

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Veränderungen in der Frequenz regulatorischer T-Zellen nach
Nierentransplantation und epigenetische Regulation stabiler Foxp3-
Expression

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katayoun Behnam Sani
aus Teheran (Iran)

Datum der Promotion: 25.11.2022

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung	IX
Abstract	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 Immunzelltherapien in der Transplantation.....	1
1.1.1 Organtransplantation und Immunsuppression.....	1
1.1.2 Die ONE Study.....	4
1.1.3 Die Referenzgruppe der ONE Study	6
1.2 Die regulatorischen T-Zellen.....	6
1.2.1 Die Entstehung und Wirkung der Tregs.....	6
1.2.2 Marker für die Charakterisierung von Treg-Zellen.....	7
1.2.3 Funktionelle Eigenschaften von Treg-Zellen.....	10
1.2.4 Die epigenetische Regulation der Foxp3-Expression	12
1.2.5 Die demethylierenden Tet-Enzyme.....	15
1.2.6 Die nukleären Rezeptoren der NR4A-Familie	16
1.3 Die Wirkung gängiger Immunsuppressiva auf Treg-Zellen.....	18
1.4 Zielsetzung.....	20
2. Material.....	21
2.1 Antikörper.....	21
2.2 Chemikalien und Reagenzien	21
2.3 Geräte.....	22
2.4 Puffer und Zusammensetzung	22
2.5 Kommerzielle Kits.....	23
2.6 Oligonukleotide für qRT-PCR.....	23
2.7 Software.....	24
2.8 Verbrauchsmaterial und Zubehör	24
3. Methodik.....	26
3.1 Studiendesign, Patientenkollektiv und Probandenrekrutierung.....	26
3.1.1 Patientenkollektiv der Referenzgruppe der ONE Study	27
3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien der Referenzgruppe der ONE Study	27
3.1.3 Nachuntersuchungen und medikamentöse Therapie in der ONE Study	28

3.2	Isolierung von PBMCs und Zellzahlbestimmung	30
3.3	Anreicherung von CD4 ⁺ Zellen	31
3.4	Zellsortierung	32
3.5	Durchflusszytometrische Kontrollen der sortierten Zellen	34
3.5.1	Lebend/Tot-Färbung	34
3.5.2	Oberflächenfärbung	34
3.5.3	Intrazelluläre Färbung	35
3.6	Isolierung von RNA und DNA	35
3.7	Konzentrationsmessung der Nukleinsäuren	36
3.8	Gewinnung von cDNA	36
3.9	Genexpressionsanalysen	36
3.9.1	Genexpressionsanalysen aus durchflusszytometrisch sortierten Treg-Zellen	36
3.9.2	Genexpressionsanalysen und Durchflusszytometrie aus Vollblut gesunder Probanden	37
3.9.3	qRT-PCR	37
3.10	Analyse der TSDR-Demethylierung	39
3.11	Auswertung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse der ONE Study	40
3.12	Statistische Auswertung	43
4.	Ergebnisse	44
4.1	Referenzgruppe der ONE Study	44
4.1.1	Frequenz der Tregs und TSDR-Demethylierung im Verlauf der Studie	44
4.1.2	Vergleich der intrazellulären Foxp3-Färbung zwischen den Zentren	47
4.1.3	Korrelation der Treg-Frequenzen mit TSDR-Demethylierung	48
4.2	Epigenetische Regulatoren der stabilen Foxp3-Expression	51
4.2.1	Korrelation der Tet- und NR4A-Expression mit Foxp3 und TSDR	51
4.2.2	Altersabhängiger Verlauf der Expression der Tet- und NR4A-Faktoren	52
4.2.3	Expression der epigenetischen Regulatoren in Tregs und konventionellen T-Zellen	55
4.2.4	Expression der epigenetischen Regulatoren in Treg-Subpopulationen	58
5.	Diskussion	61
5.1	Referenzgruppe der ONE Study	61
5.1.1	Veränderung der Treg-Frequenzen nach der Nierentransplantation	61
5.1.2	Die Veränderung der Foxp3 ^{high} Treg-Population nach Transplantation	64
5.1.3	Die TSDR-Demethylierungsrate im Verlauf der Studie	66
5.1.4	Korrelation der Treg-Frequenzen mit TSDR-Demethylierung	67
5.2	Epigenetische Regulation der Foxp3-Expression	68

5.2.1	Korrelation der Tet- und NR4A-mRNA-Expression mit Foxp3 und TSDR	68
5.2.2	Altersabhängige Expression der epigenetischen Regulatoren in gesunden Probanden	69
5.2.3	Expression der epigenetischen Regulatoren in sortierten naiven und Gedächtnis- Tregs und Tconv	70
5.2.4	Expression der epigenetischen Regulatoren in Treg-Subpopulationen.....	71
5.3	Ausblick.....	75
	Literaturverzeichnis.....	78
	Eidesstattliche Versicherung	90
	Lebenslauf	92
	Publikationsliste	94
	Danksagung	95

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die suppressiven Mechanismen von Tregs.....	11
Abb. 2: Die epigenetische Regulation der Foxp3-Expression.	14
Abb. 3: Die Rolle der TET-Enzyme in der DNA-Methylierung und -Demethylierung.	16
Abb. 4: Die Therapieprotokolle der Referenzgruppe und der Zelltherapiegruppe der ONE Study	28
Abb. 5: Sortierungsstrategie.....	33
Abb. 6: Gating-Strategie für die durchflusszytometrischen Analysen zur Bestimmung der Foxp3- exprimierenden Tregs.....	41
Abb. 7: Gating-Strategie für die durchflusszytometrischen Analysen zur Bestimmung der CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} Tregs.....	42
Abb. 8: Frequenz der Treg-Zellen und TSDR-Demethylierungsraten der Referenzgruppe der ONE-Study im Verlauf der Studie	45
Abb. 9: Vergleich der intrazellulären Foxp3-Färbung von verschiedenen Studienzentren	48
Abb. 10: Korrelation der Treg-Frequenzen mit der TSDR-Demethylierung.....	49
Abb. 11: Korrelation der Expression epigenetischer Regulatoren mit Foxp3-Expression und TSDR-Demethylierung	52
Abb. 12: Altersabhängige Veränderungen der Genexpression, TSDR-Demethylierung und Treg- Frequenzen.	54
Abb. 13: Expression der epigenetischen Regulatoren der Foxp3-Expression in Abhängigkeit von Frequenz der Gedächtnis-Tregs (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} CD45RA ⁻).....	55
Abb. 14: TSDR-Demethylierung und Expression der epigenetischen Regulatoren in naiven und Gedächtnis-Tregs und Tconv	57
Abb. 15: TSDR-Demethylierung, Expression von Foxp3 und der epigenetischen Regulatoren in CD45RA ^{+/-low} CCR4 ^{+/-low} Zellen.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die medikamentöse Therapie der Referenzgruppe der ONE-Study.	29
Tabelle 2: die medikamentöse Therapie der Zelltherapiegruppe der ONE Study.	30
Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für qRT-PCR.	38
Tabelle 4: PCR-Reaktion	39
Tabelle 5: Statistische Auswertung der Genexpressionsanalysen von naiven und Gedächtnis- Tregs und Tconv.....	58
Tabelle 6: Statistische Auswertung der Genexpressionen von CD45RA ^{+/-low} CCR4 ^{+/-low} Zellen	60

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

(c)AMP	(zyklisches) Adenosinmonophosphat
5caC	5-Carboxylcytosin
5fC	5-Formylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
A647	Alexa Fluor 647
Abb.	Abbildung
AF488	Alexa Fluor 488
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	Allophycocyanin
Aqua dest	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCRT	Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien
BER	Basenexzisionsreparatur (<i>base excision repair</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
BV510/421	<i>Brilliant violet 510/421</i>
C	Zentrum
CBF- β	<i>Core-binding factor subunit β</i>
CCL17/22	<i>C-C motif chemokine ligand 17/22</i>
CCR4	C-C Chemokinrezeptor Typ 4 (<i>C-C chemokine receptor type 4</i>)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CNI	Calcineurin-Inhibitor
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EB	<i>Elution buffer</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ets-1	<i>E26 avian erythroblastosis virus transcription factor-1</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein oder <i>Fluorescein amidite</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxo	<i>Forkhead box protein O</i>
Foxp3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	<i>Forward scatter</i>

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytantigen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukin
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene 3</i>
LD	Live/dead
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMF	Mycofenolat-Mofetil
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
Nor1	<i>Neuron- derived orphan receptor 1</i>
NR	Nukleärer Rezeptor (<i>nuclear receptor</i>)
Nurr1/77	<i>Nur-related factor 1/77</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PRA	<i>Panel-reactive antibody</i>
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RAR	Retinsäure-Rezeptor (<i>retinoic acid receptor</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SATB-1	<i>Special AT-rich sequence-binding protein-1</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of mean</i>)
SMAD2/3	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 2/3</i>
β 2M	Beta-2-Mikroglobulin
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
Tconv	Konventionelle T-Zelle (<i>Conventional T cell</i>)
TDG	Thymin-DNA-Glycosylase
Tet	<i>Ten-eleven translocation</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TIM3	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Treg	Regulatorische T-Zelle

TSDR	Treg-spezifische demethylierte Region (<i>Treg-specific demethylated region</i>)
u. a.	unter anderem
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
V	Version
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen für physikalische Größen und Einheitsvorsätze

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10^{-6})
g	Gramm
k	Kilo (10^3)
l	Liter
M	Mol
m	Milli (10^{-3})
min	Minute
n	Nano (10^{-9})
p	Pico (10^{-12})
s	Sekunde

Zusammenfassung

Der Einsatz von immunregulatorischen Zellen in der Organtransplantation zur Induktion von Toleranz kann möglicherweise den Bedarf an immunsuppressiven Medikamenten reduzieren und Transplantatempfänger*innen vor den Langzeitschäden einer Immunsuppression schützen. Die ONE Study untersucht die Immunzelltherapie im Rahmen von Nierentransplantationen auf ihre Sicherheit und Wirksamkeit. Als Referenzgruppe für diese Studie wurden Patient*innen rekrutiert, die nach einer Nierentransplantation konventionell immunsuppressiv behandelt und in regelmäßigen Abständen mit einem einheitlichen Protokoll untersucht wurden. In der ONE Study werden u. a. regulatorische T-Zellen (Tregs) untersucht, die bei der Toleranzvermittlung zu allogenen Gewebe eine wichtige Rolle spielen. Tregs sind eine heterogene Zellgruppe und können anhand ihrer funktionellen und phänotypischen Eigenschaften in mehrere Subpopulationen eingeteilt werden. Speziell die Gruppe der Effektor-Gedächtnis-Tregs, welche sich u. a. durch eine hohe Expression von Foxp3 (Foxp3^{high}) auszeichnet, scheint bei der Toleranzvermittlung eine wichtige Rolle zu spielen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Treg-Frequenzen in der Referenzgruppe der ONE Study und deren Entwicklung im Verlauf der Studie untersucht. Die Erfassung der Populationen anhand verschiedener Marker zeigte eine initiale Abnahme der Treg-Frequenzen nach Transplantation. Die Frequenzen stiegen allmählich wieder an und erreichten ein konstantes Niveau. Dieses war geringer als vor der Transplantation, möglicherweise eine Folge der laufenden Immunsuppression. Es zeigten sich allerdings Ungleichheiten in den Färbeergebnissen der teilnehmenden Zentren, weswegen die korrekte Erfassung der Populationen anhand der Foxp3-Expression fraglich ist.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Regulation stabiler Foxp3-Expression, die zur Stabilität der Tregs beiträgt. Es gibt Hinweise darauf, dass die demethylierenden Tet-Enzyme sowie die NR4A-Rezeptoren, die ihre Wirkung an verschiedenen Orten des Foxp3-Genlocus entfalten, in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Die mRNA-Expression dieser Faktoren wurde in Proben gesunder Probanden untersucht. Die Bestimmung der mRNA im Vollblut zeigte keine Korrelation mit TSDR-Demethylierung und Foxp3-Expression. Einige dieser Faktoren zeigten einen Anstieg mit dem Alter. Allerdings korrelierten diese, bis auf NR4A2, nicht mit der ebenfalls steigenden Frequenz der Effektor-Gedächtnis-Tregs. In sortierten Zellen zeigten die Tet-Enzyme teilweise signifikante Unterschiede in der Expression zwischen Tregs und konventionellen T-Zellen, wohingegen bei NR4A-Faktoren keine Unterschiede zu sehen waren. Eine Unterteilung der Treg-Subpopulationen anhand der Expression von CCR4 zeigte für die

Population der CD45RA^{low}CCR4^{low} Zellen eine Tendenz zur höheren Foxp3 Expression, was mit einer tendenziell erhöhten Expression der epigenetischen Regulatoren einherging. Dieselbe Tendenz konnte für TSDR-Demethylierung nicht beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass in Tregs die Expression der Tet- und NR4A-Faktoren Voraussetzung für die Foxp3-mRNA-Expression ist.

Abstract

Using regulatory cells in solid organ transplantation with the aim of tolerance induction can reduce the requirement for immunosuppressants and prevent the long-term side effects of these pharmaceuticals. The ONE Study investigates the safety and efficacy of cell therapy in kidney transplantation. The reference group for this study consists of kidney transplant recipients treated with a conventional immunosuppressive regimen and routinely surveyed with a unified protocol. The tolerogenic regulatory T cells (Tregs) are one of the cell types investigated in the ONE Study. Tregs are a heterogeneous cell group and can be divided into various subpopulations based on their function and phenotype. The effector/memory Tregs in particular, consisting of Tregs with a high degree of Foxp3 expression (Foxp3^{high}), seem to contribute to tolerance mediation.

In the first part of this thesis, the frequency of Treg populations from the reference group of the ONE Study were analyzed. Treg populations were assessed based on various markers, showing a reduced frequency initially after transplantation. After that, Treg frequencies gradually recovered, reaching a constant level which was lower than prior to the transplantation, possibly resulting from immunosuppressants. There were, however, differences in the staining performances of the participating centers, questioning the accurate assessment of the Treg populations based on their Foxp3 expression.

The second part of this thesis investigated the regulation of a stable Foxp3 expression, which is required for Treg stability. Research suggests that the demethylating enzymes of the Tet family and NR4A receptors, which affect different parts of the Foxp3 gene, play an important role in this context. The mRNA expression of these factors in samples from healthy volunteers was determined. Assessing the mRNA in whole blood revealed no correlation with TSDR demethylation and Foxp3 expression. Some factors showed an age-dependent increase. However, except for NR4A2, none of these factors correlated with the frequency of effector/memory Tregs, which also increases with age. Gene expression in sorted cells revealed that some Tet enzymes, but not NR4A receptors, showed significant differences between Tregs and conventional T cells. Further dividing Tregs into subpopulations based on the marker CCR4 revealed that the CD45RA^{low}CCR4^{low} cells tended to have a higher Foxp3 expression, accompanied by the tendency to increased expression of the epigenetic regulators. This was not observed regarding TSDR demethylation. This suggests that in Tregs, the expression of Tet and NR4A factors is required for the expression of the Foxp3 mRNA.

1. Einleitung

1.1 Immunzelltherapien in der Transplantation

1.1.1 Organtransplantation und Immunsuppression

Die Organtransplantation ist eine der bedeutendsten Errungenschaften der modernen Medizin und bleibt nach wie vor oft die einzige Therapiemöglichkeit bei terminalem Organversagen. Allein in Deutschland im Jahr 2018 wurden knapp 4.000 Organe transplantiert. Bei den meisten handelte es sich um Nierentransplantationen. Der Bedarf an Organen ist hoch: Ende 2018 standen noch ca. 9500 Menschen auf der Warteliste für ein neues Organ, die meisten warteten auf eine Niere (1).

Eine wesentliche Herausforderung bei der Therapie und Betreuung organtransplantierte Patient*innen ist die Abwendung von möglichen Abstoßungsreaktionen auf das Transplantat: Das eingepflanzte Gewebe wird vom Immunsystem als „fremd“ erkannt. Dies setzt eine Reihe immunologischer Mechanismen in Gang, welche zu einer gestörten Funktion des Organs bis hin zu dessen Zerstörung führen können (2).

Im Kontext der Transplantation spielen Komponenten des adaptiven Immunsystems eine maßgebliche Rolle. Die Zellen des adaptiven Immunsystems umfassen die B- und T-Lymphozyten, auch B- und T-Zellen genannt. B-Zellen können sich nach Kontakt zu einem Antigen, zu Plasmazellen differenzieren, welche für die Antikörperproduktion zuständig sind. T-Zellen haben vielfältige Funktionen: zytotoxische T-Zellen töten infizierte oder entartete Zellen. Verschiedene Typen von T-Helferzellen optimieren die Immunantwort durch Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems. Die regulatorischen T-Zellen, auch Tregs genannt, spielen eine besondere Rolle, indem sie die proinflammatorische Immunantwort supprimieren und eine überschießende Immunreaktion verhindern (3).

Nach einer Transplantation werden Effektor-T-Zellen (Teff) durch die Stimulation ihres T-Zell-Rezeptors aktiviert. Die Teff können Alloantigene erkennen, welche von antigenpräsentierenden Zellen auf den *major histocompatibility complex*(MHC)-II-Molekülen präsentiert werden (indirekte Antigenerkennung). Sie sind zusätzlich in der Lage, fremde MHC-Moleküle direkt zu erkennen (4). Die aktivierten T-Zellen wandern in das Transplantat ein und lösen dort eine inflammatorische Antwort aus. Die ebenfalls aktivierten, antigenpräsentierenden Zellen migrieren in die Lymphknoten und aktivieren dort mehr T-Zellen, die wiederum das Transplantat angreifen.

Verschiedene Strategien prä- und postoperativ können das Risiko einer Abstoßung vermindern. Beispielsweise kann vor einer Transplantation die Gewebekompatibilität durch die Typisierung der MHC-Allele bestimmt werden. Zusätzlich werden Empfänger*innen auf das Vorhandensein präformierter Antikörper gegen die Spenderantigene untersucht (5-7). Trotz dieser Vorkehrungen ist eine medikamentöse Unterdrückung der Immunantwort (sogenannte Immunsuppression), außer im Falle genetisch identischer Zwillinge, oft unvermeidbar (8).

In der Transplantationsmedizin werden verschiedene immunsuppressive Therapieprotokolle eingesetzt, die oft eine Kombination unterschiedlicher Medikamente beinhalten. In der Nierentransplantation besteht diese immunsuppressive Therapie oft aus einem Calcineurin-Inhibitor (CNI), einem antiproliferativen Mittel wie das Mycophenolat-Mofetil (MMF) und Glukokortikoiden. Darüber hinaus wird oft zum Zeitpunkt der Transplantation eine Induktionstherapie mit einem Anti-Interleukin-2(IL-2)-Antikörper oder Antithymoglobulin durchgeführt, um einer akuten Abstoßung vorzubeugen (9).

Durch die immunsuppressive Therapie konnte bei Nierentransplantierten bisher vor allem die Rate an akuten Abstoßungen verringert werden. Auch eine Besserung der operativen Techniken, Optimierung der Behandlung von Komplikationen und eine insgesamt bessere Betreuung der Patient*innen tragen hierzu bei (10-13). Allerdings stellt vor allem die chronische, Antikörpervermittelte (humorale) Abstoßung, die auf lange Sicht zum Transplantatversagen führen kann, weiterhin ein Problem dar. Auch die fehlende Therapie-Adhärenz seitens der Empfänger*innen gefährdet das Langzeitüberleben der Transplantate (14). Zwar hat sich insgesamt das Überleben der Transplantatnieren in den letzten 30 Jahren gebessert, dies ist aber hauptsächlich auf die besseren Ergebnisse in den ersten Jahren nach Transplantation zurückzuführen. Im Gegensatz dazu konnte das Langzeitüberleben nur marginal gebessert werden und ist nach wie vor nicht zufriedenstellend. Hinzu kommt, dass die positive Entwicklung der Kurzeitergebnisse sich seit dem Jahr 2000 verlangsamt, hier also weniger Fortschritte erzielt werden (15-17).

Jedoch kommt der Organverlust häufiger durch den frühzeitigen Tod der Transplantierten zustande als durch Organversagen. Hauptursachen hierfür sind Malignome und Infektionen. Kardiovaskuläre Ereignisse stellen die dritthäufigste Todesursache von Nierentransplantierten dar (18). Zu diesen Komplikationen trägt die immunsuppressive Therapie bei: Die Unterdrückung des Immunsystems erhöht die Gefahr für die Entwicklung von Infektionen und Neoplasien (19, 20). Zusätzlich haben die Medikamente jeweils weitere, spezifische unerwünschte Wirkungen. Beispielsweise begünstigen Glukokortikoide und CNI die Entstehung von Diabetes mellitus,

welcher wiederum das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöht (21). CNI sind außerdem direkt nephrotoxisch (9).

Dies verdeutlicht die Gefahren, die von einer lebenslangen Immunsuppression, trotz ihrer wichtigen Funktion im Transplantaterhalt, für die Patient*innen ausgehen. Um dieses Problem zu lösen, werden verschiedene Ansätze diskutiert: Die Entwicklung neuer, nebenwirkungsärmerer Immunsuppressiva soll angestrebt werden, die einzeln oder in Kombination mit anderen Präparaten einen längerfristigen Transplantaterhalt ermöglichen. Beispielsweise konnten gute Ergebnisse mit dem Präparat Belatacept erzielt werden, welches im Vergleich zu CNI eine bessere Nierenfunktion ermöglicht (22). Bereits eine Reduktion oder Minimierung der Dosis könnte die unerwünschten Nebenwirkungen von Immunsuppressiva verringern (23-25). Dies soll Anlass zur Optimierung etablierter Therapieprotokolle geben und auch bei der Erstellung neuer Therapien berücksichtigt werden. Dafür müssen geeignete Patient*innen identifiziert und die Therapie individuell angepasst werden. Zudem können neue Therapieansätze, auch wenn sie keinen vollständigen Verzicht auf bekannte Immunsuppressiva erlauben, durch eine Dosisreduktion einen Vorteil bieten (25).

Da die generelle Unterdrückung des Immunsystems nach der Transplantation viele Komplikationen verursacht, erscheint es erstrebenswert, spezifisch die Immunreaktion auf das Transplantat zu verhindern, ohne andere Funktionen des Immunsystems zu beeinträchtigen. In diesem Ansatz ist ein Zustand optimal, in dem eine stabile Organfunktion in Abwesenheit von Abstoßungen und ohne immunsuppressive Medikation herrscht. Interessanterweise kommt dieser Zustand in der Praxis gelegentlich vor: Manche Transplantierte, die ihre Immunsuppressiva auf Grund von Nebenwirkungen oder aus fehlender Therapie-Adhärenz absetzen, bleiben längerfristig abstoßungsfrei. Dieses Phänomen wird als „operationale Toleranz“ bezeichnet (26). Einige Patient*innen zeigen selbst Jahre nach Einstellung der Medikamenteneinnahme eine stabile Transplantatfunktion ohne Abstoßungsreaktion. In vielen Studien gelten Transplantierte als operational tolerant, wenn dieser Zustand mindestens ein Jahr lang besteht (27). Bei operational toleranten Menschen scheint das Immunsystem nicht lediglich hyporeaktiv zu sein, denn sie zeigen keine erhöhte Rate an Infektionen oder Neoplasien (28, 29). Diese Fälle bieten eine interessante Möglichkeit, die Mechanismen der Toleranz in Menschen näher zu untersuchen. Es sind bereits Versuche unternommen worden, einen ähnlichen Zustand in anderen Transplantierten zu induzieren. Das Ziel hierbei ist, eine Toleranz speziell gegen Spenderantigene zu erreichen. Einige dieser Ansätze werden im Folgenden kurz vorgestellt (30).

Eine simultane Transplantation von Niere und Knochenmark ist bereits erfolgreich für die Toleranzinduktion eingesetzt worden. Dieser Ansatz, der die Koexistenz der Knochenmarkszellen und deren Derivate von Spender und Empfänger erlaubt, wird als „gemischter Chimärismus“ (*mixed chimerism*) bezeichnet. Die transplantierten Immunzellen des Spenders bewirken zentral (im Thymus) und in der Peripherie eine Auslöschung oder Suppression der Spender-reaktiven Immunzellen. Ebenso spielen regulatorische B- und T-Zellen, sowie immunregulierende Mechanismen in der transplantierten Niere bei der Toleranzinduktion eine Rolle (28, 31, 32).

Ein anderer Ansatz ist, Organtransplantierte zu identifizieren, die operational tolerant sind oder es werden können. In solchen Fällen wäre, zumindest in der Theorie, der Verzicht auf Immunsuppressiva möglich. Essenzielle Voraussetzung hierfür ist, die toleranten Patient*innen zweifelsfrei zu identifizieren, um sie nicht unnötig der Gefahr einer Abstoßung auszusetzen. Welche biologischen Marker als Indikatoren für Toleranz brauchbar sind, ist Gegenstand aktueller Forschung (27).

Eine dritte Möglichkeit, die derzeit untersucht wird, ist die Immunzelltherapie. In diesem Ansatz soll durch die Behandlung der Transplantierten mit definierten regulatorischen Immunzellen eine antigenspezifische Toleranz induziert werden. Dies würde das Transplantat vor der Immunantwort schützen, ohne dass eine generelle Immunsuppression notwendig ist. Im Optimalfall erlaubt diese Therapieform eine Reduktion oder gar Verzicht auf Immunsuppressiva. Der Einsatz von regulatorischen Zellen im Rahmen der Transplantation wird zur Zeit in einigen klinischen Studien erprobt [eine Übersicht findet sich in (33)].

1.1.2 Die ONE Study

Die „*ONE Study*“ ist eine multizentrische klinische Studie, welche den Einsatz von Immunzelltherapien im Rahmen der Nierentransplantation untersucht. Das Projekt trägt den Namen: „*A Unified Approach to Evaluating Cellular Immunotherapy in Solid Organ Transplantation*“, auf Deutsch: „Ein einheitlicher Ansatz zur Evaluierung der Immunzelltherapie in Organtransplantation“. Die Studie ist in Zusammenarbeit von verschiedenen Transplantationszentren aus Deutschland, Italien, Frankreich, Großbritannien und den USA entstanden. Dabei entwickeln die beteiligten Zentren verschiedene Zelltherapie-Produkte aus regulatorischen Zellen, deren Sicherheit und Wirksamkeit bei Einsatz in Transplantationen untersucht werden soll. Diese regulatorischen Zellprodukte bestanden aus Tregs, dendritischen

Zellen sowie regulatorischen Makrophagen (auf die Zellprodukte wird im Abschnitt 3.1 genauer eingegangen). Die Nierentransplantation eignet sich hierfür besonders, da sie am häufigsten durchgeführt wird und zudem durch die hohe Anzahl an Lebendspenden eine ausreichende Vorbereitung ermöglicht.

Das Hauptziel dieser Studie ist, zu evaluieren, ob die Immunzelltherapie eine sichere, klinisch praktikable und therapeutisch effektive Option zur Minimierung der Immunsuppression bei Transplantationen sein kann. Um eine adäquate Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den verschiedenen beteiligten Zentren zu ermöglichen, wurde ein einheitliches, standardisiertes Protokoll (ONE) für die Studie entwickelt und verwendet (34). Oberste und höchste Priorität in der Studie hat die Sicherheit von Teilnehmenden bei der Immunzelltherapie. Somit wurde der primäre Endpunkt der Studie als akute Abstoßungsreaktion definiert, die durch Gewebebiopsie bestätigt werden musste. Es sollten zudem die verschiedenen Zelltherapie-Produkte hinsichtlich ihrer Wirksamkeit evaluiert werden. Nicht zuletzt sollte somit die Zelltherapie in einer größeren Dimension auf ihre klinische Anwendbarkeit überprüft werden. Zu diesem Zweck ist im Studienprotokoll die regelmäßige klinische sowie laborchemische Überwachung (Blut- und Urinuntersuchungen) und Evaluierung der Immunfunktionen der Teilnehmenden vorgesehen. Die laborchemische Untersuchung beinhaltet u. a. die Suche nach Infektionen, Anzeichen für eine Immundepression, Entwicklung von Antikörpern gegen das Transplantat, Erfassung verschiedener Leukozytenpopulationen und Genexpressionsanalysen. Zur besseren Vergleichbarkeit werden die meisten Laboranalysen in einem Zentrum durchgeführt, um die Variabilität zwischen den Laboren zu verringern.

Die Untersuchungen beinhalten die Analyse und Auswertung der Immunzellen in Blutproben der Teilnehmenden mittels Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie findet in der Forschung und Diagnostik seit Langem Anwendung. Allerdings können die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung zwischen verschiedenen Laboren stark variieren und sind deswegen nicht immer vergleichbar. Unterschiede bei der Lagerung und Bearbeitung der Proben, Einstellungen des Durchflusszytometers und die anschließende Analyse können zu großen Abweichungen in den Ergebnissen der Zentren führen (35). Folglich ist es essenziell, in einer multizentrischen Studie eine gute Vergleichbarkeit zwischen allen Teilnehmenden zu erzielen. Hierfür wurden von den beteiligten Zentren standardisierte Protokolle und Panels für die durchflusszytometrischen Untersuchung entwickelt und auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft (35-38).

