

Eine Psoriasis geht in etwa 30% der Fälle der PsA voraus (6). Im Durchschnitt liegen etwa zehn Jahre zwischen den ersten Hauterscheinungen und dem Auftreten der Gelenkentzündung (7). Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die Manifestation zuerst an den Gelenken auftritt. Ebenso ist das zeitgleiche Auftreten von Symptomen an Haut und Gelenken in 15% der Fälle beschrieben (7). Dabei sind beide Geschlechter etwa gleichermaßen betroffen (1). Sehr selten kann die Erkrankung bereits im Kindes- und Jugendalter auftreten und ist von der juvenilen idiopathischen Arthritis abzugrenzen (8).

##### 3.1.2 Pathogenese

Die Pathogenese der PsA ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es besteht jedoch eine Assoziation mit einigen HLA-Varianten: HLA-B\*08, B\*27, B\*38, und B\*39, welche für das MHC-Molekül (Major Histocompatibility Complex) der Klasse I kodieren (4). Es wird angenommen, dass das Binden krankheitsassoziiertter Antigene an diese MHC-Moleküle der Klasse I zu einer Kaskade von Immunreaktionen führt. Von Bedeutung für das Entzündungsgeschehen ist hierbei auch die

vermehrte Angiogenese innerhalb der Synovialmembran, die zu einem Influx von aktivierten Immunzellen beiträgt (9). Dabei sind aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (TH1, TH2, TH17, TH9 und TH22) am Entzündungsgeschehen genauso beteiligt wie Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs), Osteoklasten, Fibroblasten, Mastzellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (10). Die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der PsA ist noch nicht hinreichend geklärt. Ebenso ist auch die Rolle der Tregs im Rahmen des Entzündungsgeschehens und der Krankheitsentstehung zu diesem Zeitpunkt nicht hinreichend erforscht. Das Zusammenspiel zwischen den aktivierten Immunzellen der adaptiven und der angeborenen Immunabwehr resultiert jedoch in der Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie die des Interleukin IL-23, IL-17, und IL-22 sowie des Tumornekrosefaktors-alpha (TNF- $\alpha$ ) (7, 10).

Aktiviert Synoviozyten, Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten produzieren dann ihrerseits weitere Entzündungsmediatoren wie Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und das RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand), welche die Differenzierung der CD14<sup>+</sup> Monozyten zu Osteoklasten veranlasst (7). Die Folge dieser Kaskade an Immunreaktionen ist letztlich die Entzündung des Gelenks mit Destruktion des Knorpels und des Knochens.

### 3.1.3 Klinik

Aufgrund der Heterogenität der klinischen Manifestationen ist eine Differenzierung der PsA von anderen rheumatischen Erkrankungen wie der RA, Osteoarthritis, Gicht sowie andere Formen der Spondyloarthritiden oftmals erschwert. Dennoch weist die PsA einige wichtige klinische Merkmale auf, die eine Abgrenzung zu den oben aufgeführten Krankheitsbildern ermöglichen. Je nach Ausprägung der Gelenkveränderungen lassen sich bei der PsA verschiedene Verlaufsformen unterscheiden (Typ I-V), die 1973 durch Moll und Wright beschrieben wurden (11) (Tabelle 1). Typisch für die PsA ist der meist asymmetrische Befall. So sind die Gelenke in nur einem Finger oder nur einem Zeh befallen (asymmetrische Oligoarthritis), was auch als „*Befall im Strahl*“ bezeichnet wird (7). Die Entzündung kann aber auch andere Gelenke wie das Knie- und Sprunggelenk sowie die Gelenke des Achsenskeletts befallen und erfordert dann die Abgrenzung zur anderen Spondyloarthritiden wie der SpA (1, 7). Die RA hingegen zeichnet sich durch einen symmetrischen Befall der kleinen Hand- und Fußgelenke aus (symmetrische Polyarthritiden), wobei eine Beteiligung des Achsenskeletts für die RA nicht üblich ist (12). Zusätzlich leiden die PsA Patienten häufig an schmerzhaften Veränderungen an den Ansatzpunkten verschiedener Sehnen, einer sogenannten Enthesitis (13). Eine Daktylitis tritt bei etwa 40-50% der Betroffenen auf (14). Diese kann akut oder chronisch verlaufen und wird mit einem schweren Verlauf der Erkrankung



in Verbindung gebracht (15). Aufgrund des Entzündungsgeschehens sind die betroffenen Gelenke oft geschwollen, man spricht dann von sogenanntem „Wurstfinger“ oder „Wurstzehe“. Diese weisen jedoch im Vergleich zu der Osteoarthritis keine derbe Konsistenz auf (7), und sind bei der klinischen Untersuchung oft weniger druckempfindlich als die betroffenen Gelenke der RA Patienten (16).

**Tabelle 1** Klinische Formen der Psoriasis Arthritis (Moll und Wright, 1973)

Typ	Klinische Manifestationen	Häufigkeit (ca.)
I	Befall der distalen und/oder proximalen Interphalangealgelenke	5%
II	Deformierende, mutilierende Arthritis	5%
III	Symmetrische Polyarthritis (Typ „rheumatoide Arthritis“)	15%
IV	Asymmetrische Oligoarthritis	70%
V	Arthritis mit Achsenskelettbefall (Sacroiliitis, Spondylitis)	5%

#### 3.1.4 Labor- und Röntgendiagnostik

Zur Diagnose der PsA gibt es keine charakteristischen Laborwerte, zumal die Erkrankung in den meisten Fällen Rheumafaktor-negativ ist. Auch Entzündungsmarker im Blut wie das C-reaktive Protein (CRP) oder die Blutsenkungsgeschwindigkeit sind nur leicht erhöht oder unauffällig. Erhöhte Harnsäurewerte sind bei etwa 10 bis 20% der Betroffenen vorzufinden und erschweren oftmals die Abgrenzung zur Gicht (7). Jedoch können röntgenologisch die charakteristischen Veränderungen für die PsA festgestellt werden. Dazu zählen der gleichzeitig bestehende Knochenanbau und -abbau an den betroffenen Gelenken sowie die Syndesmophytenbildung bei Befall der Wirbelsäule (1, 7).

#### 3.1.5 Therapie

Aufgrund der nicht vollständig geklärten Ursache ist eine kausale Therapie bis heute nicht möglich. Die Remission stellt daher das primäre Ziel bei der Therapie der PsA dar (17). Hierfür

gibt es zahlreiche pharmakologisch wirksame Substanzen, die dazu dienen aktive Krankheitsphasen zu vermeiden. Eine eindeutige Definition bezüglich der „Remission“ wie sie durch die EULAR (European League Against Rheumatism) für andere rheumatische Erkrankungen wie die RA definiert wurde, ist aufgrund der Heterogenität des Krankheitsbildes nicht vorhanden. Sie richtete sich daher nach den individuellen klinischen Manifestationen und beinhaltet eine engmaschige Überwachung (Ansprechen auf Vorbehandlung, Verträglichkeit eingesetzter Präparate, Krankheitsaktivität, Nebenwirkungen etc.) sowie eine Anpassung der Therapie, wenn gesetzte Therapieziele nicht erreicht werden können, „*Treat-to-target-strategy*“ (18). Im Mittelpunkt der medikamentösen Therapie stehen die DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs) (17). Sie umfassen eine Reihe unterschiedlicher Medikamente, die mehr oder weniger spezifisch das Immunsystem supprimieren. Diese können weiter unterteilt werden in: *conventional synthetic* (cs) DMARDs, sowie *targeted synthetic* (ts) DMARDs und *biological* (b) DMARDs, wie z.B. TNF-Inhibitoren sowie IL12/23 und IL-17 Antagonisten. Für die initiale Therapie bei einer manifesten Gelenkbeteiligung empfiehlt die EULAR (cs) DMARDs, vor allem das Methotrexat (MTX). Eine Umstellung auf biologische DMARDs, die TNF-Inhibitoren (Adalimumab, Certolizumab Pegol, Etanercept, Golimumab and Infliximab), alternativ auch die IL12/23 oder IL-17 Antagonisten sollte dann erfolgen, wenn die initialen Therapieziele nicht realisiert werden können. Eine Therapie mit (ts) DMARDs, wie die Phosphodiesterase-4-Inhibitoren (PDE-4), z.B. Apremilast wird durch die EULAR erst dann vorgesehen, wenn sowohl (cs) DMARD als auch (b) DMARDs nicht erfolgsbringend eingesetzt werden können. Bei einer manifesten Enthesitis oder Daktylitis hingegen sind die TNF-Inhibitoren die Mittel der Wahl, wenn zuvor keine Therapieerfolge mit nicht-steroidalen Antirheumatika (NSARs) oder lokalen Injektionen von Glukokortikoiden verzeichnet werden können. Gleiches gilt auch für Therapie von Patienten mit Befall des Achsenskeletts (17). Die GRAPPA (Group for Research and Assessment of Psoriasis Arthritis) hingegen empfiehlt für die initiale Therapie nicht nur (cs) DMARDs wie das MTX, sondern auch die TNF-Inhibitoren. Im weiteren Verlauf wird der Einsatz weiterer TNF- Inhibitoren, IL12/23- Antagonisten sowie PDE- 4 Inhibitoren vorgeschlagen. Die Therapievorschlüsse für Patienten mit axialer Beteiligung gleichen denen der EULAR. Die TNF-Inhibitoren sind auch hier beim Vorliegen einer Enthesitis oder Daktylitis das Therapiemittel der Wahl, wobei für erstere zusätzlich auch IL12/23 Antagonisten empfohlen werden (19).

Trotz der guten Therapiemöglichkeiten erreichen jedoch nicht alle PsA Patienten das Therapieziel, deshalb sind weitere Erkenntnisse zur Pathogenese und neue Therapieentwicklungen gefragt.

### 3.2 Adoptive Zelltherapien in Autoimmunerkrankungen

Etwa 4% der Weltbevölkerung leiden unter den Folgen der Dysfunktion ihres Immunsystems, auch bekannt als Autoimmunität (20). Für viele der heute bekannten Autoimmunerkrankungen erfolgt derzeit eine rein medikamentöse Therapie mittels pharmakologischer Substanzen, die mehr oder weniger spezifisch in das Immunsystem eingreifen (17, 21, 22). Ursächlich dafür ist die in vielen Fällen fehlende Erkenntnis über die zugrundeliegenden pathophysiologischen Vorgänge der Autoimmunerkrankungen. Für die Betroffenen bedeutet dies oftmals eine lebenslange Medikation mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen.

Neben den körperlichen Einschränkungen und den nicht zu unterschätzenden psychologischen Folgen (23) zeigen PsA oftmals ein erhöhtes Risiko für weitere Komorbiditäten. Dazu zählen unter anderem kardio-vaskulären Erkrankungen wie die Hypertension (24), die Hyperlipidämie, das Metabolische Syndrom (25) sowie die Uveitis (10). Trotz des relativ erfolgreichen Einsatzes von (b) DMARDs, wie der TNF- $\alpha$  Antagonisten in den letzten Jahren zur Behandlung verschiedenster Autoimmunerkrankungen (26), sprechen etwa 40% der PsA Patienten nur teilweise oder gar nicht auf die oben genannten Therapieansätze mittels Biologika an (10).

Diese und einige andere Faktoren führten schließlich dazu, dass in den letzten Jahren nach alternativen Behandlungsmethoden geforscht, und der Fokus zunehmend auf die Treg-basierten Zelltherapien gelegt wurde (20, 27-29). Aufgrund des aktuellen Forschungsstandes ist die Rolle der Tregs innerhalb des Krankheitsbildes der PsA nicht klar definiert. Die Anzahl der auf diesem Gebiet durchgeführten Studien ist limitiert und erlaubt somit keine eindeutige Aussage hinsichtlich der Funktion der Tregs für die Pathogenese der PsA (30). Deutlich wurde jedoch bereits die überragende Rolle der Tregs für die Prävention von Autoimmunerkrankungen (31), sodass trotz fehlender Erkenntnisse über die Pathogenese autoimmuner Erkrankungen wie der PsA das Gleichgewicht zwischen den Tregs und autoreaktiven Immunzellen für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase entscheidend ist. Aufgrund dessen, erhofft man sich durch den Einsatz autologer Tregs deutliche therapeutische Vorteile zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der PsA, im Vergleich zu konventionellen immunsupprimierenden Pharmaka, wie der Biologika.

Diesbezüglich zeigen sich jedoch einige Hürden auf, die es in den kommenden Jahren noch zu überwinden gilt (siehe 3.4.2). So herrscht zum Beispiel noch keine Einigkeit über die Definition und Nomenklatur humaner Tregs. (32).

Die Heterogenität humaner Tregs und das Nicht-Vorhandensein Treg-spezifischer Oberflächenmarker erschweren nicht nur die eindeutige Charakterisierung dieser T-Zellpopulation, sondern auch den Vergleich bisher durchgeführter Studien auf diesem Gebiet (33). Subpopulationen innerhalb der Tregs (34-42) und Uneinigkeiten darüber, welche dieser Subpopulationen am besten für diese Art der Therapie geeignet wären, sind nur einige weitere Probleme, die es in den kommenden Jahren zu adressieren gilt.

### 3.3 Das Immunsystem

In einer Umwelt, in der wir ständig Gefahren durch pathogene Mikroorganismen ausgesetzt sind, ermöglicht uns das Immunsystem lebensfähig zu bleiben. Diese Fähigkeit wird als Immunität bezeichnet. Dabei findet die Immunabwehr auf zwei Ebenen statt. Das *angeborene Immunsystem* ist in der Lage unvermittelt innerhalb weniger Minuten bis Stunden auf diese Gefahren zu reagieren. Gewährleistet wird diese unmittelbare Immunantwort durch zelluläre Komponenten und lösliche Bestandteile des Serums. Ist eine Abwehr pathogener Krankheitserreger durch das angeborene Immunsystem alleine nicht möglich, so kommt das *erworbenen Immunsystems* zum Einsatz. Die Träger der erworbenen Immunabwehr sind die Lymphozyten. Sowohl B- als auch T-Lymphozyten gehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks hervor und reifen im Knochenmark, *bone marrow* (B-Lymphozyten) oder im *thymus* (T-Lymphozyten) heran. Nach dem die Zellen des erworbenen Immunsystems durch den Kontakt mit einem Antigen aktiviert wurden, sind sie in der Lage spezifisch gegen diese Krankheitserreger vorzugehen. Dabei folgt die Immunantwort der erworbenen Immunabwehr mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 5-8 Tagen dem des angeborenen Immunsystems. Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch die Bildung eines „*immunologischen Gedächtnisses*“ aus, welches bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen zur Generierung einer effizienteren Immunantwort führt (43, 44).

Das zelluläre Rückgrat des erworbenen Immunsystems wird durch die T-Zellen gebildet. Ebenso wie die B-Zellen besitzen auch sie auf ihrer Zelloberfläche einen T-Zellrezeptor, welcher mit einem CD3 Molekül assoziiert ist. Anhand der für sie charakteristischen Oberflächenmoleküle, CD-Moleküle (Cluster of differentiation) können sie weiter in CD4+ oder CD8+ T-Zellen unterteilt werden. Während B-Zellen in der Lage sind Antikörper frei zu binden, können T-Zellen Antigene nur dann erkennen, wenn diese ihnen im Zusammenhang mit einem MHC-Molekül präsentiert werden, „*MHC-Restriktion der T-Zellen*“. Das Erkennen und Binden des MHC-Molekül-Peptid-Komplexes durch den T-Zellrezeptor (Signal 1) allein ist jedoch noch nicht

ausreichend, um die T-Zelle zu aktivieren. Erst wenn auch das ko-stimulatorische Signal vorhanden ist, das CD28 Molekül auf den T-Zellen mit den B7.1 und B7.2 Molekülen auf den aktivierten antigenpräsentierenden Zellen interagiert (Signal 2), kommt es zur vollständigen Aktivierung. Das Signal 3, welches von den aktivierten antigenpräsentierenden Zellen ausgeht und sich in Form von löslichen Zytokinen äußert, ist entscheidend dafür, ob die naiven CD4+ Zellen sich zu TH1, TH2, TH17 oder zu regulatorischen T-Zellen differenzieren. Diese lassen sich hinsichtlich ihrer Effektorfunktion und ihres Zytokinprofils weiter voneinander abgrenzen (45).

### 3.3.1 Entwicklung der Immuntoleranz

Die Aufgabe des Immunsystems besteht jedoch nicht nur darin den Organismus vor exogenen Gefahren zu schützen, sondern auch vor entarteten körpereigenen Zellen sowie vor überschießenden Immunreaktionen (43). Ist der Organismus nicht in der Lage körpereigene Strukturen zu erkennen und diese als unschädlich einzustufen, so spricht man von Autoimmunität. Die Folge ist eine Selbstzerstörung von Gewebstrukturen eines einzelnen Organs, z. B der Haut (Psoriasis) oder mehrerer Organe (PsA) mit meist verheerenden Folgen für die Betroffenen. Obwohl die zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen für die jeweiligen Autoimmunerkrankungen nicht vollständig geklärt sind, ist bekannt, dass sowohl autoreaktive T-Zellen sowie B-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese einnehmen können. Zum Schutz vor einer Selbstzerstörung durch die Fehlregulation der Eigenerkennung besitzt der Organismus diverse Kontrollmechanismen, die sowohl während der T-Zellreifung im Thymus, als auch in der Peripherie zum Tragen kommen. Die Entwicklung der Immuntoleranz findet während der Reifung der Lymphozyten in den primären lymphatischen Organen statt. Unreife T-Lymphozyten (Thymozyten), die aus dem Knochenmark in den Thymus einwandern, besitzen noch keinen funktionsfähigen T-Zellrezeptor. Dieser entsteht erst durch die somatische Rekombination der segmentierten Gene (V-, D-, J- Teilgene), sodass sich durch die zufällige Rekombination für eine Vielzahl von Antigenen ein spezifischer Antigenrezeptor ergibt. Infolge der Selektionsprozesse, die während der Reifung im Thymus stattfinden, gelangt jedoch nur ein sehr kleiner Anteil der T-Zellen als funktionsfähige, reife T-Lymphozyten (naiv) in die Peripherie (etwa 1%), wo sie durch den Kontakt mit einem Antigen aktiviert werden und anschließend als Effektorzellen ihre Funktion ausüben können. Thymozyten, die in den Thymus einwandern, tragen sowohl das CD4 als auch das CD8 Moleküle auf ihrer Oberfläche, „doppelt-positive“ T-Zellen. Im Kortex des Thymus werden zunächst alle Zellen selektiert, bei denen die somatische Rekombination keinen funktionsfähigen T-Zellrezeptor erzeugt hat.

Dieser Prozess, der als *positive Selektion* bezeichnet wird, führt zur apoptotischen Elimination aller Zellen, die nicht in der Lage sind die MHC-Moleküle zu erkennen und zu binden, die ihnen durch die Thymus-Epithelzellen präsentiert werden. Jene Zellen, die das MHC-Molekül der Klasse I, das HLA -A, -B, oder C besser erkennen als das HLA-D, verlieren das CD4-Oberflächenmolekül und verbleiben als CD8+ Zellen. Umgekehrt führt das Erkennen des MHC-Molekül der Klasse II, das HLA-D mit höherer Affinität zum Verlust des CD8-Oberflächenmoleküls (45) .

Das Ziel der *negativen Selektion*, die ebenfalls während der T-Zellreifung in der Medulla des Thymus stattfindet, ist es solche Zellen zu eliminieren, die zu stark auf körpereigene Proteine reagieren. Die zu starke Bindung an das MHC-Molekül auf den DCs in der Medulla des Thymus führt ebenfalls zur apoptotischen Elimination dieser Zellen. Eine weitere Elimination autoreaktiver Zellen erfolgt durch das AIRE Gen (Autoimmune Regulator), in dem den Thymozyten körpereigene, gewebspezifische Proteine präsentiert werden. Durch die Selektionsmechanismen wird gewährleistet, dass nur solche T-Lymphozyten in die Peripherie entlassen werden, deren T-Zellrezeptor eine mittlere Affinität zu den im Thymus präsentierten Antigenen aufweisen und die nicht auf körpereigene Proteine reagieren. Aufgrund der Tatsache, dass autoreaktive T-Zellen durch die negative Selektion allein nicht komplett eliminiert werden können, gibt es noch weitere Toleranzmechanismen, wie die Abschirmung von Antigenen, „*antigen segregation*“, Anergie, „*anergy*“, Deletion, „*activation induced apoptosis*“ und nicht zuletzt die Suppression durch Tregs, die in der Peripherie stattfinden und so vor möglichen destruktiven Immunantworten autoreaktiver Zellen schützen (43-45).

Die Hauptakteure des peripheren Toleranzmechanismus sind die Tregs, die autoreaktive Immunzellen aktiv unterdrücken können (46). Das Gleichgewicht zwischen der Funktion dieser regulatorischen T-Zellen und autoreaktiver Immunzellen ist somit entscheidend für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase, weshalb man sich durch ein besseres Verständnis dieses Gleichgewichts neue Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen erhofft.

### 3.3.2 T regulatorische Zellen

Anfang der 1970er entdeckten Gershon und Kondo, dass die Immunantwort durch T-Zellen nicht nur hochreguliert, sondern auch eingedämmt werden kann (47). Mitte der 1990er machten Sakaguchi *et al.* die Entdeckung, dass die Manipulation des Thymus und der T-Zellen zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führt (48). Basierend auf diesen und weiteren Ergebnissen erlangte man die Erkenntnis, dass normale Individuen „zwei Arten“ von CD4+ T-

Zellpopulationen beherbergen. Einerseits autoreaktive T-Zellen, die den stringenten Selektionsprozessen im Thymus entkommen sind und zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen können und T-Zellen, die in der Lage sind, diese autoreaktiven T-Zellen aktiv zu unterdrücken (49). Um diese beiden CD4<sup>+</sup> Zellpopulationen phänotypisch genauer zu definieren, wurden ab Mitte der 1980er Jahre zahlreiche Versuche durchgeführt. Diese T-Zellpopulation mit suppressiven Fähigkeiten, die nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Vorbeugung von Autoimmunerkrankungen und Allergien einnehmen, sondern auch zur Feto-Maternale-Toleranz während der Schwangerschaft beitragen, wurden als regulatorische T-Zellen bezeichnet (50, 51). Ab Mitte der 1990er Jahre wurden sie zunächst in naiven Mäusen (31) und im Jahr 2001 erstmals bei Menschen als CD4<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup> T-Zellen (52-55) charakterisiert, die zusätzlich zu den Oberflächenmarkern den Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-P3 (FoxP3) exprimieren (56-58). Die darauffolgenden Jahre auf dem Gebiet der Treg-Forschung zeigten jedoch, dass es aufgrund der Heterogenität und Komplexität humaner Tregs schwierig ist eine eindeutige Charakterisierung dieser Zellpopulation vorzunehmen. Vereinfacht lassen sich jedoch zwei Arten von CD4<sup>+</sup> Tregs differenzieren: im Thymus generierte, natürlich vorkommende Tregs (nTregs) und in der Peripherie induzierte Tregs (pTregs), die den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren (59). Hinzu kommen auch die IL-10, Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) sowie IL-5 sezernierenden Typ1 regulatorischen Zellen (Tr1) (60-62) sowie die Typ 3 T-Helferzellen 3 (TH3), die vorwiegend das TGF- $\beta$  sezernieren und ebenfalls regulatorische Funktionen ausüben. Sowohl TH3 als auch Tr1 Zellen exprimieren kein FoxP3 und sind somit von den CD4<sup>+</sup> Tregs abzugrenzen (60, 63, 64).

Eine bedeutende Stellung bei der Prävention von Autoimmunerkrankungen kommt insbesondere den nTregs zu, die sich im Rahmen stringenter Selektionsprozesse (negative Selektion) im Thymus entwickeln. Als funktionell reife T-Zellpopulation, die die Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 sowie den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren (FoxP3<sup>high</sup>), sind sie in der Lage die Aktivierung und Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und auch antigenpräsentierender Zellen (APCs) zu unterdrücken (65). Die außerordentliche Stellung des Transkriptionsfaktors Foxp3 für die Treg-Funktion und Entwicklung hingegen wird bei Betrachtung des IPEX-Syndroms (Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X linked) deutlich. Hierbei handelt es sich um eine polyendokrine Autoimmunerkrankung, die durch eine Mutation im FoxP3-Gen hervorgerufen wird. Betroffene des IPEX-Syndroms entwickeln bereits wenige Tage nach der Geburt zahlreiche Autoimmunerkrankungen (Autoimmun-Enteropathie, Typ-1 Diabetes sowie einer atopischen Dermatitis), die unbehandelt tödliche sein

können (66, 67). Die pTregs hingegen entwickeln sich durch die Antigenstimulation naiver CD4+ T-Zellen in Gegenwart von IL-2 und TGF- $\beta$ . Genauso wie die nTregs exprimieren auch sie das Oberflächenmolekül CD25, den Transkriptionsfaktor FoxP3 sowie den für die Tregs charakteristischen inhibitorischen Ko-Rezeptor CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen- 4), zeigen jedoch im Vergleich zu den nTregs eine geringere *in vitro* Suppressorfunktion sowie eine instabilere Expression des FoxP3 (68).

Trotz der Heterogenität humaner Tregs ist eine stabile und hohe FoxP3 Expression unerlässlich für eine funktionierende Suppressoraktivität (69). Hierbei ist anzunehmen, dass die Expression des FoxP3 und CD25 proportional zueinander sind. Da sowohl das CD25 als auch das FoxP3, welche ursprünglich als Treg-spezifische Marker identifiziert wurden auch durch aktivierte, konventionellen T-Zellen (Tcons) exprimiert werden (58), war eine weitere Abgrenzung humaner Tregs notwendig. So wurde das CD127 als weiterer Oberflächenmarker zur Differenzierung von Tregs und Tcons beschrieben. CD4+ T-Zellen mit geringer CD127 Expression ( $\alpha$ -Kette des IL-7 Rezeptors) zeigten eine erhöhte FoxP3 Expression und damit einhergehend eine hohe Suppressoraktivität (70, 71). Aufgrund der Tatsache, dass aktivierte Tcons die CD127 Expression ebenfalls herunterregulieren können, war es durch die Kombination aus CD25 und CD127 allein nicht möglich zwischen Tregs und aktivierten Tcons zu unterscheiden (72, 73). So demonstrierten Hoffmann *et al.*, dass CD4+CD25+CD127- Tregs nach *in vitro* Expansion keine homogene FoxP3 Expression zeigten (74). Eine weitere Abgrenzung der CD4+CD25+CD127- Tregs in CD45RA+ und CD45RA- Tregs zeigte, dass vor allem antigenerfahrene CD45RA- Tregs die FoxP3 Expression herunterregulierten und zudem in der Lage waren proinflammatorische Zytokine wie das IL-2 und das Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) zu sezernieren (74). Epigenetische Untersuchungen des Treg-specific demethylated Region (TSDR), einer hoch konservierten Region innerhalb des FoxP3 Genlokus, welcher nur bei natürlich vorkommenden Tregs vollständig demethyliert vorliegt und eine stabile FoxP3 Expression bedingt (69), belegten, dass die Heterogenität der CD4+CD25-CD127- Tregs durch die CD45RA- Tregs in der Ausgangspopulation herbeigeführt wird, da diese nach *in vitro* Expansion eine partielle Methylierungen innerhalb dieser Region aufwiesen (74). Auch Miyara *et al.* nahmen eine Differenzierung humaner Tregs unter Hinzunahme des CD45RA vor, in dem sie FoxP3+CD4+ T-Zellen weiter in: CD45RA+FoxP3<sup>low</sup>, resting Tregs (rTregs), CD45RA-FoxP3<sup>high</sup>, activated Tregs (aTregs) sowie CD45RA-FoxP3<sup>low</sup> (non-Tregs) einteilten, die sich nicht nur phänotypische, sondern auch funktionell voneinander unterschieden (75). In Übereinstimmungen mit Hoffmann *et al.* demonstrierten auch sie, dass die als FoxP3+ non-Tregs charakterisierten Zellen dazu befähigt waren proinflammatorische



Zytokine: IL-2, INF- $\gamma$  sowie das IL-17 zu produzieren. Zudem wiesen sie eine nicht-vollständige Demethylierung des TSDR auf und waren auch nicht in der Lage die *in vitro* Proliferation der T Effektorzellen zu unterdrücken (75). CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> und CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>high</sup> Tregs hingegen zeigten nach Antigenstimulation eine potente *in vitro* Suppressorfähigkeit. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass einige der CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>high</sup> Tregs auch das HLA-DR exprimierten, wobei diese sich hinsichtlich der Suppressionsfähigkeit deutlich überlegener als die HLA-DR<sup>-</sup> aTregs zeigten (63, 75). Dass anhand der Expression des MHC-Moleküls der Klasse II, eine weitere Differenzierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-Zellen, in DR<sup>+</sup> und DR<sup>-</sup> Tregs möglich ist, zeigten Baecher-Allen *et al.* bereits 2006. DR<sup>+</sup> als auch DR<sup>-</sup> Tregs waren in der Lage die *in vitro* Proliferation und Zytokinproduktion der T Effektorzellen zu unterdrücken, unterschieden sich jedoch in der Art und Weise ihrer Suppressionsmechanismen. Während DR<sup>+</sup> Tregs die T Effektorzellen primär kontaktabhängige supprimierten und ihre Suppressionsfähigkeiten eine enge Korrelation mit der FoxP3 Expression zeigte, so wurde die Suppression durch die DR<sup>-</sup> Tregs durch die Sekretion der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-4 gewährleistet (34). Eine weitere Abgrenzung humaner Tregs erfolgte 2007 durch Borsellino *et al.* Sie identifizierten das Ektoenzym CD39, eine (Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase-1 [NTPDase 1]), welches Adenosintriphosphat (ATP) in Adenosinmonophosphat (AMP) umwandelt, als "spezifischen" Treg-Marker, der vornehmlich durch FoxP3<sup>+</sup> Tregs exprimiert wird (35). Auch hier zeigte die Expression des CD39 eine enge Korrelation mit der Expression des FoxP3, beschränkte sich jedoch im Gegensatz zu murinen Tregs auf eine spezielle Subpopulation von Tregs, nämlich den FoxP3<sup>+</sup> effector/memory-like T (T<sub>REM</sub>) Tregs (35). Ihre Andeutungen, dass das CD39 womöglich sogar gemeinsam mit dem CD73 exprimiert wird, wurde durch Deaglio *et al.* dargestellt (36). Im Zuge der Treg-Forschung folgten weitere Marker, darunter das CD95 (37), das ICOS (Inducible Costimulator) (38) sowie Helios (41). So beschrieben auch Sorsted *et al.* mit CD147 (Basigin/Emmpirin) einen weiteren Marker für Tregs, welcher zur Abgrenzung FoxP3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> Tregs von anderen Treg-Subsets dienen sollte. CD147<sup>+</sup> Tregs zeichneten sich durch eine signifikant höhere Expression des FoxP3 sowie eine höhere *in vitro* Suppressorkapazität als CD147<sup>-</sup> Tregs aus (40). Auch konnte eine enge Korrelation zwischen den bisher mit Tregs assoziierten Markern wie das Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR), ICOS, and CTLA-4 und einer erhöhten CD147 Expression beobachtet werden. CD147<sup>+</sup> Tregs exprimierten zusätzlich das CD45RO, den Marker für bereits aktivierte Zellen, wohingegen CD147<sup>-</sup> Tregs innerhalb des CD45RA<sup>+</sup> Pools anzutreffen waren, sodass durch das CD147 eine Differenzierung zwischen naiven and aktivierten Tregs gewährleistet werden konnte (40).

Ein weiterer Marker zur Differenzierung der FoxP3+ Tregs wurde 2015 durch Miyara *et al.* vorgestellt. Nach dem diese bereits 2009 eine Differenzierung der FoxP3+CD25+CD4+ T-Zellen vornahmen, identifizierten sie mit Sialyl Lewis x (CD15s), einen weiteren Oberflächenmarker spezifisch für enddifferenzierte, am höchsten suppressive Tregs, die sie als CD15s+FoxP3high (eTregs) beschrieben (39). Dieser Marker eignete sich außerdem zur Abgrenzung von nicht-suppressiven FoxP3+ T-Zellen, den CD15s-FoxP3+ (non-Tregs) (39). Sodass sie letztlich mit Hilfe von CD15s und CD45RA die FoxP3+CD4+ T-Zellen in drei Fraktionen unterteilten: CD15s-CD45RA+FoxP3low, CD15s+CD45RA-FoxP3high (eTregs), die zusätzlich eine höhere Expression bestimmter Treg-spezifischer Marker wie die des CD39, des Chemokinrezeptors-4 (CCR4), des intrazellulären CTLA-4, CD25 und des Proliferationsmarkers (Ki-67) zeigten, sowie CD15s-CD45RA-FoxP3low (non-Tregs), die in der Lage sind aktiv proinflammatorische Zytokine wie das IL-2 und IFN- $\gamma$  zu produzieren (39).

#### 4. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Mit dem Membranprotein TIRC7 (T cell immune response cDNA 7) wurde ein weiterer Aktivierungsmarker der T-Lymphozyten entdeckt (76, 77). Die ersten publizierten Daten hierzu zeigten, dass eine TIRC7 Expression nach allogener T-Zellaktivierung vor allem auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen hochreguliert wurde. Der Einsatz eines anti-TIRC7 Antikörpers hingegen resultierte in der verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine durch TH1 Zellen. So konnte insbesondere eine Inhibition der IL-2 sowie INF- $\gamma$  Produktion beobachtet werden, wohingegen die Effektorfunktionen der TH2 Zellen unbeeinflusst blieben (78, 79).

Ähnliche Ergebnisse bezüglich des inhibitorischen Effekts des anti-TIRC7 Antikörper auf die Immunantwort der TH1 Zellen konnten auch *in vivo* im Tiermodell mit Mäusen erzielt werden. Der Einsatz eines anti-TIRC7 Antikörpers führte auch hier zu signifikanten Erfolgen bei der Therapie von kollagen-induzierter Arthritis bei Mäusen sowie Nieren – Herztransplantationen in Mäusen und Ratten (77). Später wurden TIRC7<sup>+</sup> T regulatorischen Zellen im Tiermodell als Subpopulation von Tregs identifiziert, deren Suppressionsfähigkeit *in vivo*, im Kolitis-Modell mit Mäusen sowie *in vitro* eine enge Korrelation mit ihrer Fähigkeit IL-10 zu produzieren zeigten (42). Diese Erkenntnisse waren insofern interessant, da Tregs bis zu diesem Zeitpunkt in zwei große Populationen eingeteilt wurden. Diese umfassen natürlich vorkommende Tregs (nTregs) und induzierbare Tregs (pTregs), darunter auch die Typ 1 regulatorischen Zellen (Tr1), die IL-10 sezernieren. Die Mehrheit der Studien deuteten darauf hin, dass zumindest die *in vitro* suppressiven Eigenschaften der nTregs nicht primär IL-10 abhängig waren (63, 65, 80) (81). Ausgehend von diesen Erkenntnissen beider Arbeitsgruppen (Utku *et al.*, 2004 und Wakkach *et al.*, 2008) ergaben sich folgende Fragestellungen, die im Rahmen dieser Dissertation abgehandelt werden sollten:

1. Welcher anti-TIRC7 Antikörper eignet sich am besten, um die TIRC7<sup>+</sup> Tregs nach der Expansion zu isolieren?
2. Inwieweit sind die mit IL-10 sezernierender TIRC7<sup>+</sup> muriner Tregs erzielten Ergebnisse auch auf humane Tregs übertragbar?

Der Hauptfokus dieser Dissertation lag auf der Charakterisierung TIRC7<sup>+</sup> humaner Tregs, sowohl bei *gesunden Kontrollprobanden* als auch bei *PsA Patienten*. Hierzu wurden nach dreiwöchiger *in vitro* Expansion TIRC7<sup>+</sup> Tregs mittels MACS isoliert. Eine Phänotypisierung dieser wurde unter Verwendung „Treg-spezifischer“ Marker und des IL-10 mit Hilfe der Multicolor-Durchflusszytometrie vorgenommen. Zur Erfassung der Unterschiede der Funktionalität dieser

Treg-Subpopulation wurden Suppressionsanalysen/Proliferations-Assays, „*allogene MLRs*“ durchgeführt und mit der TIRC7+ und der Gesamt-Treg-Population verglichen. Um nachweisen zu können, dass die Suppressionsfähigkeit der TIRC7+ Tregs auf ihrer Fähigkeit beruht IL-10 zu produzieren, wurden Überstände derselben Suppressions-Assays abgenommen und die IL-10 Produktion mittels ELISA untersucht.

Zur Ermittlung des besten monoklonalen anti-TIRC7 Antikörpers für den Einsatz in Treg-Kulturen wurden Bindungsanalysen und funktionelle Assays in Form von allogenen MLRs, „*Mixed Lymphocyte Reactions*“ und Apoptose Assays durch den Einsatz eines Panels von 10 Antikörpern gegen TIRC7 durchgeführt.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Patientenkollektiv

Alle Patientenproben, die im Rahmen der Studie eingesetzt wurden, stammen von Patienten aus der Klinik für Rheumatologie mit Schwerpunkt Klinischer Immunologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte (CCM). Die Studie, mit der Projektnummer: IA 88173318 wurde am 25.04.2018 von der lokalen Ethikkommission der Charité genehmigt. Insgesamt wurden 17 Patientenproben im Zeitraum von 09/2018 bis 07/2019 sowie 18 Proben von gesunden Kontrollprobanden verwendet, nach dem eine schriftliche Einverständniserklärung dieser vorlag.

#### 5.1.1 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv setzte sich wie folgt zusammen:

Zehn Patienten mit der Diagnose einer Psoriasis Arthritis (PsA), drei Patienten mit der Diagnose Spondylitis Ankylosans (SpA) sowie vier Patienten, bei denen eine rheumatoide Arthritis (RA) diagnostiziert wurde. Unter den 17 untersuchten Patienten befanden sich, acht weibliche und neun männliche Patienten.

Die Gruppe der RA Patienten setzte sich aus zwei Frauen und zwei Männern zusammen. Das durchschnittliche Lebensalter für die PsA Patienten betrug 52,4 Jahre ( $SD \pm 7,14$ ), für die SpA Patienten 48 Jahre ( $SD \pm 8,89$ ). Für die RA Patienten lag das durchschnittliche Lebensalter ebenfalls bei 48 Jahren ( $SD \pm 6,4$ ).

Nach initialen Ansätzen wurde der Fokus auf Treg-Zellkulturen von Patienten mit PsA gelegt. In der Gruppe der PsA Patienten befanden sich fünf Frauen und fünf Männer, die das finale Patientenkollektiv im Ergebnissteil darstellen.

#### 5.1.2 Nebendiagnosen und Begleiterscheinungen

Die Mehrheit der Patienten zeigten nicht nur die Diagnose der oben aufgeführten Autoimmunerkrankungen, PsA, SpA oder RA sondern auch andere Neben- bzw. Hauptdiagnosen, die sich wie folgt darstellten: arterieller Hypertonus bei vier Patienten, Psoriasis bei drei Patienten, chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) sowie Asthma bronchiale bei zwei Patienten, Lichen ruber sowie Lupus erythematodes bei jeweils einem Patienten. Eine weitere Patientin wies das Restless-leg Syndrom auf. Weitere Nebendiagnosen waren: Pollenallergie bei einem Patienten sowie Heuschnupfen bei einer Patientin. Lediglich vier Patienten wiesen keinerlei Nebendiagnosen auf.

### 5.1.3 Therapie und Medikation

Insgesamt sieben Patienten wurden zum Zeitpunkt der Studie mit einem monoklonalen anti-IL-17A Antikörper, (Secukinumab) Cosentyx behandelt. Drei dieser Patienten erhielten zusätzlich noch niedrig dosiertes Prednisolon, einer von ihnen zusätzlich noch das MTX als Injektionslösung (Metex Pen). MTX als Therapiemittel der Wahl wurde bei drei Patienten eingesetzt. Tumornekrosefaktor-Blocker (TNF-Blocker) (Enbrel) wurden bei drei der Patienten und Certolizumab bei einem Patienten eingesetzt. Die TNF- $\alpha$  Blocker (Infiximab, Adalimumab (Humira Pen) und Golimumab) wurde bei jeweils einem Patienten angewandt. Januskinase-Hemmer (JAK1 und JAK2) waren das Therapiemittel der Wahl für einen Patienten. Ein weiterer Patient wurde mit einem anti-IL-6 Präparat (Tocilizumab) Rocatemra behandelt. Weitere Medikamente für die Behandlung systemischer Erkrankungen waren unter anderem: Ramipril, Metoprolol, Amlodipin, Alendronsäure sowie NSARs, (Tabelle2).

### 5.1.4 Klinische Daten

Die klinischen Daten wurden der elektronischen Datenbank (SAP) der Charité entnommen. Die Diagnosestellung erfolgte durch die ärztlichen Mitarbeiter der Klinik. In die Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, die eine eindeutige Diagnose einer Autoimmunerkrankung hatten, deren vollständige Anamnese erhoben wurde und denen eine Blutprobe entnommen werden konnte. Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, die eine Studienteilnahme ablehnten.

In der unten aufgeführten Tabelle (Tabelle 2) sind alle PsA, RA und SpA Patienten mit Alter, Geschlecht, Therapie sowie Nebendiagnosen aufgeführt.

### 5.1.5 Zusammensetzung der Kontrollprobanden

Die gesunden Kontrollprobanden setzten sich aus sechs weiblichen und zwölf männlichen Probanden zusammen. Das durchschnittliche Lebensalter für die gesunden Probanden betrug 29 Jahre ( $SD \pm 4,75$ ). Zum Zeitpunkt dieser Studie wies keiner der Probanden eine akute oder chronische Erkrankung auf.

**Tabelle 2** Übersicht über das Patientenkollektiv

Nr.	Geschlecht W/M/D	Alter	Diagnose	Nebendiagnosen	Therapie	Aktivitäts- marker
1	M	41	PsA	Arterielle Hypertonie Psoriasis	MTX; Folsäure; Metoprolol succ; Losartan	Keine Angaben
2	M	60	PsA	Psoriasis vulgaris Rosazea	Secukinumab; Colecalciferol (VitD3)	VAS 4/10
3	W	53	PsA	Asthma bronchiale COPD GOLD St.2 Restless leg syndrom	Secukinumab; MTX; Prednisolon; Alendronsäure; Etoricoxib; Gabapentin; Folsäure; Opipramol	VAS 5/10
4	M	48	PsA		Secukinumab; Lefunomid; Ramipril; Colecalciferol (VitD3); Pantoprazol	BASDAI: 8.3  VAS 8/10
5	W	49	PsA		Secukinumab; Adalimumab; Ibuprofen; Tramadol; Pantoprazol	BASDAI: 2  VAS 2/10
6	W	59	PsA	Adipositas Schilddrüsenknoten (Euthyreose)	Secukinumab; Sulfasalazin; Prednisolon; Etoricoxib	VAS 5/10
7	W	57	PsA	Arterielle Hyperthonie Migräne	Etanercept Vocado Colecalciferol (VitD3) Mirtazapin	Keine Angaben
8	M	60	PsA	Asthma bronchiale Heuschnupfen Psoriasis vulgaris	Infliximab Diclofenac Pantoprazol	Keine Angaben

				Ulcus ventriculi Gemischte Dyslipidämie		
9	W	55	PsA		Secukinumab Ibuprofen	VAS 4/10
10	M	42	SpA/PsA	HLA B27 positiv Enthesitis Arthralgien	Etanercept	BASDAI: 0,6
11	M	58	SpA	Lupus erythemathodes	Secukinumab; Ibuprofen; Pantoprazol; Alpicort-Lsg	BASDAI: 3,6
12	M	45	SpA	Atherom Seborrhoische Dermatitis Enteritis HLA B27 positiv	Golimumab; Celecoxib	BASDAI: 5
13	M	41	SpA	Pollenallergie	Voltaren resinat; Golimumab; Celecoxib	Keine Angaben
14	M	53	RA	COPD Arterielle Hypertonie Pulmonale Hypertonie Kerotissklerose Koronare-1 Gefäßkrankheit Hypercholesterinämie	Tocilizumab; Ibuprofen Pantoprazol; Metoprolol; Ramipril; Ezetimib	Keine Angaben  RF+ ACPA+
15	M	42	RA		Etanercept; Ibuprofen; Colecalciferol (VitD3)	DAS28: 3,1 RF+ ACPA+
16	W	43	RA	Arterielle Hypertonie	MTX; Prednisolon; Certolizumab; Amlodipin; Bisoprolol	DAS28/ CRP: 5,04 RF+ ACPA+
17	W	54	RA	Lichen ruber Osteopenie	Baricitinib; Prednisolon MR; Ibuprofen;	Keine Angaben



					Alendronsäure; Colecalciferol (VitD3)	
--	--	--	--	--	---	--

**BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index** zur Erfassung der Krankheitsaktivität bei Spondylitis ankylosans und verwandten Erkrankungen. In die Bewertung fließen folgende Parameter mit ein: Morgensteifigkeit, Erschöpfung/Müdigkeit, Schmerzen, Gelenkschmerzen/Gelenkschwellung, Druckschmerzen der Gelenke. BASDAI = (Summe aus Fragen 1 bis 4 plus Mittelwert aus Fragen 5 und 6) dividiert durch 5. (82)

**DAS 28: Disease Activity Score 28** zur quantitativen Beurteilung der Krankheitsaktivität bei einer rheumatoiden Arthritis (83)

Krankheitsaktivität:

< 2,6: klinische Remission

≥ 2,6 bis < 3,2: niedrige Krankheitsaktivität

3,2 bis < 5,1: moderate Krankheitsaktivität

≥ 5,1: hohe Krankheitsaktivität

**VAS: Visuelle Analogskala** ist eine Skala, auf der Patienten ihre Schmerzen auf einer Strecke zwischen zwei Punkten (1-10) angeben. (84)

## 5.2 Materialien

### 5.2.1 Plastikmaterialien und Pipetten

**Tabelle 3** Pipetten, Pipettenspitzen und Plastikbehälter

<i>Plastikmaterialien und Pipetten</i>	<i>Hersteller</i>
Eppendorf Tubes (0,5 ml/1,5 ml/ und 2 ml) safe tips	Eppendorf
Falcon Tubes (15 ml/50 ml)	BD Falcon
FACS Tubes (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube)	Falcon REF352052
Pipettenspitzen (10/20/100/200 und 1250 µl)	Safe Seal-Tips professional Biozym
Pipetten (10/20/100/200/1000 µl)	Eppendorf
VACUETTE® RÖHRCHEN 9 ml LH	Greiner bio-one Artikel-Nr. 1005300

### 5.2.2 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Kits

**Tabelle 4** Reagenzien und Kits

<i>Chemikalien/Reagenzien/Puffer und Kits</i>	<i>Hersteller</i>
Erythrocyte Lysis Buffer Buffer EL	Qiagen LotNo.160024979
Ethanol 70% denatured	ROTH Art.-Nr. T913.3
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare Art.-Nr. GE17-1440-03
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD	Biolegend Cat. No. 420201
MACs Running Buffer	Miltenyi Biotec Order no. 130-091-221
CD25MicroBeads II human	Miltenyi Biotec Order no.130-092-983
CD4+ Tcell isolation Kit human	Miltenyi Biotec Order no.130-096-533
Blood DC Isolation Kit II human	Miltenyi Biotec Order no.130-091-379

Treg Expansion Kit human	Miltenyi Biotec Order no.130-095-345
Cell Proliferation ELISA, BrdU (calorimetric)	Roche Cat: 11 647 229 001
IL-2, human recombinant (rHu IL-2) 50 µg	Biomol Artikel-Nr.: 50442.50
AB-Human Serum, male sterile 100 ml	Sigma Aldrich Artikel-Nr.: H4522
PBS-Dulbeco	Biochrom Artikel-Nr.: L1820
Rapamycin GMP 200 nmol in 1ml DMSO	Miltenyi Biotec Order no. 170-076-308
eBioscience™ FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Catalog Number: 00-552

### 5.2.3 Antikörper

**Tabelle 5** Antikörper für FACS

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>
CD3-APC Clone: HIT3a	Biolegend Cat: 300312
CD4-APC/ Fire Clone: RPA-T4	Biolegend Cat: 300560
CD4-PE/Cy5 Clone: OKT4	Biolegend Cat: 317412
CD8a-PE/Cy7 Clone: HIT8a	Biolegend Cat: 300914
CD14-FITC Clone: M5E2	Biolegend Cat: 301804
CD14-PE Clone:	In House Production of DRFZ
CD14-PO Clone:	In House Production of DRFZ
CD19-PE Clone: HIB19	Biolegend Cat:302208
CD25-PECy5 Clone: BC96	Biolegend Cat: 302608

CD127-APC Clone: A019D5	Biologend Cat: 351316
CD127-Brilliant Violet 421 Clone: A019D5	Biologend Cat: 351309
Annexin V-FITC	Biologend Cat:640906
CTLA-4-PE/Cy7 Clone: BNI3	Biologend Cat:369614
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec Order no. 130-091-379
FoxP3-Alexa Fluor488 Clone: PCH101	Invitrogen REF: 53-4776-41
FoxP3-Pacific Blue Clone:259D	Biologend Cat:320215
IL-10-PE Clone: JES3-9D7	Invitrogen REF: 12-7108-82
IgG1, K isotype Ctrl Clone: MOPC-21	Biologend Cat: 400108
Viability 405/452 Fixable Dye	Miltenyi Biotec Order no. 130-109-816
Zombie Green™ Fixable Viability Kit	Biologend Cat: 42311/100 tests

### 5.3 Aufbereitung der Blutproben

Die Blutproben wurden den Patienten im Rahmen von Verlaufskontrollen, seltener Erstaufnahmen zusätzlich abgenommen, nachdem diese über das Projekt aufgeklärt wurden und eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben hatten.