1.1.3 Die Referenzgruppe der ONE Study

Für die ONE Study wurden zwei Gruppen von Patient*innen rekrutiert. Die Zelltherapiegruppe wurde im Rahmen der Transplantation mit Zelltherapieprodukten behandelt. Die Referenzgruppe diente als Vergleichsgruppe und bestand aus Nierentransplantierten, die eine konventionelle immunsuppressive Therapie erhielten. Diese richtete sich nach den Empfehlungen der KDIGO-Richtlinien für die Betreuung nierentransplantierter Patient*innen (39). Beide Patientengruppen wurden unter den gleichen Bedingungen behandelt und untersucht. Da ein kompletter Verzicht auf Immunsuppressiva nicht vertretbar ist und um die Sicherheit der Teilnehmenden zu gewährleisten, erhielt die Zelltherapiegruppe zusätzlich zu den Zelltherapieprodukten eine reduzierte immunsuppressive Therapie. Unterschiede im therapeutischen Protokoll zwischen den zwei Gruppen werden im Abschnitt „Material und Methoden“ aufgeführt. Des Weiteren bot die Referenzgruppe die Gelegenheit, verschiedene Parameter des Immunsystems unter konventioneller Immunsuppression an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation ausführlich zu untersuchen. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten auch zum besseren Verständnis von molekularen und funktionalen Mechanismen der Immunität in anderen Formen der Transplantation sowie Autoimmunerkrankungen beitragen. Zu den Zellen, die im Rahmen der ONE Study evaluiert und näher untersucht wurden, gehören die regulatorischen T-Zellen.

1.2 Die regulatorischen T-Zellen

1.2.1 Die Entstehung und Wirkung der Tregs

Wie bereits erwähnt, sind Tregs durch ihre antiinflammatorische Wirkung für die Immunhomöostase notwendig. Eine gestörte Funktion von Tregs kann in Autoimmunerkrankungen beobachtet werden, denn Tregs sind ebenfalls für die Unterdrückung der Immunantwort auf Autoantigene, d. h. körpereigene Strukturen, zuständig (40). Durch ihre suppressiven Fähigkeiten sind Tregs nicht nur für die Verhinderung von Autoimmunität essenziell, sondern auch für die Toleranzinduktion zu allogenem Gewebe.

Die Vorläufer der Tregs, wie alle T-Zellen, entstehen im Knochenmark und wandern zur Reifung in den Thymus ein. Tregs, die im Thymus entstehen, werden als **t**Tregs oder natürliche Tregs, kurz **n**Tregs, bezeichnet. Zusätzlich können Treg-Zellen in Geweben wie z.B. Darm entstehen. Dies geschieht nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors in Gegenwart von Zytokinen wie *transforming*

growth factor- β (TGF- β) oder IL-2 (41, 42). Die so entstandenen Tregs werden periphere oder induzierte Tregs (**p**- oder **i**Tregs) genannt. Der Begriff iTreg wird gelegentlich speziell für *in vitro* induzierte Tregs verwendet. Beide Gruppen zeigen einen ähnlichen Phänotyp und sind in der Lage, die Aktivität der Effektor-T-Zellen (Teff) zu unterdrücken (43). tTregs bilden eine stabile Population und erkennen besonders gut Selbstantigene, die ihnen während der Reifung im Thymus präsentiert werden. Hingegen sind pTregs, die außerhalb vom Thymus entstehen, für die Toleranz gegenüber neuen Antigenen in der Peripherie essenziell. Dazu zählen Nahrungsmittel, Allergene, kommensale Bakterien und der Fetus während der Schwangerschaft (44). Beide Treg-Populationen sind somit für die Immunhomöostase im Organismus notwendig.

Die Reaktion des Immunsystems auf Alloantigene, wie z. B. ein Transplantat, wird durch die Wechselwirkung von Tregs und Teff bestimmt. Treg-Zellen sind normalerweise in zu geringer Zahl vorhanden, um die proinflammatorische Reaktion gegen das Transplantat verhindern zu können. Eine erhöhte Anzahl von Tregs kann bewirken, dass die antiinflammatorische Wirkung der Tregs überwiegt (45). In der Tat konnten in operational toleranten Nierentransplantierten erhöhte Frequenzen von Tregs beobachtet werden, bei chronischer Abstoßungsreaktion ist deren Anzahl hingegen erniedrigt (46-48). Eine erhöhte Anzahl der Treg-Zellen im peripheren Blut 12 Monate nach Transplantation ist mit einem besseren Langzeitergebnis assoziiert (49).

Allerdings ist die Wirkung von Tregs nicht immer von Vorteil, denn diese können auch Toleranz zu tumorspezifischen Antigenen in entarteten Zellen vermitteln. Studien zeigen, dass bei Tumorleiden eine erhöhte Anzahl von Treg-Zellen im Blut und im Umfeld des Tumors mit schlechter Prognose assoziiert ist (50, 51). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass der antiinflammatorische Effekt der Tregs die Tumorgenese verhindern kann, da eine inflammatorische Umgebung Entartungen begünstigt (52). Eine möglichst genaue Kenntnis der Treg-Eigenschaften ist deshalb Voraussetzung für das bessere Verständnis von Autoimmunreaktionen, Tumormunität sowie für den Einsatz dieser Zellen als Therapien.

1.2.2 Marker für die Charakterisierung von Treg-Zellen

Die Erforschung von Tregs ist dadurch erschwert, dass es bisher nicht gelungen ist, einen Treg-spezifischen Marker zu finden. Aus diesem Grund wird die Identifizierung und Charakterisierung von Tregs anhand einer Kombination verschiedener Marker vorgenommen (53). Zudem sind Tregs keine homogene Population, es gibt phänotypische und funktionelle Unterschiede zwischen

den Treg-Gruppen (s. unten). Darüber hinaus sind nicht alle Treg-Zellen in ihrer Funktion stabil: Es gibt Hinweise darauf, dass manche Tregs unter inflammatorischen Bedingungen ihre regulatorische Funktion verlieren und in einen proinflammatorischen Phänotyp übergehen können (54, 55). Umso wichtiger ist es, Marker zu finden, die eine gute Unterscheidung der Treg-Populationen sowie deren Stabilität erlauben. Im Folgenden werden die allgemein anerkannten Marker kurz erläutert, die in dieser Arbeit Anwendung finden.

Um verschiedene Gruppen von Lymphozyten voneinander unterscheiden zu können, werden sie anhand bestimmter Moleküle charakterisiert, die sie je nach Zelltyp, Differenzierungsgrad und Aktivierung exprimieren. Hierbei handelt es sich oft um membrangebundene Proteine. Sie werden als *cluster of differentiation* (CD) bezeichnet und jeweils mit einer Nummer versehen (3). Tregs gehören zu den CD4-exprimierenden (CD4⁺) T-Zellen. Insgesamt machen Tregs 5-10% aller CD4⁺ Zellen im peripheren Blut aus (56). CD4 bindet spezifisch an MHC-II-Moleküle. Daneben wird die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) auf der Oberfläche von Tregs konstitutiv in hohen Mengen exprimiert, Tregs stellen sich somit als CD25^{high} Zellen dar. Ein weiteres Merkmal von Tregs ist die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead box P3* (Foxp3) und kann neben anderen Markern für die Identifizierung von Tregs genutzt werden (57). In vielen Studien werden Tregs als CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Zellen definiert. Allerdings ist die Foxp3-Expression nicht auf Tregs begrenzt, denn Foxp3 wird auch von aktivierten Teff produziert (33). Ein weiterer Nachteil von Foxp3 ist dessen intrazelluläre Lokalisation, was den Einsatz als Marker in einigen Experimenten erschwert oder unmöglich macht. Es konnte gezeigt werden, dass sich Tregs von Effektor-T-Zellen (Teff) durch die geringe Expression des IL-7-Rezeptors (CD127) unterscheiden (58). Somit können Tregs auch als CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Zellen definiert werden.

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 beeinflusst die Expression einer Vielzahl von Genen, die für die Entwicklung und Funktion von Tregs notwendig sind. Eine stabile Foxp3-Expression ist somit für die immunsuppressive Funktion der Tregs essenziell. Die Stabilität der Foxp3-Expression wird auf epigenetischer Ebene durch den Demethylierungsgrad von Genabschnitten bestimmt, die als „Treg-spezifische demethylierte Region (TSDR)“ bezeichnet werden. Die TSDR-Demethylierung ist bisher der sicherste Marker zur Identifizierung stabiler Treg-Zellen (59). Neben Foxp3-TSDR sind andere TSDR bekannt, die in verschiedenen Genen lokalisiert sind und im Vergleich zu konventionellen T-Zellen (Tconv) unterschiedliche Demethylierungsmuster zeigen (60). Sofern nicht anders spezifiziert, bezieht sich in dieser Arbeit der Begriff TSDR auf diese spezifisch

demethylierten Abschnitte im Foxp3-Gen. Die epigenetische Regulation in dieser TSDR wird im Abschnitt 1.2.4 näher erläutert.

Vor allem tTregs zeigen eine sehr stabile Foxp3-Expression und haben eine vollständig demethylierte TSDR. pTregs, die in der Peripherie aus CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Zellen hervorgehen, exprimieren Foxp3 nur vorübergehend und ihre TSDR ist weniger demethyliert (61). Eine sichere Unterscheidung von pTregs und tTregs anhand der Oberflächenmoleküle ist bisher nicht möglich. Marker wie HELIOS und Neuropilin-1, die aus Mausmodellen bekannt sind, werden in diesem Zusammenhang diskutiert (53, 62).

Aufgrund der Heterogenität innerhalb der Tregs werden diese oft in Subpopulationen unterteilt. Eine allgemein akzeptierte Unterteilung wurde von Miyara *et al.* vorgenommen (63). Sie konnten Tregs anhand ihrer funktionellen Unterschiede und mit Hilfe der Expression von CD45RA und Foxp3 in drei Gruppen einteilen:

- I. Die CD25^{high}CD45RA⁺Foxp3^{low} ruhenden oder „naiven“ Tregs. Aus diesen entwickeln sich nach Antigen-Kontakt die Effektor/Gedächtnis-Tregs.
- II. Die CD25^{high}CD45RA⁻Foxp3^{high} Effektor- oder Gedächtnis-Tregs mit starken suppressiven Eigenschaften, die auch als aktivierte Tregs bezeichnet werden. Diese Subpopulation ist von besonderem Interesse, da gezeigt werden konnte, dass sie bei operational Toleranten im Vergleich zu anderen Nierentransplantierten erhöht ist (48). Diese Gruppe scheint auch in der Tumor-Mikroumgebung verstärkt anwesend zu sein (64).
- III. Die CD25^{high}CD45RA⁻Foxp3^{low} sind nicht-suppressive Zellen, die Zytokine wie IL-17, IL-2 und Interferon γ (IFN- γ) produzieren. Sie werden in dieser Arbeit als Foxp3⁺ Nicht-Tregs bezeichnet.

Diese Unterteilung, vor allem die Unterscheidung von Tregs anhand CD45RA in naive und Effektor/Gedächtniszellen, hat sich in Studien als nützlich erwiesen und wird von vielen Gruppen übernommen (65, 66).

In einigen Studien wird eine weitere Charakterisierung von Tregs anhand anderer Marker, z.B. C-C-Chemokinrezeptor Typ 4 (CCR4) vorgenommen (67, 68). CCR4 wird von vielen T-Zellen, auch Tregs, produziert. Es bindet an *C-C motif chemokine ligand* (CCL)17 und CCL22, die u. a. von aktivierten dendritischen Zellen, Makrophagen und anderen Zellen in entzündlichem Gewebe oder Tumoren produziert werden. Diese Liganden sind für die chemotaktische Rekrutierung der T-

Zellen von Bedeutung (69-71). CCR4 wird hauptsächlich von CD45RA⁻ Tregs produziert (67). Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Treg-Population die Foxp3^{high} Zellen (Effektor/Gedächtnis-Tregs) am stärksten CCR4 exprimieren und sich durch Anti-CCR4-Antikörper gezielt eliminieren lassen. Hingegen wird CCR4 von naiven Tregs kaum und von CD45RA⁻Foxp3^{low} Zellen in moderaten Mengen produziert (71). Somit könnte CCR4 als Marker der Effektor/Gedächtnis-Tregs fungieren (69, 71, 72). Mit Hilfe dieses Markers konnte gezeigt werden, dass besonders CCR4⁺ Effektor-Tregs bei einigen Tumoren und Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen (71, 73).

1.2.3 Funktionelle Eigenschaften von Treg-Zellen

Tregs vermitteln ein Gleichgewicht zwischen Immunreaktion und Toleranz. Sie unterdrücken die Aktivität zahlreicher Zellen, u. a. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, dendritischer Zellen, Makrophagen und natürlicher Killerzellen (74). Je nach Zelltyp können Tregs hierfür verschiedene Mechanismen einsetzen (45). Diese beinhalten sowohl direkte Zell-Zell-Kontakte als auch humorale Komponenten (51). Die bekannten regulatorischen Mechanismen von Tregs werden im folgenden Abschnitt kurz beschrieben.

Treg-Zellen produzieren inhibitorische Zytokine wie TGF- β , IL-10 und IL-35. Diese verhindern die inflammatorische Antwort anderer Effektor-Zellen (51). Tregs können auch mit der Sekretion von Proteinen wie Granzym B und Perforin dendritische Zellen und Teff direkt lysieren (75). Zusätzlich können sie extrazelluläre Vesikel produzieren, die Mikro-RNAs und Enzyme beinhalten, welche die Proliferation der Zielzellen hemmen und zu deren Apoptose führen (76).

Auf ihrer Oberfläche exprimieren Tregs inhibitorische Moleküle, wie das *lymphocyte activation gene 3* (LAG-3), welches an die MHC-II-Moleküle der antigenpräsentierenden Zellen bindet und diese inhibiert (77). Darüber hinaus tragen Tregs auf ihrer Oberfläche das *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4, auch CD152 genannt). CTLA-4 bindet an CD80 und CD86 auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen und reguliert deren Aktivität herunter. Zusätzlich wird dadurch die Bindung dieser Moleküle an CD28 verhindert. CD28 ist ein kostimulierender Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen und vermittelt nach Bindung an CD80/CD86 Signale, die für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind. CTLA-4 hat eine höhere

Affinität für CD80/CD86 als CD28. Die dadurch bedingte fehlende Stimulation führt zur Anergie der T-Zellen durch fehlende Stimulation (3, 78).

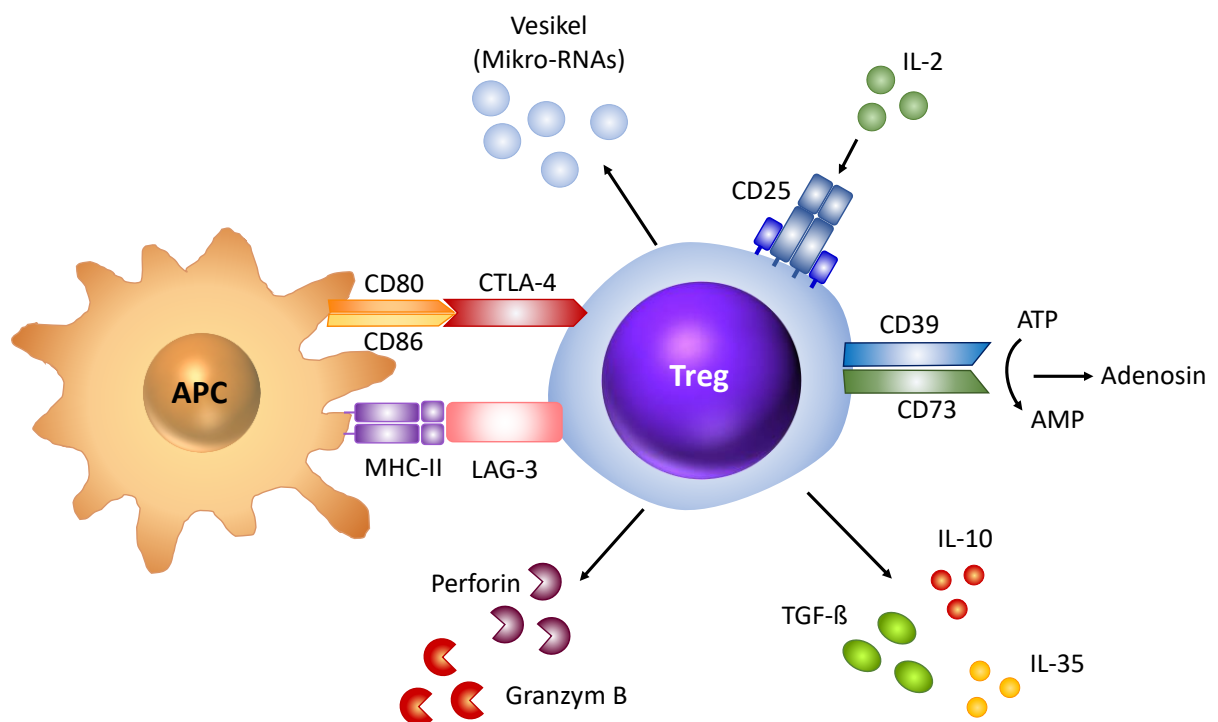


Abb. 1: Die suppressiven Mechanismen von Tregs. Tregs unterdrücken die Aktivität von Zielzellen über mehrere Mechanismen. Sie sezernieren inhibitorische Zytokine wie TGF- β , IL-2 und IL-35 oder Mikro-RNAs, die zur Hemmung oder Apoptose von Zellen führen. Tregs können zudem Zellen mit Granzym B und Perforin lysieren. Die Bindung von T-Zell-Molekülen CTLA-4 und LAG-3 an antigenpräsentierende Zellen reguliert deren Aktivität herunter. Durch Verbrauch von IL-2 verhindern Tregs die Aktivierung von Effektor-T-Zellen. Durch die Aktivität von CD39 und CD73 wird ATP verbraucht, was in Zielzellen zur Aktivitätshemmung führt. Abbildung adaptiert und modifiziert nach Martin-Moreno *et al.* (79).

Treg-Zellen exprimieren den IL-2-Rezeptor in hohen Mengen. Gleichzeitig bilden sie wenig IL-2, auf das sie für ihr Überleben angewiesen sind. Aus diesem Grund binden sie mit ihrem Rezeptor das vorhandene IL-2, welches dann für die Aktivierung und Proliferation der Tconv nicht mehr zur Verfügung steht (80). Weiterhin exprimieren Tregs auf ihrer Oberfläche CD39 und CD73, womit das extrazelluläre Adenosintriphosphat (ATP) in Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosin gespalten wird. Das Adenosin bindet an Rezeptoren der Zielzellen und führt zur Erhöhung des intrazellulären cAMP. In dendritischen Zellen bewirkt dies eine Expressionsverminderung der kostimulierenden Moleküle auf der Oberfläche, welche für die T-Zell-Aktivierung benötigt werden. In den Tconv führt der erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel zur Verhinderung der Proliferation und der Zytokin-Produktion. Tregs können außerdem cAMP über Gap-Junctions direkt an die Zielzellen weitergeben (81).

1.2.4 Die epigenetische Regulation der Foxp3-Expression

Für die Entwicklung und Funktion der Treg-Zellen ist die Expressionskontrolle durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 unabdingbar (82-84). Die Bedeutung von Foxp3 kann anhand des IPEX-Syndroms verdeutlicht werden. Es handelt sich hierbei um eine seltene Erkrankung, die durch Mutationen im Foxp3-Gen verursacht wird, welches sich auf dem X-Chromosom befindet. IPEX steht für „Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal“. Die Betroffenen können keine funktionellen Tregs bilden. Bei Ihnen manifestieren sich bereits kurz nach der Geburt zahlreiche Autoimmunerkrankungen, die Lebenserwartung ist stark verkürzt (85).

Foxp3 gilt als „Master-Regulator“ der Expression von Treg-assoziierten Molekülen und aktiviert als Transkriptionsfaktor die Expression der Mehrheit dieser Gene. Ebenso kann die Expression anderer Gene, z. B. die der proinflammatorischen Zytokine, supprimiert werden. Neben der Regulation der Transkription fungiert Foxp3 auch auf epigenetischer und posttranslationaler Ebene (85-87).

Allerdings ist die Foxp3-Expression nicht auf Treg-Zellen begrenzt und somit nicht spezifisch für diese Population. Andere Zellen, z. B. CD4⁺CD25⁻ Effektor-T-Zellen können ebenfalls nach Aktivierung vorübergehend Foxp3 exprimieren, ohne suppressive Eigenschaften zu zeigen (88). Ebenfalls hat es sich gezeigt, dass die Expression von Foxp3 allein nicht ausreicht, um stabile Treg-Zellen zu generieren (89). Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, können Tregs vor allem unter proinflammatorischen Bedingungen die Foxp3-Expression und ihre suppressive Funktion verlieren (90). Für eine stabile Foxp3-Expression sind vielmehr spezielle epigenetische Modifikationen der DNA am Foxp3-Genlocus wichtig. Diese erfolgen über DNA-(De)Methylierungen und Histon-Modifikationen. Die epigenetischen Veränderungen beginnen bereits in unreifen Tregs im Thymus und setzen sich in der Peripherie fort (60). Diese sorgen für eine stabile Expression Treg-assoziiierter Gene, u. a. Foxp3 (91). Änderungen auf epigenetischer Ebene werden als Ursache für die Instabilität der Treg-Zellen in manchen Autoimmunerkrankungen angesehen (43).

Im Foxp3-Genlocus sind vier Regionen identifiziert, die für die Regulation der Genexpression verantwortlich sind: die Promotorregion und drei Transkriptionsverstärker, auch „Enhancer“ genannt. Diese drei Enhancer bestehen aus genetisch erhaltenen (konservierten), nicht-kodierenden Sequenzen und werden als *conserved noncoding sequences* (CNS) bezeichnet. An

diesen Stellen wirken neben den epigenetischen Mechanismen noch verschiedene Transkriptionsfaktoren (92).

Die Regulation der Foxp3-Expression durch den Promotor erfolgt als Reaktion auf die T-Zell-Rezeptor-Stimulation und verschiedene Zytokine. Folglich binden an den Promotor vor allem Moleküle, die durch T-Zell-Rezeptor-Signale aktiviert werden, z. B. *nuclear factor of activated T cells* (NFAT), *activator protein 1* (AP-1), Proteine aus der NR4A-Familie und *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5), welches durch IL-2 aktiviert wird. Für die stabile Expression von Foxp3 sind vor allem die Enhancer-Regionen von Bedeutung (86). Der Promotorregion vorgeschaltet ist zusätzlich ein nicht-kodierender Abschnitt, der als CNS0 bezeichnet wird. CNS0 bindet das *special AT-rich sequence-binding protein-1* (SATB-1), welches in der Lage ist, die Chromatinstruktur zu modifizieren (93). Dies spielt vermutlich eine Rolle zu Beginn der Treg-Entwicklung, wo durch Chromatinmodifikationen der Weg für weitere epigenetische Veränderungen geebnet wird. Somit besteht die Funktion von CNS0 in der Aktivierung der anderen CNS und folglich Initiierung der Foxp3-Expression, vor allem durch CNS3 (61, 93). CNS1 hat verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie NFAT, AP-1, Retinsäure-Rezeptor (RAR) und *mothers against decapentaplegic homolog* (SMAD)2/3. Die Bindung von SMAD erfolgt durch ein TGF- β -vermitteltes Signal, welches für die Entwicklung von pTregs notwendig ist (94). CNS1 scheint somit insbesondere für die Differenzierung von pTreg-Zellen wichtig zu sein (95).

Der Begriff Foxp3-TSDR wird häufig als Synonym für CNS2 verwendet. Diese Region ist nicht für die Initiierung, sondern vor allem für die stabile Expression von Foxp3 notwendig, insbesondere unter proinflammatorischen Bedingungen (86). Hier befinden sich viele CpG-reiche Dinukleotide, somit spielt der Methylierungsstatus in der Aktivierung dieses Enhancers eine große Rolle. In tTregs ist CNS2 vollständig demethyliert und sorgt für die Stabilität dieser Zellen. Hingegen ist diese Region in pTregs etwas weniger und in iTregs selten demethyliert, was die Instabilität dieser Populationen erklären könnte (61, 96). An CNS2 binden Faktoren wie STAT5, NFAT, *runt-related transcription factor 1* (RUNX1), *core-binding factor subunit β* (CBF- β), *cAMP response element-binding protein* (CREB) und Foxp3 selbst (86). Diese bewirken zusammen eine Änderung der 3D-Struktur des Genlocus und erleichtern dadurch die Interaktion von CNS2 und Promotor (97).

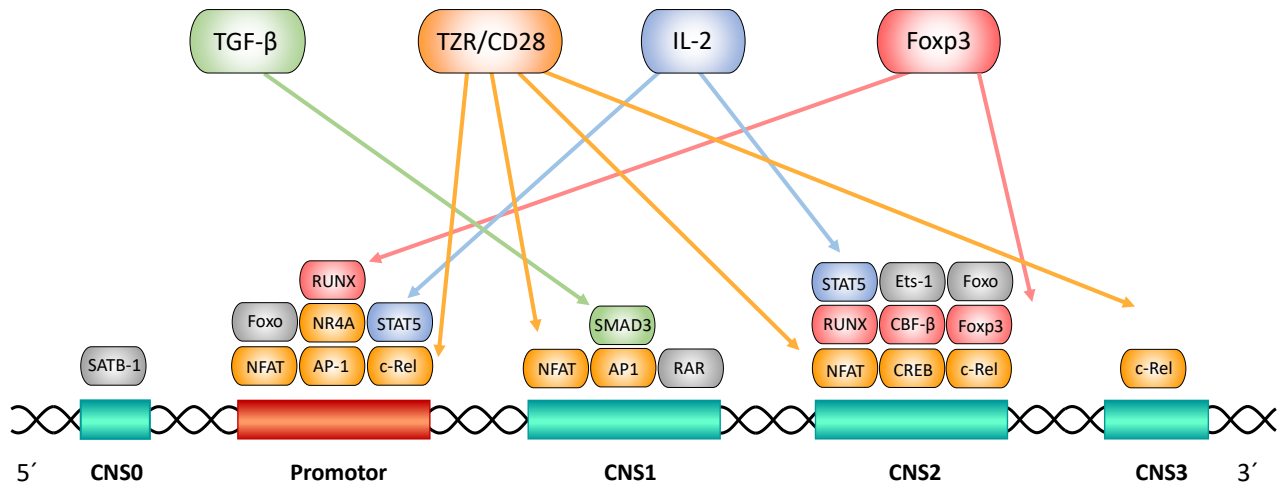


Abb. 2: Die epigenetische Regulation der Foxp3-Expression. Durch TGF- β , IL-2, Foxp3 sowie die Stimulation des T-Zell-Rezeptors und CD28 vermittelte Signale sind für die Foxp3-Expression notwendig. Die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion und an die konservierten nicht-kodierenden Sequenzen (CNS) 0-3 reguliert die stabile Expression. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Wechselwirkungen sowie einiger Faktoren verzichtet. AP-1: Activator protein 1; CBF- β : Core-binding factor subunit β ; CREB: cAMP response element-binding protein; Ets-1: E26 avian erythroblastosis virus transcription factor-1; Foxo: Forkhead box protein O; IL-2: Interleukin-2; NFAT: Nuclear factor of activated T cells; RAR: Retinsäure-Rezeptor; RUNX: Runt-related transcription factor 1; SATB-1: Special AT-rich sequence-binding protein-1; SMAD: Mothers against decapentaplegic homolog; STAT5: Signal transducer and activator of transcription 5; TGF- β : Transforming growth factor β ; TZR: T-Zell-Rezeptor. Abbildung adaptiert und modifiziert nach Huehn *et al.* (92) und Iizuka-Koga *et al.* (61).

CNS3 scheint für die Initiation der Foxp3-Expression in Treg-Vorläuferzellen wichtig zu sein, allerdings keine Rolle in der weiteren Entwicklung zu spielen. An Faktoren, die an CNS3 binden, ist c-Rel bekannt (95, 98).

Die Interaktion der CNS und Promotor für die Entwicklung stabiler Treg-Zellen kann folgendermaßen zusammengefasst werden: CNS0 wird früh in der Treg-Differenzierung aktiviert und bewirkt die Aktivierung anderer CNS. CNS3 löst epigenetische Modifikationen in der Promotorregion aus und verstärkt die Transkription von Foxp3. Die Bindung von verschiedenen Faktoren an CNS2 verändert die 3D-Struktur des Foxp3-Locus, begünstigt somit die Interaktion von Promotor und CNS2 und stabilisiert damit die Expression (97). Auf zwei Gruppen der modulierenden Faktoren bei der Foxp3-Expression wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2.5 Die demethylierenden Tet-Enzyme

Die Proteine der *ten-eleven translocation*-(Tet-)Familie sind demethylierende Enzyme und spielen eine wichtige Rolle bei der Demethylierung der TSDR in Treg-Zellen. Die Tet-Familie umfasst die Enzyme Tet1, Tet2 und Tet3. Diese Faktoren entfalten ihre DNA-demethylierende Wirkung, indem sie die Umwandlung von 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin und auch weiteren Derivaten wie 5-Formylcytosin und 5-Carboxylcytosin katalysieren (99, 100). Zudem sorgen sie für eine stabile Demethylierung der TSDR unter inflammatorischen Bedingungen (101). In Mausmodellen führte eine Ausschaltung von Tet-1 und Tet2-Genen zu einer Hypermethylierung des Foxp3-Genlocus, Störung der Treg-Differenzierung und -Funktion sowie Autoimmunerkrankungen (99). Zudem konnte für Tet2 und Tet3 gezeigt werden, dass sie für die Demethylierung von CNS1, CNS2 und anderen Loci in tTreg-Zellen von Bedeutung sind (102). Die Wirkung der Tet-Faktoren kann durch Vitamin C verstärkt werden (102, 103). In Mäusen entfaltet Tet1 seine Wirkung vorwiegend am Promotor, wobei Tet2 und Tet3 auf die Enhancer wirken (104).