Den Patienten wurde jeweils, die durch die Ethikkommission zugelassene maximale Menge an Blut abgenommen (VACUETTE® RÖHRCHEN 4x 9 ml LH Lithium Heparin) und ohne vorherige Lagerung verarbeitet.

#### 5.3.1 Isolation von peripheren mononukleären Zellen

Die Isolation peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs) erfolgte aus dem Frischblut mittels Dichtegradientenzentrifugation über einer Ficoll-Paque Trennlösung. Das Frischblut wurde zunächst in einem 50 ml Falcon Tube im Verhältnis 1:1,75 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Dulbeco) verdünnt. 15 ml Ficoll-Paque Trennlösung wurden anschließend mit 35 ml

verdünntem Blut vorsichtig überschichtet und bei 2000 Umdrehungen pro Minute (Rpm) (ohne Bremse) und 20°C für 20 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Plasma abpipettiert und der Leukozyten-Ring oberhalb der Ficoll-Schicht in ein neues 50 ml Falcon Tube überführt und mit PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 1800 Rpm und 20°C für zehn Minuten. Zur Lyse der Erythrozyten wurden 5-10 ml des Erythrocyte Lysis Buffers (ELB) eingesetzt. Die Zellen wurden solange mit PBS gewaschen und mit ELB behandelt bis ein von Erythrozyten freies Zellpellet ersichtlich war. Die letzte Zentrifugation erfolgte bei 1200 Rpm und 20°C für 10 Minuten. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 1000 µl PBS aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 5 µl der Zellsuspension 1:10 oder 1:100 in PBS verdünnt.

#### Die Formel zum Zählen

Volumen der Zellsuspension in ml\* Verdünnung\*10000\* Zellzahl (Mittelwert aus den vier Feldern der Zählkammer)

#### 5.3.2 Isolation von Zielzellen

##### Die Isolation der Zielzellen

Tregs (*hier* Zellpopulation mit der höchsten CD25 Expression, *CD25<sup>high</sup> Zellpopulation*), CD4+CD25- T-Zellen sowie Dendritische Zellen wurden:

- 1.) zur funktionellen und durchflusszytometrischen Evaluierung der anti-TIRC7 Antikörper
- 2.) für die Isolierung der TIRC7+ Tregs nach Treg-Zellexpansion eingesetzt.

Dies erfolgte mittels magnetaktivierter Zellsortierung (MACS - **M**agnetic **A**ctivated **C**ell **S**orting) unter Ausführung der beigelegten Anleitung und Beachtung der Empfehlungen der jeweiligen Kits der Firma Miltenyi Biotec.

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank ausgeführt. Alle Waschschriffe erfolgten bei 300 x g für zehn Minuten und bei 4°C. Ebenso erfolgten alle Inkubationen bei 4°C und im Dunkeln. Vorbereitend auf die Zellsortierung wurden die verwendeten MACS-Säulen (Miltenyi Biotec) nach Anleitung des Herstellers mit dem MACS Running Buffer (Miltenyi Biotec) ausgewaschen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wie unter 5.3.1 beschrieben mit einer Neubauer Zählkammer.

### Prinzip des MACS

Bei der magnetaktvierten Zellsortierung handelt es sich um eine Methode zur Sortierung von Zellen aus einem Zellgemisch anhand ihrer phänotypischen Eigenschaften, der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, welche diese Zellen charakterisieren. Hierfür werden Antikörper, die an etwa 50 nm große Magnetpartikel gebunden sind, mit dem Zellgemisch inkubiert. Beim Durchfluss durch eine geeignete Säule werden die durch die MicroBeads markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, da die Säule von einem starken magnetischen Feld umgeben ist (85).

#### *Positive Selektion und Depletion*

Handelt es sich bei den markierten Zellen, um die Zielzellen, so spricht man von einer positiven Selektion. Sind die markierten Zellen dagegen nicht die Zielzellen handelt es sich um eine sogenannte Depletion (aus dem engl. Anreicherung).

Bei der positiven Selektion werden die magnetisch markierten Zellen in der Säule zurückgehalten und können nach dem Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld durch das Ausspülen der Säule aufgefangen werden. Bei der sogenannten Depletion hingegen passieren die Zellen die Säule, da sie nicht magnetisch markiert sind und sammeln sich im Durchfluss an.

#### 5.3.3 Isolation von Tregs

Die Zellisolation zur Expansion und Evaluierung der anti-TIRC7 Antikörper auf Tregs, erfolgte unter Verwendung des CD25 Microbeads II human Kits von Miltenyi.

Vorbereitend auf die Zellsortierung wurden die PBMCs mit dem MACS Running Buffer gewaschen und zentrifugiert. Zur magnetischen Markierung der Zielzellen wurden die CD25 Microbeads zu den Zellen addiert und für 15 Minuten inkubiert. Um nicht gebundene, überschüssigen CD25 Microbeads auszuwaschen, erfolgte nach der Inkubation ein erneuter Waschschrift, sodass die Zellen nach Aufnahme im MACS Buffer sortiert werden konnten.

#### Magnetische Zellsortierung

Die Selektion der Tregs erfolgte mit dem MACS Separator unter Verwendung von 2\* LS Säulen. Da es sich hierbei um eine positive Selektion handelt, wurden die Zielzellen nach Passage durch die Säule in dieser zurückgehalten. Nach Entnahme der Säule aus dem MACS Separator wurden diese mit dem MACS Buffer aus der Säule ausgespült, in einem Falcon Tube aufgefangen und zentrifugiert. Zur Erhöhung der Reinheit wurden die zuletzt genannten Arbeitsschritte wiederholt.

Der mit den CD25- Zellen angereicherte Durchfluss wurde in einem Falcon Tube aufgefangen und zur Isolation der CD4+CD25- T-Zellen eingesetzt.

#### 5.3.4 Isolation von CD4+CD25- T-Zellen

Die Isolation der CD4+CD25- T-Zellen zur Evaluierung der Bindungseigenschaften sowie zur weiteren funktionellen Analyse des selektierten anti-TIRC7 Klons, mAb g im Rahmen der MLRs erfolgte mit dem CD4+ T Cell Isolation Kit human und den CD25 Microbeads II human von Miltenyi. Hierfür wurde der mit CD25- Zellen angereicherte Durchfluss aus 5.3.3 verwendet und anschließend für CD4+ T-Zellen angereichert. Die Zellen wurden zunächst zentrifugiert, die Zellzahl bestimmt und das Zellpellet im MACS Buffer resuspendiert. Das CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail sowie das CD4+ T Cell MicroBead Cocktail wurden nacheinander der Zellsuspension hinzugefügt und inkubiert. Die Zellsortierung erfolgte mittels einer LD Säule. Da es sich hierbei um eine negative Selektion handelt, wurden die CD4+ und CD25- Zielzellen im Durchfluss angereichert. Wurden die CD4+CD25- T-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt eingesetzt, so wurden diese kryopräserviert. Hierzu wurden jeweils eine Million Zellen in 90% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) bei einem Endvolumen von 1ml in Kyrotubes überführt und bei -80°C gelagert. Das Wiederauftauen der Zellen erfolgte in einem 36°C heißen Wasserbad.

#### 5.3.5 Isolation von Dendritischen Zellen des peripheren Blutes

Dendritische Zellen wurden für die allogene Stimulierung der CD4+CD25- T-Zellen ebenfalls mittels MACS isoliert. Hierfür wurde das Blood Dendritic Cell Isolation Kit II human von Miltenyi verwendet. Im ersten Schritt wurden nicht-dendritische Zellen magnetisch markiert (Depletion). Anschließend wurden der Durchfluss für DCs angereichert. Da es sich hierbei um eine (positive Selektion) handelt, wurden die in der Säule zurückgehaltenen Zellen ausgespült, aufgefangen, zentrifugiert und anschließend die Zellzahl bestimmt.

#### 5.3.6 Isolation von TIRC7+ Tregs

Die Gewinnung der TIRC7+ Tregs erfolgte nach Expansion ebenfalls mittels MACS. Hierfür wurde der anti-TIRC7 mAb g im Deutschen Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) mit Biotin gekoppelt. Die Zellen wurden mit dem MACS Buffer gewaschen, CD3/CD28 Microbeads via MACsiMAG Separator von Miltenyi Biotec entfernt und mit dem biotinylierten mAb g inkubiert. Im Anschluss wurden die anti-Biotin Microbeads zugefügt und nach Passage der Zellen durch eine MS Säule die TIRC7+ Tregs aufgefangen.

## **5.4 Polyklonale Treg-Expansion**

Für die polyklonale Expansion der Tregs wurden das Treg Expansion Kit human von Miltenyi Biotec sowie das TexMACS™ Medium verwendet. Das TexMACS™ Medium wurde mit 10% humanem AB Serum, 1000 IU/ml rekombinant humanem (rHu) IL-2 sowie 100 ng/ml Rapamycin angereichert. Die isolierten Tregs wurden mit dem Medium gewaschen, und CD3/CD28 MACSiBeads den Tregs hinzugefügt (4:1/ Beads:Tregs). Die Expansion erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5% und wurde nach 21 Tagen beendet. Eine Restimulierung der Zellen erfolgte nach 7 und 14 Tagen (1:1/ Beads:Tregs). Zum Entfernen der Beads wurde der MACsiMAG Separator verwendet.

## **5.5 Funktionelle Assays**

### 5.5.1 Allogene MLRs-Gemischte Lymphozyten Reaktion

Im Rahmen dieser Studie wurden verschiedene Set-ups an MLRs durchgeführt, deren Ziel es war die Proliferation und bestimmte Zytokine unter verschiedenen Konditionen mittels ELISA zu messen.

### Testung der Suppressoraktivität der Tregs und Antikörper

Frisch isolierte und auch expandierte Tregs/Treg-Subsets von gesunden Probanden und Patienten mit PsA und RA (nicht gezeigt) wurden in MLRs hinsichtlich ihrer Funktion untersucht. Ebenso wurde in diesen Versuchsreihen die Wirkung des anti-TIRC7 mAbs untersucht (nicht gezeigt). Hierfür wurden Tregs und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen vom selben Spender mit allogenen DCs stimuliert und mit oder ohne den anti-TIRC7 Antikörper oder einer Isotyp-Kontrolle bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach einer Inkubationsperiode von fünf Tagen wurden die Platten zentrifugiert, 50 µl des Überstandes für die Messung von Zytokinen abgenommen und bei -80°C gelagert. Für die Messung der Proliferation mittels ELISA wurden die Zellen für weitere 16-18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit dem 5-Bromo-2'-desoxyuridin Reagenz (BrdU) inkubiert.

### 5.5.2 BrdU Proliferations-Assay ELISA

Zur Messung der Proliferation mittels ELISA wurden die Zellen für weitere 16-18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit dem BrdU inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden nacheinander der anti-BrdU-POD Antikörper sowie die Substrat-Lösung hinzugefügt und inkubiert. Abschließend wurde die Stop- Lösung addiert und die quantitative Proliferation mittels eines ELISA Readers und der geeigneten Software bestimmt.



### Prinzip des BrdU ELISAs

Beim BrdU handelt es sich um ein Pyrimidin-Analogon, welches während der S-Phase des Zellzyklus anstelle des Thymidins in die proliferierenden Zellen eingebaut wird. Hierzu werden die Zellen wie bereits beschrieben bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für weitere 16-18 Stunden mit dem BrdU reinkubiert. Nachdem die Zellen fixiert und permeabilisiert wurden, wird ein mit POD konjugierter anti-BrdU-Antikörper addiert. Hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper. Dieser bindet an das BrdU, das zuvor in die DNA eingebaute wurde. Nach Inkubation der Zellen mit der Substrat-Lösung kommt es zu einem blauen Farbumschlag. Dies ist durch die chemische Reaktion zu begründen, die hierbei stattfindet. Das Tetramethyl-Benzidin der Substratlösung reagiert mit dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Bildung von Wasser. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Peroxidase POD. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag, nachdem das farblose Chromogen durch die freiwerdenden Protonen oxidiert wurde. Der Versuch kann an dieser Stelle beendet werden. Dies hat zur Folge, dass die quantitative Proliferation mittels eines ELISA Readers und einer geeigneten Software unmittelbar ermittelt werden muss. Durch die Hinzugabe einer Stop-Lösung ist es aber auch möglich die Messung der Proliferation zu einem späteren Zeitpunkt vorzunehmen. Dies wird durch die Bildung eines stabilen gelben Farbkomplexes zwischen dem Tetramethylbenzidin und der Schwefelsäure, die in der Stop-Lösung enthalten ist, ermöglicht (86).

### **5.6 Durchflusszytometrie**

Die Ermittlung der Apoptose auf frisch isolierten Tregs zur Evaluierung der anti-TIRC7 Klone, sowie die phänotypischen Analysen der Zellen und die Analysen der Reinheit der MACS erfolgten mittels Durchflusszytometrie mit dem BD FACS Canto II und der entsprechenden Software der Firma. Die Färbung der Zellen erfolgte in 96er Rundboden-Platten. Für die Oberflächenfärbung wurde ein sogenannter Master-Mix-Cocktail mit den entsprechenden Oberflächenantikörpern unter Beachtung der jeweiligen Verdünnungen hergestellt. Nach dem die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung angereichert mit EDTA und Proteinen (PBE) oder PBS gewaschen wurden, wurde 50 µl des Cocktails zu den Zellen addiert und für 15 Minuten bei 4°C und im Dunkeln inkubiert. Zum Auswaschen der nicht gebundenen, überschüssigen Antikörper erfolgte ein erneuter Waschschrift mit PBE.

Für zusätzliche intrazelluläre Färbungen wurde das Fixation and Permeabilization Kit von Invitrogen by Thermo Fisher Scientific verwendet. Hierfür wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung zunächst fixiert und anschließend permeabilisiert. Für die intrazelluläre

Färbung wurden die entsprechenden Antikörper im Permeabilization Buffer (1X) resuspendiert und jeweils 50 µl zu den Zellen addiert und für 30 Minuten bei 4°C und im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte unmittelbar nach der Färbung mit dem BD FACS Canto II und der entsprechenden Software der Firma. Wurde die Messung zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt, so wurden die Zellen bis zur Messung bei 4°C und im Dunkeln gelagert.

#### 5.6.1 Apoptose Assay auf Tregs

Die durchflusszytometrische Analyse der Apoptose auf frisch isolierten Tregs nach Inkubation mit den anti-TIRC7 Antikörpern zur Evaluierung der verschiedenen Klone wurde mit dem FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD der Firma Biolegend durchgeführt. Hierzu wurden MACS isolierte Tregs mit 1 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert, mit oder ohne den anti-TIRC7 Antikörper (40 µg/ml) oder dem jeweiligen Kontrollantikörper (IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3) für 72 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationsperiode wurden die Zellen nach Anleitung des Färbeprotokolls vom Hersteller mit den jeweiligen Antikörpern, Annexin V und 7-AAD gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

#### 5.6.2 Phänotypische Analyse frisch isolierter und expandierter Tregs

Zur Ermittlung der Reinheit des MACS, sowie der Beurteilung der Stabilität der expandierten Tregs erfolgte eine phänotypische Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie, dem BD FACS Canto II und der entsprechenden Software der Firma. Die CD3/CD28 Microbeads, die für die Expansion eingesetzt wurden, wurden vor der Färbung der expandierten Tregs entfernt.

Zur Oberflächenfärbung wurden folgende Antikörper eingesetzt: anti-CD4, anti-CD25-, anti-CD127 und Live/Dead dye. Die Oberflächenfärbung als auch die intrazelluläre Färbung für FoxP3 erfolgte wie bereits unter 5.6 beschrieben. Die Messung erfolgte mit dem BD FACS Canto II. Die anschließende Analyse der Fcs Files wurde mit Flowjo Version 10.0 durchgeführt.

<u>PANEL</u>	<u>VERDÜNNUNG</u>
• anti-CD4-APC/Fire	(1/100)
• anti-CD25-PE/Cy5	(1/100)
• anti-CD127-APC	(1/100)
• Live/Dead Dye-Zombie Green	(1/400)
ODER	
• Live/Dead -Vio Green	(1/100)
• anti-FoxP3-Alexa Fluor488	(1/100)
ODER	
• anti-FoxP3-Pacific Blue	(1/100)

### 5.6.3 Bestimmung der TIRC7 Expression auf PBMCs (CD4+ T-Zellpopulation)

Um unspezifische Bindungen des anti-TIRC7 Antikörpers zu verhindern, wurden die Zellen vor der Oberflächenfärbung mit dem Fc-Rezeptor (FcR) blocking Reagenz inkubiert. Hierfür wurde das FcR Blocking Reagenz im Verhältnis 1:10 in PBE resuspendiert und jeweils 50 µl der Suspension zu den Zellen addiert und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung für das TIRC7 mit den jeweiligen direkt-konjugierten anti-TIRC7 mAbs.

Für die Oberflächenfärbung der PBMCs wurden neben dem anti-TIRC7 folgende weitere Antikörper verwendet: anti-CD3, anti-CD4 sowie Live/Dead dye. Hierfür wurde ein Master-Mix-Cocktail mit den entsprechenden Oberflächenantikörpern unter Beachtung der jeweiligen Verdünnungen hergestellt und jeweils 50 µl des Cocktails zu den Zellen hinzugegeben und inkubiert. Zum Auswaschen der nicht gebundenen überschüssigen Antikörper erfolgte ein erneuter Waschschrift.

Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen anschließend in 200 µl PBE aufgenommen und in FACS Tubes überführt. Die Messung erfolgte unmittelbar mit dem BD FACS Canto II.

<u>PANEL</u>	<u>VERDÜNNUNG</u>
• anti-CD3-APC	(1/100)
• anti-CD4-PE/Cy5	(1/100)
• Live/Dead-DAPI	(1/400)
• anti-TIRC7-FITC	(20µg/ml)

#### 5.6.4 Bestimmung der TIRC7 Expression auf frisch isolierten Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>)

Zur Bestimmung der TIRC7 Expression auf frisch isolierten Tregs wurde das CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit II, human der Firma Miltenyi verwendet und die Zellen mittels MACS isoliert.

Die Tregs wurden zunächst mit dem konjugierten anti-TIRC7 Antikörper inkubiert. Nicht gebundene, überschüssige Antikörper wurden im Anschluss ausgewaschen.

Zur weiteren Oberflächenfärbung wurden folgende Antikörper eingesetzt: anti-CD4, anti-CD25, Live/ Dead dye sowie anti-CD127. Unter Beachtung der jeweiligen Verdünnungen wurde ein Master-Mix-Cocktail in PBE oder PBS mit den oben aufgeführten Oberflächenantikörpern hergestellt, zu den Zellen addiert und inkubiert. Auch hier wurden die nicht-gebundenen Antikörper ausgewaschen. Die intrazelluläre Färbung für FoxP3 erfolgte wie zuvor beschrieben. Die durchflusszytometrischen Analysen erfolgten mit dem BD FACS Canto II.

#### 5.6.5 Analyse der Wirkung des selektierten anti-TIRC7 Antikörpers (mAb g) auf Zellsubsets

Zur Bestimmung der Wirkung des selektierten mAb g auf Zellsubsets: CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Tregs, wurden zunächst PBMCs mit oder ohne den anti-TIRC7 mAbg oder dem entsprechenden Kontrollantikörper für 72 Stunden ko-inkubiert und nach den oben genannten unterschiedlichen Zielpopulationen gegatet. Die Stimulierung der Zellen erfolgte mit 1000 IU/ml rHu IL-2. Für die Analyse wurden zwei unterschiedliche Panels verwendet, die sich wie folgt zusammensetzten: PANEL 1 (Live/Dead, anti-CD3 sowie anti-CD4) und PANEL 2 (Live/Dead, anti-CD4, anti-CD25, anti-CD127, anti-FoxP3, anti-IL-10).

<u>PANEL</u>	<u>VERDÜNNUNG</u>
• anti-CD4-APC/Fire	(1/100)
• anti-CD25-PE/Cy5	(1/100)
• anti-CD127-APC	(1/100)
• Live/Dead Dye-Zombie Green	(1/400)
ODER	
• Live/Dead-Vio Green	(1/100)
• anti-FoxP3-Pacific Blue	(1/100)
ODER	
• anti-FoxP3-Alexa Fluor488	(1/100)
• anti-TIRC7-FITC	(20µg/ml)
• anti-IL-10-PE	(1/100)

#### 5.6.6 Phänotypische Analyse expandierter TIRC7+ Tregs sowie der mit mAb g expandierter Tregs

Die phänotypische Analyse zur Bestimmung der Reinheit des MACS für TIRC7+ Tregs und die phänotypische Analyse der mit dem mAb g expandierten Tregs erfolgte nach dem Protokoll wie zuvor unter 5.6.4 beschrieben. Die Oberflächenfärbung TIRC7+ Tregs erfolgte unter Verwendung folgender Oberflächenantikörper: anti-CD4, anti-CD25-, anti-CD127, Live/ Dead dye sowie anti-CTLA-4. Die intrazelluläre Färbung für das FoxP3 und das IL-10 erfolgten wie zuvor beschrieben.

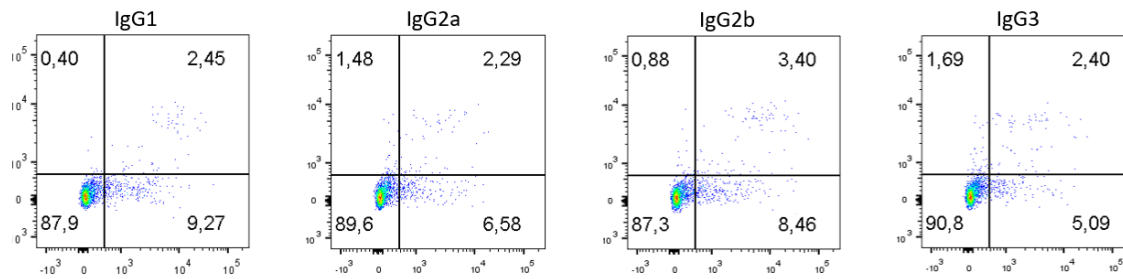
<u>PANEL</u>	<u>VERDÜNNUNG</u>
• anti-CD4-APC/Fire	(1/100)
• anti-CD25-PE/Cy5	(1/100)
• anti-CD127-APC	(1/100)
• Live/Dead-Vio Green	(1/100)
• anti-CTLA-4-PE/Cy7	(1/100)
• anti-TIRC7-FITC	(20µg/ml)
• anti-FoxP3-Pacific Blue	(1/100)
• anti-IL-10-PE	(1/100)

## 6. Ergebnisse

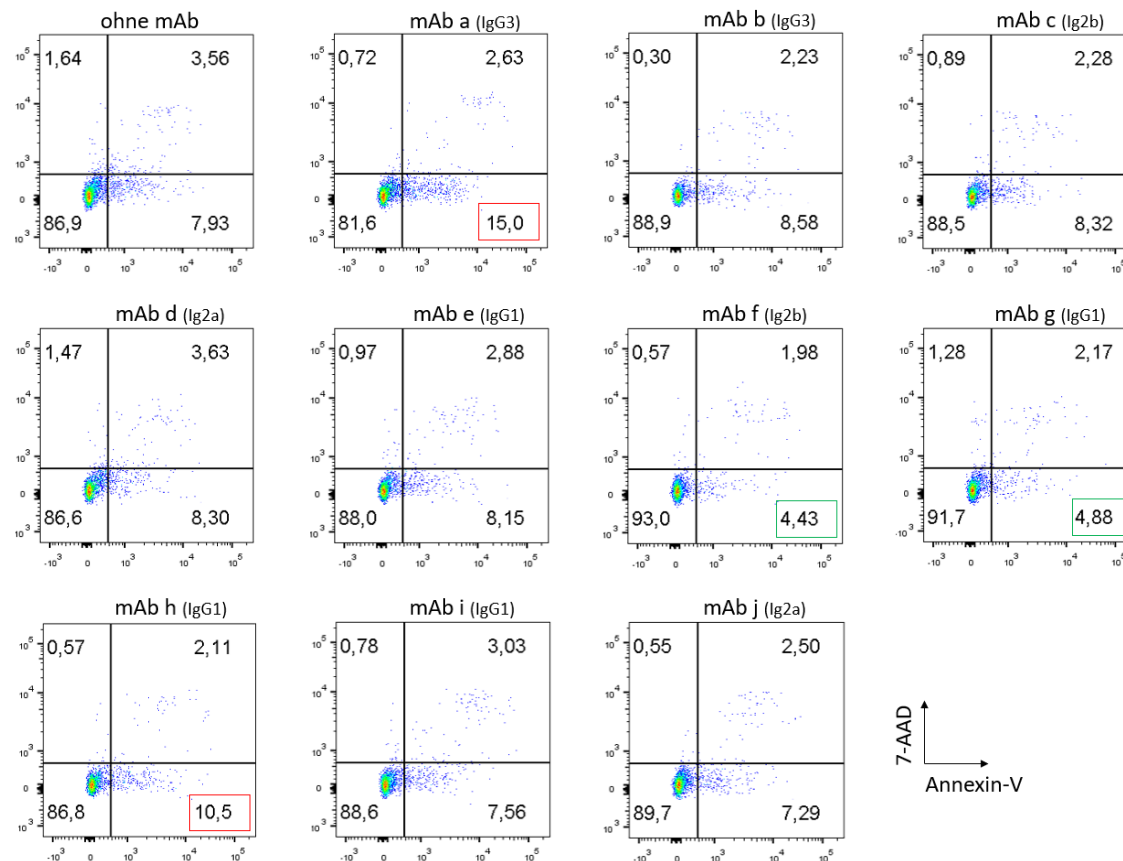
### 6.1 Evaluierung der anti-TIRC7 mAbs a-j: Allogene MLRs (One-Way) und Apoptose Assays

In den Vorversuchen wurden verschiedene anti-TIRC7 Antikörper (SIFIN Diagnostics GmbH) zunächst in Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) von gesunden Probanden *in* MLRs getestet (Daten nicht gezeigt). Eine verminderte Proliferation der T Effektorzellen nach Inkubation mit den anti-TIRC7 Antikörpern im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollantikörpern (IgG1, IgG3, IgG2a und IgG2b, Biolegend) und einer Negativkontrolle (ohne Antikörper) konnte wie durch Utku *et al.* beschrieben, ebenfalls beobachtet werden (78, 79). Während die anti-TIRC7 Antikörper a, b, c und d eine deutliche proliferationshemmende Wirkung zeigten, wirkten die Klone e und f weniger inhibitorisch. Überstände dieser Ansätze wurden zur Bestimmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine anhand kommerzieller ELISA Kits (Biolegend) analysiert. Die inhibitorischen Effekte der verschiedenen Klone konnte auf die Produktion der Zytokine: IFN- $\gamma$  und IL-2 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Parallel hierzu erfolgte die Evaluierung der anti-TIRC7 Antikörper auf Tregs in Form von Apoptose Assays in gesunden Kontrollprobanden. Das Ziel dieser Versuchsreihe war es die Wirkung der verschiedenen anti-TIRC7 Klone (mAb a-j) auf den Tregs zu ermitteln, um einen geeigneten anti-TIRC7 Klon für die spätere Selektion der TIRC7+ Tregs auszuwählen. Eine Induktion der Apoptose in den Treg-Zellkulturen konnte für die TIRC7 Antikörper a und h mit einer Zunahme der Population früh-apoptotischer Tregs (Annexin+ 7-AAD-Population) gezeigt werden. Im Vergleich dazu führt die Inkubation mit dem Antikörper f und g zu einer Verminderung innerhalb der Annexin+7-AAD- Population. Die restlichen Antikörper (mAb c, d, e, i und j) zeigten im Vergleich zu den Kontrollantikörpern und der Negativkontrolle ohne Antikörper keine apoptotische Wirkung auf den Tregs (Abbildung 1).



a)



b)

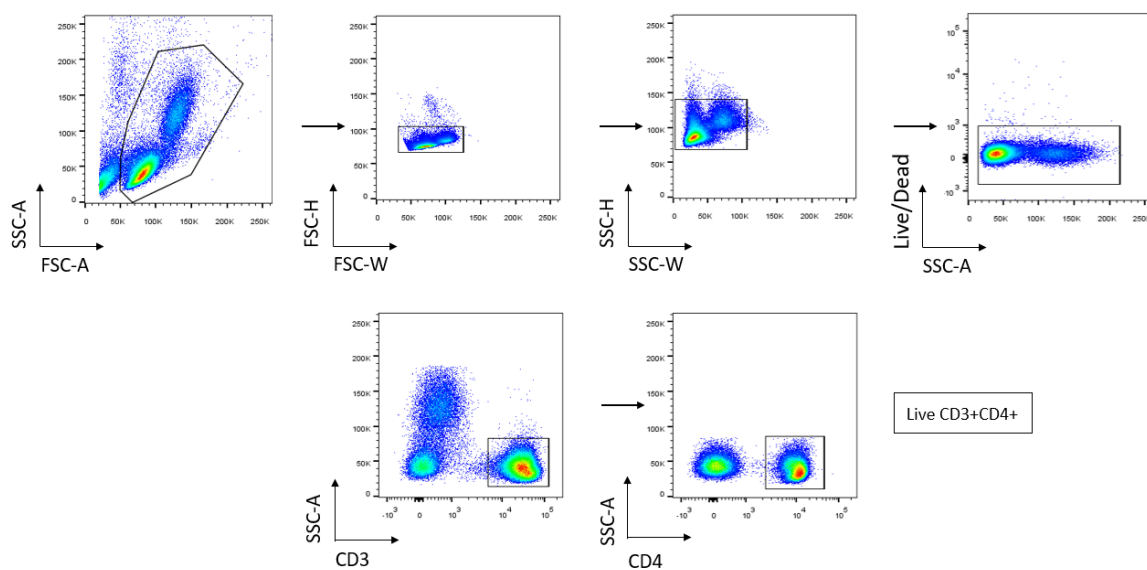
### Abbildung 1: Evaluierung der anti-TIRC7 mAbs auf Tregs: Apoptose Assay

20.000 frische MACS isolierte Tregs wurden mit PHA (1 µg/ml) stimuliert und mit oder ohne den jeweiligen TIRC7 Klon (a-j), siehe b) oder dem entsprechenden Kontrollantikörper (IgG1, IgG2a, IgG2b oder IgG3) inkubiert (conc.40 µg/ml), siehe a). Nach einer Inkubationsperiode von 72 Stunden wurden die Zellen mit FITC-Annexin-V und PerCP-Cy5.5-7-AAD gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die früh-apoptotische Zellen als: (Annexin-V+/7-AAD- Population) sowie spät-apoptotische Zellen als: (AnnexinV+/7-AAD+ Population). Die Analyse der FACS Daten erfolgte mit FlowJo Version 10.0. Dargestellt ist ein exemplarisches Beispiel aus fünf voneinander unabhängig durchgeführter Experimente in gesunden Kontrollprobanden.

## 6.2 Bindung des anti-TIRC7 Antikörpers auf Lymphozyten

Ausgehend von den Ergebnissen der Versuchsreihen unter 6.1 wurden drei ausgewählte Klone zur Bestimmung der TIRC7 Expression eingesetzt und die Bindungseigenschaften dieser Klone im Rahmen der Durchflusszytometrie analysiert.

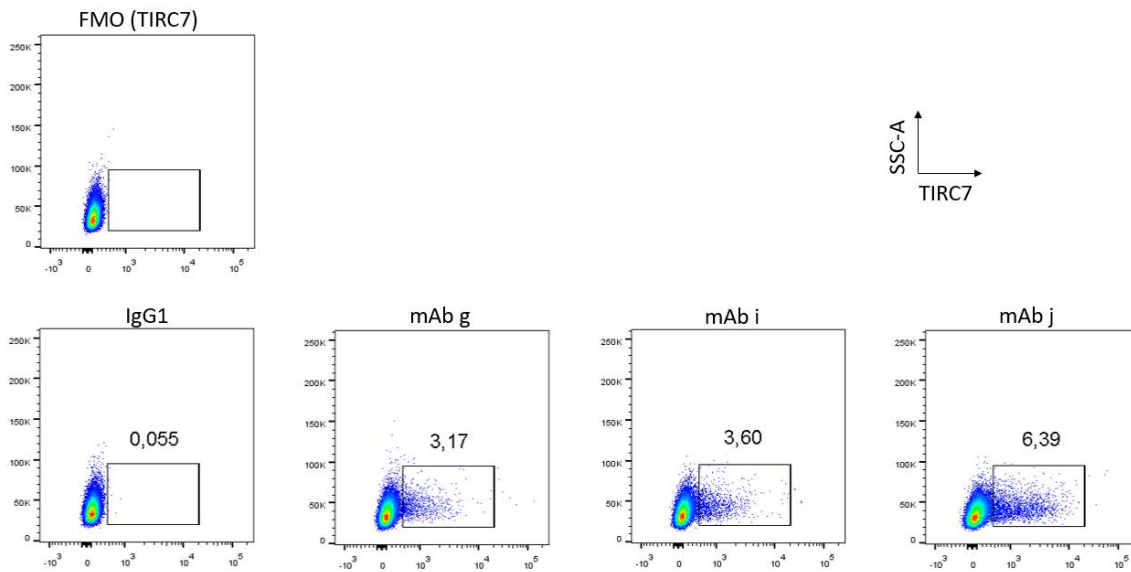
Ein repräsentatives Beispiel der „*Gating Strategie*“ ist in Form eines Dot Plots in Abbildung 2 dargestellt. Die durchflusszytometrische Analysen zeigten eine TIRC7 Expression auf den nach CD4<sup>+</sup> T-Zellen gateden PBMCs mit allen drei Klonen (Abbildung 3). Klonabhängige Unterschiede, wie sie zuvor in den funktionellen Assays, MLRs festgestellt wurden, zeigten sich auch hinsichtlich der Bindungseigenschaften der Klone. Im Vergleich zu Klon g und i konnte mit Klon j eine höhere TIRC7 Expression auf der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation beobachtet werden. So betrug der Mittelwert für die TIRC7 Expression auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Klon j (MW=4,88; SD±1,45). Die Mittelwerte der TIRC7 Expression für Klon g und i stellten sich wie folgt dar: mAb g (MW=2,3; SD±1,01) und mAb i (MW=2,63; SD±1,18), (Abbildung 3).



**Abbildung 2: Bestimmung der TIRC7 Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen „*Gating Strategie*“**

Zur Bestimmung der TIRC7 Expression wurden jeweils 100.000 frisch isolierte PBMCs eingesetzt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen vor der Oberflächenfärbung mit dem FcR Blocking Reagenz behandelt. Die Zellen wurden zunächst mit den FITC konjugierten anti-TIRC7 mAbs (Klon g, i oder j) inkubiert. Anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung mit folgenden Antikörpern: Live/Dead-DAPI, anti-CD3-APC sowie anti-CD4-PE Cy5.5. Die Analyse der FACS Daten erfolgte mit FlowJo Version 10.0.





**Abbildung 3: Bestimmung der TIRC7 Expression auf CD4+ T- Zellen** „Expressionsanalyse“

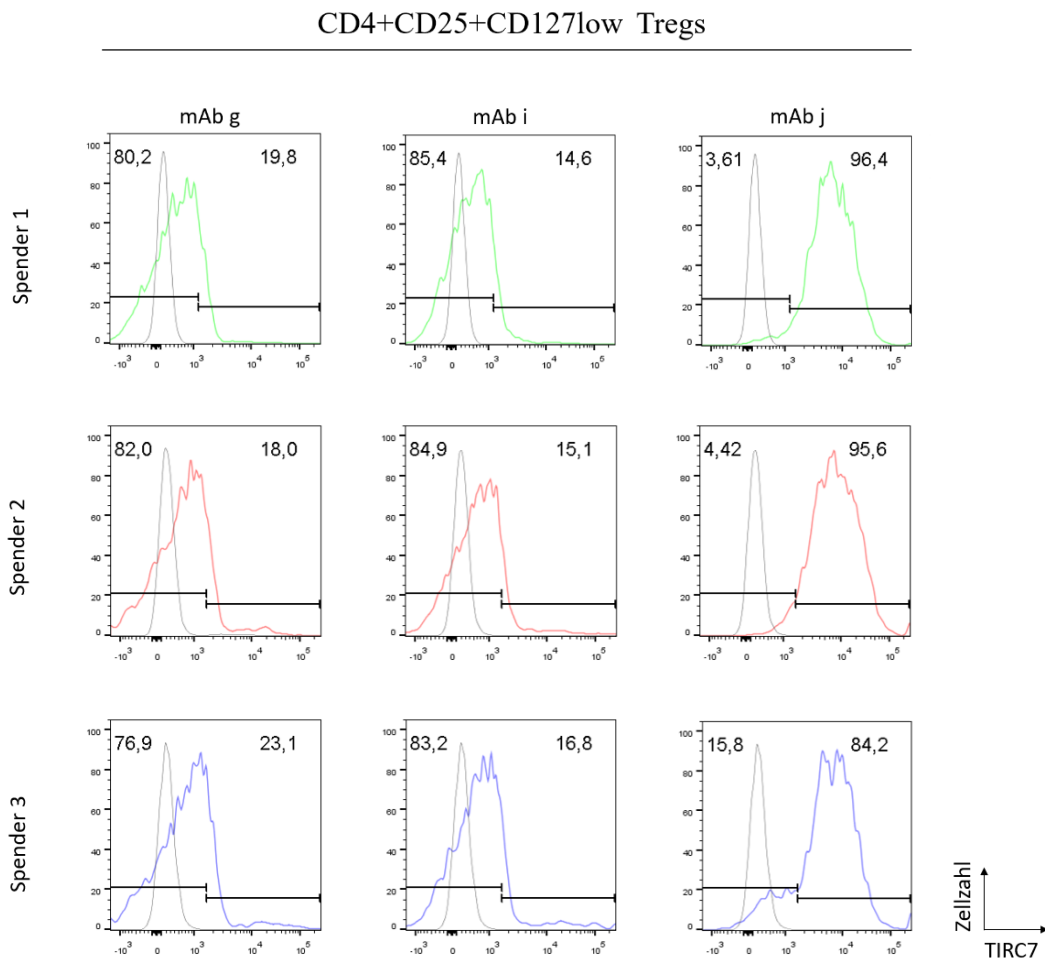
Durchflusszytometrische Analyse der TIRC7 Expression auf ruhenden, nach CD4+ T-Zellen getateten PBMCs mit den Klonen g, i und j sowie die Kontrollen: FMO (= Fluorescence Minus One) für TIRC7 und Isotyp-Kontrolle (IgG1). Das Panel für die Oberflächenfärbung setzte sich wie folgt zusammen: FITC konjugierter anti-TIRC7 mAb (Klon g, i oder j), Live/Dead-DAPI, anti-CD3-APC, anti-CD4-PE Cy5.5. Die Analyse der FACS Daten erfolgte mit FlowJo Version 10.0. Exemplarisches Beispiel aus fünf voneinander unabhängig durchgeführter Experimente in gesunden Kontrollprobanden.

### 6.3 Expressionsanalyse von TIRC7

#### CD4+CD25+CD127low Tregs

Um die Effekte der monoklonalen anti-TIRC7 Antikörper (mAb) auf frisch isolierten, nicht aktivierten Tregs zu analysieren, wurde die TIRC7 Expression auf MACS isolierten CD4+CD25+CD127low Tregs von gesunden Kontrollprobanden untersucht. Hierzu wurden wie zuvor auch unter 6.2 die Klone g, i und j eingesetzt. Grund hierfür waren vorläufige Ergebnisse parallel stattgefundenener Apoptose Assays auf Tregs mit den Klonen a-j (Abbildung 1). Da einige der anti-TIRC7 Klone (mAb a und h) zu einer Zunahme innerhalb der Population früh-apoptotischer Tregs führten, d.h eine Tendenz zur Induktion der Apoptose auf den Tregs zeigten, wurden diese in weiteren Versuchen mit Tregs nicht mehr eingesetzt. Eine TIRC7 Expression auf Tregs konnte mit allen eingesetzten Klonen beobachtet werden. Es zeigten sich jedoch große Diskrepanzen in Bezug auf die Bindungseigenschaften und somit die Expressionsrate mit den unterschiedlichen Klonen.

So betrug der Mittelwert für die TIRC7 Expression auf Tregs mit Klon j (MW=92,06; SD±6,82). Die Mittelwerte der TIRC7 Expression für Klon g und i auf Tregs stellten sich wie folgt dar: mAb g (MW=20,3; SD±2,58) und mAb i (MW=15,5; SD±1,15), (Abbildung 4).



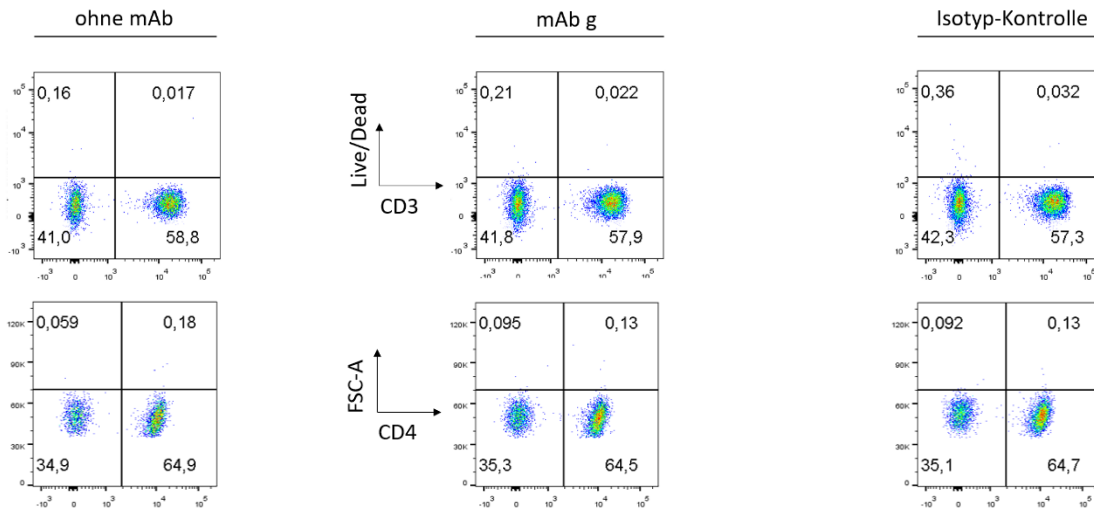
**Abbildung 4: Bestimmung der TIRC7 Expression auf frisch isolierten Tregs „Expressionsanalyse“**

Durchflusszytometrische Analyse der TIRC7 Expression auf frisch isolierten, nicht aktivierten CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> Tregs (MACS) von gesunden Spendern. Dargestellt sind drei von insgesamt fünf voneinander unabhängig durchgeführte Expressionsanalysen der extrazellulären TIRC7 Expression mit den anti-TIRC7 Klonen g, i und j in Form von Histogrammen. Bei den anti-TIRC7 Klonen handelt es sich um FITC konjugierte mAbs. Die Analyse der Daten erfolgte mit FlowJo Version 10.0.

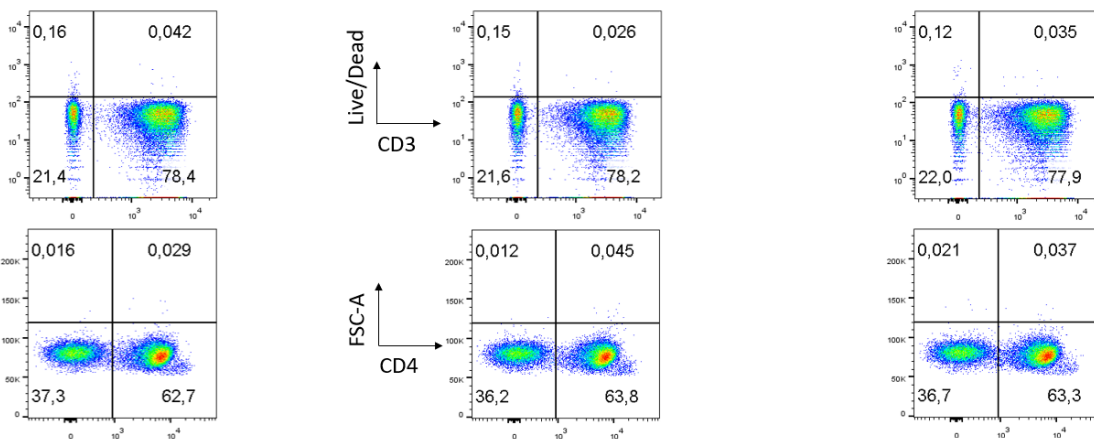
#### **6.4 Funktionelle Analyse des anti-TIRC7 Antikörpers auf Zellsubsets**

Anschließend untersuchten wir die Wirkung des für die weiteren Versuchsreihen und den späteren Sort der TIRC7<sup>+</sup> Tregs ausgewählten anti-TIRC7 Klons (mAb g) auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen, (Abbildung 5) und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Tregs, (Abbildung 6) in Ko-Inkubations-Assays mittels Durchflusszytometrie. Im Vergleich zur Isotypkontrolle und der Negativkontrolle (ohne mAb) konnte eine Verschiebung der Zellsubsets innerhalb des PANEL 1 nach 72-stündiger Ko-Inkubation mit dem anti-TIRC7 Klon g nicht beobachtet werden. Innerhalb der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> Population hingegen zeichnete sich bereits eine Tendenz der Induktion der IL-10<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs nach 72-stündiger Ko-Inkubationsperiode mit dem anti-TIRC7 Antikörper ab: ohne mAb (MW=13,87,12; SD±2,28), mAb g (MW=15,23; SD±4,93) und Isotypkontrolle (MW= 13,23; SD±2,36).

„Zeitpunkt Null“ CD3+CD4+



„72 Stunden nach Aktivierung“ CD3+CD4+

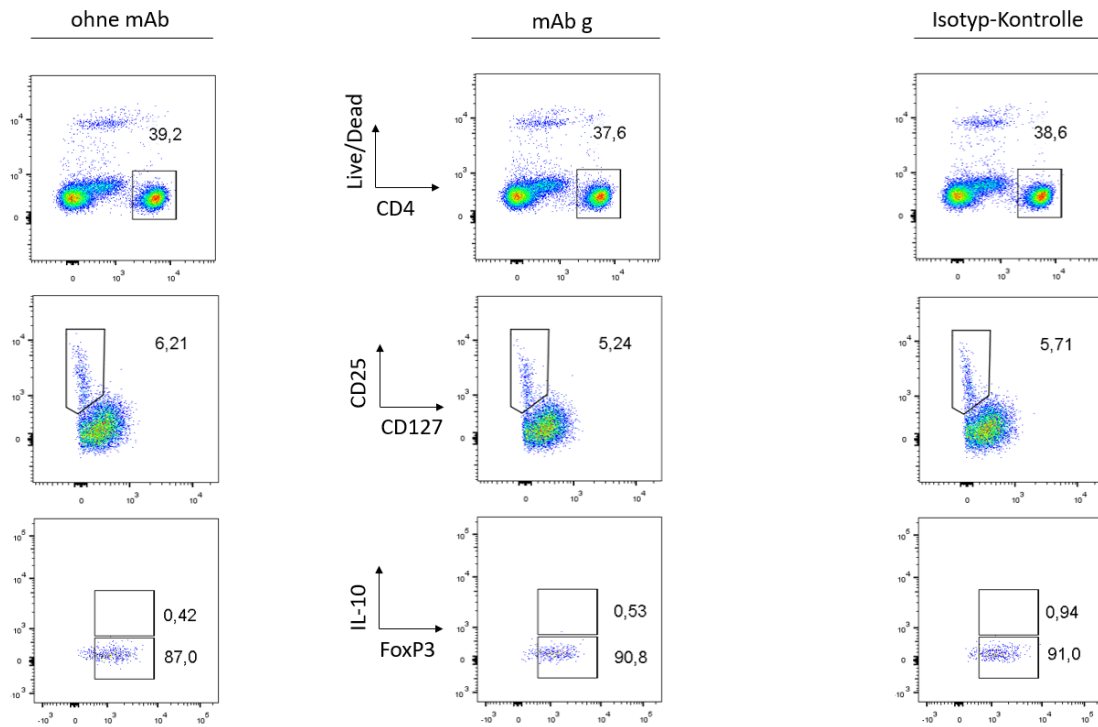


**Abbildung 5: Effekt des anti-TIRC7 mAb g auf Lymphozyten-Population nach Inkubation**

Durchflusszytometrische Analyse des Ko-Inkubations Assays mit dem anti-TIRC7 Klon g (mAb g). Gezeigt wird die Wirkung des anti-TIRC7 Antikörper nach Ko-Inkubation mit oder ohne den anti-TIRC7 mAb g oder der Isotyp-Kontrolle auf den PBMCs ( $1 \times 10^5$ ) eines gesunden Spenders zum „Zeitpunkt Null“ sowie „72 Stunden nach Aktivierung“. Die Stimulierung der Zellen erfolgte mit rHu IL-2 (1000 IU/ml). Das Panel für die Oberflächenfärbung setzte sich wie folgt zusammen: Live/Dead-DAPI, CD3-APC und CD4- PE- Cy5.5. Die Analyse der FACS Daten erfolgte mit FlowJo Version 10.0. Exemplarische Darstellung von insgesamt drei voneinander unabhängig durchgeführter Versuchsansätze.