Für die TSDR-Demethylierung durch die Tet-Enzyme ist die Signalvermittlung durch den T-Zell-Rezeptor notwendig. In iTregs bewirkt die Stimulation des T-Zell-Rezeptors eine erhöhte Expression von Tet2 und die Bindung an CNS2, was in einer erhöhten Demethylierung resultiert (105). Es konnte auch gezeigt werden, dass IL-2 für die stabile Expression von Tet2 notwendig ist. In Mausmodellen führte ein IL-2-Defizit zur verminderten Tet2-Expression und Hypermethylierung der TSDR in Treg-Zellen (106).

Es ist nicht abschließend geklärt, welche Faktoren die Wirkung der Tet-Enzyme an Demethylierungsstellen vermitteln. Es gibt aber Hinweise darauf, dass STAT5 ein wichtiger Interaktionspartner ist. Für Tet1 und Tet2 konnte gezeigt werden, dass diese durch STAT5 an CNS2, CNS1 und den Promotor rekrutiert werden und dort ihre Wirkung entfalten (99). Studien an Patient*innen mit kolorektalem Karzinom zeigten, dass Tet2 und STAT5 in CD4⁺ T-Zellen aus dem Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe erhöht sind. Die TSDR-Demethylierung dieser Zellen war ebenfalls hoch, was wiederum auf die mögliche Toleranz-vermittelnde Rolle von Foxp3⁺ Tregs bei Neoplasien hindeutet (107). Es muss beachtet werden, dass für die TSDR-Demethylierung möglicherweise nicht nur die aktive Reaktion der Tet-Enzyme, sondern auch andere Mechanismen, wie die Inhibition von methylierenden Faktoren, z. B. den DNA-Methyltransferasen (DNMT), von Bedeutung sind (61).

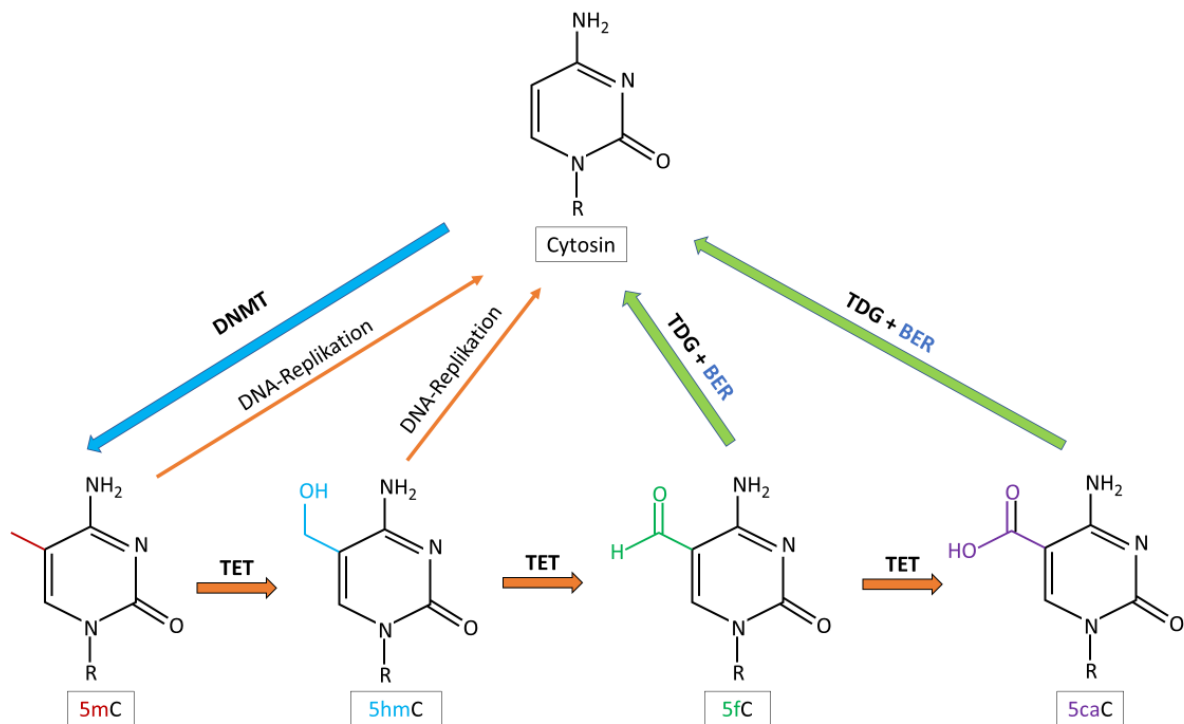


Abb. 3: Die Rolle der TET-Enzyme in der DNA-Methylierung und -Demethylierung. Cytosin wird durch DNMT-Enzyme zu 5mC methyliert. Die TET-Enzyme katalysieren die Umwandlung von 5mC zu 5hmC, 5fC und 5caC. Eine enzymatische Demethylierung von 5mC und 5hmC ist bislang in Säugetieren nicht beschrieben. Allerdings können diese Formen während der DNA-Replikation „passiv“ durch Cytosin ersetzt werden: Bei der Bildung des DNA-Tochterstranges werden nicht-methylierte Cytosin-Basen verwendet. Jede weitere Generation erhält somit weniger methyliertes Cytosin. Hingegen ist ein aktives Austauschen von 5fC und 5caC gegen Cytosin bekannt. 5fC und 5caC werden durch TDG exzidiert. Der Mechanismus der Basenexzisionsreparatur (BER) füllt die leeren Stellen mit unmethyliertem Cytosin. 5caC: 5-Carboxylcytosin; 5fC: 5-Formylcytosin; 5hmC: 5-Hydroxymethylcytosin; 5mC: 5-Methylcytosin; BER: Basenexzisionsreparatur; DNMT: DNA-Methyltransferase; TDG: Thymin-DNA-Glycosylase. Abbildung adaptiert und modifiziert nach Tsiouplis *et. al* (108) und An *et. al* (109).

1.2.6 Die nukleären Rezeptoren der NR4A-Familie

Die NR4A-Proteine gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren (NR) und bestehen aus den eng miteinander verwandten Rezeptoren NR4A1 (auch Nur77 genannt), NR4A2 (Nurr1) and NR4A3 (Nor1) (110). Diese besitzen eine homologe DNA-bindende Domäne, mit der sie an nukleäre DNA binden und die Transkription bestimmter Gene regulieren (111). Trotz Zugehörigkeit zu nukleären Rezeptoren scheint die Aktivität der NR4A-Proteine nicht ligandengesteuert zu sein, da ihre Liganden-bindenden Domänen durch Aminosäurereste verdeckt sind. Vielmehr sind diese konstitutiv aktiv (112). Die Expression der NR4A-Proteine in CD4⁺ T-Zellen wird durch die

Aktivierung des T-Zell-Rezeptors angeregt. Dies geschieht bereits in den unreifen T-Zellen im Thymus (113, 114). Die NR4A-Expression ist in tTreg-Zellen, verglichen mit anderen T-Zell-Subpopulationen, stark erhöht (89, 115).

Die NR4A-Rezeptoren entfalten ihre regulatorische Rolle auf Expressionsebene (113). Sie wirken direkt auf den Foxp3-Promotor und sind für deren Expression und somit die Differenzierung und Funktion von Treg-Zellen von Bedeutung (116). Zusätzlich binden sie an CNS1 und CNS2 (113). Versuche mit Mäusen, bei denen alle drei NR4A-Gene ausgeschaltet waren, zeigten, dass diese keine Treg-Zellen bilden konnten und frühzeitig an Autoimmunerkrankungen starben. Dies geschah allerdings nicht, wenn nur einer der drei Faktoren deaktiviert wurde, was darauf hindeutet, dass die Wirkung eines Faktors durch die anderen kompensiert werden kann (114). Die NR4A-Proteine spielen vermutlich auch eine Rolle bei der Übermittlung von T-Zell-Rezeptor-Signalen zur Foxp3-Induktion (97, 114). Darüber hinaus sind die NR4A-Rezeptoren für die Stabilität Foxp3-Expression wichtig. Sie nehmen dabei keinen Einfluss auf den Methylierungsstatus der Foxp3-TSDR (113, 117). Die Deletion dieser Faktoren in Mäusen führte nicht zur Hypermethylierung an CNS2 (118). Vielmehr wirken die NR4A-Faktoren über die Modifikation der Chromatinstruktur: Sie öffnen das Chromatin an bestimmten Genabschnitten und ermöglichen auf diese Weise deren Expression. Die Aktivität anderer Gene wiederum wird durch Chromatinmodifikation am entsprechenden Gen-Locus herunterreguliert (119). In CD8⁺ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die NR4A-Proteine die inhibitorischen Rezeptoren *programmed cell death protein 1* (PD-1) und *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3* (TIM-3) hochregulieren und die Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) hemmen (119). Neuere Studien deuten darauf hin, dass die NR4A-Faktoren für die Treg-vermittelte Toleranz zu Tumorantigenen mitverantwortlich sind. Die Inaktivierung dieser Faktoren auf genetischer oder pharmakologischer Ebene führte in Mäusen zu einer wirksamen Immunantwort gegen den Tumor mit Tumorregression (120). Die NR4A-Rezeptoren haben außerdem Bedeutung im hepatischen Glucosestoffwechsel sowie in der neuroprotektiven Antwort von Neuronen auf toxischen oder oxidativen Stress (121, 122).

1.3 Die Wirkung gängiger Immunsuppressiva auf Treg-Zellen

Es ist wichtig, im Rahmen der Untersuchung von Tregs in Transplantationen zusätzlich die Wechselwirkungen der gängigen immunsuppressiven Medikation auf diese Zellen zu beachten. Diese werden in diesem Abschnitt kurz erläutert.

Die immunsuppressive Therapie bei der Nierentransplantation beinhaltet initial eine Therapie mit einem gegen Lymphozyten gerichteten Wirkstoff. Bei diesem handelt es sich in der Regel entweder um einen IL-2-Rezeptor-Antagonist oder ein Thymoglobulin, welches gegen T-Zellen wirkt (123). Diese sogenannte Induktionstherapie wird empfohlen, da das Transplantat nach der Operation aufgrund der Ischämie, des Gewebetraumas und daraus folgender Entzündung besonders anfällig für eine Immunreaktion ist (124). Die Induktionstherapie mit Thymoglobulin senkt zwar die Frequenz von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, verändert aber das Verhältnis von Tregs zu Effektor-T-Zellen zugunsten von Tregs. Ebenso erholen sich nach einer solchen Therapie die Tregs schneller als die Tconv, was einen günstigen Einfluss auf das Transplantat haben könnte (125). Der Anti-CD25-Antikörper Basiliximab findet ebenfalls Verwendung als Medikament bei der Induktionstherapie. Da CD25 in hohen Konzentrationen auf Tregs exprimiert wird, wird angenommen, dass dieses Medikament einen negativen Einfluss auf Tregs haben kann (126). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass Basiliximab lediglich die Expression von CD25 auf der Oberfläche der Tregs verringert und keine tatsächliche Reduktion der Tregs bewirkt (127, 128). Wie bereits erwähnt, benötigen Tregs für ihre Entwicklung IL-2. CNI, wie Tacrolimus und Ciclosporin A, blockieren die Translokation von NFAT in den Zellkern und hemmen die Expression von IL-2. Somit wird die Proliferation und das Überleben von Tregs vermindert (125, 129). Die Reduktion peripherer Treg-Frequenzen unter CNI-Therapie ist aus Studien bekannt (129).

Die mTOR-Inhibitoren können dosisabhängig die Differenzierung und Expansion der Tregs verstärken und die Expression von Foxp3 erhöhen (125). Allerdings schützen sie die Organtransplantierten weniger vor einer chronischen Abstoßung (130).

Glucocorticoide entfalten ihre Wirkung über verschiedene Mechanismen. U. a. hemmen sie den Transkriptionsfaktor NFκB und damit die Produktion vieler proinflammatorischer Zytokine. Glucocorticoide scheinen die Treg-Zellen nicht negativ zu beeinflussen, es wurden darunter sogar positive Effekte auf die Frequenz und Aktivität der Treg-Zellen beobachtet (125).

MMF verhindert die Purin-Synthese durch die Inhibition des Enzyms Ionisine-Monophosphat-Dehydrogenase. B- und T-Zellen sind für die Purinsynthese auf dieses Enzym angewiesen. Dennoch scheint eine Behandlung mit MMF die Frequenz und Funktion von Tregs nicht negativ zu beeinflussen (125, 131).

Es muss beachtet werden, dass neben Immunsuppressiva auch andere Medikamentenklassen eine Wirkung auf Treg-Zellen haben können. Beispielsweise konnten Studien mit Mäusen eine Beeinflussung der Anzahl und Differenzierung von Tregs durch das Antidiabetikum Metformin, zeigen (132, 133). Der Einfluss von Komedikationen der Transplantatempfänger*innen sollte in Studien ebenfalls berücksichtigt werden.

1.4 Zielsetzung

Studien an Nierentransplantierten deuten darauf hin, dass die Anzahl der Treg-Zellen im peripheren Blut mit dem langfristigen Transplantatüberleben zusammenhängt (49). In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass die Frequenz der Gesamt-Tregs ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}Foxp3^+$) sowie der Effektor-Gedächtnis- ($Foxp3^{high}$) Tregs mit der TSDR-Demethylierung stark korreliert. Sowohl die Gesamt-Tregs als auch die Effektor-Gedächtnis-Tregs und die TSDR-Demethylierungsrate waren in operational toleranten Nierentransplantierten erhöht (48). Für die Referenzgruppe der ONE Study sollte durch die Untersuchung dieser Populationen über die gesamte Studienlaufzeit evaluiert werden, ob die gleichen Zusammenhänge in dieser Kohorte beobachtet werden können. Es stellte sich die Frage, ob diese Populationen einen geeigneten Parameter zur Vorhersage des klinischen Ergebnisses und zur Identifizierung von Patienten mit erhöhter Toleranz darstellen. Außerdem bilden die Untersuchungen der Referenzgruppe die Grundlage zur Evaluierung der Ergebnisse aus der Zelltherapiegruppe.

Darüber hinaus ist bekannt, dass eine stabile Foxp3-Expression Voraussetzung für die Stabilität und Funktionalität von Treg-Zellen ist. Die genauen Mechanismen der stabilen Foxp3-Expression sind nicht vollständig geklärt. Eine Reihe aktueller Forschungsergebnisse deutet auf die Rolle der Tet-Enzyme und NR4A-Rezeptoren hin, die allerdings bislang nicht an humanen Tregs erforscht sind. Um Erkenntnisse über die Rolle der Tet- und NR4A-Faktoren in Treg-Zellen zu gewinnen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Expression dieser Faktoren im Blut sowie in den Treg-Zellen von gesunden Menschen bestimmt. Dabei sollten Expressionsmuster abhängig von den Zelltypen und den Subpopulationen bestimmt werden und auf Zusammenhänge mit Foxp3-mRNA-Expression und TSDR-Demethylierung untersucht werden. Zusätzlich bot sich hier die Möglichkeit an, die Expression dieser Faktoren auf ihre Altersabhängigkeit zu überprüfen. Diese Ergebnisse sollten als Grundlage zur weiteren Forschung an diesen Faktoren und ihre Änderungen im Kontext der Transplantation und Immunsuppression dienen.

2. Material

2.1 Antikörper

Antigen	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
CCR4	L291H4	BV421	1:200	Biolegend, San Diego, USA
CD127	A019D5	APC	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD127	R34.34	FITC	1:50	Beckman Coulter, Brea, USA
CD127 (IL7Ra)	A019D5	APC	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD25	M-A251	PE	1:100	Biolegend, San Diego, USA
CD3	UCHT1	Alexa700	1:200	Biolegend, San Diego, USA
CD4	OKT4	BV510	1:200	Biolegend, San Diego, USA
CD45RA	HI100	PE-Cy7	1:50	Beckman Coulter, Brea, USA
FoxP3	259D	AF647	1:100	Biolegend, San Diego, USA
FoxP3	259D	AF488	1:50	Biolegend, San Diego, USA

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Biocoll Trennlösung	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)/ Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNAse-freies H ₂ O	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Bovines Serumalbumine (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFuer™ 506 (LD)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Descosept Pur alkoholisches Desinfektionsmittel	Dr. Schumacher, Malsfeld, Deutschland
Softasept® alkoholisches Hautdesinfektionsmittel	B. Braun, Melsungen, Deutschland
EB Puffer	QIAGEN, Hilden, Deutschland

2.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Sitz
7500 Real-Time PCR-System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Computer: Acer Travelmate 5760	Acer, New Taipei City, Taiwan
Computer: Dell Latitude D520	Dell, Roundrock, USA
Computer: Fujitsu Esprimo E920 E85+, Model DT8	Fujitsu Technology Solutions GmbH, München, Deutschland
DNA Thermocycler	PerkinElmer, Waltham, USA
Durchflusszytometer: LSRFortessa	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer: Navios™	Beckman Coulter, Brea, USA
FACSAria™ II SORP	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Gefrierschrank: UF 755 G	Dometic Medical Systems, Solna, Schweden
Kühlschrank: CUN 3933	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborwaage: PT150	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Lichtmikroskop: TMS	Nikon, Tokyo, Japan
Magnetrührer/Heizplatte	VWR, Radnor, USA
Mikrozentrifuge 5410	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
NanoDrop 1000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten (0,5-10 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (10-200 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe: Pipetboy acu	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Sicherheitswerkbank: Antares 48 NF	Biohit, Helsinki, Finnland
Sicherheitswerkbank: NU 440-400 E	Nuaire, Caerphilly, Großbritannien
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe: KNF Neuberger Miniport	KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Vortex Mixer neoLab® 7.2020	Neolab Migge, Heidelberg, Deutschland
Vortex Schüttler VF2	IKA®-Werke, Staufen, Deutschland
Zentrifuge: Multifuge™ X3R	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.4 Puffer und Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS + 2% FCS + 0.1% Natriumazid
MACS-Puffer	PBS + 2mM EDTA + 0,5% BSA
PBS/FCS	PBS + 2% FCS

2.5 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Demethylierungsspezifische Primer	Epiontis GmbH, Berlin, Deutschland
Demethylierungsspezifische Sonde	Epiontis GmbH, Berlin, Deutschland
EpiTect Bisulfite Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
FastStart Universal Probe Master	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
FoxP3 Staining Buffer Set	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Lambda DNA	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Methylierungsspezifische Sonde	Epiontis GmbH, Berlin, Deutschland
Methylierungsspezifischer Primer	Epiontis GmbH, Berlin, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assays	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.6 Oligonukleotide für qRT-PCR

Gen-Name	Assay-ID	Exon-Übergang	Assay-Lokalisation	Amplikon-Länge [bp]	Transkript-Länge [bp]	RefSeq
HPRT	Hs02800695_m1	2 - 3	297	82	1435	NM_000194.2
β2M	Hs00984230_m1	3 - 4	431	81	987	NM_004048
GAPDH	Hs99999905_m1	2	229	122	1407	NM_001289746.1
		3	243	122	1407	NM_002046.5
Tet1	Hs00286756_m1	11 - 12	5909	65	9601	NM_030625.2
Tet2	Hs00325999_m1	9 - 10	4665	81	9796	NM_001127208.2
Tet3	Hs00379125_m1	9 - 10	3267	69	11405	NM_001287491.1
NR4A1	Hs00374230_m1	7 - 8	1767	87	2603	NM_001202233.1
		7 - 8	2694	87	3530	NM_001202234.1
		7 - 8	1856	87	2692	NM_002135.4
		6 - 7	1706	87	2542	NM_173157.2

NR4A2	Hs004286 91_m1	5 - 6	1578	69	3546	NM_006186. 3
NR4A3	Hs001750 77_m1	7 - 8	2361	70	5635	NM_006981. 3
		8 - 9	2433	70	5707	NM_173200. 2
Foxp3	Hs002039 58_m1	9 - 10	1132	64	2292	NM_0011143 77
		10 - 11	1237	64	2397	NM_014009

2.7 Software

Bezeichnung	Hersteller
7500 Real-Time PCR Software (V2.3)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
7500 System Sequence Detection Software (V1.4.0.25)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EndNote V X9.3.3.	Clarivate, Philadelphia, USA
FlowJo™ Software (V10.4.2)	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Graphpad Prism (V7.00/V8.3.0)	GraphPad Software, La Jolla, USA
Kaluza Analyse Software (V2.1.00001.20653)	Beckman Coulter, Brea, USA
Microsoft Excel (V1908/Professional Plus 2016)	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint (V1908)	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Word (V1908)	Microsoft, Redmond, USA
NanoDrop 1000 (V3.8.1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Windows 10 Education/Home	Microsoft, Redmond, USA

2.8 Verbrauchsmaterial und Zubehör

Bezeichnung	Hersteller
CD4 MicroBeads human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Deckgläser	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Falcon® Glaspipetten (5/10/25 ml)	Corning, Corning, USA
Falcon® Konische Zentrifugenröhrchen (15/50 ml)	Corning, Corning, USA

Falcon® Rundbodenröhrchen (14 ml)	Corning, Corning, USA
Falcon® Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen, Flachboden	Corning, Corning, USA
Flachdeckel für PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Gesopfte Pipettenspitzen, 10 µl	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Multistand magnetischer Block	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Manueller Zellzähler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Messzylinder	SIMAX, Sázava, Tschechische Republik
MidiMACS magnetische Trennvorrichtung	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Neubauer Improved Zählkammer	Laboroptik, Lancing, Großbritannien
PCR Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR-Gestell, 96 Vertiefungen	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipettenspitzen (10/200/1000 µl)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Präzisionswischtücher KIMTECH Science	Kimberly-Clark, Irving, USA
Reagiergefäße (0,5/1,5/2,0 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchengestelle	Faust Lab Science, Klettgau, Schweiz
Rotilabo®-Spritzenfilter	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäße (0,5 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Sempercure® Untersuchungshandschuhe	Semperit AG Holding, Schwarzatale, Österreich
Spritze (20 ml)	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Transferpipetten	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Vacurette® Blutentnahmesets	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Vacurette® Lithium Heparinröhrchen (9 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Vasco® Nitrilhandschuhe	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Zellstofftupfer	Fuhrmann, Much, Deutschland

3. Methodik

3.1 Studiendesign, Patientenkollektiv und Probandenrekrutierung

Für die ONE Study wurden 7 einarmige Studien durchgeführt und miteinander verglichen. Alle Studien waren offen und nicht randomisiert. Die Referenzgruppe bildete eine einarmige, multizentrische Studie, die als Vergleichsgruppe für die Studien mit Zelltherapieprodukten diente. Diese wurde in den 8 teilnehmenden Zentren in Europa und USA durchgeführt, die ebenfalls eine Studie mit Zelltherapieprodukten durchführten und startete bereits vor den Zelltherapiestudien. Folgende Zentren (gekennzeichnet mit C10-C80) nahmen an der Studie teil:

C10. Ospedale San Raffaele, Mailand (Italien)

C20. Centre hospitalier universitaire de Nantes (Frankreich)

C30. Universitätsklinikum Regensburg (Deutschland)

C40. University of California, San Francisco (USA)

C50. Charité Universitätsmedizin Berlin (Deutschland)

C60. King's College, London (Großbritannien)

C70. University of Oxford (Großbritannien)

C80. Massachusetts General Hospital, Boston (USA).

Die 6 Zelltherapien umfassten folgende Zellprodukte: zwei Produkte aus polyklonalen Tregs (pTreg-1 und pTreg-2), zwei aus Spender-reaktiven Tregs (darTreg-CSB und dar-Treg-sBC), ein Produkt aus tolerogenen dendritische Zellen (ATDC) sowie ein Produkt aus regulatorischen Makrophagen (Mreg). Jedes Zelltherapieprodukt wurde in einem Zentrum in einer einarmigen Studie getestet. Ausgenommen hiervon waren Oxford und London, die gemeinsam eine Studie mit einem Zellprodukt (p-Treg-1) durchführten. Das Zentrum in Mailand nahm nur an der Referenzgruppenstudie teil, da das zu testende Zellprodukt keine Zulassung für die klinische Verwendung erhielt.

Für die Genexpressionsanalysen wurden klinisch gesunde Erwachsene untersucht. Die meisten wurden per Anfrage auf der Intranetseite der Charité Universitätsmedizin zu Berlin rekrutiert. Ein entsprechendes Ethikvotum der Ethikkommission der Charité (EA2-020-14) lag vor.

Alle Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Alle personenbezogenen Daten von Patienten wurden anonymisiert.

3.1.1 Patientenkollektiv der Referenzgruppe der ONE Study

Für die Referenzgruppe der ONE-Study wurden Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz rekrutiert, die erstmalig eine Nierentransplantation bekommen sollten. Die Diagnosestellung, Rekrutierung, Transplantation sowie Nachuntersuchungen wurden in den 8 teilnehmenden Zentren (C10-80) in Europa und Nordamerika durchgeführt.

Es wurden insgesamt 70 Patienten rekrutiert, 20 Frauen und 50 Männer. Die Altersspanne betrug 18 bis 84 Jahren (Mittelwert: 48.4 Jahre). Davon beendeten 61 die Studie bis zur letzten Nachuntersuchung. Gründe für die Ausscheidung aus der Studie wurden folgendermaßen angegeben: Abweichungen vom Protokoll (2 Patienten), ärztliche Entscheidung (3 Patienten), Widerrufung der Einverständniserklärung (3) und keine Teilnahme an Nachuntersuchungen (1 Patient). Der primäre Endpunkt der Studie wurde als akute Abstoßungsreaktion definiert. Eine akute Abstoßungsreaktion lag vor, wenn die Patienten klinische Symptome einer Abstoßung zeigten und diese sich in einer Biopsie bestätigen ließ. Die Auswertung der Biopsie-Proben erfolgte durch einen einzigen, "zentralen" Pathologen.

3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien der Referenzgruppe der ONE Study

Neben der Diagnose der chronischen Niereninsuffizienz und die geplante, erstmalige Nierentransplantation mussten die Organempfänger mindestens 18 Jahre alt und einwilligungsfähig sein. Darüber hinaus sollten sie in der Lage sein, die erforderliche immunsuppressive Therapie gemäß Studienprotokoll einzunehmen. Aus diesem Grund wurden Patienten mit bekannten Allergien gegen die geplante Medikation von der Teilnahme ausgeschlossen. Ebenfalls wurden Patienten ausgeschlossen, die bereits eine Transplantation in ihrer Vorgeschichte hatten oder Patienten, bei denen weitere Organtransplantationen geplant waren. Die Teilnehmer durften keine genetisch identischen HLA (humanes Leukozytenantigen)-Loci zu den Spendern aufweisen. Patienten sollten zudem bisher keine Desensibilisierungstherapie erhalten haben und keine *panel reactive antibodies* (PRA), also präformierte Antikörper gegen fremde HLA-Antigene über 40% aufweisen. Als weiteres Ausschlusskriterium galten aktive

Krebserkrankungen oder Malignome in den letzten 5 Jahren (ausgenommen waren hiervon erfolgreich therapierte, nicht-metastasierte Basalzellkarzinome der Haut). Ebenfalls durften keine malignen hämatologischen Erkrankungen oder Präkanzerosen bestehen. Weiterhin durften Teilnehmer keine Hinweise auf lokale oder systemische Infektionen, nachweisbare Infektion mit HIV, chronische Virale Hepatitis, schweren Lebererkrankungen oder serologische EBV-Negativität aufweisen.

3.1.3 Nachuntersuchungen und medikamentöse Therapie in der ONE Study

Die Patienten der ONE Study wurden in festgelegten Abständen vor und nach der Transplantation klinisch und laborchemisch untersucht. Die erste Untersuchung erfolgte 4 Wochen vor geplanter Transplantation. Die Nachuntersuchungen wurden jeweils nach 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 und 60 Wochen ab dem Transplantationszeitpunkt durchgeführt (Abb. 4).

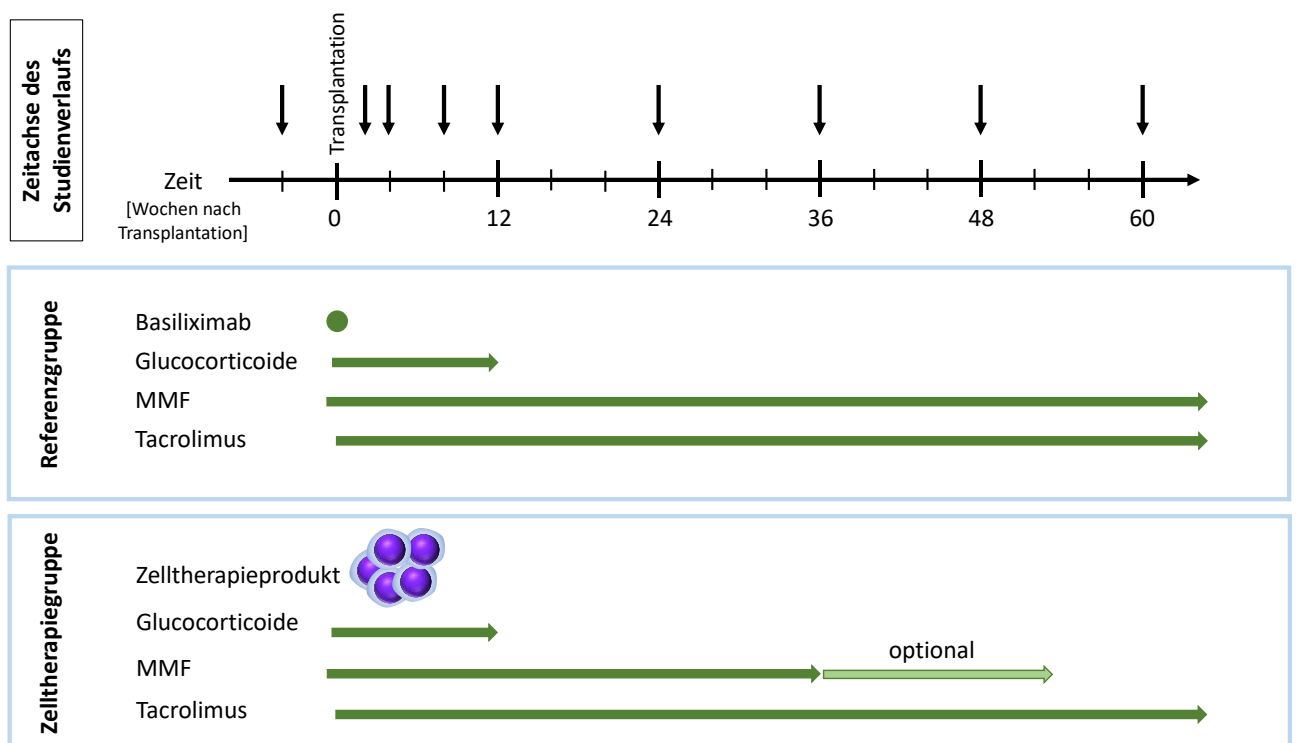


Abb. 4: Die Therapieprotokolle der Referenzgruppe und der Zelltherapiegruppe der ONE Study. Auf der Zeitachse zeigt Zeitpunkt 0 die Transplantation. Der Beobachtungszeitraum umfasste ab 4 Wochen vor der Transplantation bis 60 Wochen danach. Die Pfeile markieren die Untersuchungszeitpunkte, welche die klinische und laborchemische Evaluation beinhalteten. Die Therapieprotokolle der Referenz- und Zelltherapiegruppe sind entsprechend der Therapiedauer dargestellt. Zur besseren Übersicht wurde in der Zelltherapiegruppe die Gabe der Zellprodukte als einmalige Gabe zeitgleich mit der Transplantation dargestellt, tatsächlich variierte dies je nach Zellprodukt. MMF: Mycophenolat-Mofetil.

Die immunsuppressive Therapie für die Referenzgruppe setzte sich folgendermaßen zusammen: Die Induktionstherapie wurde mit Basiliximab intravenös ab 2 Stunden vor der Operation durchgeführt. Es erfolgte eine erneute Gabe derselben Dosierung nach 4 Tagen. Eine intravenöse Gabe von Glucocorticoiden (Prednisolon) erfolgte perioperativ, danach wurde auf orale Glucocorticoide umgestellt, welche im Verlauf ausgeschlichen wurden. Außerdem erhielten die Patienten präoperativ Tacrolimus und postoperativ MMF. Beide Medikamente wurden als Erhaltungstherapie weitergenommen. Die medikamentöse Therapie ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Die medikamentöse Therapie der Referenzgruppe der ONE-Study.

Medikament	Zeitpunkt	Dosierung
Basiliximab	Tag 0	20 mg intravenös ≤ 2 h vor der Transplantation
	Tag 4	20 mg intravenös
Prednisolon	Tag 0	500 mg intravenös (250 mg präoperativ, 250 mg intraoperativ)
	Tag 1	125 mg intravenös
	Tag 2-14	20 mg/Tag oral
	Woche 3-4	15 mg/Tag oral
	Woche 5-8	10 mg/Tag oral
	Woche 9-12	5 mg/Tag oral
	Woche 13-14	2,5 mg/Tag oral
	Woche 15-Studienende	Beendigung
MMF	Tag -1-14	2 g/Tag oral
	Tag 15-Studienende	1,5 g/Tag oral (2x750 mg/Tag)
Tacrolimus	Tag -4-14	3-12 ng/ml
	Woche 3-12	3-10 ng/ml
	Woche 13-36	3-8 ng/ml
	Woche 37-Studienende	3-6 ng/ml

Die Zelltherapiegruppe wurde mit intravenösen und oralen Glucocorticoiden, MMF und Tacrolimus behandelt, wobei Glucocorticoide im Verlauf ausgeschlichen wurden. Im Gegensatz zur Referenzgruppe bestand die Möglichkeit, bei fehlenden Zeichen einer Abstoßungsreaktion auch MMF auszuschleichen. Die Dosis von Tacrolimus wurde im Verlauf reduziert, als Erhaltungstherapie wurde es aber weiterhin genommen. Das Absetzen von CNI, sogar in langjährig stabilen Nierentransplantierten, ist nach derzeitigem Wissensstand nicht vertretbar (134, 135).

Die Zellprodukte wurden, je nach Zellart, zwischen Tag 7 vor Transplantation und Tag 10 nach Transplantation einmalig intravenös appliziert. Dosierung und Therapie mit den Zelltherapieprodukten ist von Sawitzki *et al.* (136) detailliert beschrieben und publiziert. Da diese Arbeit sich mit der Referenzgruppe befasst, werden diese Details der Zelltherapiegruppen hier nicht weiter aufgeführt. In Tabelle 2 ist die medikamentöse Therapie der Zelltherapiegruppe zusammengefasst.

Tabelle 2: die medikamentöse Therapie der Zelltherapiegruppe der ONE Study.

Medikament	Zeitpunkt	Dosierung
Zelltherapieprodukt¹		
Prednisolon	Tag 0	500 mg intravenös (250 mg präoperativ, 250 mg intraoperativ)
	Tag 1	125 mg intravenös
	Tag 2-14	20 mg/Tag oral
	Woche 3-4	15 mg/Tag oral
	Woche 5-8	10 mg/Tag oral
	Woche 9-12	5 mg/Tag oral
	Woche 13-14	2,5 mg/Tag oral
	Woche 15- Studienende	Beendigung
Tacrolimus	Tag -4 bis 14	3-12 ng/ml
	Woche 3-12	3-10 ng/ml
	Woche 13-36	3-8 ng/ml
	Woche 37- Studienende	3-6 ng/ml
MMF²	Tag -7 bis -2	500mg/Tag oral
	Tag -1 bis 14	2 g/Tag oral
	Woche 3-36	1 g/Tag oral
	Woche 37-40	750 mg/Tag oral
	Woche 41-44	500 mg/Tag oral
	Woche 45-48	250 mg/Tag oral
Woche 49- Studienende	Beendigung	

1. Die Zellprodukte unterschieden sich in der Zellart, Dosierung und Zeitpunkt der Gabe.
2. MMF-Dosisreduktion ab Woche 36 möglich, wenn keine klinischen oder paraklinischen Hinweise auf eine Abstoßungsreaktion sowie andere Kontraindikationen vorlagen.

3.2 Isolierung von PBMCs und Zellzahlbestimmung

Die Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur (RT). Frisch entnommenes Vollblut (in 9 ml Vacuette®-Röhrchen) wurde mit gleichem Volumen PBS verdünnt, in 15 ml Zentrifugenröhrchen auf je 3 ml Biocoll vorsichtig überschichtet und für 20

min bei 840 x g zentrifugiert. Der separierte Lymphozytenring wurde mittels Pasteur-Pipette aufgenommen, mit PBS auf 50 ml Endvolumen aufgefüllt und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet aufgelockert, mit PBS auf 30 ml Endvolumen aufgefüllt und erneut für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde 25 µl von der Zellsuspension mit 100 µl PBS verdünnt, hiervon 25 µl entnommen und mit dem gleichen Volumen Trypanblau zur Färbung der toten Zellen vermischt. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop gezählt. Die Gesamtzellzahl wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{Anzahl Quadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Volumen} * \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

3.3 Anreicherung von CD4⁺ Zellen

Um aus den PBMCs CD4⁺ Zellen zu gewinnen, wurden diese mit Hilfe von magnetischen CD4 MicroBeads separiert (*magnetic cell separation*, MACS). In dieser Methode binden magnetische MicroBeads an CD4⁺ Zellen. Diese können dann mit Hilfe einer Säule, die an einem magnetischen Block befestigt ist, von restlichen Zellen getrennt werden. Die mit CD4⁺ Zellen beladenen MicroBeads binden an die Säule, während CD4⁻ Zellen ungebunden durch die Säule fließen. Nach Entfernung der Säule vom magnetischen Block können die CD4⁺ Zellen durch Spülen mit einem Puffer ebenfalls von der Säule entfernt werden.

Hierzu wurden die isolierten PBMCs, nach Bestimmung der Zellzahl, durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 300 x g, RT) und der Überstand durch Absaugen entfernt. Pro 1 x 10⁷ Zellen wurden 80 µl MACS-Puffer und 20 µl CD4 MicroBeads zu den Zellen gegeben, gut vermischt und für 15 min im Kühlschrank (2-8 °C) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer pro 1 x 10⁷ Zellen gewaschen (10 min, 300 x g, 4 °C), der Überstand wurde abgekippt. Bis zu 1 x 10⁸ Zellen wurden in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Diese wurden auf eine zuvor mit MACS-Puffer gespülte LS-Säule gegeben, welche am magnetischen Block befestigt war. Die Säule wurde 3 Mal mit je 3 ml MACS-Puffer durchgespült, wobei jedes Mal die Flüssigkeit vollständig durch die Säule lief, bevor erneut Puffer auf die Säule gegeben wurde. Danach wurde der Magnet entfernt, die Säule auf ein frisches 15 ml Zentrifugenröhrchen gestellt, 5 ml MACS-

Puffer auf die Säule gegeben und mit einem sterilen Kolben durchgedrückt. Die gewonnenen CD4⁺ Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank (2-8 °C) aufbewahrt.

3.4 Zellsortierung

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Erfassung verschiedener Merkmale von Zellen oder anderen Partikeln, die einzeln durch eine Säule fließen und mittels optischer Signale analysiert werden (137, 138). Diese Technik kann zusätzlich dafür eingesetzt werden, Zellen und Partikel anhand ihrer Oberflächenmerkmale in definierte Gruppen zu sortieren. Für diese Arbeit wurde die Zellsortierung verwendet, um CD4⁺ Zellen in Subpopulationen zu separieren, welche dann weiter untersucht wurden.

Hierfür wurden CD4⁺ angereicherte Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen die gewählten Oberflächenmoleküle gefärbt. Die entsprechende Anzahl von Zellen wurden nach Zentrifugation (5 min, 300 x g, 4 °C) in PBS/FCS resuspendiert, mit Antikörpern vermischt und 20 min im Kühlschrank (2-8 °C) inkubiert (Liste der Antikörper und Verdünnungen im Abschnitt 2.1). Danach erfolgte die Gabe von je 1000 µl PBS/FCS und die Zellen wurden pelletiert (5 min, 300 x g, 4 °C). Überstände wurden abgesaugt und die Zellen in PBS/FCS aufgenommen, sodass eine Endkonzentration von 5×10^7 Zellen/ml erreicht wurde. Die Zellsortierung wurde mit einem FACSAria™ II SORP der Firma Becton-Dickinson durch Dr. Désirée Kunkel und Jens Hartwig vom Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien (BCRT) durchgeführt. Die Sortierungsstrategie ist in Abb. 5 dargestellt.

Die sortierten Zellen wurden in 1,5 ml Reagiergefäßen gesammelt, die mindestens 30 min vorher mit PBS/FCS beschichtet worden waren. Die Zellzahl jeder Fraktion wurde während der Sortierung vom Gerät gemessen. Zusätzlich wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

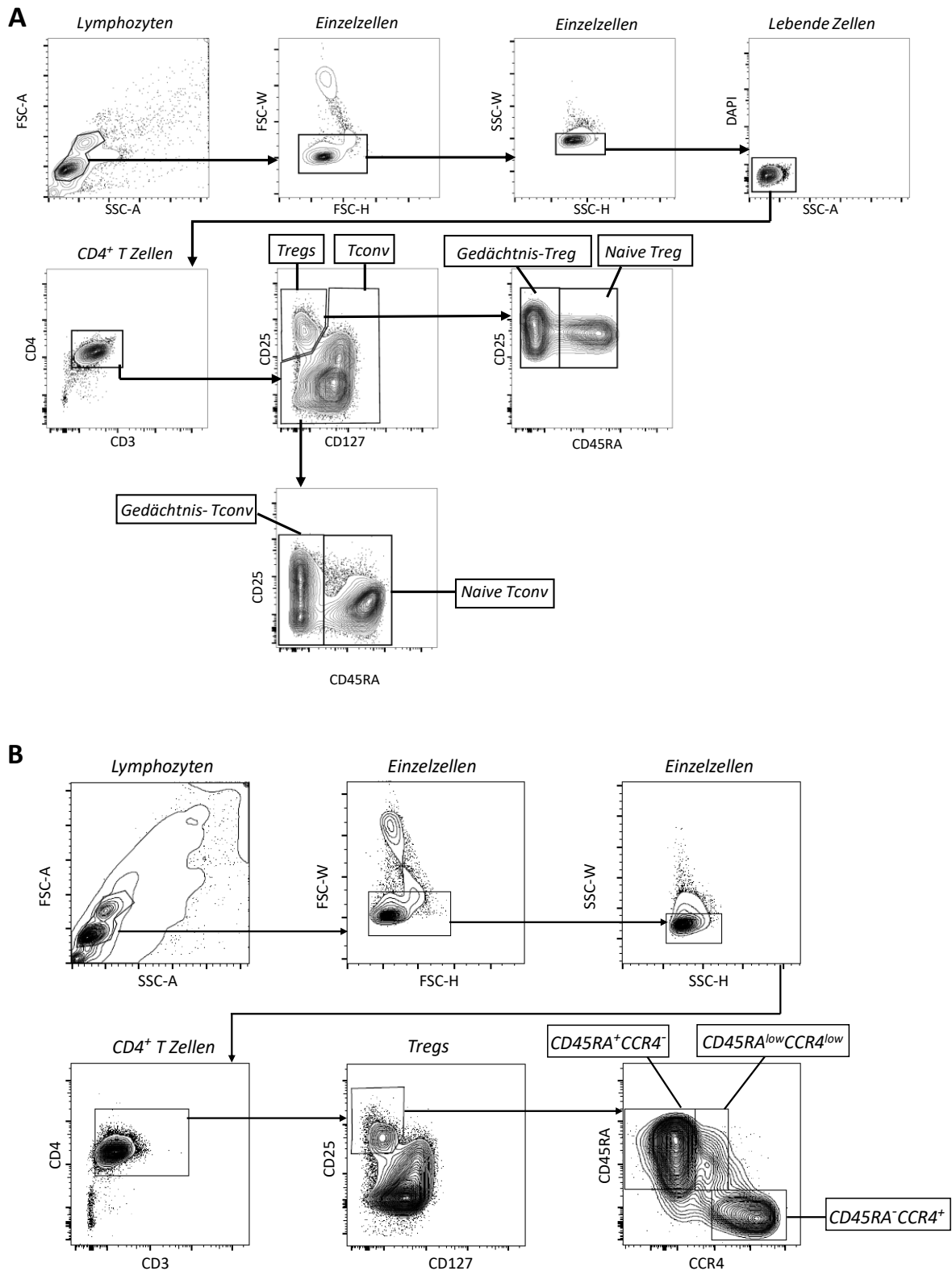


Abb. 5: Sortierungsstrategie. Aus dem Blut gesunder Proband*innen gewonnene PBMCs wurden nach Anreicherung von CD4⁺ Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie sortiert. Die Ereignisse sind hier als Konturdiagramme dargestellt. Die Achsen stellen das jeweils zur Analyse des Fensters herangezogene Merkmal (z. B. Streulicht oder Zellmarker) dar. Die gesuchten Zellpopulationen (deren Bezeichnung befindet sich über entsprechendem Fenster) wurden von den restlichen Zellen

abgegrenzt und in nachfolgenden Analysefenstern (schwarze Pfeile) weiter ausgewertet. A) Sortierungsstrategie für naive und Gedächtnis-Tregs sowie naive und Gedächtnis-Tconv. Dubletten wurden über zwei unterschiedliche Fenster (FSC-W und FSC-H sowie SSC-W und SSC-H) und tote Zellen mithilfe des Farbstoffes DAPI ausgeschlossen. Zielpopulationen wurden folgendermaßen definiert: Tregs: $CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$; Tconv: $CD3^+CD4^+$. Die Gedächtnis-Zellen wurden als $CD45RA^-$ und naive Zellen als $CD45RA^+$ definiert. B) Sortierungsstrategie für $CD45RA^{+/-low}CCR4^{+/-low}$ Zellen. Ausschluss von Dubletten erfolgte über zwei unterschiedliche Fenster (FSC-W und FSC-H; SSC-W und SSC-H). Zellen wurden in drei verschiedene Populationen sortiert: $CD45RA^+CCR4^-$, $CD45RA^-CCR4^+$ und $CD45RA^{low}CCR4^{low}$ Zellen. FSC: forward scatter, SSC: side scatter, Treg: regulatorische T-Zelle, Tconv: konventionelle T-Zelle.

3.5 Durchflusszytometrische Kontrollen der sortierten Zellen

Parallel zur Zellsortierung erfolgte in den meisten Fällen eine Kontrolle der Färbungen von Proben mittels Durchflusszytometrie. Diese Messungen wurden mit der Software „Flowjo™“ ausgewertet. Das Färbeprotokoll setzte sich folgendermaßen zusammen:

3.5.1 Lebend/Tot-Färbung

Um tote Zellen bei der Messung auszusortieren, wurden die Proben mit einem Lebend/Tot (*live/dead*, LD)-Farbstoff gefärbt. Dieser Farbstoff bindet an die Aminogruppe von Proteinen. Die Zellmembran ist für den Farbstoff nicht durchlässig, somit fällt die Färbung bei lebenden Zellen viel schwächer aus, da bei intakter Zellmembran nur die Membranproteine gefärbt werden. Im selben Schritt erfolgte die Zugabe eines Fc(*Fragment crystallizable*)-Rezeptor-Blockers, um eine unspezifische Bindung des Fc-Anteils der Antikörper an den Fc-Rezeptor zu vermeiden.

5×10^5 Zellen wurden in PBS gewaschen (4 min, 300 x g, 4 °C), mit 100 µl des 1:100 verdünnten LD/Fc-Blocker-Farbstoffes versetzt, 15 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen (4 min, 300 x g, 4 °C).

3.5.2 Oberflächenfärbung

Für die Färbung der Oberflächenproteine wurden die Zellen zuerst mit dem CCR4-Antikörper (1:200) versetzt und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dieser Antikörper wurde im Gegensatz zu anderen bei RT inkubiert, da hiermit bessere Färbeergebnisse erzielt werden konnten. Danach wurden die Proben mit FACS-Puffer gewaschen, um die nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen (4 min, 300 x g, 4 °C). Anschließend wurden die restlichen Oberflächen-Antikörper

hinzupipettiert. Die Proben wurden für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und danach mit FACS-Puffer gewaschen (4 min, 300 x g, 4 °C).

3.5.3 Intrazelluläre Färbung

Die Foxp3-Färbung erfolgte mit dem Kit „Foxp3 Staining Buffer Set“ der Firma Miltenyi. Die Vorbereitung der Lösungen erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. In dieser Färbemethode wird die Zellmembran zunächst stabilisiert (meistens durch Formaldehyd) und dann permeabilisiert, um den Antikörpern den Zugang zu intrazellulären Ziel-Proteinen, in diesem Fall Foxp3, zu ermöglichen.

Zellen wurden für 30 min bei 4 °C mit 500 µl der Fixierung- und Permeabilisierungslösung (*Fixation and Permeabilization solution*) inkubiert, anschließend mit FACS-Puffer und danach mit Permeabilisierungspuffer (*Permeabilization Buffer*) gewaschen (jeweils für 4 min, 500 x g, 4°C). Nach der Zugabe des Foxp3-Antikörpers wurden die Proben erneut mit Permeabilisierungspuffer gewaschen (4 min, 500 x g, 4 °C) und in FACS-Puffer resuspendiert.

3.6 Isolierung von RNA und DNA

Zur Gewinnung von RNA und DNA aus sortierten Zellen wurde das Kit „AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit“ der Firma Qiagen gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Dieses Kit erlaubt die simultane Gewinnung von Nukleinsäuren und Proteinen aus einer Probe. Zellen wurden, je nach Zellzahl, durch Vortexen oder mittels einer QIA-Schredder-Säule homogenisiert. Abweichend vom Protokoll wurde bei der RNA-Isolierung nach Zugabe des Waschpuffers im ersten Waschschrift die Zentrifugationszeit von 15 Sekunden auf 1 min und im zweiten Waschschrift von 2 auf 4 min erhöht. Dies trocknet die Säule und verhindert eine Übertragung von Ethanol auf die Säulenmembran, welches nachfolgende Versuche beeinträchtigen könnte. Zur Erhöhung der DNA- und RNA-Ausbeute wurden jeweils die Eluate nach dem Ausspülen erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Die gewonnene RNA wurde zusätzlich für 5 min bei 65 °C inkubiert. RNA- und DNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.7 Konzentrationsmessung der Nukleinsäuren

Die DNA- und RNA-Konzentration wurde mit einem NanoDrop™ 1000 Spektralphotometer und entsprechender Software (NanoDrop 1000) gemessen. Sofern die Proben vorher auf -80 °C gekühlt waren, wurden sie auf Eis aufgetaut. Zuerst wurde eine Basislinienkorrektur mit RNase-freiem Aqua dest und EB-Puffer vorgenommen, dann die Konzentration in je 1,5 µl der Probe bestimmt.

3.8 Gewinnung von cDNA

Um eine qRT-PCR (quantitative Reverse-Transkriptase-PCR, *quantitative reverse transcription PCR*) mit RNA als Vorlage durchführen zu können, muss die RNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Hierfür wurde das „Qiagen Quantitect Reverse Transcription Kit“ gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Dieses Kit beinhaltet zusätzlich eine Komponente, die eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA beseitigt, sodass die Probe nur cDNA beinhaltet. Dies verhindert, dass bei der späteren PCR genomische DNA mitamplifiziert wird.

Die Inkubationszeit für die Elimination der genomischen DNA wurde von 2 auf 10 min erhöht. Entsprechend der Herstellerempfehlung wurde zur Steigerung der möglichen cDNA-Ausbeute der Reaktionsansatz nach Zugabe von RNA 30 min (statt 15 min) bei 42 °C inkubiert. Nach dem letzten Inkubationsschritt zur Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte die Zugabe von 20 µl RNase-freiem Aqua dest. Die cDNA-Proben wurden, falls nicht sofort weiterverwendet, bei -20 °C gelagert.

3.9 Genexpressionsanalysen

3.9.1 Genexpressionsanalysen aus durchflusszytometrisch sortierten Treg-Zellen

Für die Analysen mit naiven und Gedächtnis-Tregs ($CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}CD45RA^{+/-}$) und Tconv wurden insgesamt 8 Probanden (7 Frauen und 1 Mann) im Alter von 22 bis 26 rekrutiert, da frühere Arbeiten gezeigt hatten, dass in dieser Altersgruppe tendenziell die höchste Frequenz von naiven Tregs zu erwarten ist (37). Genexpressionsanalysen aus sortierten $CD45RA^{+/-}CCR4^{+/-}$ Treg-Zellen wurden an 5 Probanden (3 Frauen und 2 Männern) im Alter von 29 bis 32 durchgeführt, wo eine höhere Frequenz von Gedächtnis-Tregs zu erwarten war.

3.9.2 Genexpressionsanalysen und Durchflusszytometrie aus Vollblut gesunder Probanden

Die Studienpopulation war identisch mit dem von Kverneland *et al.* beschriebenen und veröffentlichten Kollektiv (37). Es handelte sich um 52 gesunde Erwachsene im Alter von 20 bis 75 Jahren mit ausgeglichenem Geschlechterverhältnis und jeweils 10 bzw. 12 Individuen in den Altersgruppen 20-29, 30-39, 40-49, 50-59 und 60-75 Jahre. Als gesund wurden Proband*innen definiert, die keine symptomatischen Infektionen in den vergangenen 14 Tagen und keine Immunisierungen in dem vergangenen Monat hatten, nicht an entzündlichen Erkrankungen litten oder Medikamente mit bekannter oder vermuteter Wirkung auf das Immunsystem nahmen und nicht schwanger waren. Im Rahmen der Studie wurden RNA-Proben aus dem Vollblut der Teilnehmenden isoliert, die in vorliegender Arbeit analysiert wurden. Die Expression von Foxp3 wurden von Herrn Anders Kverneland mit der im Abschnitt 3.9.3 beschriebenen Methodik bestimmt. Die durchflusszytometrische Messung der Leukozytenpopulationen, von denen die der gesamten Tregs, nativen Tregs und Gedächtnis-Tregs in dieser Arbeit dargestellt werden, erfolgte durch Herrn Anders Kverneland.

3.9.3 qRT-PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde die relative mRNA-Expression mit „Taqman Gene Expression Assays“ bestimmt. Als Matrize für die PCR diente die aus den Proben gewonnene cDNA (Abschnitt 3.8).

Die Taqman-Assays beinhalten neben einem Paar sequenzspezifischer Primer eine Taqman-Sonde. Diese Sonde besteht aus einer komplementären Sequenz zur Matrizen-DNA. Wichtige Bestandteile der Taqman-Sonde sind ein fluoreszierender Farbstoff am 5'-Ende sowie ein *Quencher* am 3'-Ende. Bei intakter Sonde wird durch die räumliche Nähe die Fluoreszenzenergie auf den Quencher übertragen und unterdrückt, ist also nicht detektierbar. Wenn die Taq-Polymerase die Sonde erreicht, spaltet sie diese, wodurch sich der Farbstoff und Quencher voneinander entfernen. Das Fluoreszenzsignal wird nicht mehr durch den Quencher unterdrückt und ist folglich messbar. Die somit detektierte Fluoreszenz ist proportional zur DNA-Menge. Da die Polymerase nur Sonden abbauen kann, die an der Matrize gebunden haben, wird kein Signal von freien Sonden oder unspezifisch amplifizierten Genabschnitten emittiert.

Die mRNA-Konzentration wird im Bezug zu drei sogenannten Haushaltsgenen (*house keeping genes*) berechnet. Haushaltsgene sind für die Aufrechterhaltung von grundlegenden Zellfunktionen notwendig und werden daher konstitutiv in relativ konstanter Menge in Zellen exprimiert. Für diese Arbeit wurde die mRNA-Expression bezogen auf folgende Haushaltsgene bestimmt:

1. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)
2. β 2-Mikroglobulin (β 2M)
3. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Die Expression wurde für jedes Gen und Haushaltsgen in Doppelansätzen bestimmt. Zusätzlich wurde für jedes Gen ein Ansatz ohne cDNA angefertigt, um mögliche Kontaminationen zu detektieren. Der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen (Tabelle 3):

Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für qRT-PCR.

Komponente	Volumen
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	10 μ l
Taqman® Gene Expression Assay	1 μ l
RNase freies Wasser	8 μ l
cDNA	bis 2 μ l

Die PCR-Reaktion wurde mit einem 7500 Real-Time PCR-System der Firma Thermo Fisher Scientific nach dem Schema in Tabelle 4 durchgeführt. Dem Reaktionsansatz ist UDG (Uracil-DNA-Glykosylase) beigefügt, die bei möglichen Kontaminationen durch DNA aus anderen Proben die dadurch entstandenen PCR-Produkte verdaut.

Tabelle 4: PCR-Reaktion. Die Denaturierung sowie Hybridisierung und Elongation wiederholten sich in 40 Zyklen.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)	
Deaktivierung möglicher Kontaminationen durch UDG*	50	02:00	
Initialisierung	95	10:00	
Denaturierung	95	00:15	x 40 Zyklen
Hybridisierung und Elongation	60	01:00	

Die Auswertung erfolgte mit der Software „7500 Real-Time PCR“. Nach der Messung wurde die relative Genexpression, bezogen auf ein bestimmtes Haushaltsgen, mit folgender Formel berechnet, wobei die Expression den Mittelwert jeder Doppelbestimmung darstellt.:

$$\text{Relative mRNA-Expression} = 2^{- (\text{Expression Gen} - \text{Expression Haushaltsgen})}$$

Für jedes Gen wurde der geometrische Mittelwert aus den relativen Expressionen bezogen auf die Haushaltsgene ermittelt. Proben wurden von der Analyse ausgeschlossen, falls die Werte in der Doppelbestimmung mehr als 0,5 Einheiten voneinander abwichen.

3.10 Analyse der TSDR-Demethylierung

Die Bestimmung der TSDR-Demethylierung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Katrin Vogt vom Institut für Medizinische Immunologie, AG Molekulare Immunmodulation, durchgeführt. Bis zu 2 µg DNA pro Probe wurden mit dem „EpiTect Bisulfite Kit“ (Qiagen) behandelt. Hierbei werden durch die Behandlung mit Natriumbisulfit die demethylierten Cytosin-Basen gegen Uracil ausgetauscht, wobei die methylierten Cytosin-Basen unverändert bleiben. Die TSDR-Demethylierung wurde durch Echtzeit-PCR bestimmt. Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen: 10 µl FastStart Universal Probe Master, 100 µg Lambda-DNA, 5 pmol methylierungs- oder demethylierungsspezifische Sonde, 30 pmol methylierungs- oder demethylierungsspezifischer Primer und bis zu 15 ng DNA (nach der Bisulfid-Behandlung). Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Messung erfolgte anschließend an einem 7500 Real-Time PCR-System. Die Demethylierung wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$\text{DNA-Demethylierung} = \frac{\text{Anzahl der demethylierten DNA-Kopien}}{\text{Gesamtanzahl der DNA-Kopien}} * 100 * \text{Geschlechtsfaktor}$$

Der Geschlechtsfaktor beträgt 1 für Männer und 2 für Frauen, da Frauen zwei X-Chromosomen und somit zwei Kopien des Foxp3-Gens besitzen, wobei nur eine Kopie aktiv und demethyliert ist.