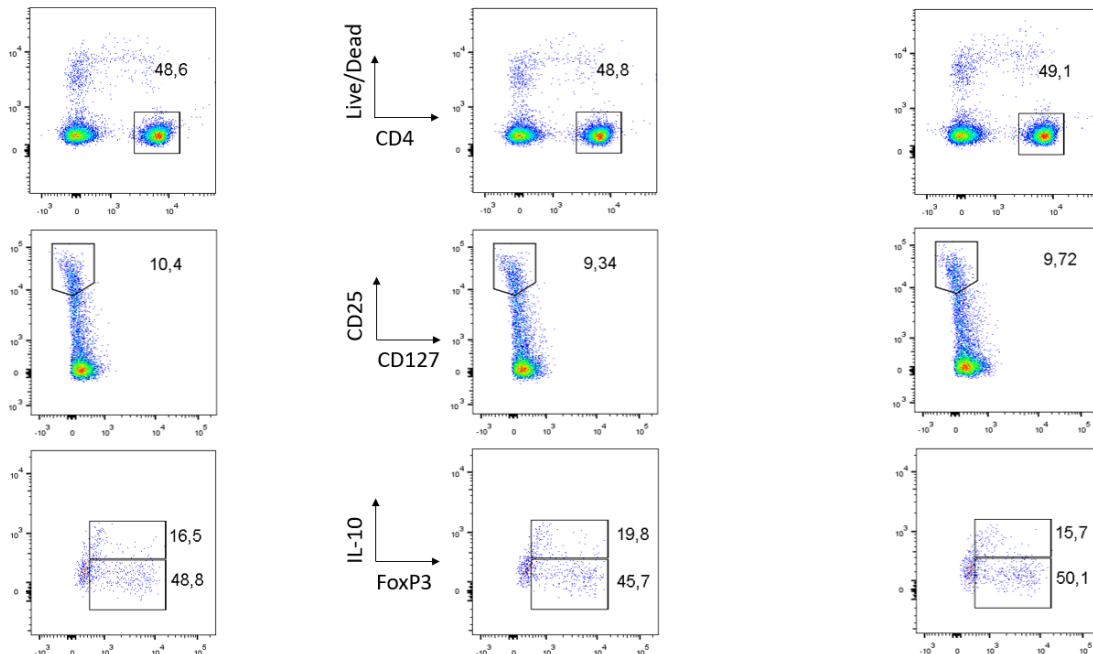
„Zeitpunkt Null“

CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>Tregs



„72 Stunden nach Aktivierung“

CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>Tregs

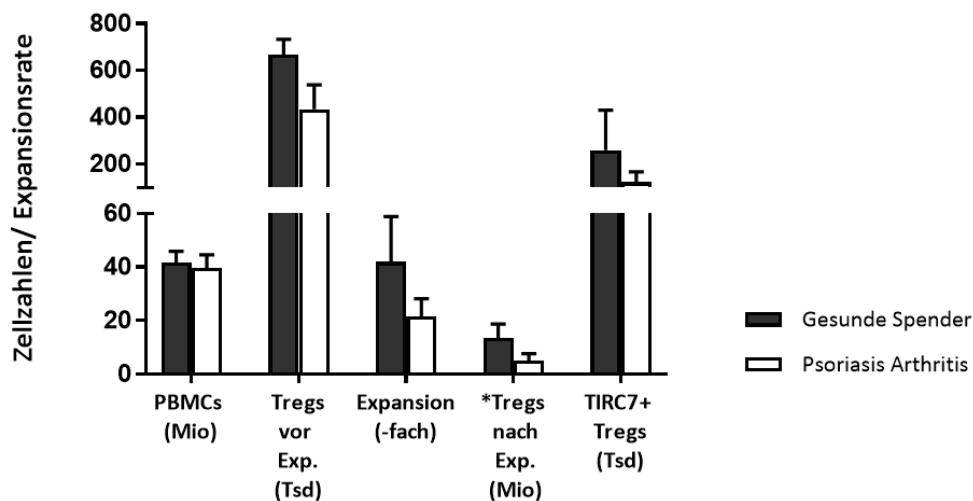


**Abbildung 6: Effekt des anti-TIRC7 mAb g auf Treg-Subsets**

Durchflusszytometrische Analyse des Ko-Inkubations Assays mit dem anti-TIRC7 Klon g (mAb g) oder einer Isotypkontrolle auf den PBMCs ( $1 \times 10^5$ ) eines gesunden Spenders nach Stimulierung mit rHu IL-2 (1000 IU/ml). Das Panel setzte sich wie folgt zusammen: Live/Dead-AmCyan, CD4-APC-Cy7, CD25-PE-Cy5.5, CD127-APC, FoxP3-Pacific Blue, IL-10-PE. Die Analyse der FACS Daten erfolgte mit FlowJo Version 10.0. Exemplarische Darstellung insgesamt drei voneinander unabhängig durchgeführter Versuchsansätze.

## 6.5 Polyklonale Expansion der T regulatorischen Zellen

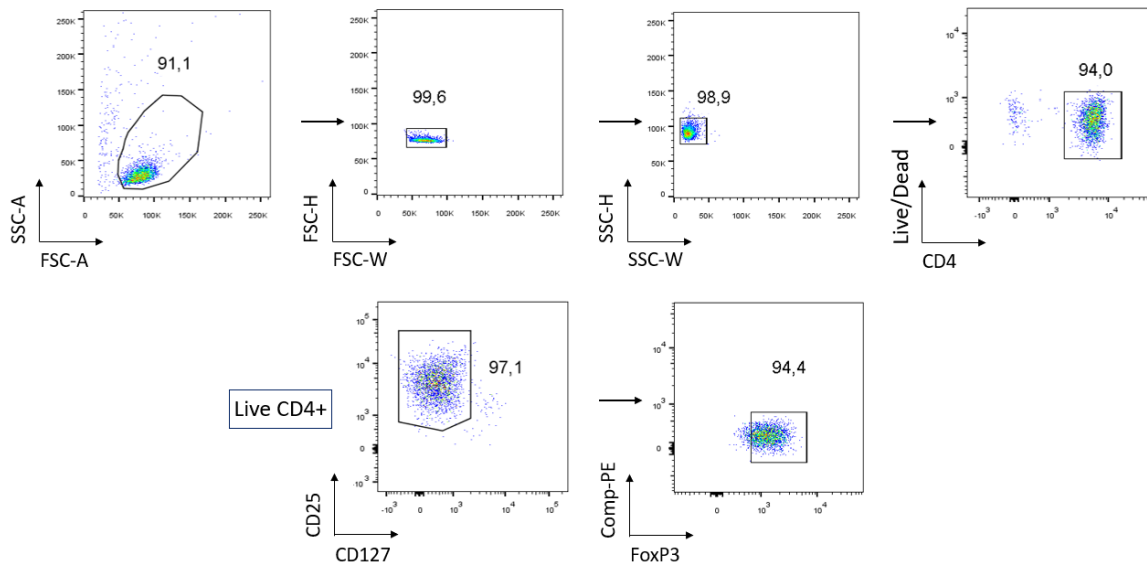
Die Expansion der unter 6.6 sowie später unter 6.7 und 6.8 eingesetzten Tregs erfolgte polyklonal über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die initialen Zellzahlen der PBMCs sowie die daraus gewonnenen Tregs für die Treg-Zellexpansion sind für die jeweiligen Gruppen in der Abbildung 7 aufgeführt. Die Reinheit der mittels MACS isolierten und für die Expansion eingesetzten Tregs sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt. Im Vergleich zur Ausgangspopulationen (FoxP3: MW=90,94; SD±6,40) war nach dreiwöchiger *in vitro* Expansion und mehrmaliger Restimulation der Tregs ein Verlust der FoxP3 Expression (FoxP3: MW=81,91; SD±8,18) zu verzeichnen. Diese Beobachtungen sind übereinstimmend mit bereits publizierten Daten (74), und sind unter anderem durch die nicht vollständig homogene Ausgangspopulation und die Methode der Treg-Isolierung nach der CD25<sup>high</sup> Zellpopulation zu begründen.



\*nach Entfernung der CD3/CD28 MacsiBeads

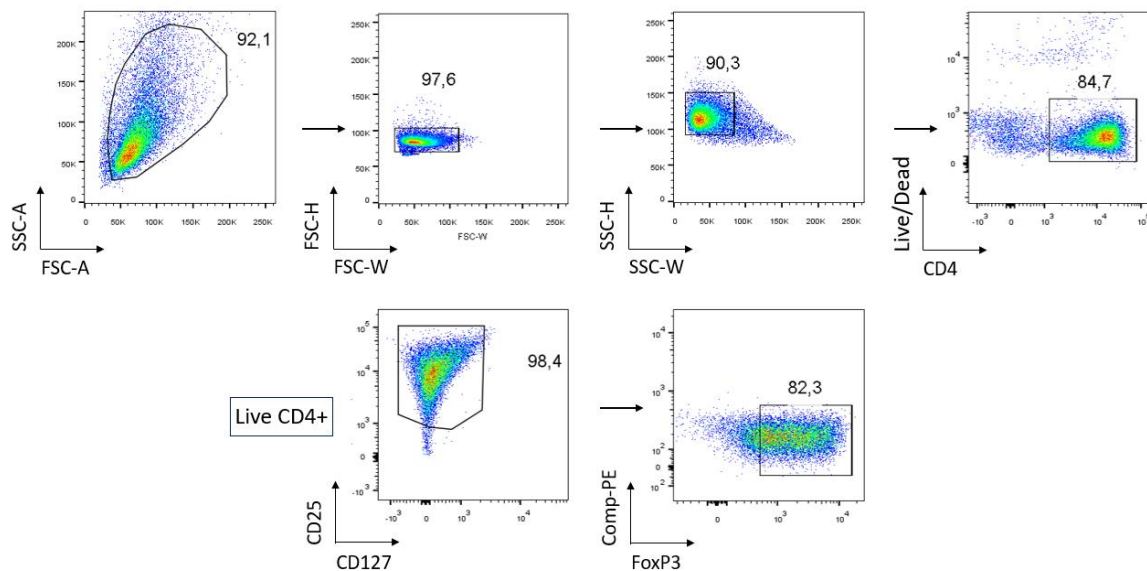
### Abbildung 7: Zusammenfassung der Treg-Zellexpansion für gesunde Spender und PsA Patienten

Dargestellt ist die zusammenfassende Ausbeute der Tregs nach Zellexpansion für gesunde Spender und auch die PsA Patienten als Vergleich. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism 7.04 erstellt, gezeigt werden die Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichung.



**Abbildung 8: Qualitätskontrolle der frisch isolierten Tregs „MACS-Check“**

Durchflusszytometrische Analyse der Reinheit mittels magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS) selektierter humaner Tregs aus PBMCs. Dargestellt ist ein exemplarisches Beispiel der „Gating Strategie“ in Form eines DotPlots. Zahlen in (%).



**Abbildung 9: Qualitätskontrolle der *in vitro* expandierten Tregs**

Durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps polyklonal expandierter humaner Tregs nach 21-tägiger *in vitro* Expansion. Dargestellt ist ein exemplarisches Beispiel in Form eines DotPlots. Zahlen in (%). Ersichtlich ist auch der Verlust der FoxP3 Expression nach *in vitro* Expansion im Vergleich zur Ausgangspopulation.

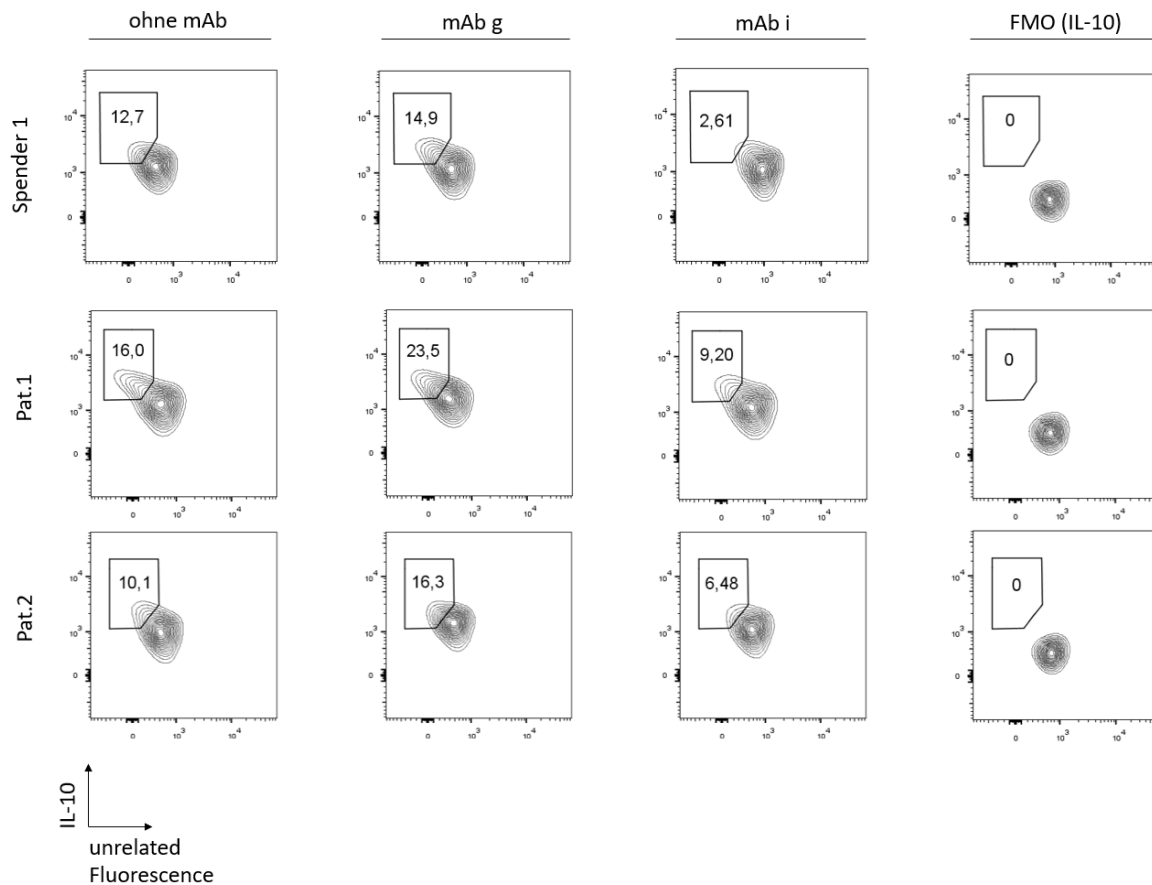
## **6.6 Induktion der IL-10 Expression durch selektierten anti-TIRC7 mAb auf Tregs**

Nach dem die Effekte der anti-TIRC7 Antikörper, für die Induktion von Tregs im Tierversuch, (Tullius SG *et al.* AST, 2018) bereits gezeigt wurden, wurde hier die Wirkung des mAb g im Hinblick auf das IL-10 innerhalb der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> und FoxP3<sup>+</sup> Tregs untersucht.

Hierfür wurden expandierte und aktivierte Tregs nach Expansion (Patient Nr. 1 und 2) für weitere zwei Stunden mit dem anti-TIRC7 mAb g oder mAb i inkubiert und hinsichtlich der IL-10 Expression mit einer Negativkontrolle, ohne Antikörper verglichen und durchflusszytometrisch analysiert. Der aufgrund vorangegangener Studien eliminierte anti-TIRC7 mAb i wurde als Kontrollantikörper eingesetzt (Abbildung10).

Im Vergleich zur Negativkontrolle und der Ko-Inkubation mit anti-TIRC7 mAb i konnte mit mAb g wie bereits zuvor beobachtet, eine Induktion des IL-10 bereits nach zwei Stunden sowohl bei gesunden Spendern als auch bei Psoriasis Arthritis Patienten beobachtet werden. Interessanterweise resultierte die Ko-Inkubation mit Klon i in einer verminderten IL-10 Expression im Vergleich zu dem Kontrollansatz ohne Antikörper. Spenderabhängige Unterschiede hinsichtlich der „basalen“ IL-10 Expression (ohne Antikörper) konnten ebenfalls beobachtet werden.



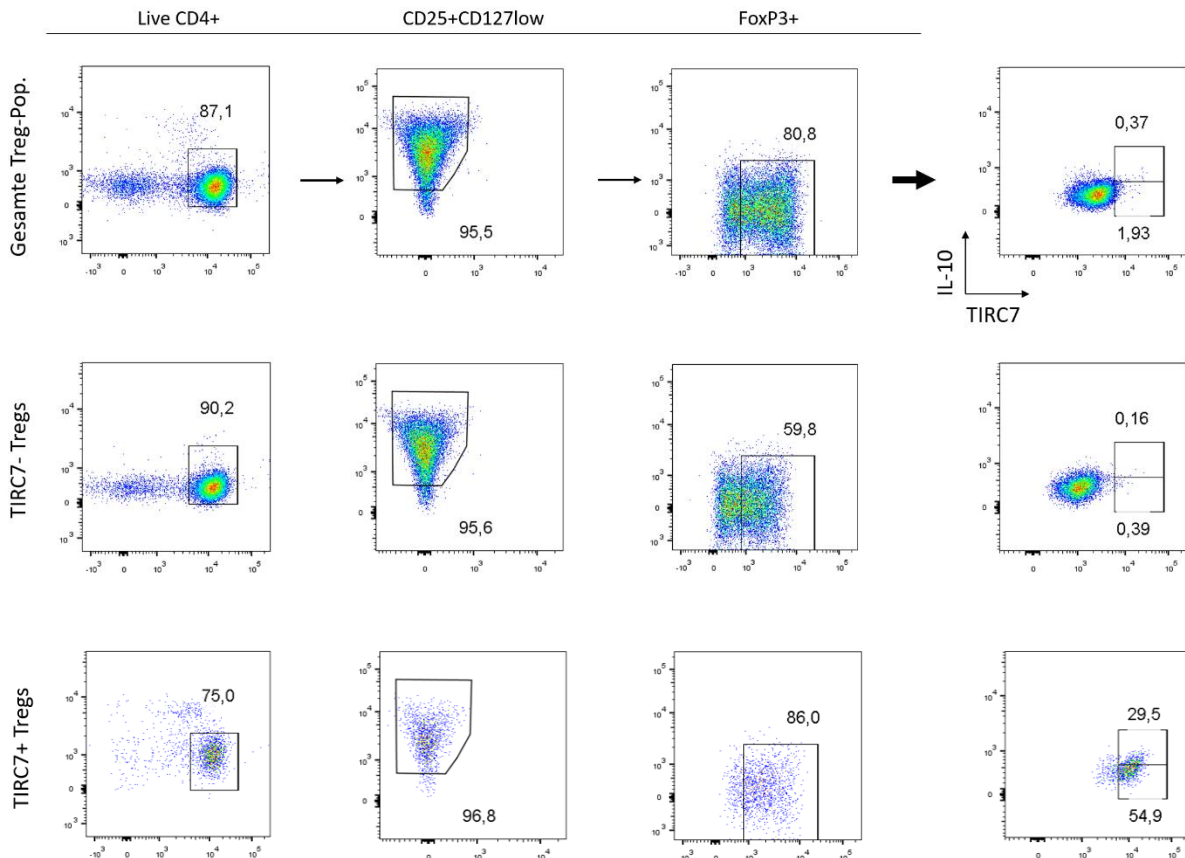


**Abbildung 10: Induktion der IL-10 Expression in expandierten Tregs „nach 2-stündiger Ko-Inkubation mit dem anti-TIRC7 mAb g“**

Durchflusszytometrische Analyse des Ko-Inkubation Assays mit dem anti-TIRC7 mAb g auf Tregs nach Expansion. Jeweils 20.000 expandierte und aktivierte Tregs wurde für weitere zwei Stunden mit dem jeweiligen anti-TIRC7 Klon inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch für die IL-10 Expression analysiert. Die Analyse der FACS Daten erfolgte mit FlowJo Version 10.0. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiele aus drei voneinander unabhängig durchgeführter Experimente für die Kontrollprobanden sowie zwei repräsentative Beispiele für PsA Patienten (Nr. 1 und 2) aus drei voneinander unabhängig durchgeführter Experimente.

## **6.7 Erhöhte suppressive Fähigkeit TIRC7+ Tregs in gesunden Spendern und Psoriasis Arthritis Patienten**

Nach polyklonaler Treg-Expansion, wurden humane TIRC7+ Tregs mittels MACS isoliert und charakterisiert. Hierfür wurde der mAb g selektiert, da in zahlreichen Ansätzen gezeigt werden konnte, dass dieser keine Apoptose-Induktion und Inhibierung der Proliferation der Tregs zeigte. Die phänotypische Charakterisierung der TIRC7+ Treg-Population erfolgte mittels FACS, anhand der für Tregs charakteristischen Marker (anti-CD4, -CD25, -CD127, -FoxP3, Live/Dead sowie anti-IL-10 und -TIRC7). Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass aus dem MACS für TIRC7+ Tregs zwei Zellpopulationen hervorgingen, eine CD4+ und CD4- Zellpopulation, die sich hinsichtlich der CD25-, FoxP3-, TIRC7- und IL-10 Expression deutlich unterschieden (nicht dargestellt). Dies ist vor allem durch die nicht vollständig homogene Ausgangspopulation und die Methode der Treg-Isolierung, nach der Zellpopulation mit der höchsten CD25 Expression zu begründen. Daher ist eine geringe Verunreinigung mit B-Zellen anzunehmen. Dennoch zeigte wie zu erwarten nur die CD4+ Zellpopulation die Treg-spezifischen Eigenschaften, wie eine hohe CD25 und FoxP3 Expression. Darüber hinaus war eine fast vollständige TIRC7 Expression (84,3%), auch nur innerhalb dieser Zellpopulation zu verzeichnen, wobei etwa 25% dieser TIRC7+ Tregs eine IL-10 Expression zeigten (MW=24,13; SD±5,08). Dieser Subset wurde durch den spezifischen TIRC7 mAb isoliert und zur Inhibierung der Proliferation eingesetzt. Im Vergleich dazu konnte bei den TIRC7- Tregs eine sehr geringe bis keine IL-10 Expression festgestellt werden (Abbildung 11).