3.11 Auswertung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse der ONE Study

Für die ONE-Study wurden die Panels zur Auswertung der Leukozytenpopulationen vorab definiert, standardisiert und getestet (35-37). In vorliegender Arbeit wurde das Panel ausgewertet, welches die intrazelluläre Foxp3-Färbung beinhaltet. Dieses war ein optionaler Bestandteil der Studie und wurde von zwei Zentren, King's College in London und University of Oxford, nicht durchgeführt. Patienten aus diesen Zentren wurden folglich hinsichtlich der Foxp3-Expression ihrer Zellen nicht durchflusszytometrisch untersucht.

Die durchflusszytometrische Messungen der Patientenproben aus der ONE Study wurden in den beteiligten Zentren durchgeführt. Die Proben wurden in einem Navios™ Durchflusszytometer des Herstellers Beckman Coulter gemessen. Die Daten wurden mit der „Kaluza Analysis Software“ ausgewertet. Die Kompensationen für die Auswertung wurden von Herrn Mathias Streit vom Institut für Medizinische Immunologie der Charité Berlin durchgeführt. Die Gating-Strategie ist beispielhaft in Abb. 6 dargestellt. Die Bestimmung der CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Tregs in der Referenzgruppe der ONE Study erfolgte in einem separaten Panel und wurde von Herrn Mathias Streit ausgewertet. Abb. 7 zeigt die Gating-Strategie für dieses Panel.

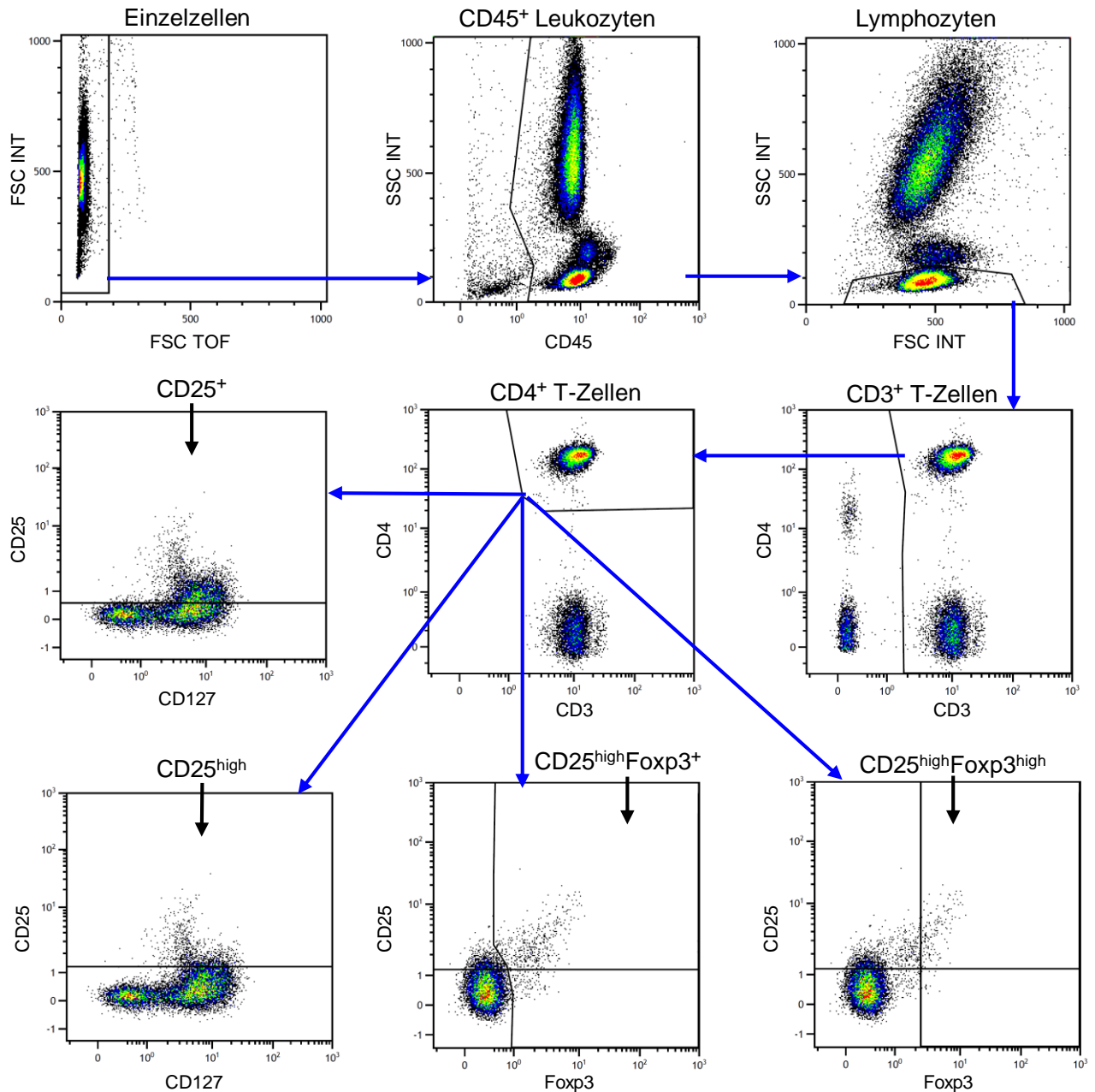


Abb. 6: Gating-Strategie für die durchflusszytometrischen Analysen zur Bestimmung der Foxp3-exprimierenden Tregs. Die Achsen stellen das jeweils zur Analyse des Fensters herangezogene Merkmal (z. B. Streulicht oder Zellmarker) dar. Die gesuchten Zellpopulationen (deren Bezeichnung befindet sich über entsprechendem Fenster oder ist mit schwarzen Pfeilen markiert) wurden von den restlichen Zellen durch Gating abgegrenzt und in nachfolgenden Analysefenstern (blaue Pfeile) weiter ausgewertet. Zur Bestimmung der CD25^{high}Foxp3^{+/high} Populationen wurde die Höhe der CD25-Expression (2. und 3. Reihe, jeweils erstes Fenster von links) genutzt. Dubletten wurden von der Analyse ausgeschlossen (1. Reihe, erstes Fenster von links). FSC: *Forward scatter*; (Vorwärtsstreulicht); INT: *Integral*; SSC: *Side scatter*, (Seitwärtsstreulicht); TOF: *Time of flight*.

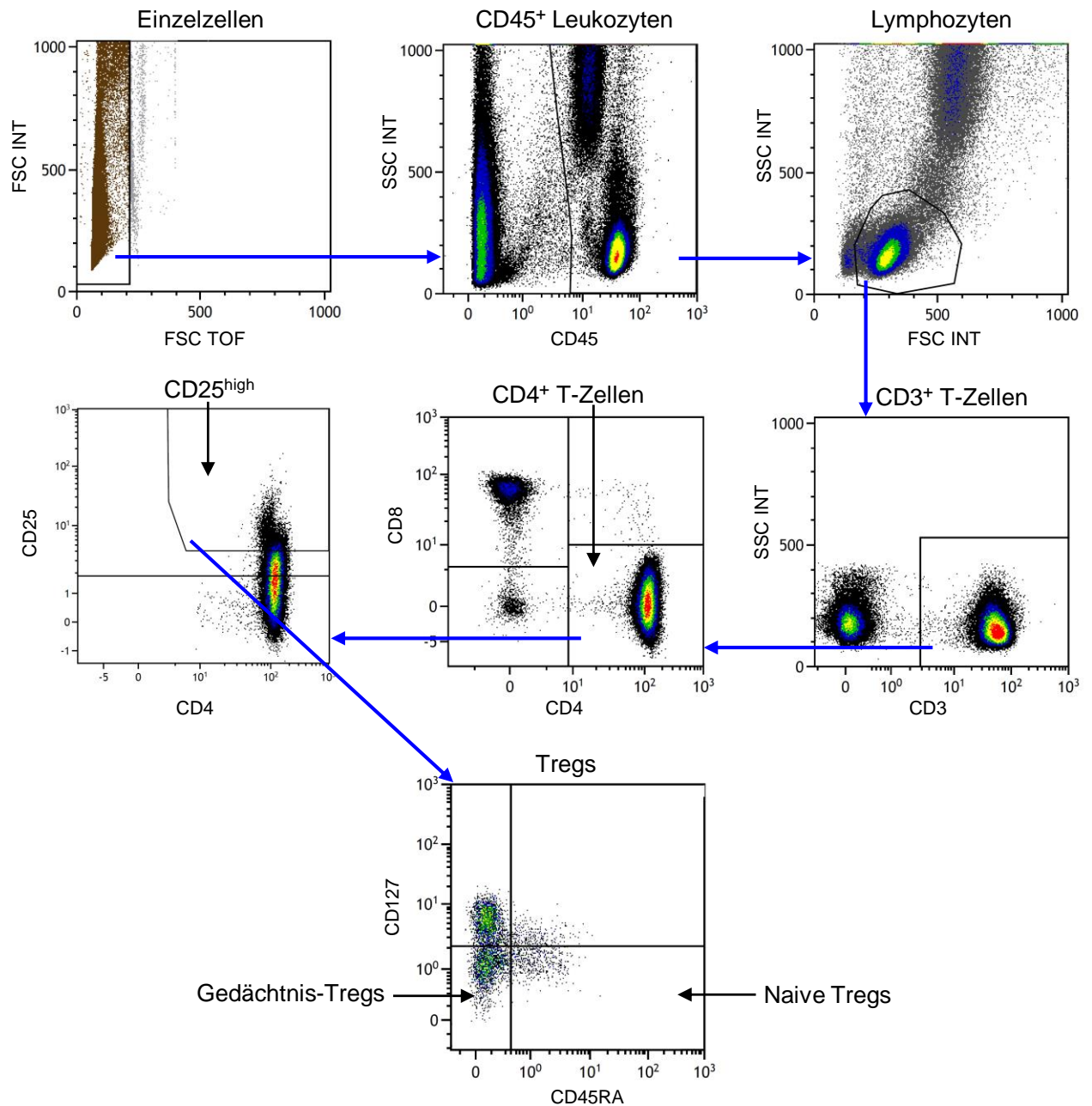


Abb. 7: Gating-Strategie für die durchflusszytometrischen Analysen zur Bestimmung der $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Tregs. Die Achsen stellen das jeweils zur Analyse des Fensters herangezogene Merkmal (z. B. Streulicht oder Zellmarker) dar. Die gesuchten Zellpopulationen (schwarze Pfeile) wurden von den restlichen Zellen abgegrenzt und in nachfolgenden Analysefenstern (blaue Pfeile) weiter ausgewertet. Die Populationen der naiven und Gedächtnis-Tregs (letztes Fenster) bildeten gemeinsam die Treg-Population. Dubletten wurden von der Analyse ausgeschlossen (1. Reihe, erstes Fenster von links). FSC: *Forward scatter*; (Vorwärtsstreulicht); INT: Integral; SSC: *Side scatter*, (Seitwärtsstreulicht); TOF: *Time of flight*.

Untersuchungen mit deutlich misslungener Färbung oder unvollständigem Datensatz wurden für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse der Auswertungen wurden in „Microsoft Excel“ zusammengestellt.

3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité Berlin. Die Daten wurden mit den Programmen „GraphPad Prism“ sowie Microsoft Excel analysiert. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism.

Die Frequenzen und die TSDR der untersuchten Zellpopulationen aus der ONE-Study sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) dargestellt. Der nicht-parametrische Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman wurde ermittelt, um die Altersabhängigkeit verschiedener Parameter zu überprüfen und die Korrelation zwischen TSDR und Zellfrequenzen zu untersuchen. Zur besseren Veranschaulichung wurden in den Graphen durch lineare Regressionsanalyse Ausgleichslinien (Regressionslinien) gezeichnet, um als optische Führung zu dienen. Bei Vergleich von mehr als zwei Gruppen aus Zellen gleichen Ursprungs wurde ein nicht-parametrischer Friedman-Test und *post-hoc* der Dunn-Test verwendet. Bei Fehlenden Messwerten in den Genexpressionsanalysen wurde mit GraphPad Prism ein gemischtes Modell erstellt. Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wurden graphisch als Box-Whisker-Plot dargestellt, wobei die Box den Bereich zwischen dem 0,25 und 0,75 Quartil beinhaltet. Der Median ist als Strich in der Box abgebildet. Die Antennen (Whisker) erstrecken sich von Minimum bis Maximum der Werte, zusätzlich ist jeder Wert individuell als Punkt dargestellt.

Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ definiert und in den Abbildungen folgendermaßen dargestellt: n.s.: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Bei einer Stichprobe < 16 handelt es sich um einen exakten p-Wert, bei größeren Stichproben um einen Näherungswert.

4. Ergebnisse

4.1 Referenzgruppe der ONE Study

Die Referenzgruppe der ONE Study bestand aus Nierentransplantierten, die konventionell immunsuppressiv behandelt wurden und als Kontrolle für die Zelltherapiegruppe dienten. Alle Teilnehmenden wurden mit einem einheitlichen, standardisierten Protokoll untersucht, was u. a. die Untersuchung der Leukozytenpopulationen mittels Durchflusszytometrie sowie die Bestimmung der TSDR-Demethylierung beinhaltete. Für die Referenzgruppe erfolgte die Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten der Treg-Zellen und der TSDR-Demethylierungsrate. Diese Befunde bilden die Grundlage für die Auswertung der Ergebnisse der Zelltherapiegruppe.

4.1.1 Frequenz der Tregs und TSDR-Demethylierung im Verlauf der Studie

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Blutzellen erfolgte einmalig vor der Transplantation sowie in definierten Abständen bis 60 Wochen nach dem Eingriff. Im Panel mit der intrazellulären Foxp3-Färbung wurde die Frequenz von Tregs, definiert als $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ Zellen, bestimmt. Aus dieser Population wurde die Untergruppe der aktivierten Treg-Zellen mit hoher Foxp3-Expression ($CD4^+CD25^{high}Foxp3^{high}$ Zellen) ermittelt. Die Gating-Strategie für diese Analysen ist in Abschnitt 3.11 dargestellt. Beide Populationen wurden auf die Anzahl der $CD4^+$ Zellen normiert. Zur besseren Übersicht wurde für jedes Zentrum pro Untersuchungszeitpunkt (z.B. 2 Wochen nach Transplantation) der Mittelwert aus den relativen Treg-Frequenzen aller Teilnehmenden gebildet und in Abb. 8. dargestellt.

Abb. 8. A zeigt die Frequenz der $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ Zellen (in % von $CD4^+$) im Verlauf der Studie. 4 Wochen vor Transplantation liegen die Frequenzen zwischen 7,3% und 14,1%. In der Literatur wird die Frequenz von Tregs im peripheren Blut mit 5-10% aller $CD4^+$ Zellen angegeben (56). Es fällt auf, dass die Werte aus Zentrum(C)10 und C80 mit jeweils 11,3 und 14,1% über diesem Durchschnittswert liegen. Die hohen Werte in beiden Zentren sind durch jeweils eine Person zustande gekommen, die zu diesem Zeitpunkt sehr wenig Lymphozyten und $CD4^+$ Zellen aufwies. Möglicherweise sind in diesen Fällen im Zuge des Färbeprozesses überdurchschnittlich viele Zellen verloren gegangen. Das daraus resultierende Verhältnis von $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ zu

CD4⁺ Zellen könnte fehlerhaft sein, da bei wenig Zellmaterial selbst einzelne Zellen das Verhältnis stark verändern können.

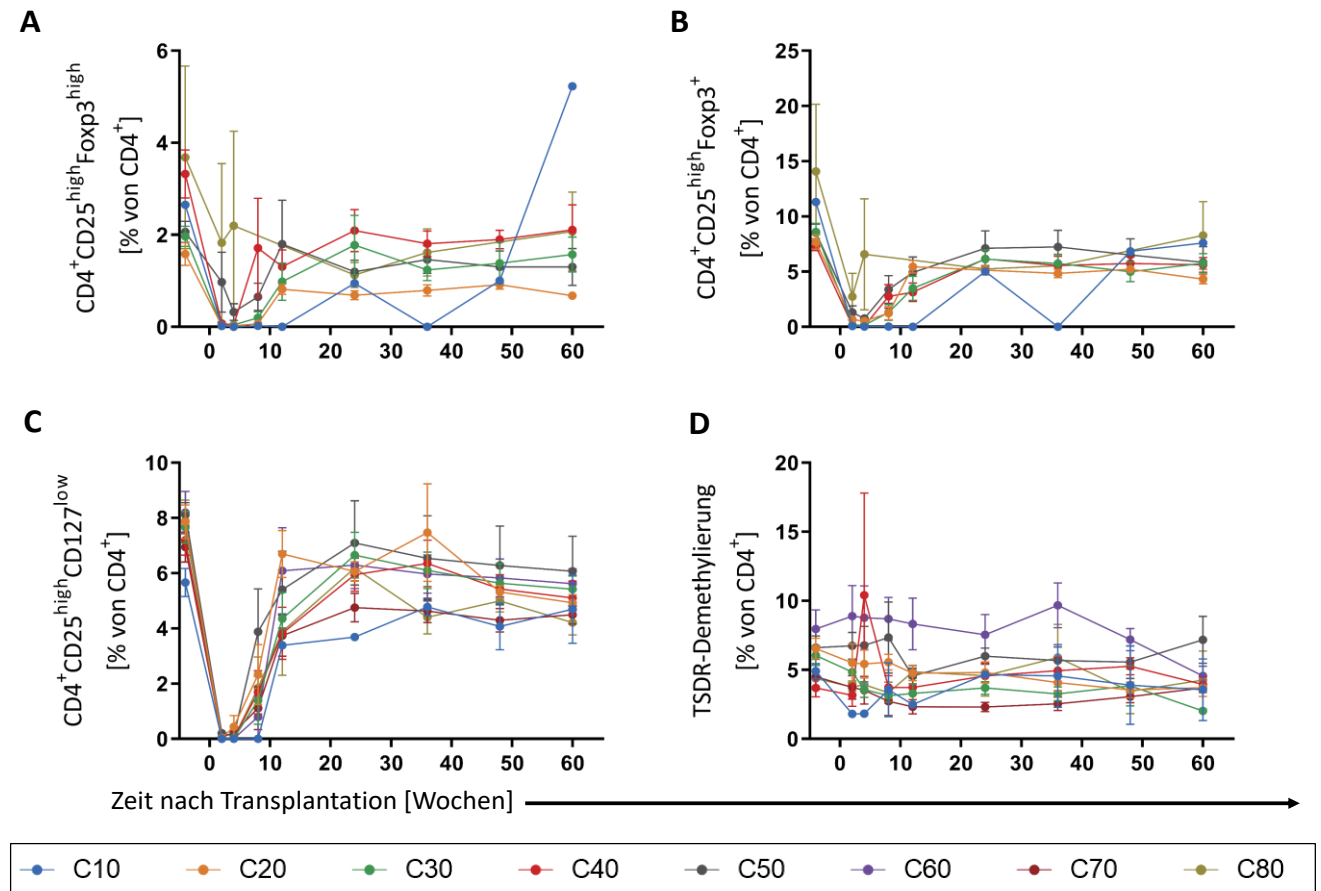


Abb. 8: Frequenz der Treg-Zellen und TSDR-Demethylierungsraten der Referenzgruppe der ONE-Study im Verlauf der Studie. Dargestellt sind die Ergebnisse aus Untersuchungen ab 4 Wochen vor der Transplantation bis zur letzten Nachuntersuchung (60 Wochen nach Transplantation). Zeitpunkt 0 stellt die Transplantation dar. Datenpunkte und Balken zeigen MW \pm SEM von Teilnehmenden eines Zentrums. Dargestellt als % von CD4⁺ Zellen sind A) CD4⁺CD25^{high} Foxp3⁺ Zellen; B) CD4⁺CD25^{high}Foxp3^{high} Zellen; C) CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Zellen sowie D) die Foxp3-TSDR-Demethylierung. Die Foxp3-Färbung wurde in Zentren 60 und 70 nicht durchgeführt, diese Zentren sind folglich in A und B nicht abgebildet ($n_{\text{Zeitpunkt}} = 38-43$). Daten für C und D hingegen stammen aus allen Zentren ($n_{\text{Zeitpunkt}} = 58-67$). C: Zentrum, MW: Mittelwert, SEM: Standardfehler des Mittelwerts.

Die Frequenzen nehmen nach der Transplantation (erstmalige Bestimmung postoperativ nach 2 Wochen) in allen Zentren stark ab. Die Zellfrequenz erholt sich im Verlauf wieder. Generell erreicht sie nach 12-24 Wochen ein relativ konstantes Niveau, welches tendenziell etwas niedriger als das Ausgangsniveau ist und sich bis zur letzten Nachuntersuchung nicht erheblich verändert [Mittelwert (MW) der Zellfrequenzen beträgt vor Transplantation 9,6%, MW nach 60 Wochen 6,2%].

Eine ähnliche Dynamik ist für die Frequenzen der $CD4^+CD25^{high}Foxp3^{high}$ Zellen zu beobachten (Abb. 8. B). Die anfänglichen Werte liegen zwischen 1,6% und 3,7% der $CD4^+$ Zellen. Die Frequenzen fallen postoperativ (nach 2 und 4 Wochen) ab, nehmen aber allmählich wieder zu und erreichen ein relativ ähnliches und konstant bleibendes Niveau nach 24 Wochen (MW vor Transplantation 2,5%, MW bei der letzten Nachuntersuchung 2,2%). In den Untersuchungszeitpunkten davor zeigen sich zwischen einigen Zentren große Unterschiede in den durchschnittlichen Frequenzen, zusätzlich ist der SEM teilweise groß. In den meisten Fällen sind diese Unterschiede durch die insgesamt erniedrigte $CD4^+$ -Anzahl zustande gekommen, was zu größeren Schwankungen im Verhältnis von $CD4^+CD25^{high}Foxp3^{high}$ zu $CD4^+$ Zellen führen kann. Zur Überprüfung der Ergebnisse und um mögliche Probleme in der intrazellulären Foxp3-Färbung zu berücksichtigen, wurden die Treg-Frequenzen aus einem anderen Panel von ONE Study zum Vergleich herangezogen. Tregs wurden in diesem Panel als $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Zellen definiert und ebenfalls bezogen auf die Anzahl von $CD4^+$ Zellen normiert. In Abb. 8. C ist zu sehen, dass die $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Zellen einen ähnlichen Verlauf wie die $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ zeigen. Vor der Transplantation liegen die Frequenzen der Zellen durchschnittlich zwischen 5,7% und 8,2%. Diese nehmen nach der Transplantation stark ab und steigen ab Woche 8-12 postoperativ wieder an. Ab Woche 24 bleiben die durchschnittlichen Frequenzen auf relativ konstantem Niveau, welches bis zur letzten Nachuntersuchung (MW: 5,1%) geringer ist als vor der Transplantation (MW: 7,4%).

Neben Marker auf der Zelloberfläche kann der Demethylierungsstatus der TSDR-Region im Foxp3-Genlocus der Tregs für die Identifizierung dieser Zellen genutzt werden, was als eine sehr genaue Bestimmungsmethode gilt (139). Die TSDR-Demethylierung der Referenzgruppe, bezogen auf die Anzahl von $CD4^+$ Zellen, ist in Abb. 8. D. als Durchschnittswert pro Zentrum dargestellt.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, nimmt die TSDR-Demethylierung in den meisten Fällen postoperativ ab. Es fällt auf, dass diese Abnahme, verglichen mit den $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ und $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Zellen, deutlich geringer ausfällt. In zwei Zentren, C60 und C50, scheint die Demethylierungsrate nach der Transplantation leicht anzusteigen. Zum Teil kann diese Tendenz durch die niedrigen $CD4^+$ -Zahlen einzelner Teilnehmenden erklärt werden, die möglicherweise durch unzureichende $CD4$ -Färbung oder hohe Zellverluste im Färbeprozess zustande gekommen sind. Weiterhin fällt ein besonders hoher Wert von C40 in der 4. postoperativen Woche auf. Dies ist ebenfalls auf eine Person zurückzuführen, die in der Durchflusszytometrie sehr wenig $CD4^+$ Zellen aufwies. Der auf die Anzahl von $CD4^+$ Zellen normierte TSDR-Demethylierungswert war aus diesem Grund sehr hoch. 12 Wochen nach der

Transplantation nimmt die durchschnittliche TSDR-Demethylierung in fast allen Zentren zu, ab Woche 24 bleibt der Wert auf vergleichbarer Höhe.

4.1.2 Vergleich der intrazellulären Foxp3-Färbung zwischen den Zentren

Bei der Auswertung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse der Referenzgruppe zeigte sich, dass die intrazelluläre Foxp3-Färbung der beteiligten Zentren unterschiedlich ausgefallen war. Insbesondere zwei Zentren, C30 und C40, wiesen ein besseres Färbeergebnis auf, d.h. die Foxp3⁺ Zellen bildeten eine von Foxp3⁻ Zellen deutlich abgrenzbare Population. In anderen Zentren hingegen waren die Foxp3⁺ und Foxp3⁻ Zellen nicht eindeutig getrennt, eine sichere Unterscheidung dieser Populationen war nicht möglich. Abb. 9. zeigt exemplarisch zwei Färbungen aus C20 und C40. Die Foxp3⁺ und Foxp3⁻ Zellen des C40 bilden zwei separate Populationen (Abb. 9. A), im Gegensatz dazu sind diese im C20 nicht deutlich voneinander abzugrenzen (Abb. 9. B). Die Gegenüberstellung dieser Daten als überlagerte Histogramme verdeutlicht, dass im Beispiel aus C20 die Foxp3⁻ Population die Foxp3⁺ Zellen überlagert (Abb. 9. C). Diese unterschiedlichen Färbeergebnisse waren innerhalb jedes Zentrums überwiegend konstant. Folglich war die Bestimmung der Foxp3⁺ sowie Foxp3^{high} Population in diesen Fällen erschwert und die Genauigkeit der Ergebnisse fraglich.

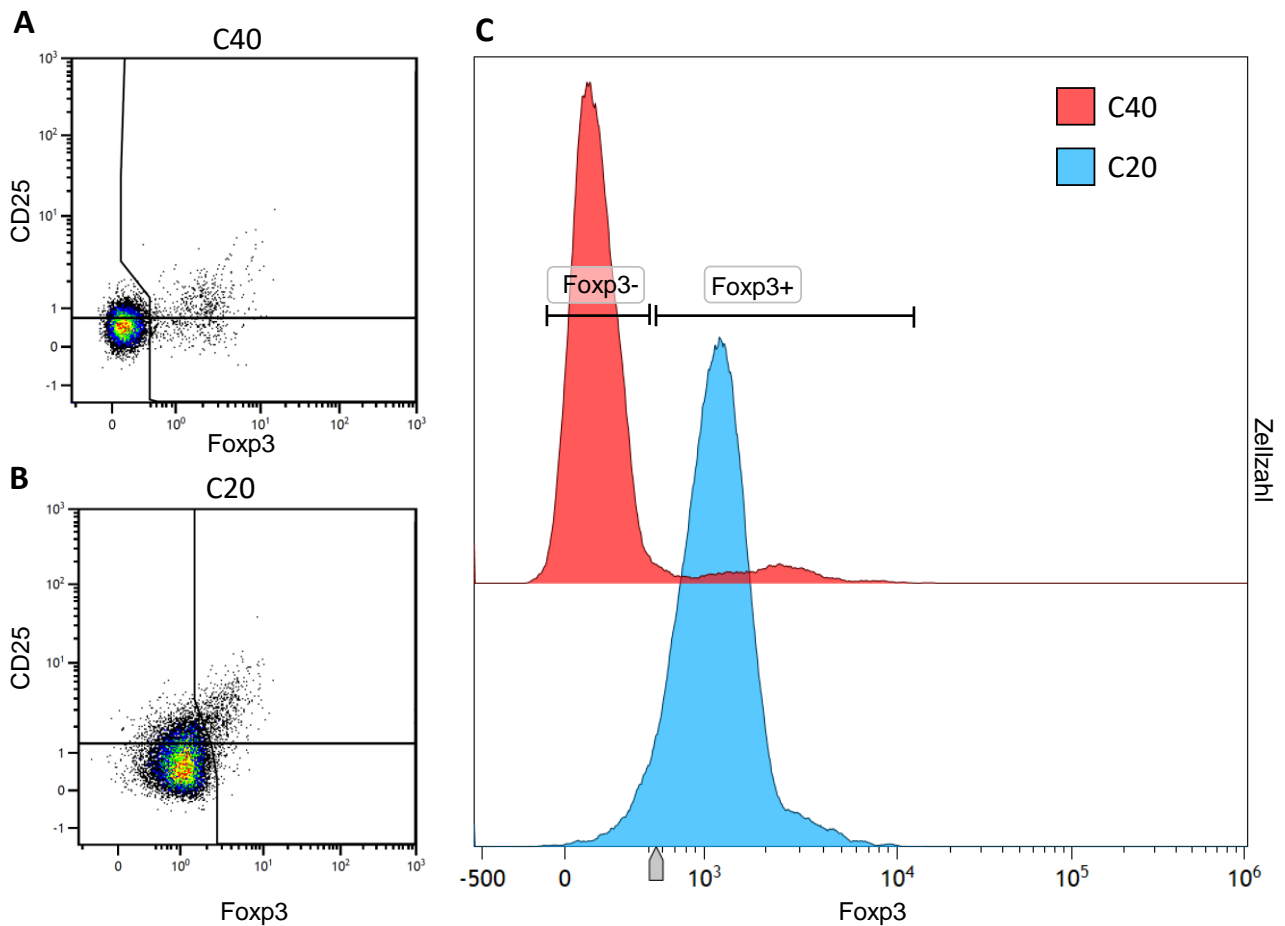


Abb. 9: Vergleich der intrazellulären Foxp3-Färbung von verschiedenen Studienzentren. Als repräsentative Beispiele sind zwei Färbungen von C20 und C40 aufgeführt. A) Die Färbungen aus C40 ermöglichen eine gute Abgrenzung der Foxp3⁺ Population von Foxp3⁻ Zellen. In B) ist das “schlechtere” Färbeergebnis aus C20 dargestellt. C) Überlagerte Histogramm-Darstellung der Foxp3-Färbung derselben Messungen. Im Falle von C40 (rotes Histogramm) bilden die Foxp3⁺ und Foxp3⁻ Zellen zwei separate Population. Die Foxp3⁻ Zellen aus C20 (blaues Histogramm) reichen in den Foxp3⁺ Bereich und erschweren die Unterscheidung beider Populationen. C: Zentrum.

4.1.3 Korrelation der Treg-Frequenzen mit TSDR-Demethylierung

Die Studie von Braza *et al.* hatte gezeigt, dass in Nierentransplantierten Frequenz der Tregs sowie die der Foxp3^{high} Zellen mit der TSDR-Demethylierung in CD4⁺ Zellen korrelierte (48). Es wurde untersucht, ob in der Referenzgruppe der ONE Study ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der TSDR-Demethylierung und der Frequenz der Tregs, speziell den Foxp3^{high} Tregs bestand. Um diese Korrelation möglichst unabhängig vom Einfluss der perioperativen Maßnahmen und Medikation, speziell der Induktionstherapie und der damit einhergehenden Zellreduktion zu bewerten, wurden zwei Zeitpunkte für die Untersuchung ausgewählt: die präoperative Voruntersuchung (4 Wochen vor Transplantation, V1) sowie die letzte Nachuntersuchung (60

Wochen nach Transplantation, V2). Die Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten (Abb. 8.) hatte gezeigt, dass die Zellfrequenzen bei den letzten Nachuntersuchungen ein konstantes Niveau aufwiesen und keine großen Veränderungen im Verlauf zeigten.

Wie in Abb. 10. zu sehen ist, zeigte sich für die $CD4^+CD25^{high}Foxp3^{high}$ Zellen keine signifikante Korrelation zur TSDR-Demethylierung in der Zeit vor der Transplantation (Alle Zentren: $p = 0,0776$; $r = 0,0463$) sowie in der letzten Nachuntersuchung ($p = 0,0974$; $r = 0,2692$). Hingegen zeigte die Frequenz der $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ Zellen sowohl vor als auch nach der Transplantation eine signifikante Korrelation mit der TSDR-Demethylierung (V1: $p = 0,0023$; $r = 0,4692$; V2: $p = 0,0214$; $r = 0,3721$).

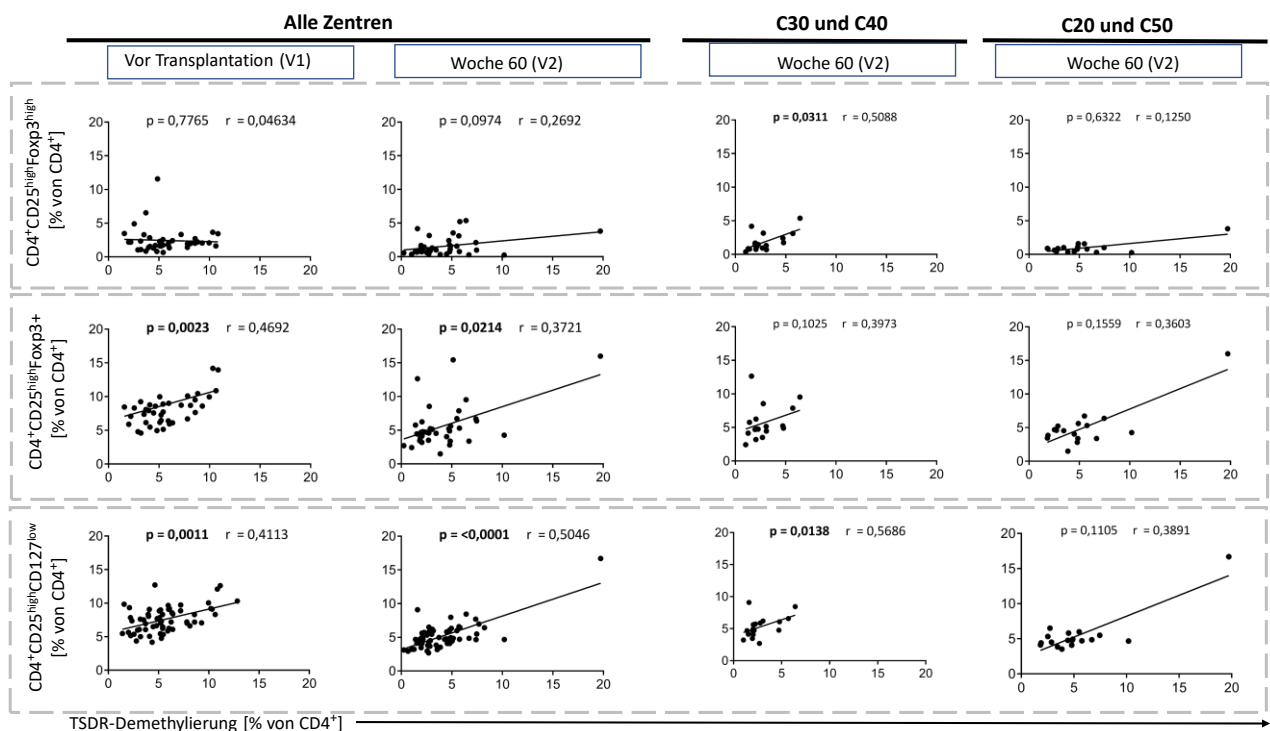


Abb. 10: Korrelation der Treg-Frequenzen mit der TSDR-Demethylierung. Von oben nach unten sind in Reihen als % $CD4^+$ abgebildet: $CD4^+CD25^{high}Foxp3^{high}$, $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ und $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Zellen. Die Korrelationen sind für die Teilnehmenden aller Zentren ($n = 40-59$) an zwei Untersuchungszeitpunkten dargestellt: 4 Wochen vor der Transplantation (V1) und 60 Wochen nach Transplantation (V2). Zusätzlich sind die Zentren mit guten Färbeergebnissen (C30 und C40, $n = 18-19$) sowie Zentren mit schlechten Färbeergebnissen (C20 und C50, $n = 17-18$) zum Zeitpunkt der letzten Nachuntersuchung gesondert dargestellt. Da C60 und C70 keine intrazelluläre Foxp3-Färbung durchführten, sind aus diesen Zentren nur die $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Zellen in der Auswertung eingeschlossen. Signifikante p-Werte ($p < 0,05$) sind hervorgehoben. Der Rangkorrelationskoeffizient r wurde mit einer nicht-parametrischen Spearman-Analyse ermittelt. Der p-Wert stellt einen Näherungswert dar. Die Ausgleichslinien (Regressionslinien) wurden als lineare Regressionsanalyse mit 95%igem Konfidenzintervall gezeichnet und dienen als optische Führung.

Die TSDR-Demethylierung korrelierte zu beiden Zeitpunkten signifikant mit der Frequenz der CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Zellen (V1: p = 0,0011; r = 0,4113; V2: p < 0,0001; r = 0,5046), die aus einem anderen Panel bestimmt wurden.

In den Daten der letzten Nachuntersuchung fällt Datenpunkt mit hohem TSDR-Demethylierungswert auf. Dies bezieht sich auf eine teilnehmende Person, die zu diesem Zeitpunkt eine verminderte Leukozyten-Anzahl aufwies, möglicherweise aufgrund von medikamentöser Behandlung infolge zweier Abstoßungsreaktionen. Trotz geringer Anzahl CD4⁺ Zellen war die TSDR-Demethylierung hoch. Betrachtet man die Ergebnisse ohne diesen „Ausreißer“, so ändern sich die statistischen Ergebnisse wie folgt: Bei den CD4⁺CD25^{high}Foxp3^{high} wird keine Signifikanz erreicht (p = 0,1848; r = 0,2198). Die CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Zellen sinkt der p-Wert unter das statistische Signifikanzniveau (p = 0,0537; r = 0,3198). Die Korrelation der CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Zellen hingegen ändert sich kaum (p = 0,0001; r = 0,4785).

Aufgrund der unterschiedlichen Färbeergebnissen zwischen den Zentren (s. Abschnitt 4.1.2), welche die intrazelluläre Foxp3-Färbung durchführten, wurden Korrelationen gesondert für Zentren mit besser gelungener Färbung sowie Zentren mit schlechteren Färbeergebnissen dargestellt, um eine mögliche Auswirkung auf die Ergebnisse zu erkennen. Die Zentren C30 und C40 wiesen gute Färbeergebnisse auf. Hingegen waren die Färbeergebnisse aus Zentren C20 und C50 mangelhaft. C10 und C80 hatten wurden aufgrund geringer Teilnehmerzahl (n =5) nicht berücksichtigt.

Nach Färbeergebnissen aufgeteilt, zeigten die Zentren mit guten Färbeergebnissen eine signifikante Korrelation der CD4⁺CD25^{high}Foxp3^{high} mit TSDR-Demethylierung (p = 0,0311; r = 0,5088), welche für Zentren mit schlechter Färbung nicht bestand (p = 0,6322; r = 0,1250). Ebenso korrelierte die CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Frequenz nicht mit der TSDR-Demethylierung in diesen Zentren (p = 0,1559; r = 0,3603). Die Zentren mit guter Färbung zeigten für die CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ ebenso keine signifikante Korrelation (p = 0,1025; r = 0,3973). Die Frequenz der CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Zellen in den Zentren mit guter Färbung korrelierte signifikant mit der TSDR-Demethylierung (p = 0,1105; r = 0,3891), für die Zentren mit schlechter Färbung hingegen war keine signifikante Korrelation zu beobachten (p = 0,1408; r = 0,3509). Auch unter Ausschluss des „Ausreißers“ erreichen keine der Korrelationen statistische Signifikanz (CD4⁺CD25^{high}Foxp3^{high}: p = 0,8565 ; r = -0,050; CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺: p = 0,3852 ; r = 0,2324 ; CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} : p = 0,2853 ; r = 0,2754).

Zusammengefasst korrelierten insgesamt die Treg-Frequenzen (CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ und CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}) mit der TSDR-Demethylierung. Diese Korrelation war für die

CD4⁺CD25^{high}Foxp3^{high} Zellen nicht vorhanden. Wurden die Zentren entsprechend ihrer Färbeergebnissen separat betrachtet, zeigte sich für die Zentren mit guter Färbung eine statistisch signifikante Korrelation dieser Population mit der TSDR-Demethylierung, jedoch nicht für die Zentren mit schlechten Färbeergebnissen.

4.2 Epigenetische Regulatoren der stabilen Foxp3-Expression

Die Expression von Foxp3 ist Voraussetzung für die Entwicklung und stabile Funktion von Tregs. Verschiedene Moleküle regulieren am Foxp3-Genlocus die stabile Expression auf epigenetischer Ebene. Dazu zählen die demethylierenden Tet-Enzyme sowie die NR4A-Rezeptoren. Um diese Faktoren in Tregs weiter zu charakterisieren, wurde deren Expression in RNA-Proben aus peripherem Blut von gesunden Menschen bestimmt. Zur genaueren Analyse erfolgte anschließend die Bestimmung der Genexpression in sortierten Zellen.

4.2.1 Korrelation der Tet- und NR4A-Expression mit Foxp3 und TSDR

Im ersten Schritt wurde die Expression der Tet- und NR4A-Faktoren in gesunden Proband*innen aus verschiedenen Altersgruppen und mit ausgeglichenem Geschlechterverhältnis bestimmt. Die Proben hierfür wurden im Rahmen einer von Kverneland *et al.* durchgeführten Studie gewonnen (37). Aus den Proben gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Expression der 6 Gene Tet1, Tet2, Tet3, NR4A1, NR4A2, NR4A3 per RT-PCR bestimmt.

Im ersten Schritt wurde untersucht, ob die Expression der genannten Gene mit der Expression von Foxp3 und/oder der TSDR-Demethylierung korreliert. Abb. 11 stellt das Ergebnis dieser Untersuchung dar.

Wie in der Abb. 11 A zu sehen ist, besteht keine statistisch signifikante Korrelation der Genexpression mit der TSDR-Demethylierung der CD4⁺ Zellen. Die Expression der epigenetischen Regulatoren korreliert ebenfalls nicht mit der Foxp3-Expression (Abb. 11 B).

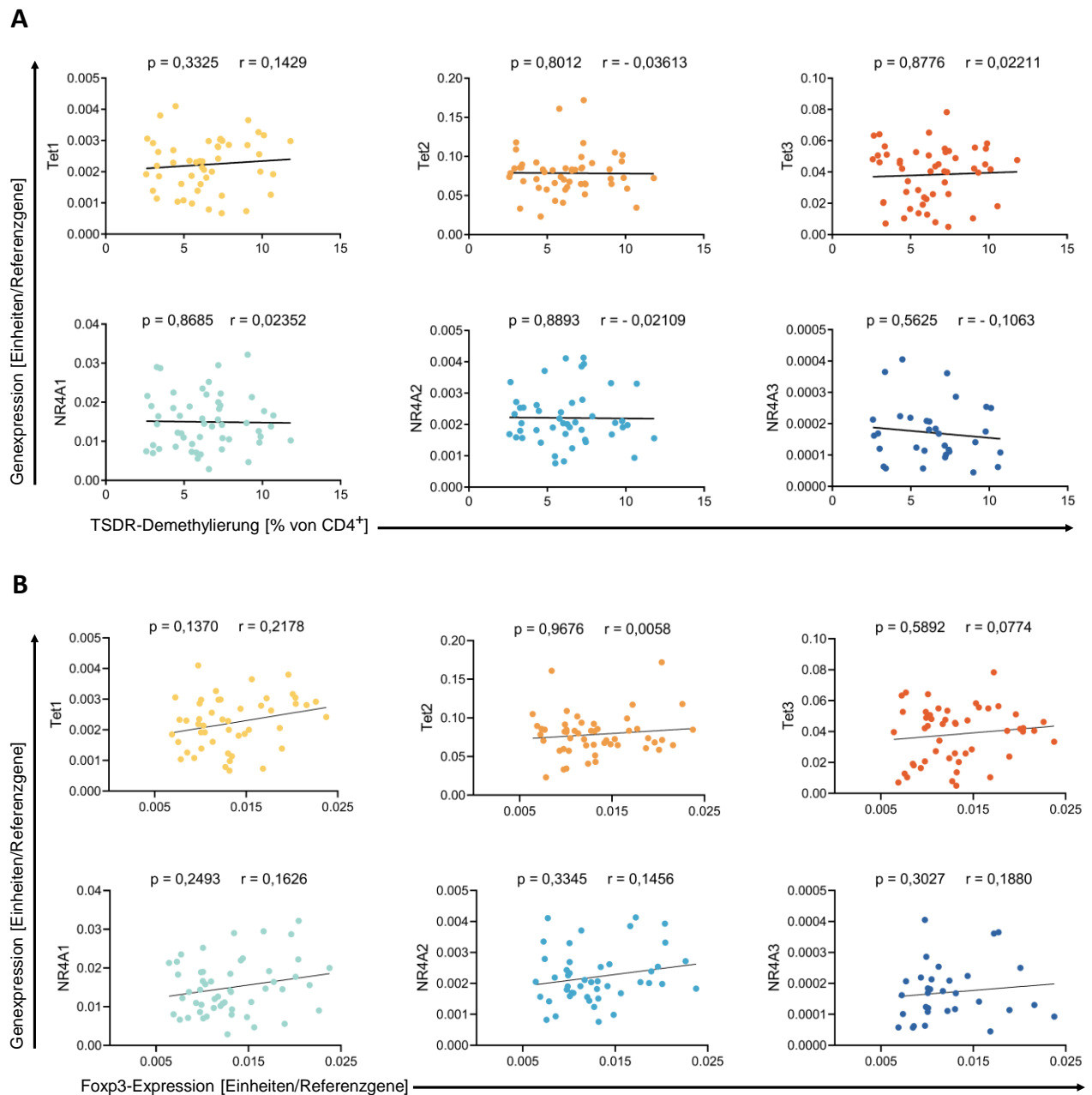


Abb. 11: Korrelation der Expression epigenetischer Regulatoren mit Foxp3-Expression und TSDR-Demethylierung. Ergebnisse der Untersuchung von 52 gesunden Erwachsenen (Alter: 20-75 Jahre). A) Korrelation der Genexpression mit TSDR-Demethylierung. B) Korrelation der Genexpression mit Foxp3-Expression. Die Genexpression wurde relativ zur Expression dreier Haushaltsgene bestimmt. Der Rangkorrelationskoeffizient r nach Spearman und der p -Wert sind dargestellt. Bei dem p -Wert handelt es sich um einen Näherungswert. Die Ausgleichslinien wurden durch lineare Regressionsanalyse ermittelt und dienen als optische Führung.

4.2.2 Altersabhängiger Verlauf der Expression der Tet- und NR4A-Faktoren

Die untersuchte Kohorte in der Studie von Kverneland *et al.* wurde unter anderem zur Bestimmung der altersabhängigen Veränderungen in verschiedenen Leukozytenparametern rekrutiert. Aus

diesem Grund wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen der Genexpression und dem Alter vorhanden war. Die Untersuchung der Genexpression in Abhängigkeit vom Alter der Teilnehmenden zeigte, dass die Expression einiger Gene mit steigendem Alter signifikant zunimmt (Abb. 12. A). Diese Korrelation war für die Faktoren Tet2 ($p < 0,0001$; $r = 0,5288$), NR4A1 ($p = 0,0029$; $r = 0,4054$) und NR4A2 ($p = 0,0091$; $r = 0,3808$) gegeben. Hingegen zeigten Tet1, Tet3 und NR4A3 keine signifikante Korrelation mit dem Alter.

Da einige dieser Gene mit dem Alter signifikant zunahm, wurde untersucht, ob dies mit einer Zunahme der Foxp3-Expression und TSDR-Demethylierung einherging. Wie in Abb. 12. B zu sehen ist, war eine signifikante Korrelation mit dem Alter für die TSDR-Demethylierung sowie die Foxp3-Expression nicht vorhanden.

Kverneland *et al.* hatten in ihrer Arbeit gezeigt, dass die Frequenz der gesamten Treg-Zellen ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$) über alle Altersgruppen konstant bleibt. Ebenso zeigt die TSDR-Demethylierung keine Abhängigkeit vom Alter der Proband*innen. Die Frequenz der Gedächtnis-Tregs ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^-$) nimmt mit steigendem Alter zu, wohingegen die Frequenz der naiven Tregs ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^+$) abnimmt (37). Zur Veranschaulichung sind die Befunde aus dieser Studie (Frequenz von allen Tregs, nativen sowie Gedächtnis-Tregs) in Abb. 12. B. dargestellt.

Es stellte sich die Frage, ob die epigenetischen Regulatoren, die ebenfalls mit dem Alter zunehmen, mit höherer Gedächtnis-Treg-Frequenz korrelieren und möglicherweise im Zusammenhang mit der höheren Foxp3-Expression in diesen Zellen stehen. Zu diesem Zweck wurde die Korrelation zwischen der Expression dieser Gene und der Frequenz von Gedächtnis-Tregs untersucht (Abb. 13). Tet1 ($p = 0,0301$; $r = 0,3133$) und NR4A2 ($p = 0,0024$; $r = 0,4368$) korrelierten mit der Frequenz von Gedächtnis-Tregs. Andere Faktoren zeigten zwar eine tendenziell positive Korrelation, erreichten allerdings keine statistische Signifikanz.

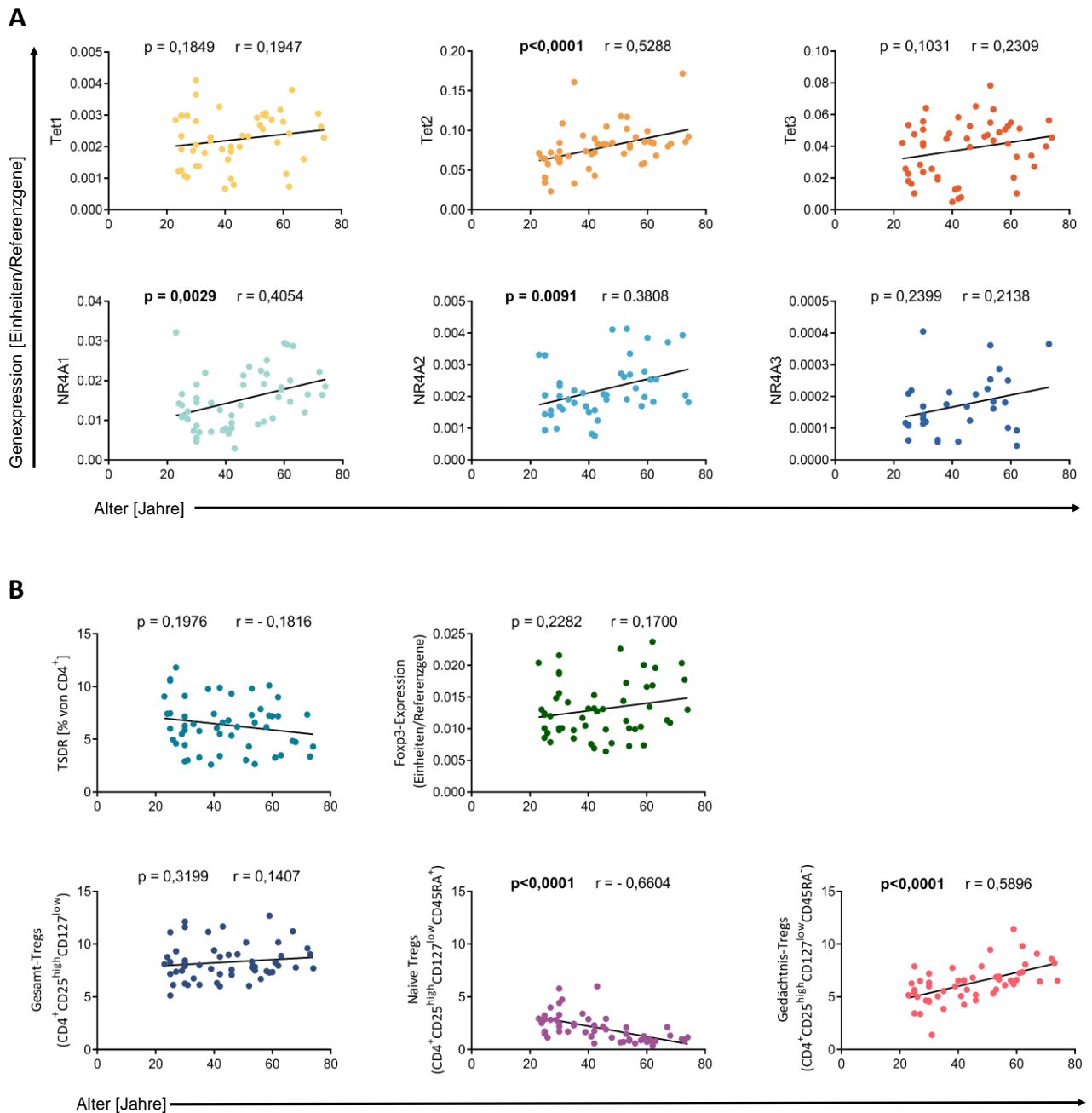


Abb. 12: Altersabhängige Veränderungen der Genexpression, TSDR-Demethylierung und Treg-Frequenzen. Blutproben von 52 gesunde Proband*innen im Alter von 20 bis 75 Jahren wurden untersucht. A) Altersabhängigkeit der Expression von Tet- und NR4A-Genen. B) Altersabhängigkeit der TSDR-Demethylierung, Foxp3-Expression und Frequenz der Gesamt-, Naiv- und Gedächtnis-Tregs. Die Frequenz der Treg-Populationen ist bezogen auf %CD4⁺ Zellen angegeben. Die relative Genexpression ist bezogen auf die Expression von drei Referenzgenen gemessen. Für die statistische Auswertung wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient r sowie der p-Wert als Näherungswert ermittelt. Statistisch signifikante p-Werte sind hervorgehoben. Zur optischen Führung sind Ausgleichslinien (Regressionslinien) gezeichnet, welche durch lineare Regressionsanalyse berechnet wurden. Die Gesamt-Tregs, nativen Tregs sowie Gedächtnis-Tregs sind aus den Daten der Studie von Kverneland *et. al* (37) generiert.

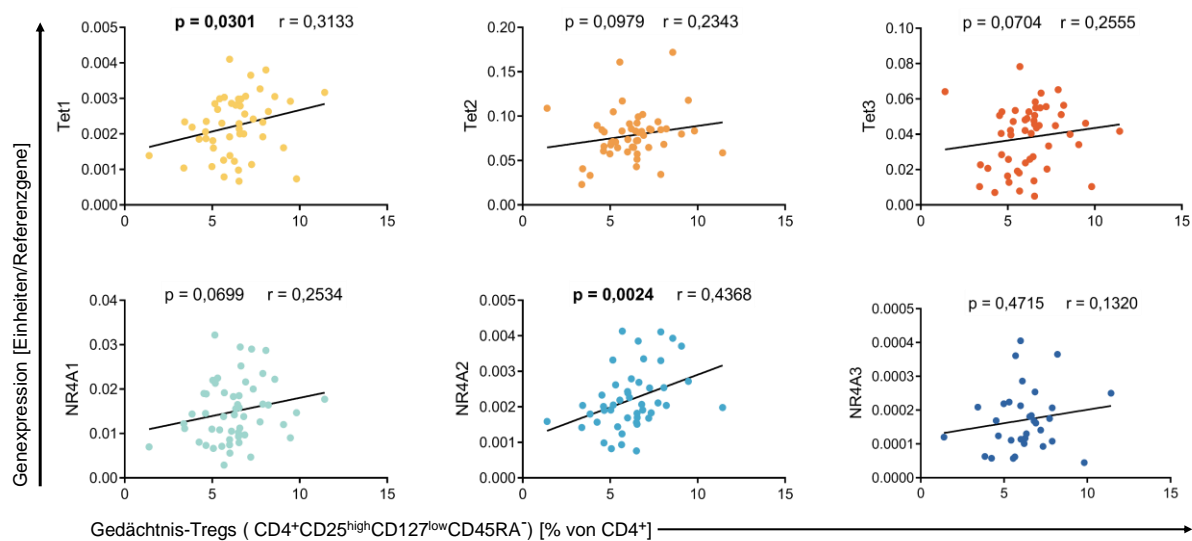


Abb. 13: Expression der epigenetischen Regulatoren der Foxp3-Expression in Abhängigkeit von Frequenz der Gedächtnis-Tregs ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^-$). Ergebnisse der Untersuchung von 52 gesunden Proband*innen (Alter: 20-75 Jahre). Die Genexpression wurde relativ zur Expression dreier Haushaltsgene gemessen. Der Rangkorrelationskoeffizient r nach Spearman und der p -Wert sind dargestellt. Statistisch signifikante p -Werte sind hervorgehoben. Bei dem p -Wert handelt es sich um einen Näherungswert. Die Ausgleichslinien wurden durch lineare Regressionsanalyse ermittelt und dienen als optische Führung.

4.2.3 Expression der epigenetischen Regulatoren in Tregs und konventionellen T-Zellen

Die bisherigen Genexpressions-Versuche wurden mit RNA-Proben aus Vollblut durchgeführt. Das bedeutet, dass diese die Expression der Gene in allen Leukozyten im Blut widerspiegeln, ohne dass zwischen den verschiedenen Leukozytentypen unterschieden wurde. Um diese Unterschiede zu minimieren und jede Population möglichst unabhängig von anderen Zellen zu untersuchen, wurden $CD4^+$ -angereicherte PMBCs aus dem Blut gesunder Menschen gewonnen und mit Antikörpern gefärbt, um sie mit Hilfe ihrer Oberflächenmoleküle in einzelne Populationen zu sortieren. Diese Populationen wurden folgendermaßen definiert: Naive Tregs ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^+$), Gedächtnis-Tregs ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^-$), Naive Tconv ($CD3^+CD4^+CD25^{+/-}CD45RA^+$) und Gedächtnis-Tconv ($CD3^+CD4^+CD25^{+/-}CD45RA^-$). Die Sortierungsstrategie ist in Abschnitt 3.4 präsentiert. Aus diesen Zellpopulationen wurde RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Expression mittels RT-PCR ermittelt. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der TSDR-Demethylierung aus den Zellen DNA gewonnen.