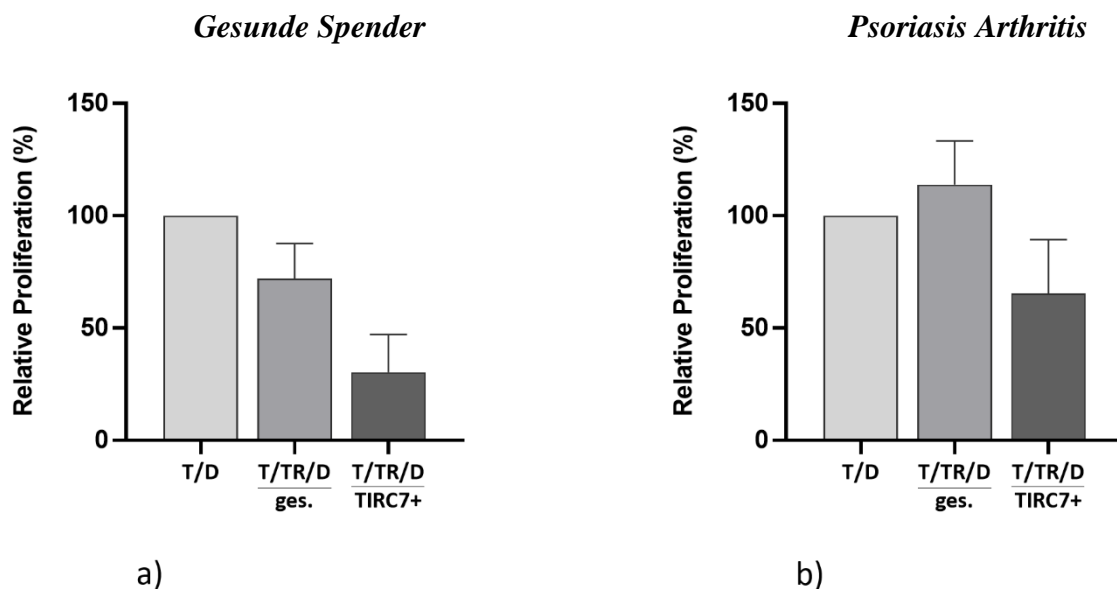
**Abbildung 11: Phänotypische Charakterisierung TIRC7+, TIRC7- und expandierter Tregs (ges.)**  
 „Vergleich IL-10 und TIRC7“

Repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse des MACS für TIRC7+ Tregs (n=3). Dargestellt ist der Vergleich der Ges.-Treg-Population, TIRC7- und TIRC7+ Tregs in Bezug auf die CD4, CD25, CD127, FoxP3, TIRC7 und IL-10 Expression ausgehend von der Live CD4+ Zellpopulation, die sich für die unterschiedlichen Treg-Populationen wie folgt darstellte: Ges.-Treg-Population (87,1%), TIRC7- (90,2%) und TIRC7+ Tregs (75%). Von der Live CD4+ Population aus wurde weiter nach CD25+CD127low FoxP3+ Tregs und schließlich nach TIRC7+IL-10+ Treg gegatet. Für jede der oben dargestellten Treg-Population erfolgte die Färbung einzeln nach der magnetaktivierten Zellisolierung für TIRC7+ Tregs anhand der oben aufgeführten Zellmarker. Das Panel setzte sich wie folgt zusammen: Live/Dead-AmCyan, CD4-APC-Cy7, CD25-PE Cy5.5, CD127-APC, TIRC7-FITC, FoxP3-Pacific Blue und IL-10-PE. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten bei gesunden Spendern. Der Mittelwert für die IL-10 Expression TIRC7+ Tregs betrug (MW=24,13; SD±5,08).

Für die funktionelle Analyse der TIRC7+ Tregs wurden *Psoriasis Arthritis* Patienten, (Nr.1 bis 8) mit *gesunden Spendern* verglichen. Die Tregs der *Psoriasis Arthritis* Patienten waren nicht in der Lage die *in vitro* Proliferation der CD4+CD25- T-Zellen effektiv zu unterdrücken, wohingegen dies bei *gesunden Spendern* erzielt werden konnte

Wurden im gleichen Versuchsansatz anstelle der gesamten Tregs ( $T/TR_{(ges.)}/D$ ) die TIRC7+ Tregs eingesetzt ( $T/TR_{(TIRC7+)}/D$ ), so konnte auch bei Patienten mit Psoriasis Arthritis eine deutliche Suppression der CD4+CD25- T-Zellen beobachtet werden.

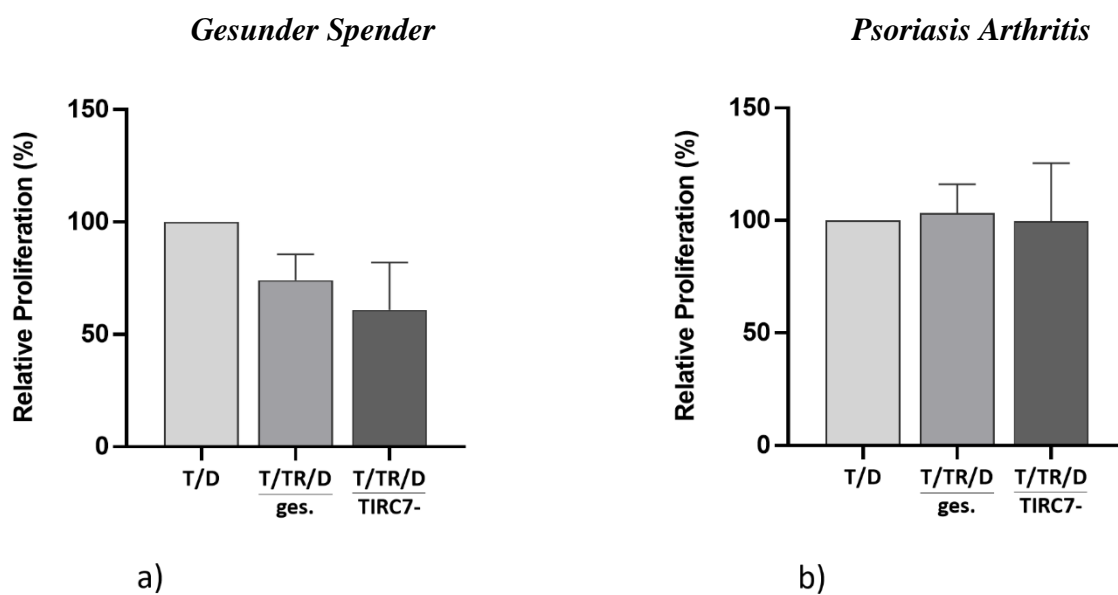
Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Gruppe der gesunden Spender erzielt. Wobei die gesamten Tregs hier im Vergleich zu PsA Patienten eine höhere Inhibition in den MLRs zeigten. CD4+CD25- T-Zellen, die zusammen mit TIRC7+ Tregs ( $T/TR_{(TIRC7+)}/D$ ) inkubiert wurden, zeigten ebenfalls eine deutlich verminderte Proliferation im Vergleich zu dem Ansatz mit der Gesamt-Treg-Population ( $T/TR_{(ges.)}/D$ ). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse für beide Gruppen ist in Abbildung 12 dargestellt.



**Abbildung 12: Funktionelle Analyse TIRC7+ Tregs „Vergleich der relativen Proliferation“**

Allogenes MLR: CD4+CD25- T-Zellen (T) vom a) gesunden Spender, b) Patienten mit Psoriasis Arthritis wurden mit allogenen Dendritischen Zellen (D) stimuliert und entweder mit der gesamten expandierten Treg-Population  $TR_{(ges.)}$  oder TIRC7+ Tregs  $TR_{(TIRC7+)}$  für fünf Tage inkubiert. Nach Inkubation der Zellen für weitere 16-18 Stunden mit dem BrdU labeling Reagenz wurde die Proliferation mittels ELISA bestimmt. Die Proliferation wurde als relative Proliferation, als Verhältnis der MLRs ohne suppressive Zellen (100%) zu den jeweiligen Ansätzen mit den Tregs:  $TR_{(ges.)}$  oder TIRC7+ Tregs bestimmt. PsA (n=7) und Gesunde Spender (n=6). Die Graphen wurden mit GraphPad Prism 7.04 erstellt, gezeigt werden die Mittelwerte sowie die jeweiligen Standardabweichung

TIRC7- Tregs hingegen zeigten eine ähnliche suppressive Fähigkeit wie die Gesamt-Treg-Population sowohl für die Gruppe der gesunden Spender als auch für Psoriasis Arthritis Patienten. Sodass für die PsA Patienten keine Inhibition der CD4+CD25- T-Zellen nach Inkubation mit den TIRC7- Tregs erzielt werden konnte. TIRC7+ Tregs hingegen zeigten sich im Vergleich zur Gesamt-Treg-Population als auch zur TIRC7- Tregs in Bezug auf ihre suppressiven Fähigkeiten als deutlich überlegen. Ein Vergleich der Gesamt-Tregs und TIRC7- Tregs in Bezug auf die Inhibition der Proliferation der CD4+CD25- T-Zellen ist in Abbildung 13 dargestellt.

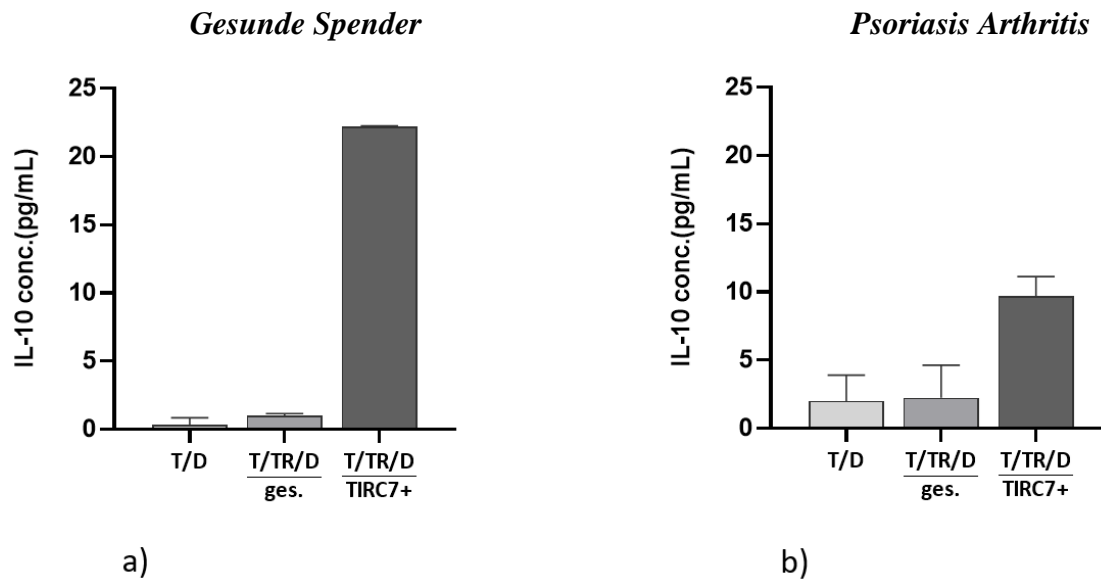


**Abbildung 13: Funktionelle Analyse TIRC7- Tregs „Vergleich der relativen Proliferation“**

Allogenes MLR CD4+CD25- T-Zellen (T) vom a) einem gesunden Spender, b) Patienten mit Psoriasis Arthritis wurden mit allogenen Dendritischen Zellen (D) stimuliert und entweder mit der gesamten expandierten Treg-Population TR(ges.) oder TIRC7- Tregs TR(TIRC7-) für fünf Tage inkubiert. Nach Inkubation der Zellen für weitere 16-18 Stunden mit dem BrdU labeling Reagenz wurde die Proliferation mittels ELISA bestimmt. Die Proliferation wurde als relative Proliferation, als Verhältnis der MLR ohne suppressive Zellen (100%) zu den jeweiligen Ansätzen mit den Tregs: TR(ges.) oder TIRC7- Tregs bestimmt. PsA (n=4) und Gesunde Spender (n=4). Die Graphen wurden mit GraphPad Prism 7.04 erstellt, gezeigt werden die Mittelwerte sowie die jeweiligen Standardabweichung

## 6.8 Erhöhte IL-10 Zytokin-Produktion in TIRC7+ Tregs

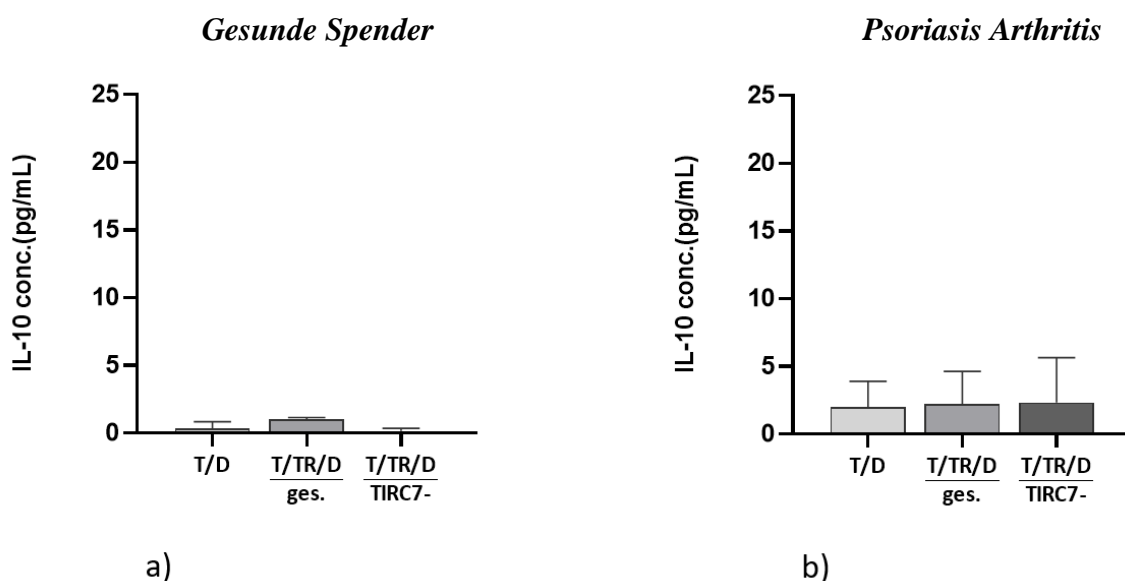
Um die durchflusszytometrischen Analysen und die Ergebnisse der Proliferations-Assays unter 6.7 bestätigen zu können, erfolgte eine Analyse der Überstände dieser Ansätze für das IL-10 mittels kommerzieller ELISA Kits (Biolegend). Die Messungen der Zytokin-Assays zeigten nur in den Ansätzen mit TIRC7+ Tregs (T/TR(TIRC7+)/D) deutlich messbare Mengen an IL-10.



**Abbildung 14: Funktionelle Analyse TIRC7+ Tregs „Vergleich der IL-10 Sekretion“**

20.000 CD4+CD25- T-Zellen (T) vom a) gesunder Spender, b) Psoriasis Arthritis wurden mit 4.000 allogenen Dendritischen Zellen(D) stimuliert und entweder mit der gesamten expandierten Treg Population TR(ges.), TIRC7+ Tregs TR(TIRC7+) oder mit TIRC7- Tregs TR(TIRC7-) inkubiert. Nach einer Inkubationsperiode von fünf Tagen wurden die Überstände zur Bestimmung des IL-10 mittels kommerzieller ELISA Kits analysiert. a) zeigt ein repräsentatives Beispiel aus insgesamt sieben durchgeführten unabhängigen Ansätzen von gesunden Spendern. b) zeigt eine Zusammenfassung aus insgesamt vier durchgeführten unabhängigen Ansätzen von PsA Patienten. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism 7.04 erstellt, gezeigt werden die Mittelwerte der IL-10 conc. (pg/ml) sowie die jeweiligen Standardabweichung.

Im Vergleich dazu, waren in den Ansätzen mit der gesamten Treg-Population (T/TR<sub>(ges.)</sub>/D), den TIRC7- Tregs (T/TR<sub>(neg.)</sub>/DC sowie den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen (T/D) nur sehr geringe Mengen bis gar kein IL-10 nachweisbar. Diese Ergebnisse konnten sowohl bei gesunden Spendern, als auch bei Psoriasis Arthritis Patienten beobachtet werden. Ein repräsentatives Beispiel für die Gruppe der gesunden Spender ist in Abbildung 14 a dargestellt. Abbildung 14 b zeigt eine Zusammenfassung der durchgeführten Analysen für die Gruppe der Psoriasis Arthritis Patienten. Repräsentative Beispiele für die Ansätze mit den TIRC7- Tregs (T/TR<sub>(neg.)</sub>/DC sind in den Abbildungen 15 a und b dargestellt.



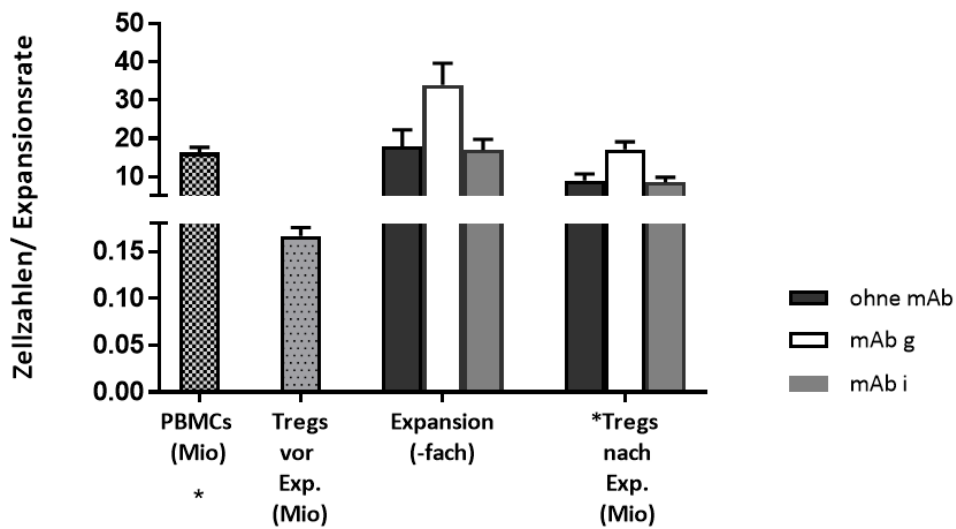
**Abbildung 15: Funktionelle Analyse TIRC7- Tregs „Vergleich der IL-10 Sekretion“**

Vergleich der IL-10 Sekretion. Allogenes MLR 20.000 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T- Zellen (T) vom a) *gesunder Spender*, b) *Psoriasis Arthritis* Patient wurden mit 4.000 allogenen Dendritischen Zellen (D) stimuliert und entweder mit der gesamten expandierten Treg Population TR<sub>(ges.)</sub> oder mit TIRC7- Tregs TR<sub>(TIRC7-)</sub> inkubiert. Nach einer Inkubationsperiode von fünf Tagen wurden die Überstände zur Bestimmung des IL-10 mittels kommerzieller ELISA Kits analysiert. a) zeigt ein repräsentatives Beispiel aus insgesamt sieben durchgeführten unabhängigen Ansätzen von gesunden Spendern. b) zeigt eine Zusammenfassung aus insgesamt vier durchgeführten unabhängigen Ansätzen von PsA Patienten. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism 7.04 erstellt, gezeigt werden die Mittelwerte der IL-10 conc. (pg/ml) sowie die jeweiligen Standardabweichung.

## 6.9 Effekt des anti-TIRC7 Antikörpers mAb g auf die Expansion der Tregs

Da in den Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass der Antikörper mAb g keine inhibitorische Wirkung auf die kurzfristige Ko-Inkubation in Proliferations-Assays auf Tregs ausübt (Daten nicht gezeigt), aber in der Lage ist in expandierten Tregs die IL-10 Expression zu induzieren, (Abbildung 10) stellte sich die Frage, ob der mAb g die Expansion der Tregs begünstigen würde.

Somit erfolgte im letzten Schritt die Analyse der anti-TIRC7 Antikörper, mAb g und mAb i, bezüglich der Wirkung auf die Expansion der Tregs im Rahmen eines sogenannten „Ko-Inkubations Assays“. Hierfür wurden in das Nährmedium der Tregs für die Expansionsdauer von 21 Tagen die jeweiligen anti-TIRC7Antikörper (mAb g und mAb i), zu Beginn der Expansion, nach 7 und 14 Tagen hinzugefügt. Der mAb i wurde auch hier als Kontrollantikörper mitgeführt.



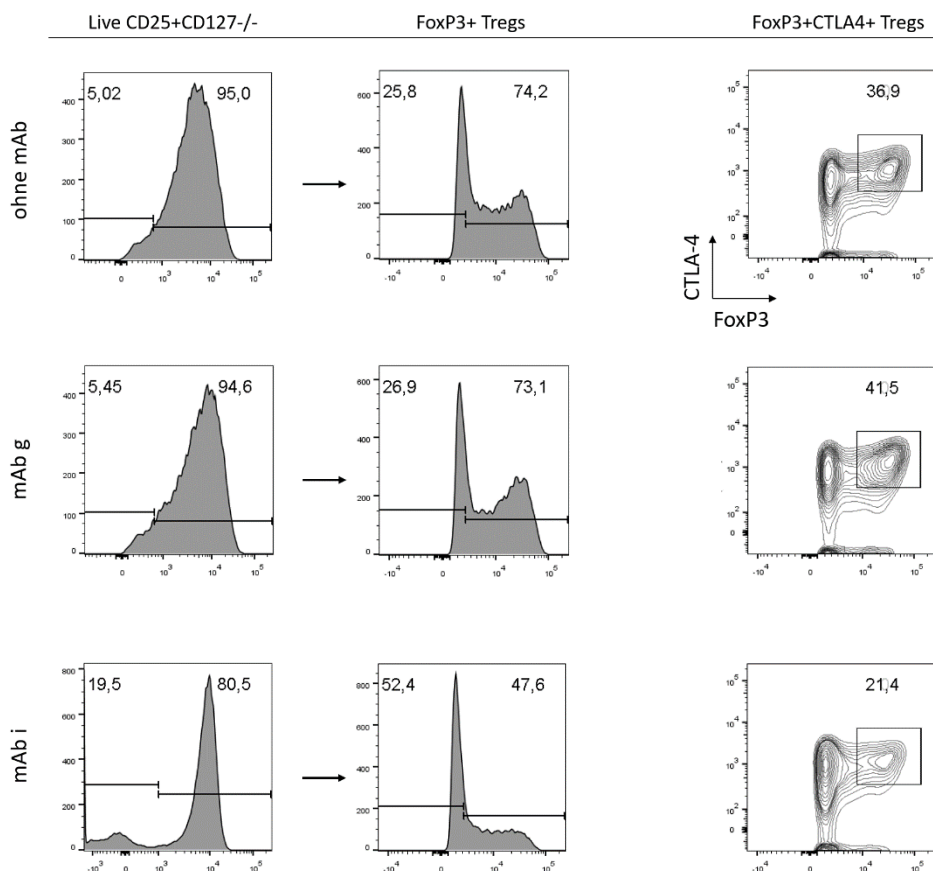
\* Identische Anzahl an PBMCs und Tregs für alle Ansätze

**Abbildung 16: Säulendiagramm** „Vergleich der Ko-Inkubation mit mAb g und mAb i für die Treg-Expansion/ Ausbeute“

Dargestellt ist der Vergleich der Treg-Ausbeute des Ko-Inkubation Assays mit mAb g mAb i für die Treg-Expansion über drei Wochen sowie der Kontrollansatz ohne Antikörper (ohne mAb) in Form eines Säulendiagramms. Mittels MACS isolierte Tregs gesunder Spender (n=2) wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen expandiert. In die Ansätze mAb g und mAb i wurden die jeweiligen anti-TIRC7 mAb zu Beginn der Expansion sowie nach 7 und 14 Tagen hinzugefügt (20 µg/ml). Eine Restimulation der Zellen erfolgte an Tag 7 und 14. Dargestellt ist eine Zusammenfassung zweier voneinander unabhängig durchgeführter Experimente von gesunden Spendern. Die Ansätze ohne mAb und mAb i zeigten eine 18-fache (ohne mAb) und 17-fache (mAb i) Expansion. Der Ansatz mit mAb g zeigte eine 34-fache Expansion. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism 7.04 erstellt, gezeigt werden die Mittelwerte sowie die jeweiligen Standardabweichung.



Die durchflusszytometrischen Analysen dieser Kulturansätze mit dem anti-TIRC7 mAb g zeigten, dass der Phänotyp der Tregs, im Vergleich zu den Kontrollen (ohne mAb und mAb i) die höchsten FoxP3 und CTLA-4 Expression zeigte. Die Hinzugabe des anti-TIRC7 Antikörpers mAb g führte nicht nur zu einem stabilen FoxP3 Phänotyp, sondern nach drei Wochen auch zu einer Verdopplung der Zellzahl, die am Ende der Expansionsperiode erfasst wurde, siehe Abbildung 16. Die Hinzugabe des mAb i hingegen führte zu einer verminderten FoxP3 und CTLA-4 Expression im Vergleich zu den Ansätzen mit mAb g und ohne Antikörper. Eine Veränderung bezüglich der Ausbeute an Tregs konnte mit Klon i nicht erzielt werden.



**Abbildung 17: Effekt der anti-TIRC7 mAb g und i „auf die in vitro Expansion der Tregs“**

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse des Phänotyps der Tregs als repräsentatives Beispiel nach Ko-Inkubation mit mAb g oder mAb i für die Treg-Expansion über drei Wochen sowie der Kontrollansatz ohne Antikörper (ohne mAb) in Form von Histogrammen und Contour Plots. In die Ansätze mAb g und mAb i wurden die jeweiligen anti-TIRC7 mAb zu Beginn der Expansion sowie nach 7 und 14 Tagen hinzugefügt (20 µg/ml). Eine Restimulation der Zellen erfolgte an Tag 7 und 14.. Die Analyse der Daten erfolgte mit FlowJo Version 10.0.

## 7. Diskussion

Die Erkenntnis, dass ein Subset an CD4+ T-Zellen, bekannt als regulatorische T-Zellen (natural Tregs), die den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren in der Lage ist die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktionen, wie die Produktion proinflammatorischer Zytokine einer Vielzahl an Zellen: CD4+ und CD8+ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und APC (DCs) zu unterdrücken (65), machte sie zum Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten, deren Fokus auf der Prävention und Therapie von Autoimmunerkrankungen lag. Die Unentbehrlichkeit dieser regulatorischen T-Zellen im Rahmen der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase konnte bereits anhand Treg-basierter Modelle systemischer Autoimmunerkrankungen, wie APS II (autoimmune polyglandular syndrome type II) (87), APECED (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis and ectodermal dystrophy) (88, 89) sowie IPEX (66, 67, 90) belegt werden. Eines dieser Krankheitsbilder, das in Bezug auf die Funktionalität der Tregs hinreichend untersucht wurde, ist die RA, die aufgrund unzureichender Kenntnisse hinsichtlich der Krankheitsursache und der zugrundeliegenden pathophysiologischen Vorgänge aktuell symptomatisch mittels Medikation behandelt wird (22, 44). Die medikamentöse Behandlung bedeutet für Betroffene allerdings oft, mit massiven Nebenwirkungen leben zu müssen. Daher wäre es nicht für die RA, sondern auch für viele andere Autoimmunerkrankungen, wie die PsA von Interesse, den Einsatz Treg-basierter adoptiver Therapien mit dem Ziel der Reetablierung der peripheren Toleranz voranzutreiben. Der Einsatz Treg-basierter adoptiver T-Zelltherapien wäre vor allem bei Patienten, bei denen die Krankheitsursache auf einen Defekt der Suppressorfunktion der Tregs zurückzuführen ist, von großer Bedeutung. Die aktuelle Literatur bietet diesbezüglich jedoch widersprüchliche Ergebnisse (91-94). Diese inkonsistenten Beobachtungen bezüglich der Funktionalität und Frequenz von Tregs in Autoimmunerkrankungen allgemein sowie im Hinblick auf die RA (91, 92, 95-97), sind kritisch zu betrachten (75). Denn die Definition humaner Tregs ist aufgrund fehlender spezifischer Treg-Marker und ihrer Heterogenität erschwert. Deshalb wäre eine erfolgreiche Identifizierung von Zielstrukturen, die neben der Treg-basierten adoptiven T-Zelltherapie bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen genutzt werden könnten, von großem Vorteil.

## 7. 1 TIRC7

Ein solches Oberflächenmolekül, welches bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen als Zielstruktur genutzt werden könnte, ist das Membranmolekül TIRC7. Hierbei handelt es sich um ein transmembranes Oberflächenmolekül, das in der frühen Phase der T-Zellaktivierung eine Rolle spielt und als ein Master Immunregulator eine wichtige Immuncheckpoint-Funktion ausführt (76, 78). Nach Aktivierung der T-Zellen wird TIRC7 an die Oberfläche transportiert, wo es an seinen Liganden, die HLA-DR alpha2 Domäne bindet, um die T-Zellaktivierung zu inhibieren (98).

Durch den Einsatz eines agonistischen anti-TIRC7 Antikörpers konnte anhand funktioneller Assays, (MLRs mit PBL) gezeigt werden, dass Effektorfunktionen von TH1 und TH17 Zellen, insbesondere die T-bet, IL-2, INF- $\gamma$  sowie die IL-17 Produktion inhibiert werden können, wohingegen die Effektorfunktionen der TH2 unbeeinflusst blieben (78, 79) (98).

Ähnliche Ergebnisse bezüglich des inhibitorischen Effekts des anti-TIRC7 mAb auf die Immunantwort der TH1 Zellen konnten auch *in vivo* in Mäusen erzielt werden. Der Einsatz eines anti-TIRC7 mAbs führte auch hier zu signifikanten Erfolgen bei der Therapie von kollagen-induzierter Arthritis bei Mäusen sowie Transplantatabstoßungen (77). Aus früheren Publikationen von Utku *et al.* geht hervor, dass eine Expression des TIRC7 vor allem auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach allogener T-Zellaktivierung hochreguliert wird, wobei die Expression auch auf B-Zellen und APCs vorkommt (78, 99)

## 7. 2 TIRC7+ Tregs

Im Jahr 2008 erfolgte durch Wakkach *et al.* erstmals die Charakterisierung TIRC7<sup>+</sup> Tregs im Maus Tiermodell. Anhand eines polyklonalen anti-TIRC7 Antikörpers gelang es der Arbeitsgruppe in den sekundären lymphatischen Organen von „wildtype“ Mäusen zwei neue Subsets an Tregs zu identifizieren, die sich durch die Expression von FoxP3 sowie der Fähigkeit der *in vivo* und *in vitro* Suppression auszeichneten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die *in vitro* suppressiven Eigenschaften dieser Tregs, die in diesem Fall als CD25<sup>low</sup> TIRC7<sup>+</sup> charakterisiert wurden, IL-10 abhängig waren (42). Diese Erkenntnisse waren insofern interessant, da Tregs bis zu diesem Zeitpunkt in zwei große Populationen eingeteilt wurden. Diese umfassen natürlich vorkommende Tregs und induzierbare Tregs, darunter auch die regulatorischen Tr1 Zellen, die IL-10 sezernieren (68).

Die Mehrheit der Studien deuteten darauf hin, dass zumindest die *in vitro* suppressiven Eigenschaften der natürlich vorkommenden Tregs nicht primär IL-10 abhängig waren (81). Ausgehend von diesen Erkenntnissen beider Arbeitsgruppen (Utku *et al.*, 2004 und Wakkach *et al.*, 2008) ergab sich folgende Fragestellung, die im Rahmen dieser Dissertation abgehandelt werden sollte:

Inwieweit sind die Ergebnisse IL-10 sezernierender TIRC7+ muriner Tregs auch auf humane Tregs übertragbar und welche Therapieoptionen könnten sich hieraus für Patienten mit Autoimmunerkrankungen ergeben?

Im Vergleich zu früheren Studien wurde im Rahmen dieser Dissertation der Effekt des anti-TIRC7 mAb, neben PBL hauptsächlich auf den unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen untersucht, um diesen in Treg-Kulturen zur Isolation der TIRC7+ Tregs einzusetzen. Dies wurde neben gesunden Probanden, die als Kontrollgruppe dienten, auch bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen untersucht.

Bevor ich mit der Diskussion beginne, möchte ich auf einige Einschränkungen dieser Studie aufmerksam machen. Aufgrund der zeitlichen Ausdehnung der Experimente, Treg-Zellexpansion über einen Zeitraum von 21 Tagen mit anschließender magnet-aktivierter Zellsortierung für TIRC7+ Tregs (MACS), Phänotypisierung und funktionelle Untersuchung dieser mittels ELISA (BrdU Proliferations-Assay und Zytokinmessung für IL-10) liegt die Anzahl der untersuchten Proben für die Kontrollgruppe bei (n=7), für die PsA Patienten bei (n=8). Um eindeutigere Aussagen über die bisher gemachten Beobachtungen zu treffen und um diese zu unterstützen, sind weiterführende Untersuchungen erforderlich. An dieser Stelle sei auch nochmal ausdrücklich darauf hingewiesen, dass aufgrund einiger Limitationen (maximal zugelassene Menge an Blut durch die Ethikkommission, Anergie der Tregs *in vitro*, sowie die Medikamentenanamnese der Patienten) die Zellsortierung für Tregs, ausschließlich nach der Zellpopulation mit der höchsten CD25 Expression erfolgte.

### **7.3 Anti-TIRC7 mAb inhibiert Effektorfunktionen der CD4+CD25- T-Zellen und induziert Treg-Funktion**

Der Einsatz des für die Isolation der TIRC7+ Treg ausgewählten anti-TIRC7 mAbs g in funktionellen Assays resultierte im Vergleich zu einer Isotyp- und Negativkontrolle in einer (signifikanten) Verminderung der *in vitro* Proliferation, sowie der IFN- $\gamma$  Produktion der CD4+ CD25- T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Bei der Ko-Inkubation von Tregs, (TR/D) und dem anti-

TIRC7 mAb kam es zu keinem signifikanten Unterschied. Ähnliche Effekte wurden in Treg Apoptose Assays erzielt, sodass sich daraus schließen lässt, dass der anti-TIRC7 mAb keinen direkten/inhibitorischen Effekt auf die Tregs hat. Unterstützend dieser Annahmen ist die Tatsache, dass die Ko-Inkubation des TIRC7 Antikörpers mit Tregs eine deutliche Induktion der Proliferation der Tregs zeigte. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Beobachtungen überein, die zeigen, dass der monoklonale anti-TIRC7Antikörper humane Tregs in PBL innerhalb von wenigen Tagen induziert (Krause N, unpublizierte Daten). Zusammenfassend lässt sich durch die Anwendung des agonistischen Antikörpers, für die TIRC7 Funktion verstärkt ableiten, dass TIRC7 möglicherweise eine duale Funktion auf Lymphozyten hat. Ähnliche Daten wurden bereits für die Funktion von CTLA-4, das auf Effektorzellen inhibitorische Signale sendet, aber Treg-Funktionen hingegen unterstützend wirkt, gemacht (100).

#### **7.4 TIRC7+ Tregs zeigen höhere suppressive Kapazität**

Im Rahmen dieser Dissertation wurden auch erstmalig humane TIRC7+ Tregs im peripheren Blut charakterisiert. Wegweisend hierfür waren die Vorarbeiten in den Arbeitsgruppen Utku & EL Milford (Harvard Medical School) & ImmuSite Inc. zur Vorbereitung einer TIRC7+ Treg basierten Zelltherapie (unpublizierte Daten). Die im Jahr 2008 publizierten Ergebnisse durch die Arbeitsgruppe Wakkach *et al.* zeigten die Charakterisierung der TIRC7+ Tregs aus den sekundär lymphatischen Organen im Mausmodell. Wie aus 6.7 und 6.8 hervorgeht, wurde die Charakterisierung mittels unterschiedlicher Methoden durchgeführt. Während eine Phänotypisierung TIRC7+ Tregs nur bei gesunden Probanden erfolgte, wurden die funktionellen Analysen sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Psoriasis Arthritis Patienten durchgeführt. Aufgrund der Rarität dieser Zellpopulation (63) mussten diese zunächst expandiert werden. Ein Vergleich des Phänotyps der eingesetzten Gesamt-Treg-Population vor Beginn und nach Expansion zeigen, dass die Zellen während der dreiwöchigen Expansionsperiode einen Verlust der FoxP3 Expression zeigten: vor Expansion (MW=90,94; SD±6,40) und nach Expansion (MW=81,91; SD±8,18). Diese Beobachtungen stimmen mit bereits publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen überein (63, 74, 101).

Die phänotypische Charakterisierung TIRC7<sup>+</sup> Tregs erfolgte anhand der für Tregs charakteristischen Marker (CD25, CD127, FoxP3) und des IL-10 mittels Durchflusszytometrie. Wie durch Wakkach *et al.* für Maus Tregs beschrieben, zeigte die Mehrheit der TIRC7<sup>+</sup> Tregs eine FoxP3 Expression. Eine IL-10 Expression konnte bei etwa ein Viertel der FoxP3<sup>+</sup>TIRC7<sup>+</sup> Tregs (MW=24,13; SD±5,08) ohne eine vorherige Stimulation verzeichnet werden. Die funktionelle Charakterisierung der TIRC7<sup>+</sup> Tregs erfolgte anhand, BrdU Proliferations-Assays sowie Zytokinmessungen mittels ELISA. In Proliferations-Assays waren TIRC7<sup>+</sup> Tregs im Vergleich zu der Gesamt-Treg-Population in der Lage die Proliferation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen zu supprimieren. Diese Ergebnisse sind insofern von Bedeutung, da bei Patienten mit einer Psoriasis Arthritis eine Suppression der T-Zellen mit den gesamten Tregs nicht erzielt werden konnte. Auch bei den gesunden Kontrollprobanden zeigten TIRC7<sup>+</sup> Tregs eine deutlich höhere suppressive Kapazität als die Gesamt-Treg-Population. Um herauszufinden, ob diese Fähigkeit der TIRC7<sup>+</sup> Tregs die *in vitro* Proliferation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen effektiver zu unterdrücken auf die Produktion des antiinflammatorischen IL-10 zurückzuführen ist, wurden Überstände derselben Assays zur Untersuchung der IL-10 Produktion abgenommen. Die IL-10 Messungen mittels kommerzieller ELISA Kits zeigten, dass insbesondere in den Ansätzen mit TIRC7<sup>+</sup> Tregs deutlich messbare Mengen an IL-10 produziert wurden. In den Ansätzen mit der Gesamt-Treg-Population, TIRC7<sup>-</sup> Tregs oder der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen hingegen wurden keine oder nur sehr niedrige IL-10 Konzentrationen nachgewiesen. Durch den Ausschluss weiterer IL-10 Produzenten anhand unserer Kontrollen, ließ sich schlussfolgern, dass die Suppressionsfähigkeit TIRC7<sup>+</sup> Tregs durch das IL-10 gewährleistet wird.

## **7.5 Treg-basierte adoptive T-Zelltherapien: Hindernisse und Lösungsansätze**

Auf der Suche nach alternativen Behandlungsmethoden nicht nur für die Therapie von Autoimmunerkrankungen, sondern auch zur Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen wurde der Fokus in den letzten Jahrzehnten auf den adoptiven Transfer von autologen Tregs gelegt (102), Tabelle 2. Wegweisend hierfür waren die Ergebnisse vorklinischer Studien in Tiermodellen, die belegten, dass durch den Einsatz Treg-basierter adoptiver Therapien die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Typ1 Diabetes (103-105) oder auch Multiple Sklerose (MS) (106, 107), verhindert werden kann. Ähnliche Resultate konnten auch in Studien, die die Entstehung des sogenannten Graft versus Host Disease (GVHD) nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation untersuchten, erzielt werden (108-110). Die Überführung solcher Therapieansätze in die Klinik erfordert jedoch eine effiziente *in vitro*

Expansion dieser Zellpopulation, die weniger als 10% der CD4+ T-Zellen ausmachen (63). Nicht nur, um ausreichende Zellzahlen zu erreichen, sondern auch um wiederholte Einsätze bei Patienten gewährleisten zu können. Durch allgemeingültige Expansionsprotokolle, die die Gabe hoher Dosen an IL-2 und die Stimulation der Tregs mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern vorsehen, ist eine effiziente *in vitro* Expansion möglich. Die Erfüllung der Anforderung, dass solche Ansätze nur dann in die Klinik überführt werden können, wenn die Isolation „reiner“ Treg-Populationen gewährleistet wird, ist jedoch schwierig. Aus bereits publizierten Daten, geht eindeutig hervor, dass die Generierung phänotypisch und funktionell stabiler Treg-Populationen nach mehrwöchiger *in vitro* Expansion eine der größten Hürden darstellt (74, 101), was sich im Rahmen dieser Arbeit bestätigte. Wie bereits durch Hoffmann *et al.* beschrieben, ist trotz reiner Ausgangspopulationen nach mehrwöchiger *in vitro* Expansion und mehrmaliger Restimulation mit einem Verlust der FoxP3 Expression und damit einhergehend dem Verlust der Suppressionsfähigkeit der Tregs zu rechnen (74). Dieser Verlust ist auf epigenetische Veränderungen, die Methylierung des TSDR innerhalb des FoxP3 Gens zurückzuführen (74, 75). Diese für Tregs spezifische Region, auch bekannt als Conserved Non-Coding Sequence 2 (CNS2) liegt bei natürlich vorkommenden Tregs im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen und auch induzierten Tregs vollständig demethyliert vor und ist grundlegend für eine stabile FoxP3 Expression und damit einhergehend auch für eine stabile Treg-Suppressorfunktion (69). Versuche diese Probleme durch den Einsatz hochgradig reiner Ausgangspopulationen unter Hinzunahme weiterer Oberflächenmarker, wie das CD127 (70, 71) oder die Gabe von Substanzen wie das Rapamycin, zur Vermeidung von Kontaminationen mit konventionellen T-Zellen oder induzierten Tregs, zu umgehen (111, 112), waren wenig erfolgsversprechend (80). Dies führte letztlich zur Entwicklung neuer Strategien zur Isolation von Tregs. Wie durch Hoffmann *et al.* und auch Miyara *et al.* beschrieben, konnten reine Treg-Populationen nach Expansion, die eine homogene hohe FoxP3 Expression und eine vollständige Demethylierung des TSDR und somit einhergehend eine stabile Suppressorfunktion zeigten, nur durch den Sort nach CD4+CD25+CD45RA+ T-Zellen erzielt werden. Heterogenitäten bezüglich der FoxP3 Expression und des Demethylierungsstatus des TSDR nach Expansion, trotz anfänglich „reiner“ Ausgangspopulationen waren auf die CD45RA- memory Tregs innerhalb der CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Population zurückzuführen (74, 75, 101).

Basierend auf den Ergebnissen beider Arbeitsgruppen wäre anzunehmen, dass CD45RA+ naive Tregs ideal zur Herstellung reiner Treg-Zellprodukte wären. Dies ist jedoch nur bedingt zutreffend. CD45RA+ Treg machen etwa 10% der FoxP3+ Tregs bei jungen Erwachsenen aus (113). Außerdem ist zu bedenken, dass im peripheren Blut aufgrund der evolutionsbedingten Involvulation

des Thymus eine altersabhängige Abnahme naiver CD45RA<sup>+</sup> Tregs stattfindet (114, 115). Die Isolation und Expansion wäre vor allem bei älteren Patienten schwierig, zumal die meisten Autoimmunerkrankungen mit verminderten Zellzahlen und Dysfunktionen der Tregs assoziiert sind (33), Tabelle 1. Ein weiterer Einflussfaktor diesbezüglich ist auch die Medikamentenanamnese der Patienten, die oft mittels starker Immunsuppressiva oder in Kombination mit Biologica behandelt werden. Dies erschwert oft nicht nur die Ausbeute und die Expansion, sondern auch die *in vitro* suppressiven Eigenschaften der Tregs. Eine Alternative zur Umgehung der oben aufgeführten Probleme bei der Expansion und der Generierung „reiner“ Treg-Populationen könnten TIRC7<sup>+</sup> Tregs in Kombination mit dem anti-TIRC7 Antikörper darstellen. Wie bereits beschrieben, stellen diese eine Subpopulation innerhalb der FoxP3<sup>+</sup> Tregs dar. Das Potential TIRC7<sup>+</sup> Tregs zur Suppression der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen beruht unter anderem auf ihrer Fähigkeit IL-10 zu exprimieren und scheint sich somit, zumindest *in vitro*, von der der Gesamt-Treg-Population zu unterscheiden (42).

## **7.6 IL- 10, Tr1 regulatorische T-Zellen und TIRC7+ Tregs**

Das Potential des IL- 10 als antiinflammatorisches Zytokin zur Prävention von Autoimmunerkrankungen konnte anhand einer Vielzahl von Studien bereits belegt werden (116-118). In Tiermodellen mit Mäusen konnten Exazerbationen von Autoimmunerkrankung wie RA, chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) oder Autoimmunencephalitis beobachtet werden, wenn ein Defizit an IL-10 vorlag. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 1995 erlagen Mäuse, die einen IL-10 Defizit aufwiesen, nicht- tödlichen Dosen an Lipopolysacchariden (LPS) (119). Im Gegensatz dazu führte die Therapie mit rIL-10 bei Psoriasis Patienten zur temporären klinischen Remission der Erkrankung (120). Ähnliche Beobachtungen konnten auch beim Morbus Crohn gemacht werden (121).

Das IL-10 wurde erstmal Ende der 1980er Jahre durch Mosmann und Kollegen beschrieben (122, 123). Entgegen der früheren Annahme, dass das IL-10 ausschließlich durch TH2 Zellen produziert wird, ist heute bekannt, dass eine Vielzahl an Zellen: Tregs (Tr1), TH1, TH17, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Monozyten und stimulierte Makrophagen und DCs sowie B-Zellen eine Quelle für das IL-10 sein können (124). Die Hauptfunktion des IL-10 scheint in der Inhibition der Antigenpräsentation zu liegen, indem es die Expression des MHC II und der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie die Reifung und Differenzierung der DCs inhibiert. Des Weiteren ist auch die Inhibition proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12 und TNFs sowie die Inhibition der Produktion des IL-2, INF- $\gamma$ , IL-4 und IL-5 ein wichtiges Merkmal des IL-10 (124).



Gegenwärtig wird die IL-10-Treg Achse durch die Tr1 Tregs dominiert. Diese sind durch die Stimulation CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit dem TGF- $\beta$  und IL-10 induzierbar und stellen eine wichtige biologische Quelle für das antiinflammatorische IL-10 dar (61). So wurde der erste klinische Versuch mit Tr1 Zellen zur Treg-basierten adoptiven T-Zelltherapie bei Menschen nach allogener Knochenmarkstransplantation durchgeführt. Der Grund für den Einsatz von Tr1 Tregs waren die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie, die sie als wichtigen zellulären Bestandteil zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz bei Patienten nach allogener HLA-Mismatch hämatopoetischer Stammzelltransplantation beschrieben haben (125). Auch die Studie aus dem Jahr 1999 zeigte eine Korrelation zwischen dem Nichtauftreten eines GVHD und einer langfristigen Toleranz des Transplantats und einer hohen Frequenz an IL-10 produzierenden Spenderzellen (126). Auch die Forschungsergebnisse von VanBuskirk *et al.* deuteten darauf hin, dass Tr1 Tregs vermehrt in Patienten vorkamen, die spontan eine Toleranz gegenüber Leber- oder Nierentransplantaten entwickelten (127). Diese und ähnliche Beobachtungen konnten auch mit natürlich vorkommenden Tregs sowohl in vorklinischen Studien (108, 128) als auch 2009 im ersten klinischen Versuch im Menschen durch eine polnische Arbeitsgruppe gemacht werden (129).

Ein Vergleich von Immunreaktionen nach Transplantation mit Autoimmunreaktionen erweist sich jedoch als schwierig. Bei Autoimmunerkrankungen handelt es sich um manifeste pathologische Immunreaktionen, mit kaum vorhersagbarem Verlauf der Erkrankung. Die meisten Patienten weisen einen langen Leidensweg auf und stehen bereits unter immunsuppressiver Medikation. Trotz der oben aufgeführten erfolgversprechenden Ergebnisse bezüglich des adoptiven Einsatzes der Tr1 Tregs liegt die Schwierigkeit vor allem darin, dass diese Zellen keinen definierten Phänotyp besitzen und erst durch die Stimulation CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter ganz bestimmten Bedingungen induziert werden. Dies erschwert einerseits die Isolation dieser Zellen und wirft andererseits die Frage auf inwieweit diese Zellen nach Rücküberführung phänotypisch und auch funktionell stabil bleiben würden. Natürlich vorkommende CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs hingegen sind aufgrund des Vorhandenseins „spezifischer“ Oberflächenmarker leichter zu isolieren, dennoch ergeben sich auch hier wie bereits diskutiert einige Schwierigkeiten, die vor allem auf deren Heterogenität zurückzuführen ist. Eine Alternative und ein neuer Versuchsansatz zur Umgehung der oben aufgeführten Problematik der Tr1 und nTregs könnten TIRC7<sup>+</sup> Tregs darstellen. Durch ihre Eigenschaft sowohl FoxP3 zu exprimieren und zusätzlich das antiinflammatorische IL-10 zu exprimieren, vereinen sie die Eigenschaften hochsuppressiver Treg Pools.

## 7.7 Zusammenfassung

Für den Einsatz Treg-basierter adoptiver Therapien sind eine Reihe an Qualitätskriterien zu bedenken und einzuhalten, deren Erfüllung sich gegenwärtig als schwierig erweisen. Eine hochgradig reine Ausgangspopulation scheint keinesfalls ein Garant dafür zu sein, dass nach mehrwöchiger *in vitro* Expansion phänotypisch stabile und funktionsfähige Tregs generiert werden können (74, 75).