Durch Demethylierungsanalysen wurde bestätigt, dass die Foxp3-TSDR in naiven und Gedächtnis-Tregs stark demethyliert war, in Tconv hingegen war die Demethylierung gering (Abb. 14. A). Auf Genexpressionsebene unterschieden sich die Tregs und Tconv weniger (Abb. 14. B). Die Gedächtnis-Tconv zeigten, verglichen mit den anderen Populationen, die geringste Tet1-Expression (naive Tregs: $p = 0,0033$; Gedächtnis-Tregs $p = 0,0014$; naive Tconv $p = 0,0104$). Die Tet1-Expression in anderen Zellgruppen war vergleichbar und unterschied sich nicht signifikant. Bei Tet2 waren signifikante Unterschiede zwischen naiven Tregs und Gedächtnis-Tconv ($p = 0,0402$) zu sehen, wobei die Expression in anderen Zellgruppen vergleichbar war. Bei der Expression von Tet3 unterschieden sich naive und Gedächtnis-Tregs ($p = 0,0221$) signifikant, ebenso naive Tconv und Gedächtnis-Tconv ($p = 0,0221$). Naive Tregs exprimierten signifikant mehr Tet3 als Gedächtnis-Tconv ($p = 0,0006$), ein signifikanter Unterschied zwischen Gedächtnis-Tregs und naiven Tconv war nicht vorhanden. Zusammengefasst zeigten sowohl naive Tregs als auch naive Tconv eine signifikant höhere Tet3-Expression als ihre Gedächtniszellen. Bei den Genexpressionen der NR4A-Rezeptoren gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellpopulationen (Abb. 14. C). Die NR4A-Gene waren im Vergleich zu den Tet-Genen im Allgemeinen in geringerem Maß exprimiert. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 5 dargestellt.

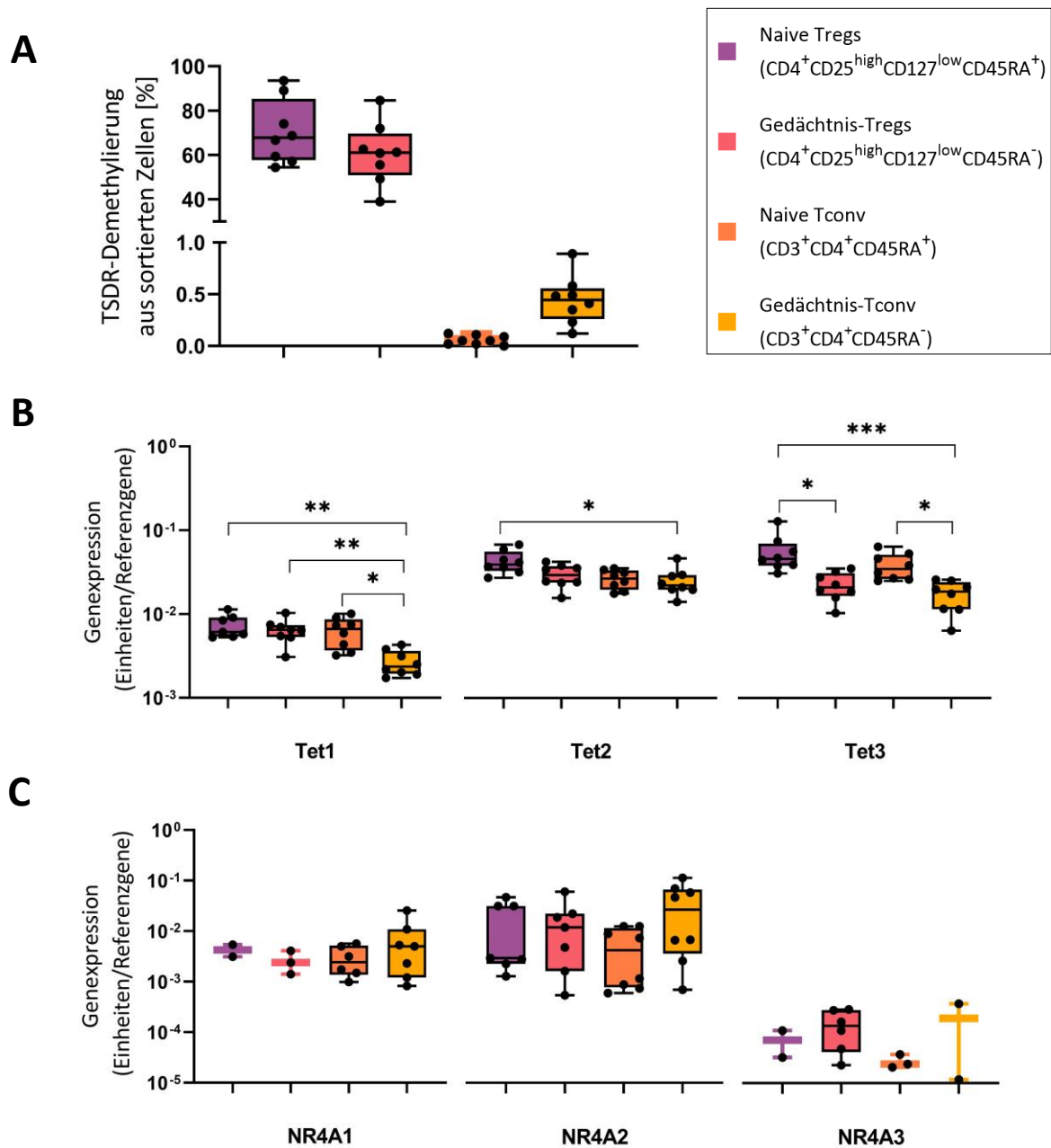


Abb. 14: TSDR-Demethylierung und Expression der epigenetischen Regulatoren in naiven und Gedächtnis-Tregs und Tconv. Aus den sortierten Zellgruppen wurde RNA für RT-PCR und DNA für TSDR-Analysen gewonnen. Die Genexpressionen wurden relativ zur Expression von drei Referenzgenen gemessen. Dargestellt sind A) TSDR-Demethylierungs-Analyse (n = 8), B) Expression der Tet-Gene (n = 7-8) und C) Expression der NR4A-Gene (n = 2-8). Die Boxen umfassen das 25. bis 75. Quartil, die mittleren Linien bilden den Median ab. Die Antennen (Whisker) zeigen das Minimum und Maximum. Für die statistische Auswertung wurde ein Friedman-Test und für die Mehrfachvergleiche ein Dunn-Test durchgeführt.

Tabelle 5: Statistische Auswertung der Genexpressionsanalysen von naiven und Gedächtnis-Tregs und Tconv mit Friedman-Test und post-hoc Dunn-Test. Waren diese Tests aufgrund fehlender Messwerte nicht möglich, wurde ein gemischtes Modell erstellt. Dargestellt sind p-Werte, statistisch signifikante Werte ($p < 0,05$) sind hervorgehoben. Fehlende p-Werte sind aufgrund kleiner Stichproben entstanden, wo keine statistisch verwertbaren Ergebnisse gewonnen werden konnten.

	Tet1	Tet2	Tet3	NR4A1	NR4A2	NR4A3
Naive Tregs vs. Gedächtnis-Tregs	0,4607	0,3168	0,0221	-	>0,9999	0,7493
Naive Tregs vs. naive Tconv	0,771	0,1208	>0,9999	0,7548	0,1977	-
Naive Tregs vs. Gedächtnis-Tconv	0,0033	0,0402	0,0006	0,9861	0,2984	>0,9999
Gedächtnis-Tregs vs. naive Tconv	0,9988	>0,9999	0,3168	0,9913	0,3385	0,5041
Gedächtnis-Tregs vs. Gedächtnis-Tconv	0,0014	>0,9999	>0,9999	0,8928	0,4678	0,8598
Naive Tconv vs. Gedächtnis-Tconv	0,0104	>0,9999	0,0221	0,6287	0,1314	>0,9999

4.2.4 Expression der epigenetischen Regulatoren in Treg-Subpopulationen

Die bisherigen Genexpressionsanalysen bestätigten nicht die Annahme, dass die Tet- und NR4A-Faktoren aufgrund ihres Beitrages zur Foxp3-Expression in Treg-Zellen vermehrt exprimiert werden. Es war nicht auszuschließen, dass dieses Ergebnis durch eine zu grobe Einteilung der Treg-Zellen zustande gekommen ist, welche die Heterogenität der Treg-Zellen nicht berücksichtigt. Obwohl die naiven Tregs als CD45RA⁺ Zellen identifiziert werden können, ist eine Trennung der CD45RA⁻ Zellen in die Effektor-Gedächtnis-Gruppe und Foxp3⁺ Nicht-Tregs nicht immer problemlos möglich. Beispielsweise bestehen die Foxp3⁺ Nicht-Tregs größtenteils aus aktivierten Teff, enthalten aber wahrscheinlich zum Teil Tregs (140). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer klaren Abgrenzung der Treg-Subpopulationen. Da Foxp3 ein intrazelluläres Molekül und somit zur Nutzung in Zellsortierung ungeeignet ist, wurde die Einteilung mit Hilfe der CCR4-Expression vorgenommen.

Für diese Analysen wurden CD4⁺ angereicherte Zellen gesunder Proband*innen in Treg-Subpopulationen sortiert. Die Sortierungsstrategie ist im Abschnitt 3.4 abgebildet. Hierbei konnten die Zellen in drei Subpopulationen eingeteilt werden: CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD45RA⁺CCR4⁻, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^{low}CCR4^{low} und CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD45RA⁻CCR4⁺. Aus diesen Zellen wurde RNA und DNA extrahiert und die TSDR-Demethylierung sowie die mRNA-Expression gemessen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde in diesem Versuch zusätzlich die Expression von Foxp3 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt.

Alle drei Subpopulationen zeigten eine ähnlich hohe TSDR-Demethylierung ohne statistisch signifikante Unterschiede. Die Foxp3-Expression war in der CD45RA^{low}CCR4^{low} Population tendenziell höher, erreichte aber keine statistische Signifikanz (Abb. 15 A).

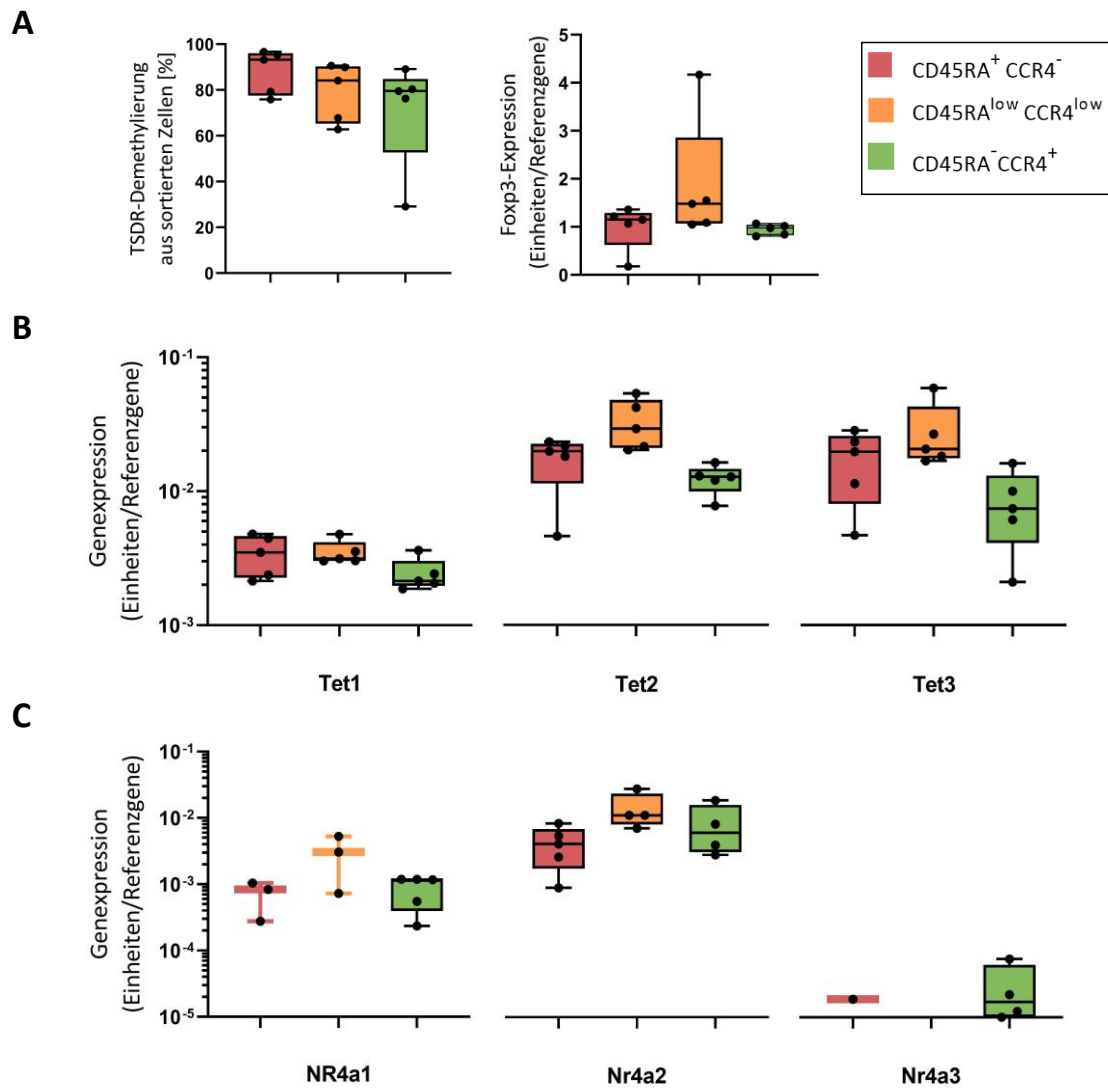


Abb. 15: TSDR-Demethylierung, Expression von Foxp3 und der epigenetischen Regulatoren in CD45RA^{+/-low}CCR4^{+/-low} Zellen. Aus den sortierten Zellen wurde RNA für RT-PCR und DNA für TSDR-Analysen gewonnen. Die Genexpressionen wurden relativ zur Expression von drei Haushaltsgenen gemessen. Abgebildet sind A) TSDR-Demethylierung (n = 5), B) Foxp3-Expression (n = 5), C) Expression der Tet-Gene (n = 5), D) Expression der NR4A-Gene (n = 1-5). Die Boxen umfassen das 25. bis 75. Quartil, die mittleren Linien bilden den Median ab. Die Antennen (Whisker) zeigen das Minimum und Maximum. Statistische Auswertung mittels Friedman-Test, ein Dunn-Test wurde für Mehrfachvergleiche durchgeführt.

Interessanterweise zeigte diese Population ebenso tendenziell höhere mRNA-Expressionen bei Tet2, Tet3, NR4A1 und NR4A2, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Im Fall von NR4A3 war ein Vergleich zwischen den Populationen aufgrund des sehr niedrigen Expressionsgrades nicht möglich, da das Gen in einigen Fällen nicht detektierbar war. Die CD45RA⁻CCR4⁺ Zellen zeigten geringere Raten an TSDR-Demethylierung und Foxp3-Expression. Ebenso zeigte diese Population bei Tet-Genen eine tendenziell geringere Expression

im Vergleich zu anderen Zellgruppen. In Bezug auf die NR4A-Gene zeigte diese Population vergleichbare Expressionsraten mit der CD45RA⁺CCR4⁻ Population. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Statistische Auswertung der Genexpressionen von CD45RA^{+/-low}CCR4^{+/-low} Zellen.

Dargestellt sind die mit dem Friedman-Test und post-hoc Dunn-Test berechneten p-Werte.

Waren diese Tests aufgrund fehlender Messwerte nicht möglich, wurde ein gemischtes Modell erstellt. Fehlende p-Werte sind entstanden, wenn aufgrund zu kleiner Stichprobe keine statistisch verwertbaren Ergebnisse gewonnen werden konnten.

	Tet1	Tet2	Tet3	NR4A1	NR4A2	NR4A3	Foxp3
CD45RA⁺ CCR4⁻ vs. CD45RA^{low} CCR4^{low}	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,5371	0,0982	-	>0,9999
CD45RA⁺ CCR4⁻ vs. CD45RA⁻CCR4⁺	>0,9999	0,3415	0,1733	0,9144	0,3114	-	0,3415
CD45RA^{low} CCR4^{low} vs. CD45RA⁻CCR4⁺	>0,9999	0,0806	0,1733	0,2875	0,0757	-	0,0806

5. Diskussion

5.1 Referenzgruppe der ONE Study

Insgesamt zeigt die Bestimmung von Tregs postoperativ eine Reduktion der Frequenz, die sich im Laufe der Studie erholt, aber tendenziell auf einem niedrigeren Niveau im Vergleich zum Ausgangsniveau bleibt. Dies ist vermutlich auf die medikamentöse Therapie zurückzuführen. Basiliximab und Tacrolimus können sich negativ auf die Treg-Frequenz auswirken, wobei bedacht werden muss, dass Teilnehmende auch andere Immunsuppressiva einnahmen. Die Bestimmung der Treg-Zellen anhand der TSDR-Demethylierung unterliegt möglicherweise niedrigeren Schwankungen. Die untersuchten Populationen, die Unterschiede in den Färbeergebnissen sowie Limitationen werden im Folgenden ausführlicher diskutiert. Für den Vergleich mit anderen Publikationen gilt, dass die Beurteilung der Studienlage oft dadurch erschwert wurde, dass diese sich lediglich auf Tregs beziehen, ungeachtet der Heterogenität der Subpopulationen. Die anhand gängiger Marker definierten Treg-Populationen können beispielsweise auch die proinflammatorischen Foxp3⁺ Nicht-Tregs beinhalten. Dies könnte die teilweise widersprüchlichen Studienresultate über die Rolle von Tregs in verschiedenen Erkrankungen erklären und eine Ursache für die abweichenden Beobachtungen sein (141). Eine andere Limitation dieser Arbeit ist, dass in der Referenzgruppe viel weniger Frauen eingeschlossen wurden als Männer. Einige Komponenten des Immunsystems zeigen Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Im Falle von Tregs sind Studien zu geschlechterspezifischen Unterschieden nicht einheitlich (37, 142). Aus diesem Grund sollte in zukünftigen Studien möglichst auf ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis geachtet werden, damit diese auch auf größere Bevölkerungsgruppen anwendbar sind.

5.1.1 Veränderung der Treg-Frequenzen nach der Nierentransplantation

Für die Referenzgruppe der ONE Study wurden die Treg-Frequenzen der Teilnehmenden im Verlauf der Studie überwacht. Die Erfassung der Tregs erfolgte mit einem Protokoll, welches die Färbung des intrazellulären Transkriptionsfaktors Foxp3 beinhaltet. Tregs wurden bei dieser Färbung als CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ definiert. Zum Vergleich wurden Tregs in einem anderen Panel anhand ihrer Oberflächenmarker als CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Zellen erfasst. Es zeigte sich, dass Tregs aus beiden Panels eine ähnliche und vergleichbare Dynamik im Verlauf der Studie

aufwiesen. Die durchschnittlichen $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ Frequenzen zeigten bei einzelnen Teilnehmenden große Schwankungen, die vermutlich am Färbeprozess liegen (siehe Abschnitt 5.1.4). Die anfänglichen, präoperativen Treg-Frequenzen nahmen nach der Transplantation vorerst stark ab. In einigen Fällen waren in den ersten 4 Wochen nach Transplantation fast keine Tregs mehr detektierbar. Dies ist möglicherweise auf die medikamentöse Therapie, speziell die Induktionstherapie mit Basiliximab, zurückzuführen. Studien bestätigen die Reduktion der Treg-Frequenz nach solch einer Induktionstherapie (143, 144). In einer Studie wurde von einer Abnahme der Treg-Frequenzen bis zu 12 Monaten nach der Induktionstherapie berichtet (144). Allerdings liefern andere Studien Hinweise darauf, dass Basiliximab lediglich die Expression von CD25 auf der Oberfläche der Tregs verringert, ohne dabei deren Funktion zu stören (127, 128, 145). Darüber hinaus zeigten Abadja *et al.*, dass Basiliximab mit einigen Klonen der Fluorochrom-konjugierten CD25-Antikörper interagieren und somit die Detektion von $CD25^+$ Zellen verhindern kann (146). Für den in der ONE Study verwendeten Klon konnte eine solche Interaktion gezeigt werden, die bis 3 Monate nach der Therapie mit Basiliximab nachweisbar ist (146). Dies könnte mitverantwortlich für den drastischen Verlust der $CD25^+$ Zellen nach der Induktionstherapie sein. Dennoch konnten Bouvy *et al.* unter Verwendung eines geeigneten CD25-Klons die Abnahme der Treg-Frequenz nach einer Basiliximab-Therapie bestätigen (144). In einer anderen Studie konnte in Patient*innen nach Basiliximab-Therapie, unter Verwendung desselben Klons wie in der ONE Study, eine $CD4^+CD25^{low/-}Foxp3^+$ Population detektiert werden. Diese Zellen verschwanden innerhalb von 90 Tagen nach Transplantation allmählich, während sich die Tregs erholten (145). Die Autoren äußerten die Vermutung, dass es sich bei dieser Population um Treg-Zellen handeln könnte. Für künftige Studien ist es daher empfehlenswert, bei Verwendung von Basiliximab auf die Wahl eines passenden CD25-Klons zu achten und zusätzlich die Dynamik der $CD4^+CD25^{low/-}Foxp3^+$ Population zu kontrollieren.

Neben Basiliximab scheinen die CNI (im Falle der ONE Study Tacrolimus) ebenfalls einen Einfluss auf die Treg-Zellen zu haben. In der Referenzgruppe konnten wir beobachten, dass die Teilnehmenden bis 60 Wochen nach Transplantation durchschnittlich geringere Treg-Frequenzen als vor der Transplantation aufweisen. Diese Beobachtung wurde auch in Langzeitstudien bestätigt. Verglichen mit gesunden Menschen sind die Treg-Frequenzen im Blut von Nierentransplantierten auch 7 Jahre nach der Transplantation niedriger (129, 147). Teilnehmende dieser Studien erhielten ebenfalls eine CNI-haltige Immunsuppression. Es sollte allerdings beachtet werden, dass in der ONE Study, wie in allen Studien an Nierentransplantierten, mehrere Immunsuppressiva gleichzeitig eingesetzt wurden, welche einen möglichen Einfluss auf die

beobachteten Zellen haben. Zum jetzigen Zeitpunkt deutet die Literatur darauf hin, dass die beobachteten Dynamiken höchstwahrscheinlich durch die Einnahme von Tacrolimus begründet sind, denn Glucocorticoide oder MMF scheinen Treg-Zellen nicht zu reduzieren (125). Die Einnahme von CNI verursacht möglicherweise die niedrigeren Treg-Frequenzen, die sich bis zur letzten Nachuntersuchung zeigen. Hier könnte eine Korrelation mit den Treg-Frequenzen und dem Tacrolimus-Talspiegel bessere Hinweise liefern.

In der Literatur wird auch die Möglichkeit diskutiert, dass die Medikation die nTregs weniger beeinflusst und die Verminderung der Frequenz hauptsächlich durch eine Abnahme der pTreg-Zellen zustande kommt, denn CNI hemmen die Generierung von pTregs (125). Dafür spricht auch die Beobachtung von Bouvy *et al.*, die anhand der Helios-Expression die nTregs bestimmten und keine Verminderung der Frequenz von nTregs nach der Basiliximab-Induktionstherapie feststellen konnten (144). Inwiefern die Beeinflussung von nTregs und pTregs durch die Immunsuppressiva *in vivo* sich unterscheidet und ob dies Auswirkungen auf den klinischen Verlauf hat, muss noch untersucht werden.

Es stellt sich die Frage, ob das durch die Operation entstandene Gewebetrauma auch die Treg-Frequenz beeinflusst haben könnte. Die Auswirkung von Operationen auf die Treg-Zellen in Menschen ist wenig erforscht, da die meisten Studien sich mit dem Einfluss von schwerem Trauma auf die Zellen befassen. Sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme nach Trauma sind berichtet worden, wobei in den meisten Fällen die Frequenz der Tregs nur für einige Tage bestimmt wurde (148-150). Albertsmeier *et al.* konnten in Patient*innen nach elektiven abdominalen Operationen keine Änderung der Treg-Frequenz finden (151). Obwohl dieses Modell vermutlich einer Nierentransplantation am nächsten kommt, macht die kurze Dauer der Beobachtung (24 h) den Vergleich mit der ONE Study schwierig. Im Großen und Ganzen ist es fraglich, ob eine Operation auch Monate nach dem Eingriff einen signifikanten Einfluss auf die Treg-Zellen hat.

Es ist bekannt, dass terminale Niereninsuffizienz zur Reduktion einiger T-Zell-Subpopulationen führt (152). Diese Erkrankung könnte somit einen Einfluss auf die untersuchten Tregs haben, da für die Teilnahme an der ONE Study die Diagnose einer chronischen Niereninsuffizienz Voraussetzung war. Litjens *et al.* fanden beim Vergleich von Patient*innen mit terminaler Niereninsuffizienz zu Gesunden keinen Unterschied in der Frequenz und absoluten Treg-Zahlen, unabhängig davon, ob die Erkrankten bereits Hämodialyse erhielten oder nicht (153). In Übereinstimmung mit dieser Studie beobachteten wir in der Referenzgruppe vor der Transplantation Treg-Frequenzen, die innerhalb des in der Literatur angegebenen

Referenzbereichs lagen. Obwohl in der ONE Study keine gesunde Vergleichsgruppe untersucht wurde, kann somit davon ausgegangen werden, dass die Niereninsuffizienz keinen signifikanten Einfluss auf die Treg-Frequenzen hatte.

5.1.2 Die Veränderung der Foxp3^{high} Treg-Population nach Transplantation

Die CD4⁺CD25^{high}Foxp3^{high} Population folgte einer ähnlichen Dynamik wie die Gesamt-Treg-Zellen. Die Foxp3^{high} Tregs stellten sich in einer Studie von Braza *et al.* als die möglicherweise entscheidende Treg-Population in der Toleranz der Nierentransplantation dar, denn diese war in operational toleranten Patient*innen erhöht. Zusätzlich wies sie eine höhere TSDR-Demethylierungsrate auf (48). Die Foxp3^{high} Population ist bisher in der Nierentransplantation selten untersucht worden. Schwierigkeiten bereitet die intrazelluläre Färbung, wofür die Zellen permeabilisiert werden und somit für Zellsortierung und konsekutiven Untersuchungen nicht mehr verwendbar sind. In vergleichbaren Studien wird oft auf die Foxp3-Färbung verzichtet. Manche Studien verwenden stattdessen z. B. HLA-DR als Marker von aktivierten Tregs (154, 155). In einer Studie mit Nierentransplantierten wurde eine stark reduzierte Frequenz von HLA-DR^{high+}CD45RA⁻ innerhalb der Treg-Population im ersten Jahr nach Transplantation beobachtet (156). In der Referenzgruppe der ONE Study hingegen beobachteten wir nach 12 Wochen eine allmähliche Zunahme der Foxp3^{high} Treg-Population. Dieser Unterschied kann durch die verschiedene Methodik verursacht worden sein, denn im Gegensatz zu der ONE Study erfolgte in der genannten Studie keine Beobachtung derselben Teilnehmenden über einen längeren Zeitraum, sondern eine einmalige Messung (156). Zusätzlich wurde die Effektor-Gedächtnis-Population mit Hilfe von CD45RA definiert, auf das im entsprechenden ONE Study-Panel verzichtet wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass die somit identifizierte Population die Ergebnisse aus anderen Studien nicht exakt reproduzieren konnte. Generell erschwert die uneinheitliche Verwendung von Markern für Tregs die Vergleichbarkeit der Studien. Schwierigkeiten bei der Auswertung bereiteten die insgesamt niedrige Frequenz dieser Zellen und auch die teilweise mangelhaften Färbeargebnissen.

Die Auswertung der Durchflusszytometriedaten der Referenzgruppe offenbarte, dass die intrazelluläre Foxp3-Färbung nicht immer eine sichere Trennung der Foxp3⁺ Population ermöglichte. Zwei Zentren wiesen hierbei bessere Ergebnisse auf, wobei die Färbeargebnisse in anderen Zentren vergleichsweise schlecht waren. Da das jeweilige Färbeargebnis innerhalb jedes Zentrums überwiegend konstant war, ist die Ursache eher in der Durchführung der Färbung zu vermuten. Die intrazelluläre Färbung, wie im Falle von Foxp3, stellt in dem Gesamtprozess eine

Herausforderung dar. Solch eine Färbung ist mit zusätzlichen Färbeschritten verbunden, die zeitaufwendig und anfällig für Zellverluste sind und in einer reduzierten Fluoreszenz des Fluorochroms resultieren können (157). Beispielsweise können die Diskrepanzen durch Unterschiede im Entfernen des Überstandes der Probe nach Oberflächenfärbung und damit Verdünnen des Fixierungspuffers zustande kommen. Law *et al.* zeigten, dass bei der Foxp3-Färbung, je nach verwendetem Antikörper, dem konjugierten Fluorochrom und dem Fixierungs/Permeabilisierungs-Puffer unterschiedlich gute Ergebnisse erzielt werden können. Darüber hinaus ist das richtige Gating wichtig, um Foxp3⁺ Zellen sicher zu identifizieren (158).

Insgesamt kann eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung beeinflussen und muss für die Standardisierung beachtet werden. Dazu gehören Reagenzien, Bearbeitung und Färbung der Proben, Definition der Subpopulationen, Einstellungen des Durchflusszytometers und die Auswertung der Daten [zusammengefasst in (38) und (159)]. Diese Faktoren wurden für die ONE Study standardisiert, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Zentren zu erzielen (35). Die verwendeten Panels waren vor der Studie definiert und getestet worden. Allerdings handelte es sich bei dem Panel mit der Foxp3-Färbung um einen optionalen Bestandteil der Studie, der nicht von allen Zentren durchgeführt wurde. Dieses Panel war folglich auch nicht vorab auf Reproduzierbarkeit im direkten Vergleich zwischen den teilnehmenden Zentren getestet.