Autoimmunerkrankungen, ohne genauere Definition der Pathogenese, können als Zusammenbruch der Immuntoleranz betrachtet werden (65). Dass autoreaktive T-Zellen, die den strikten Selektionsmechanismen im Thymus entkommen sind, auch in gesunden Individuen existieren und durch funktionsfähige Tregs in Schach gehalten werden, ist wissenschaftlich belegt (49). In Hinblick auf die Therapie von Autoimmunerkrankungen bedeutet das vor allem, dass wenn eine Reetablierung der Immuntoleranz durch die Treg-Achse nicht gewährleistet werden kann, alternativ die Eliminierung pathogener Effektorzellen als weitere Therapieoption in Erwägung gezogen werden könnte. Die Schwierigkeit für solche Therapieansätze, die überwiegend im Bereich der Tumorummunologie erforscht wurden, lag bis zum jetzigen Zeitpunkt darin, dass bevorzugt Oberflächenmoleküle auf Tregs als Zielstruktur genutzt wurden (130). Diese Ansätze waren insofern problematisch, da keines dieser Oberflächenmoleküle/Zielstrukturen ausschließlich durch Tregs exprimiert werden (131). Für die effektive Anwendung solcher Therapeutika wie zum Beispiel monoklonaler Antikörper bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen, bedeutet dies somit, dass die Zielstruktur im Idealfall ausschließlich auf den Effektorzellen vorhanden sein beziehungsweise nur durch diese exprimiert werden sollte.

Nicht nur die funktionellen Assays, sondern auch durchflusszytometrische Analysen unabhängig voneinander durchgeführter Inkubationen haben gezeigt, dass der Einsatz des monoklonalen anti-TIRC7 Antikörpers keinen direkten Einfluss auf die Treg-Population hat und sich daher sehr gut eignete diesen Antikörper zur Isolierung der TIRC7+ Tregs einzusetzen. Dass der anti-TIRC7 mAb die Tregs nicht nur funktionell, sondern auch phänotypisch nicht beeinflusst, konnte auch anhand expandierter Tregs bestätigt werden. Zellen aus den Expansionsansätze, in deren Nährmedium über die Expansionsdauer der anti-TIRC7 Antikörper hinzugefügt wurde, zeigten im Vergleich zu dem Kontrollansatz ohne Antikörper keine Veränderung hinsichtlich ihres Phänotyps. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Zellen, die den anti-TIRC7 mAb in ihrem Nährmedium mit enthielten, besser expandierten. So wurde mit dem Zusatz des monoklonalen Antikörpers nach einer dreiwöchigen Expansionsperiode die Ausbeute an Tregs

fast verdoppelt werden. Diese Beobachtungen sind insofern interessant, da insbesondere die Tregs von PsA Patienten, trotz hoher Dosen an rHu IL-2 (1000 IU/ml) und TCR Stimulation mit anti-CD3/CD28 Beads anergisch und somit oft schwieriger zu expandieren waren. Welcher Wirkmechanismus für die Beobachtungen verantwortlich sein könnte, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt und wird weiterführende Untersuchungen nach sich ziehen. Man kann spekulieren, dass die IL-10 Expression in Tregs, die durch den TIRC7 Antikörper induziert wird, einen Beitrag für die Expansion leisten könnte. Auch die Ergebnisse der funktionellen Assays, Proliferations-Assays mit BrdU und Zytokinmessungen mittels ELISA (Daten nicht gezeigt) sind unterstützend für unsere Annahme, dass die Zielpopulation des anti-TIRC7 Antikörper innerhalb der T-Zellen vornehmlich die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellsubpopulation darstellen. Anhand unserer Ergebnisse konnte kein negativer Einfluss des Antikörpers (mAb g) auf den Tregs verzeichnet werden. TIRC7<sup>+</sup> Tregs hingegen zeigten sich in Bezug auf die Suppressionsfähigkeit im Vergleich zu der Gesamt-Treg-Population als deutlich überlegen. Diese Ergebnisse sind insofern vielversprechend, da Beobachtungen in Tiermodellen mit Mäusen zeigen, dass für den adoptiven Transfer von Tregs bessere Resultate bezüglich der Suppressionsfähigkeit erzielt werden, wenn zuvor eine Elimination pathogener Effektorzellen angestrebt wurde (132, 133). Wenn diese Ergebnisse, die im Tiermodell erzielt wurden auch auf den Menschen übertragbar sind, wäre eine Kombinationstherapie aus Elimination der T Effektorzellen mit dem anti-TIRC7 Antikörper und dem anschließenden oder parallelen adoptiven Transfer TIRC7<sup>+</sup> Tregs ein deutlich besserer Ansatz als der alleinige adoptive Transfer von Tregs. Vorher bleibt jedoch die Frage zu klären, welchen Einfluss der anti-TIRC7 Antikörper auf den antigenpräsentierenden Zellen, den B-Zellen und DCs hat und inwieweit die *in vitro* generierten TIRC7<sup>+</sup> Tregs auch *in vivo* ihre Funktion beibehalten würden. Wie eingangs darauf hingewiesen, sind zur Bestätigung dieser initialen Beobachtungen weiterführende Untersuchungen notwendig.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann Rheum Dis.* 2005;64 Suppl 2:ii14-7.
2. Candia L, Marquez J, Gonzalez C, Santos AM, Londono J, Valle R, Zabaleta J, Yaqub Z, Espinoza LR. Low frequency of anticyclic citrullinated peptide antibodies in psoriatic arthritis but not in cutaneous psoriasis. *J Clin Rheumatol.* 2006;12(5):226-9.
3. FitzGerald O, Haroon M, Giles JT, Winchester R. Concepts of pathogenesis in psoriatic arthritis: genotype determines clinical phenotype. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:115.
4. Gladman DD. Psoriatic arthritis. *Dermatol Ther.* 2009;22(1):40-55.
5. Stuart PE, Nair RP, Tsoi LC, Tejasvi T, Das S, Kang HM, Ellinghaus E, Chandran V, Callis-Duffin K, Ike R, Li Y, Wen X, Enerback C, Gudjonsson JE, Koks S, Kingo K, Esko T, Mrowietz U, Reis A, Wichmann HE, Gieger C, Hoffmann P, Nothen MM, Winkelmann J, Kunz M, Moreta EG, Mease PJ, Ritchlin CT, Bowcock AM, Krueger GG, Lim HW, Weidinger S, Weichenthal M, Voorhees JJ, Rahman P, Gregersen PK, Franke A, Gladman DD, Abecasis GR, Elder JT. Genome-wide Association Analysis of Psoriatic Arthritis and Cutaneous Psoriasis Reveals Differences in Their Genetic Architecture. *Am J Hum Genet.* 2015;97(6):816-36.
6. Mease PJ, Gladman DD, Papp KA, Khraishi MM, Thaci D, Behrens F, Northington R, Fuiman J, Bananis E, Boggs R, Alvarez D. Prevalence of rheumatologist-diagnosed psoriatic arthritis in patients with psoriasis in European/North American dermatology clinics. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(5):729-35.
7. Ritchlin CT, Colbert RA, Gladman DD. Psoriatic Arthritis. *N Engl J Med.* 2017;376(10):957-70.
8. Colbert RA. Classification of juvenile spondyloarthritis: Enthesitis-related arthritis and beyond. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(8):477-85.
9. Espinoza LR, Vasey FB, Espinoza CG, Bocanegra TS, Germain BF. Vascular changes in psoriatic synovium. A light and electron microscopic study. *Arthritis Rheum.* 1982;25(6):677-84.
10. Veale DJ, Fearon U. The pathogenesis of psoriatic arthritis. *Lancet.* 2018;391(10136):2273-84.
11. Moll JM, Wright V. Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1973;3(1):55-78.
12. Zwerina J, Redlich K, Schett G, Smolen JS. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:716-29.
13. Kehl AS, Corr M, Weisman MH. Review: Enthesitis: New Insights Into Pathogenesis, Diagnostic Modalities, and Treatment. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(2):312-22.
14. Gladman DD, Ziouzina O, Thavaneswaran A, Chandran V. Dactylitis in psoriatic arthritis: prevalence and response to therapy in the biologic era. *J Rheumatol.* 2013;40(8):1357-9.
15. Brockbank JE, Stein M, Schentag CT, Gladman DD. Dactylitis in psoriatic arthritis: a marker for disease severity? *Ann Rheum Dis.* 2005;64(2):188-90.
16. Buskila D, Langevitz P, Gladman DD, Urowitz S, Smythe HA. Patients with rheumatoid arthritis are more tender than those with psoriatic arthritis. *J Rheumatol.* 1992;19(7):1115-9.
17. Gossec L, Smolen JS, Ramiro S, de Wit M, Cutolo M, Dougados M, Emery P, Landewe R, Oliver S, Aletaha D, Betteridge N, Braun J, Burmester G, Canete JD, Damjanov N, FitzGerald O, Haglund E, Helliwell P, Kvien TK, Lories R, Luger T, Maccarone M, Marzo-Ortega H, McGonagle D, McInnes IB, Olivieri I, Pavelka K, Schett G, Sieper J, van den Bosch F, Veale DJ, Wollenhaupt J, Zink A, van der Heijde D. European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies: 2015 update. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(3):499-510.
18. Schoels MM, Braun J, Dougados M, Emery P, Fitzgerald O, Kavanaugh A, Kvien TK, Landewe R, Luger T, Mease P, Olivieri I, Reveille J, Ritchlin C, Rudwaleit M, Sieper J, Smolen JS, Wit M, van der Heijde D. Treating axial and peripheral spondyloarthritis, including psoriatic

arthritis, to target: results of a systematic literature search to support an international treat-to-target recommendation in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(1):238-42.

19. Coates LC, Ritchlin CT, Kavanaugh AF. GRAPPA treatment recommendations: an update from the GRAPPA 2013 Annual Meeting. *J Rheumatol.* 2014;41(6):1237-9.

20. Ferreira LMR, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. Next-generation regulatory T cell therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(10):749-69.

21. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2007;370(9602):1861-74.

22. Smolen JS, Landewe RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, McInnes IB, Sepriano A, van Vollenhoven RF, de Wit M, Aletaha D, Aringer M, Askling J, Balsa A, Boers M, den Broeder AA, Buch MH, Buttgereit F, Caporali R, Cardiel MH, De Cock D, Codreanu C, Cutolo M, Edwards CJ, van Eijk-Hustings Y, Emery P, Finckh A, Gossec L, Gottenberg JE, Hetland ML, Huizinga TWJ, Koloumas M, Li Z, Mariette X, Muller-Ladner U, Mysler EF, da Silva JAP, Poor G, Pope JE, Rubbert-Roth A, Ruysse-Witrand A, Saag KG, Strangfeld A, Takeuchi T, Voshaar M, Westhovens R, van der Heijde D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis.* 2020.

23. Husni ME, Merola JF, Davin S. The psychosocial burden of psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2017;47(3):351-60.

24. Horreau C, Pouplard C, Brenaut E, Barnetche T, Misery L, Cribier B, Jullien D, Aractingi S, Aubin F, Joly P, Le Maitre M, Ortonne JP, Paul C, Richard MA. Cardiovascular morbidity and mortality in psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27 Suppl 3:12-29.

25. Bravo A, Kavanaugh A. Bedside to bench: defining the immunopathogenesis of psoriatic arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(11):645-56.

26. B. W-U. TNF- $\alpha$ -Antagonisten: Immunbiologika bei Entzündungen. <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=47053>. Pharmazeutische Zeitung online. 2013

27. Bluestone JA, Tang Q. Treg cells-the next frontier of cell therapy. *Science.* 2018;362(6411):154-5.

28. Bluestone JA, Thomson AW, Shevach EM, Weiner HL. What does the future hold for cell-based tolerogenic therapy? *Nat Rev Immunol.* 2007;7(8):650-4.

29. Esensten JH, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. Regulatory T-cell therapy for autoimmune and autoinflammatory diseases: The next frontier. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(6):1710-8.

30. Wang J, Zhang SX, Hao YF, Qiu MT, Luo J, Li YY, Gao C, Li XF. The numbers of peripheral regulatory T cells are reduced in patients with psoriatic arthritis and are restored by low-dose interleukin-2. *Ther Adv Chronic Dis.* 2020;11:2040622320916014.

31. 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;155(3):1151-64.

32. Sakaguchi S, Vignali DA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):461-7.

33. Miyara M, Gorochoy G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;10(12):744-55.

34. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;176(8):4622-31.

35. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Hopner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Rotzschke O, Falk

- K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225-32.
36. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204(6):1257-65.
37. Fritzsching B, Oberle N, Eberhardt N, Quick S, Haas J, Wildemann B, Krammer PH, Suri-Payer E. In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol*. 2005;175(1):32-6.
38. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, Qin FX, Gilliet M, Liu YJ. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity*. 2008;28(6):870-80.
39. Miyara M, Chader D, Sage E, Sugiyama D, Nishikawa H, Bouvry D, Claer L, Hingorani R, Balderas R, Rohrer J, Warner N, Chapelier A, Valeyre D, Kannagi R, Sakaguchi S, Amoura Z, Gorochoy G. Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(23):7225-30.
40. Solstad T, Bains SJ, Landskron J, Aandahl EM, Thiede B, Tasken K, Torgersen KM. CD147 (Basigin/Emmprin) identifies FoxP3+CD45RO+CTLA4+-activated human regulatory T cells. *Blood*. 2011;118(19):5141-51.
41. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2010;184(7):3433-41.
42. Wakkach A, Augier S, Breitmayer JP, Blin-Wakkach C, Carle GF. Characterization of IL-10-secreting T cells derived from regulatory CD4+CD25+ cells by the TIRC7 surface marker. *J Immunol*. 2008;180(9):6054-63.
43. Lüllman-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage ed: 2012 Georg Thieme Verlag KG; 2012.
44. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System. 5th ed: ELSEVIER Inc.; 2016.
45. Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. 9th ed: Garland Science Taylor & Francis Group, LLC New York; 2017.
46. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
47. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18(5):723-37.
48. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 1996;184(2):387-96.
49. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. Autoreactive T cells in healthy individuals. *J Immunol*. 2004;172(10):5967-72.
50. Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006;212:203-16.
51. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005;6(4):345-52.
52. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001;167(3):1245-53.
53. Taams LS, Vukmanovic-Stejic M, Smith J, Dunne PJ, Fletcher JM, Plunkett FJ, Ebeling SB, Lombardi G, Rustin MH, Bijlsma JW, Lafeber FP, Salmon M, Akbar AN. Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(6):1621-30.

54. Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD, Lechler RI. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*. 2001;98(9):2736-44.
55. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*. 2001;193(11):1285-94.
56. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F, Banham AH. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol*. 2005;35(6):1681-91.
57. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*. 2004;16(11):1643-56.
58. Walker MR, Kaspirowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*. 2003;112(9):1437-43.
59. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. 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;198(12):1875-86.
60. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001;182:68-79.
61. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737-42.
62. Groux H. Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation*. 2003;75(9 Suppl):8S-12S.
63. Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(3):346-51.
64. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994;265(5176):1237-40.
65. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006;212:8-27.
66. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20-1.
67. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001;27(1):18-20.
68. Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest*. 2004;114(9):1209-17.
69. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*. 2013;38(3):414-23.
70. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1693-700.

71. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701-11.
72. Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):144-54.
73. Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2008;251(2):109-15.
74. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, Olek S, Dietmaier W, Andreesen R, Edinger M. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol*. 2009;39(4):1088-97.
75. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochov G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30(6):899-911.
76. Bulwin GC, Heinemann T, Bugge V, Winter M, Lohan A, Schlawinsky M, Schulze A, Walter S, Sabat R, Schulein R, Wiesner B, Veh RW, Lohler J, Blumberg RS, Volk HD, Utku N. TIRC7 inhibits T cell proliferation by modulation of CTLA-4 expression. *J Immunol*. 2006;177(10):6833-41.
77. Utku N, Heinemann T, Winter M, Bulwin CG, Schlawinsky M, Fraser P, Nieuwenhuis EE, Volk HD, Blumberg RS. Antibody targeting of TIRC7 results in significant therapeutic effects on collagen-induced arthritis in mice. *Clin Exp Immunol*. 2006;144(1):142-51.
78. Utku N, Heinemann T, Tullius SG, Bulwin GC, Beinke S, Blumberg RS, Beato F, Randall J, Kojima R, Busconi L, Robertson ES, Schulein R, Volk HD, Milford EL, Gullans SR. Prevention of acute allograft rejection by antibody targeting of TIRC7, a novel T cell membrane protein. *Immunity*. 1998;9(4):509-18.
79. Utku N, Boerner A, Tomschegg A, Bennai-Sanfourche F, Bulwin GC, Heinemann T, Loehler J, Blumberg RS, Volk HD. TIRC7 deficiency causes in vitro and in vivo augmentation of T and B cell activation and cytokine response. *J Immunol*. 2004;173(4):2342-52.
80. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500.
81. Shevach EM, Piccirillo CA, Thornton AM, McHugh RS. Control of T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *Novartis Found Symp*. 2003;252:24-36; discussion -44, 106-14.
82. Bonisch A, Ehlebracht-Konig I. [The BASDAI-D--an instrument to defining disease status in ankylosing spondylitis and related diseases]. *Z Rheumatol*. 2003;62(3):251-63.
83. van Riel PL, Renskers L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34(5 Suppl 101):S40-S4.
84. Myles PS. The pain visual analog scale: linear or nonlinear? *Anesthesiology*. 2004;100(3):744; author reply 5.
85. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231-8.
86. sigma-aldrich R. Cell Prolifeartion ELISA, BrdU (calorimetric). August 2018. p. 1-20.
87. Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM. Defective suppressor function of human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med*. 2004;199(9):1285-91.
88. Nomura T, Sakaguchi S. Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance. *Nat Immunol*. 2007;8(4):333-4.



89. Kekalainen E, Tuovinen H, Joensuu J, Gylling M, Franssila R, Pontynen N, Talvensaari K, Perheentupa J, Miettinen A, Arstila TP. A defect of regulatory T cells in patients with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Immunol.* 2007;178(2):1208-15.
90. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest.* 2000;106(12):R75-81.
91. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med.* 2004;200(3):277-85.
92. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 2008;253(1-2):92-101.
93. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Nochy D, Debre P, Piette JC, Gorochov G. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2005;175(12):8392-400.
94. Bonelli M, Savitskaya A, von Dalwigk K, Steiner CW, Aletaha D, Smolen JS, Scheinecker C. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Int Immunol.* 2008;20(7):861-8.
95. Heinemann T, Bulwin GC, Randall J, Schnieders B, Sandhoff K, Volk HD, Milford E, Gullans SR, Utku N. Genomic organization of the gene coding for TIRC7, a novel membrane protein essential for T cell activation. *Genomics.* 1999;57(3):398-406.
96. Toubi E, Kessel A, Mahmudov Z, Hallas K, Rozenbaum M, Rosner I. Increased spontaneous apoptosis of CD4+CD25+ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:506-14.
97. Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2005;140(2):360-7.
98. Bulwin GC, Walter S, Schlawinsky M, Heinemann T, Schulze A, Hohne W, Krause G, Kalka-Moll W, Fraser P, Volk HD, Lohler J, Milford EL, Utku N. HLA-DR alpha 2 mediates negative signalling via binding to Tirc7 leading to anti-inflammatory and apoptotic effects in lymphocytes in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2008;3(2):e1576.
99. Frischer JM, Reindl M, Kunz B, Berger T, Schmidt S, Milford EL, Knosp E, Lassmann H, Utku N. TIRC7 and HLA-DR axis contributes to inflammation in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014;20(9):1171-81.
100. Jain N, Nguyen H, Chambers C, Kang J. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(4):1524-8.
101. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreesen R, Edinger M. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood.* 2006;108(13):4260-7.
102. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(8):585-98.
103. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 2004;199(11):1455-65.
104. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 2004;199(11):1467-77.

105. Masteller EL, Warner MR, Tang Q, Tarbell KV, McDevitt H, Bluestone JA. Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2005;175(5):3053-9.
106. Hori S, Haury M, Coutinho A, Demengeot J. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(12):8213-8.
107. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002;169(9):4712-6.
108. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med.* 2002;196(3):401-6.
109. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2002;196(3):389-99.
110. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood.* 2002;99(10):3493-9.
111. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol.* 2006;177(12):8338-47.
112. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood.* 2005;105(12):4743-8.
113. Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, Kissane S, Agius E, Jackson SE, Salmon M, Falciani F, Yong K, Rustin MH, Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol.* 2010;184(8):4317-26.
114. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, Nanan R, Fazekas de Saint Groth B. Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood.* 2006;107(7):2830-8.
115. Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1953-62.
116. Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Lincoln PM, Burdick MD, Kunkel SL. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J Clin Invest.* 1995;95(6):2868-76.
117. Powrie F, Coffman RL. Inhibition of cell-mediated immunity by IL4 and IL10. *Res Immunol.* 1993;144(8):639-43.
118. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993;75(2):263-74.
119. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Menon S, Davidson N, Grunig G, Rennick D. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest.* 1995;96(5):2339-47.
120. Asadullah K, Sterry W, Stephanek K, Jasulaitis D, Leupold M, Audring H, Volk HD, Docke WD. IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest.* 1998;101(4):783-94.
121. Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, Isaacs K, van Deventer SJ, Koningsberger JC, Cohard M, LeBeaut A, Hanauer SB. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic

- active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1461-72.
122. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170(6):2081-95.
123. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*. 1990;248(4960):1230-4.
124. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008;226:205-18.
125. Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, de Waal Malefyt R, de Vries JE, Roncarolo MG. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 1994;179(2):493-502.
126. Baker KS, Roncarolo MG, Peters C, Bigler M, DeFor T, Blazar BR. High spontaneous IL-10 production in unrelated bone marrow transplant recipients is associated with fewer transplant-related complications and early deaths. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23(11):1123-9.
127. VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, Chin T, Kusaka S, Geissler F, Pelletier RP, Orosz CG. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest*. 2000;106(1):145-55.
128. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9(9):1144-50.
129. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juscinska J, Dobyszek A, Krzystyniak A, Marek N, Mysliwska J, Hellmann A. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol*. 2009;133(1):22-6.
130. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer*. 2010;127(4):759-67.
131. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*. 2005;201(5):723-35.
132. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol*. 2006;177(9):5852-60.
133. Miyara M, Wing K, Sakaguchi S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(4):749-55; quiz 56-7.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Aysegül Adam, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Charakterisierung von TIRC7+ T regulatorischen Zellen in Autoimmunerkrankungen am Beispiel der Psoriasis Arthritis

*Characterization of TIRC7+ regulatory T cells in autoimmune diseases, Psoriatic Arthritis as an example*

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## LEBENS LAUF

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



## DANKSAGUNG

Für die Verwirklichung dieser Doktorarbeit möchte ich mich bei meinen Betreuern und all denen Menschen bedanken, die es mir mit der Betreuung dieser Arbeit erst ermöglicht haben, zu promovieren und mein Interesse in der experimentellen Forschung geweckt haben. Durch den regelmäßigen Austausch war die Betreuung stets motivierend und engagiert. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Khetam Ghannam bedanken, der ich das Erlernen der Methoden zu verdanken habe und die immer ein offenes Ohr für Probleme während der verschiedenen Experimente hatte. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Lorena Martinez Gamboa bedanken, die immer Zeit für mich hatte und bei der Lösung von Problemen mir stets beratend zur Seite stand.

Ein besonders großer Dank gilt an dieser Stelle auch an Marcos Cases für seine allzeit große Hilfsbereitschaft, den regelmäßigen Austausch und die Motivation auch in schwierigen Phasen, dem ich das Erlernen der Durchflusszytometrie zu verdanken habe. Ohne seine Hilfe und Geduld wäre manches nicht zu verwirklichen gewesen.

Darüber hinaus gilt insbesondere meinen Eltern großer Dank, die immer unterstützend hinter mir standen. Ohne sie wäre mein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich gewesen.

Abschließend möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. E. Feist und Herrn Prof. Dr. G. Burmester für die Möglichkeit zum Forschen in der Medizinischen Klinik für Rheumatologie mit Schwerpunkt Klinischer Immunologie bedanken. Ich danke auch dem ganzen Team der Studienabteilung, die mich stets herzlich empfangen haben und mir bei der Patientenorganisation und der Probensammlung immer unterstützend zur Seite standen.