In der ONE Study wurde der Versuch unternommen, durch eine einheitliche Wahl der Materialien und Färbeprotokolle sowie durch eine zentrale Auswertung die Unterschiede möglichst gering zu halten. Interessanterweise konnten in einer Studie, welche die Panels aus ONE Study an zwei Kohorten gesunder Probanden testete, die Treg-Zahlen nicht reproduziert werden. Die Autoren führten dies auf die unterschiedlichen Färbeprotokolle zurück, da in einer Kohorte die Foxp3 Expression für die Identifizierung von Tregs benutzt wurde, in der anderen hingegen Tregs als CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} definiert wurden (37). Dies verdeutlicht die Schwierigkeit der gleichzeitigen Nutzung von intrazellulären sowie extrazellulären Marker für die Identifizierung von Tregs.

Insgesamt kann eine bessere Vergleichbarkeit der Foxp3-Färbung erzielt werden, indem neben der Wahl des Antikörpers und der Reagenzien mit bestmöglichen Ergebnissen auf die Standardisierung der intrazellulären Färbung geachtet wird. Pitoiset *et al.* konnten durch Verwendung von speziell vorgefertigten Röhrchen (Duraclone-Technologie) in einem multizentrischen Vergleich eine gute Vergleichbarkeit erzielen (160). Die hierfür verwendeten

Röhrchen beinhalteten alle Antikörper, inklusive den Foxp3-Antikörper, in definierten Konzentrationen in getrockneter Form. Damit konnten die Färbeschritte, der Zeitaufwand und die benötigte Menge an Blut reduziert werden (160). Dieser Ansatz ist für zukünftige Untersuchungen vielversprechend, muss allerdings noch in großen, multizentrischen Studien geprüft werden.

Zusammenfassend deutet die Literatur darauf hin, dass insbesondere die aktivierten Tregs in Transplantierten eine wichtige Rolle spielen und weiter erforscht werden sollten. Beispielsweise konnten Revilla-Nuin *et al.* in einer Studie an Lebertransplantierten, unter Verwendung von HLA-DR, eine erhöhte Frequenz der CD45RA⁻HLA-DR⁺ Tregs im Blut von toleranten Patient*innen verglichen mit anderen Transplantierten feststellen (161). In der ONE Study könnte, in Fällen mit aussagekräftigen Färbeergebnissen, der Vergleich mit der Zelltherapiegruppe weitere Hinweise für die Rolle dieser Population bei der Transplantation liefern. Es wäre von Interesse, zu evaluieren, ob sich Unterschiede in der Frequenz dieser Population zwischen Teilnehmenden, bei denen eine Minimierung der Immunsuppression gelingt, und anderen Teilnehmenden feststellen lassen.

5.1.3 Die TSDR-Demethylierungsrate im Verlauf der Studie

Die TSDR-Demethylierung gilt als der sicherste Marker zur Identifizierung stabiler Tregs. In der Referenzgruppe der ONE Study nimmt die Frequenz von TSDR-demethylierten Zellen anfänglich leicht ab. Vergleicht man diese Frequenz mit den Abbildungen 8 A und C, fällt die Reduktion der Treg-Frequenz, die anhand der TSDR-Demethylierung ermittelt wurde, im Verhältnis zu den anhand der Oberflächenmarker bestimmten Treg-Frequenzen viel geringer aus. Das könnte daran liegen, dass eine verminderte Expression von CD25 auf der Zelloberfläche vorliegt und die tatsächliche Frequenz der Tregs unterschätzt wird. Eine Erklärung hierfür könnte die medikamentöse Therapie liefern. Wie bereits im Abschnitt 5.1.1 erwähnt, gibt es Hinweise auf eine negative Wirkung von Basiliximab auf die CD25-Expression auf der Oberfläche von Tregs, welche nicht mit einer Depletion dieser Zellen einhergeht. Unsere Beobachtung in der ONE-Study bestätigt diese These. Allerdings gibt es auch Studien, die einen Einfluss von Basiliximab auf die TSDR-Demethylierung zeigen. Wieczorek *et al.* beobachteten eine Abnahme der TSDR-Demethylierung bereits 1 Tag nach der Basiliximab-Therapie (139). Dies könnte eine Erklärung für die anfängliche, leichte Abnahme der TSDR-demethylierten Zellen in der ONE-Study liefern. Dieser Effekt scheint aber nicht von Dauer zu sein, denn eine andere Studie konnte keinen Unterschied in der Frequenz von TSDR-demethylierten Zellen 6-12 Monate nach der

Induktionstherapie mit Basiliximab feststellen (144), was unsere Beobachtung bestätigt. Diese Ergebnisse liefern eine Erklärung für die beobachtete Dynamik der TSDR-demethylierten Zellen in der Referenzgruppe. Dennoch muss beachtet werden, dass eine zusätzliche Wirkung anderer Medikamente nicht auszuschließen ist. In diesem Fall spielen die CNI möglicherweise eine untergeordnete Rolle, denn einige Studien berichten, dass die TSDR-Demethylierung unter Tacrolimus stabil bleibt (65, 162).

5.1.4 Korrelation der Treg-Frequenzen mit TSDR-Demethylierung

In Studien mit operational toleranten Transplantatempfängern wurde eine Korrelation zwischen der TSDR-Demethylierung und der Treg-Frequenz beobachtet (163). Braza *et al.* stellten in Nierentransplantierten eine positive Korrelation zwischen der TSDR-Demethylierung (%CD4⁺) und der Frequenz von CD25⁺CD127^{low}Foxp3⁺ Zellen fest (48). Revilla *et al.* konnten eine Korrelation zwischen der TSDR-Demethylierungsrate und CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Zellen in Lebertransplantierten zeigen, und beobachteten ebenfalls eine erhöhte TSDR-Demethylierung in toleranten Patient*innen (161). In der Referenzgruppe der ONE Study korrelierten die Gesamt-Treg-Frequenzen, definiert als CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ oder CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, mit der TSDR-Demethylierung.

Für die Frequenz der CD4⁺CD25^{high}Foxp3^{high} Zellen hingegen konnte keine Korrelation mit der TSDR-Demethylierung beobachtet werden. Eine Ausnahme bildeten hier die Zentren mit guten Färbeergebnissen in der letzten Nachuntersuchung. Somit konnten die Ergebnisse aus der Studie von Braza *et al.* nicht bestätigt werden, wo eine starke Korrelation der CD45RA⁻Foxp3^{high} Zellen mit der TSDR-Demethylierung in Nierentransplantierten beobachtet wurde (48). Einige Unterschiede in den Studien könnten diese abweichenden Ergebnisse erklären. Braza *et al.* verwendeten zusätzlich zu Foxp3 die Expression von CD45RA, um die Effektor-Gedächtnis-Tregs zu identifizieren. Zudem wurde die TSDR-Demethylierung in einer Studienpopulation bestimmt, die zu einem Drittel aus operational toleranten Patient*innen bestand, die seit mindestens einem Jahr keine Immunsuppressiva nahmen. Im Gegensatz dazu erhielten die ONE-Study-Teilnehmenden mehrere Immunsuppressiva, u. a. Tacrolimus. Von CNI ist bekannt, dass sie die Frequenz von naiven (CD45RA⁺Foxp3^{low}) und Effektor-Gedächtnis-Tregs (CD45RA⁻Foxp3^{high}) in Organtransplantierten reduzieren (164). Hinzu kommt, dass in der ONE Study die uneinheitlichen Färbeergebnisse die Erfassung dieser Population erschwerten und die Bestimmung mittels Foxp3 in Frage stellen. Somit eignet sich die Frequenz der Tregs aus Zentren mit

misslungener Färbung nicht, um mögliche Korrelationen zu klinischen Ereignissen zu evaluieren und mit der Zelltherapiegruppe zu vergleichen. Insgesamt sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Rolle der Foxp3^{high} Population in Nierentransplantieren zu klären.

5.2 Epigenetische Regulation der Foxp3-Expression

5.2.1 Korrelation der Tet- und NR4A-mRNA-Expression mit Foxp3 und TSDR

Die Expression von Foxp3 in Treg-Zellen wird auf molekularer Ebene durch verschiedene Faktoren reguliert, die auf unterschiedliche Bereiche des Foxp3-Genlocus wirken. Dazu gehören die Proteine der Tet- und NR4A-Familien, die mitverantwortlich für die stabile Foxp3-Expression sind. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Expression dieser Gene mit der Foxp3-Expression oder der TSDR-Demethylierung korreliert. Die mRNA-Expression der Tet- und NR4A-Faktoren wurde in Blutproben von gesunden Proband*innen im Alter von 20 bis 75 Jahren bestimmt.

Eine Korrelation zwischen der Expression der epigenetischen Regulatoren mit Foxp3-mRNA oder TSDR-Demethylierung konnte nicht festgestellt werden. Auf den ersten Blick scheint dies im Widerspruch zu bisherigen Publikationen zu stehen, welche in Menschen eine Korrelation mit Foxp3-Expression und TSDR-Demethylierung zeigen konnten, zumindest für Tet2 (165). Ebenfalls konnten Studien zeigen, dass Foxp3⁺ Zellen (in Mausmodellen) auf Protein- und mRNA-Ebene mehr NR4A besitzen als Foxp3⁻ Zellen (113). Allerdings unterscheiden sich diese Studien von unseren Experimenten dadurch, dass sie an sortierten Zellen durchgeführt wurden. Die Expressionsraten wurden somit in einzelnen Zell-Populationen bestimmt. Die RNA-Proben in unseren Experimenten hingegen wurden aus Vollblut gewonnen. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die aus verschiedenen Ausgangsmaterialien bestimmten Genexpressionen variieren können (166, 167). Sowohl die Tet-Enzyme als auch die NR4A-Rezeptoren werden zusätzlich in anderen lymphoiden und myeloiden Zellen exprimiert [zusammengefasst in (104) und (111)]. Dies kann ein Grund für die abweichenden Beobachtungen sein. Für zukünftige Studien zu den epigenetischen Regulatoren empfiehlt es sich, nach Möglichkeit eine Auftrennung des Ausgangsmaterials nach Zelltyp vorzunehmen.

5.2.2 Altersabhängige Expression der epigenetischen Regulatoren in gesunden Probanden

Es wurde vermutet, dass die Zunahme der epigenetischen Faktoren in der ebenfalls mit dem Alter steigenden Frequenz der Gedächtnis-Tregs begründet sein könnte, welche eine hohe Foxp3-Expression aufweisen. Kverneland *et al.* hatten gezeigt, dass die Frequenz der Gesamt-Tregs ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$) sich über die verschiedenen Altersgruppen nicht nennenswert ändert, die Frequenz der Gedächtnis-Tregs ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^-$) jedoch zunimmt (37). Daher wurde untersucht, ob die Expression der Tet- und NR4A-Faktoren mit der Frequenz der Gedächtnis-Tregs korreliert. Eine Korrelation konnte hier für NR4A2 und zusätzlich für Tet1 beobachtet werden. Somit kann postuliert werden, dass NR4A2 für die Funktion von Gedächtnis-Tregs eine wichtige Rolle spielt. Eine Studie von Sekiya *et al.* scheint dies zu bestätigen, da sie zeigte, dass NR4A2 in der Lage ist, die Foxp3-Expression zu induzieren und für deren Stabilität zu sorgen (113). Allerdings sind diese Ergebnisse im Hinblick auf die Expressionsanalyse aus Vollblut mit Vorsicht zu interpretieren, denn NR4A2 wird auch in anderen Leukozyten, wie $CD8^+$ T-Zellen und Monozyten exprimiert, von denen einige Subpopulationen ebenfalls mit dem Alter steigen (37, 168). Für die Bestätigung der vermutlichen Rolle von NR4A2 in Treg-Zellen ist eine Bestimmung der Expressionsraten in sortierten Zellen notwendig.

Die Bestimmung der mRNA-Expression aus Vollblut zeigte, dass die Faktoren Tet2, NR4A1 und NR4A2 mit steigendem Alter zunahmen. Hingegen änderte sich die Expression von Tet1, Tet3 und NR4A3 nicht signifikant. Die TSDR-Demethylierung sowie die Foxp3-Expression zeigten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen im Laufe des Lebens. Die altersabhängige Expression der Tet- und NR4A-Faktoren ist bisher selten untersucht worden. Zwei Studien zur Altersabhängigkeit von Tet-Faktoren in T-Zellen und PBMCs von Menschen zeigten eine Abnahme von Tet1 und Tet3-Expression mit dem Alter, wohingegen die Expression von Tet2 gleichblieb [zusammengefasst in (169)]. Eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse könnte die unterschiedliche Methodik sein: In dieser Arbeit wurde die Messung der RNA aus Vollblut durchgeführt, wobei die genannten Studien sich jeweils auf PBMCs und T-Zellen bezogen. Eine Studie von Montarolo *et al.* konnte keine Korrelation zwischen Alter und relativer Expression der NR4A-Faktoren in Gesunden feststellen (170). Ein Grund für die unterschiedlichen Befunde könnte sein, dass in der genannten Studie die Zahl der Teilnehmenden in verschiedenen Altersgruppen nicht ausgeglichen und die Altersgruppe der 20- bis 30-Jährigen nicht vertreten war. Eine andere Erklärung bieten die unterschiedlichen Kriterien für die Probandenrekrutierung: Während in der Studie von Montarolo *et al.* Menschen als gesund galten, die keine bekannten

neurologischen oder anderen Erkrankungen hatten, wurden Gesunde in der Studie von Kverneland *et al.* mit dem Schwerpunkt auf immunologischen- oder immunmodulierenden Kriterien ausgewählt (siehe Abschnitt 3.1.5). Zur Altersabhängigkeit der Foxp3-Expression in Menschen finden sich in der Literatur keine einheitlichen Aussagen. Manche Studien berichten über eine Zunahme der Foxp3-Expression mit dem Alter, wobei andere keinen Unterschied zwischen jungen und älteren Menschen feststellen konnten (171, 172). Die unterschiedliche Methodik erschwert zusätzlich die Vergleichbarkeit der Studien.

5.2.3 Expression der epigenetischen Regulatoren in sortierten naiven und Gedächtnis-Tregs und Tconv

Die Genexpressionsanalysen aus Vollblut haben den Nachteil, dass sie möglicherweise nicht exakt die Verhältnisse in Tregs wiedergeben, da sowohl Tet- als auch NR4A-Faktoren auch in anderen Blutzellen exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde die Expression der epigenetischen Regulatoren in sortierten Gedächtnis- und naive Tregs und Tconv gemessen. Da diese Faktoren zur stabilen Foxp3-Expression beitragen, wurde vermutet, dass diese in Tregs höher exprimiert werden, besonders in den stark Foxp3-exprimierenden Effektor-Gedächtnis-Tregs.

Als Marker stabiler Tregs wurde die TSDR-Demethylierung bestimmt. In humanen Zellen zeigen sich sowohl naive CD45RA⁺ Tregs als auch CD45RA⁻ Gedächtnis-Tregs mit vollständig demethylierter TSDR (60, 63). In Übereinstimmung mit der Literatur zeigte sich in dieser Arbeit die Foxp3-TSDR in naiven und Gedächtnis-Tregs stark demethyliert. Im Gegensatz dazu war die TSDR in Tconv kaum demethyliert. Die Demethylierungsraten zwischen naiven und Gedächtnis-Tregs waren vergleichbar, was sich mit den Beobachtungen von Miyara *et al.* deckt (63). In einer aktuelleren Studie an gesunden Proband*innen fanden Arroyo Hornero *et al.* eine signifikant höhere TSDR-Demethylierung in Gedächtnis-Tregs im Vergleich zu naiven (65). Sie unterschieden jedoch zusätzlich zwischen CD25^{high} und CD25^{int} Gedächtnis-Tregs. Diese Unterteilung wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen und könnte verantwortlich für die unterschiedliche Beobachtung sein.

Beim Vergleich der Genexpressionen beobachteten wir die größten Unterschiede in den Tet-Enzymen. Die Gedächtnis-Tconv exprimierten signifikant weniger Tet1 als die anderen Zellgruppen. Die Tet2-Expression unterschied sich nur zwischen naiven Tregs und Gedächtnis-Tconv. Interessanterweise gab es signifikante Unterschiede bei der Expression von Tet3 zwischen

den naiven und Gedächtnis-T-Zellen, sowohl in der Tregs- als auch in der Tconv-Population. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von Tet3 für den Naive-Phänotyp von Bedeutung ist. Zu aktuellem Zeitpunkt scheinen keine weiteren Studien zum Einfluss von Tet3 auf den T-Zell-Phänotyp vorzuliegen. Für die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs ist weitere Forschung nötig.

Bei den NR4A-Faktoren unterschieden sich die Expressionen zwischen den Zellpopulationen nicht. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu anderen wissenschaftlichen Publikationen, welche über eine erhöhte NR4A-Expression in Tregs berichten (117, 120). Diese Befunde stellten die ursprüngliche Hypothese in Frage und veranlassten uns, eine genauere Einteilung der Tregs in Subpopulationen vorzunehmen. Insbesondere war nicht auszuschließen, dass die CD45RA⁺ Population auch Nicht-Tregs enthielt. Diese Gruppe besteht wahrscheinlich größtenteils aus aktivierten Teff und könnte die beobachteten Ergebnisse erklären (140).

5.2.4 Expression der epigenetischen Regulatoren in Treg-Subpopulationen

Unter der Annahme, dass die Einteilung der Tregs in naive und Gedächtnis-Tregs einzig anhand der CD45RA-Expression nicht der Heterogenität der Treg-Gruppen gerecht wird, wurde eine weitere Sortierung der Tregs anhand der CCR4-Expression vorgenommen. Ihara *et al.* nutzen ebenfalls die Expression von CCR4 und zeigten, dass CD4⁺CD127^{low}CCR4^{high} und CD4⁺CD127^{inter}CCR4^{low} Zellen jeweils den CD45RA⁻Foxp3^{high} und CD45RA⁺Foxp3^{low} Tregs entsprachen (72). Eine andere Studie charakterisierte die Tregs anhand von CD45RA und CCR4, und konnte somit Teil der Foxp3⁺ Nicht-Tregs den naiven oder Effektor-Gedächtnis-Populationen zuordnen. Die Autoren zeigten, dass die CD45RA^{high}CCR4^{low} Zellen vorwiegend dem naiven Phänotyp entsprachen. Die CD45RA^{low}CCR4^{high} Population überlappten sich mit den Effektor-Gedächtnis-Tregs (68). Diese Daten legen nahe, dass die Treg-Subpopulationen in Fällen, wo eine Nutzung der Foxp3-Expression nicht möglich ist, anhand von CCR4 unterschieden werden können. Für diese Arbeit konnten die Tregs in drei Subpopulationen eingeteilt und sortiert werden: CD45RA⁺CCR4⁻, CD45RA⁻CCR4⁺ und CD45RA^{low}CCR4^{low} Tregs.

Bezüglich TSDR-Demethylierung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subpopulationen. Dies spricht dafür, dass diese Populationen tatsächlich aus Tregs bestehen und wenig Teff enthält. Die CD45RA⁺CCR4⁻ Population hatte tendenziell die höchste TSDR-Demethylierungsrate, gefolgt von der CD45RA^{low}CCR4^{low} Population. Die CD45RA^{low}CCR4^{low}

Population zeigte eine tendenziell höhere Foxp3-Expression, wobei dies keine statistische Signifikanz erreichte. Basierend auf der CD45RA-Expression und der Studie von Kordasti *et al.* kann diese Population eher dem Effektor-Gedächtnis-Phänotyp zugeordnet werden (68). Interessanterweise zeigte diese Population tendenziell höhere Expressionsraten von Tet2, Tet3, NR4A1 und NR4A2 im Vergleich zu anderen Populationen, was allerdings nicht statistisch signifikant war. Dies könnte aus der kleinen Stichprobe (n=5) resultieren. Um diese Tendenz zu überprüfen, sind weitere Untersuchungen mit größeren Stichproben notwendig. Für NR4A3 konnte diesbezüglich keine Aussage getroffen werden, denn die NR4A3-Expression war oft nicht detektierbar. Dennoch deuten diese Daten darauf hin, dass die Expression dieser epigenetischen Regulatoren für die Foxp3-mRNA-Transkription notwendig ist, da eine erhöhte Expression dieser Faktoren mit einer höheren Foxp3-Expression einhergeht. Eine ähnliche Tendenz konnte für die TSDR-Demethylierung nicht beobachtet werden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass diese epigenetischen Regulatoren auf den Methylierungsstatus keinen Einfluss haben; möglicherweise besteht dies aus komplexen Wechselwirkungen von unterschiedlichen Faktoren und Signalen. Auf mögliche Erklärungen und anderen Studien zu den Tet- und NR4A-Faktoren wird im Folgenden näher eingegangen.

Wie bereits erwähnt, muss bei diesen Ergebnissen beachtet werden, dass es sich hierbei um eine kleine Stichprobe handelt. Die Aussagekraft wird zudem durch fehlende Expressionswerte eingeschränkt. Durch die Einteilung in Subgruppen wurden die einzelnen Populationen so klein, dass die RNA-Ausbeute teilweise nicht ausreichte, um die mRNA-Expression zu detektieren. Dies war insbesondere für die NR4A-Faktoren der Fall, die in geringen Mengen exprimiert wurden. Die Ergebnisse im Zusammenhang mit den NR4A-Rezeptoren sind deswegen mit Vorsicht zu interpretieren. Da Tregs insgesamt im peripheren Blut nur in geringen Frequenzen vorkommen, empfiehlt es sich für zukünftige Untersuchungen, die Menge des Blutmaterials nach Möglichkeit zu erhöhen, oder die Zellen nach Gewinnung *in vitro* zu expandieren.

Der Großteil der bisherigen Erkenntnisse über die epigenetische Regulation der Foxp3 Expression ist aus Mausmodellen gewonnen worden. Ob diese Erkenntnisse sich auf Menschen übertragen lassen, bleibt jedoch zu klären. Die meisten Studien über Tet-Enzyme in Menschen befassen sich mit Tumorerkrankungen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Tet2 und Stat5 in CD4⁺ T-Zellen im Tumorgewebe von Patient*innen mit kolorektalem Karzinom erhöht sind, ebenso ist die TSDR-Demethylierung in diesen Zellen hoch (107). In Menschen mit allergischer Rhinitis hingegen war die Treg-Frequenz, die Foxp3- und Tet2-Expression vermindert, die Foxp3-TSDR hypermethyliert (165). Studien an Mäusen zeigten, dass eine Deletion der Gene für Tet2/Tet3 zum

Verlust der Foxp3-Expression und Hypermethylierung der Foxp3-TSDR in Tregs führt. Diese Tet2/Tet3-defizienten Tregs können in gesunden Mäusen Autoimmunerkrankungen auslösen (173). Obwohl diese Befunde suggerieren, dass Treg-Frequenzen, Tet-Expression und TSDR-Demethylierung zusammenhängen, konnte eine Studie mit operational toleranten Lebertransplantierten keinen Unterschied in der Tet2-Expression zu Patient*innen unter Immunsuppression und Gesunden finden, trotz einer Erhöhung der aktivierten Tregs in toleranten Teilnehmenden (161). Dies kann daran liegen, dass die Tet-Expression in der genannten Studie aus Vollblut bestimmt wurde und nicht in sortierten Zellen. Andere Tet-Enzyme wurden in der genannten Studie nicht untersucht. Vergleichbare Untersuchungen an Nierentransplantierten fehlen bisher, somit bleibt die Rolle der Tet-Enzyme in der Treg-vermittelten Toleranz noch unklar. Bei Studien an Transplantierten muss jedoch beachtet werden, dass der Einfluss von immunsuppressiven Medikamenten auf die Tet-Enzyme noch unerforscht ist. Aus Mausmodellen ist bekannt, dass die Reduktion von Tet2 die TSDR-Demethylierung verhindert und das IL-2-Signal für die Aufrechterhaltung des Tet2-Spiegels notwendig ist (106). Dies deutet auf eine mögliche Beeinflussung der Tet-Faktoren und der Foxp3-TSDR durch Immunsuppressiva wie CNI hin, da diese sich auf die Expression von IL-2 auswirken. Zur Erforschung der Wirkung von Immunsuppressiva auf die Tet-Faktoren in Menschen sind im ersten Schritt Experimente an *in vitro* expandierten Treg-Zellen denkbar, um die epigenetische Regulation, den TSDR-Methylierungsstatus und damit die Stabilität und Funktionalität von Tregs zu untersuchen.

Interessanterweise zeigte eine Studie an Nierentransplantierten, dass die Ischämiezeit während der Transplantation die Aktivität von Tet-Enzymen vermindert, was in einer Hypermethylierung von Genen resultiert, die chronischen Transplantatschäden vorbeugen (174). Dieser Befund deutet darauf, dass die Tet-Enzyme auf verschiedenen Ebenen zu der Immunreaktion auf das Transplantat beitragen. Im Hinblick auf den Einsatz von Tregs in der Zelltherapie ist die Rolle der Tet-Faktoren als mögliche Stabilisatoren dieser Zellen von Interesse. Someya *et al.* konnten durch die Überexpression der katalytischen Domäne von Tet-Enzymen die TSDR von iTregs demethylieren und die Foxp3-Expression somit stabilisieren (175). Neben der bekannten positiven Wirkung von Vitamin C auf die Aktivität von Tet-Enzymen und die erhöhten suppressiven Eigenschaften von Tregs, könnten die Erkenntnisse zur Generierung stabiler und potenter Tregs für den Einsatz als Therapeutikum beitragen (102, 176).

Bei der Interpretation der Studienergebnisse muss zusätzlich beachtet werden, dass die Aktivität der Tet-Enzyme nicht nur von deren mRNA-Expression abhängt, sondern auch von der posttranslationalen Modifikation, beispielsweise durch Ubiquitinierung, Acetylierung und

Phosphorylierung [zusammengefasst in (177)]. Die Beurteilung der Effektivität alleinig anhand der Expression könnte somit unvollständig sein und der Komplexität epigenetischer Mechanismen nicht gerecht werden.

Die Rolle der NR4A-Rezeptoren im menschlichen Immunsystem ist bislang wenig erforscht. In manchen Autoimmunerkrankungen wurde eine Veränderung dieser Faktoren festgestellt (178). Vergleichbare Studien in Transplantierten fehlen. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Expression der NR4A-Gene und -Proteine in Tregs, verglichen mit anderen CD4⁺ T-Zellen erhöht ist (117). In dieser Arbeit konnten wir in humanen Zellen keinen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen den Treg-Subpopulationen feststellen, obwohl die Population der CD45RA^{low}CCR4^{low} Zellen eine Tendenz zur höheren Expression mehrerer Faktoren zeigte. Dieses Ergebnis scheint eine Arbeit von Hibino *et al.* zu bestätigen, die berichtet, dass die menschlichen Effektor-Tregs die NR4A-Rezeptoren stärker als naive Tregs und Foxp3⁺ Nicht-Tregs exprimieren (120). Die Autoren machten jedoch keine genaueren Angaben dazu, wie viele Proben für diese Messung verwendet wurden und ob der gemessene Unterschied signifikant war, was den Vergleich der Ergebnisse erschwert. Aufgrund der geringen Expressionsmengen sind weitere Untersuchungen mit mehr Ausgangsmaterial nötig, um diese Tendenz zu bestätigen.

Neuere Untersuchungen unterstreichen vor allem die Rolle der NR4A-Faktoren während der Entwicklung der Tregs. Bei der Erforschung von Treg-Vorläufern im Thymus beobachteten Sekiya *et al.*, dass Foxp3 während der Treg-Entwicklung auch in Abwesenheit von NR4A-Faktoren exprimiert wird, wenn auch in geringerem Maß. Allerdings war die Foxp3-Expression in diesen Zellen instabil und sie entwickelten sich zu autoreaktiven Zellen (114). NR4A-Rezeptoren scheinen somit nicht für die initiale Foxp3-Expression, sondern für die Stabilität nach den anfänglichen Entwicklungsstufen zu sorgen. Inwiefern die NR4A-Faktoren für die Stabilität der Foxp3-Expression in reifen Tregs in der Peripherie notwendig sind, ist nicht hinreichend untersucht. Möglicherweise spielen hier zusätzlich weitere Einflussfaktoren eine Rolle. Foxp3 wiederum verstärkt die Expression von NR4A-Faktoren über einen positiven Rückkopplungsmechanismus durch Bindung an den jeweiligen Promotor (114). Auch dies bestätigt unsere Beobachtung, dass Zellen mit höherer Foxp3-Expression auch tendenziell mehr NR4A-mRNA aufwiesen.

Es muss beachtet werden, dass die NR4A-Rezeptoren neben Foxp3 auch die Expression einer Vielzahl anderer Gene regulieren, welche für die Treg-Funktion essenziell sind. Dazu gehören *ikzf4* und *il2ra*, die für Eos (beteiligt an der Zellhomöostase) und CD25 kodieren (117).

Interessanterweise scheinen NR4A-Rezeptoren für die Demethylierung der ikfz4-TSDR notwendig zu sein, aber nicht für CNS2 (114). Diese Befunde zeigen, dass die Wirkung von NR4A in Tregs aus einer Vielzahl von Wechselwirkungen besteht, die bei weiterer Forschung mitberücksichtigt werden sollten. Hierfür wären *in vitro* Experimente zur weiteren Untersuchung der NR4A-Faktoren in menschlichen T-Zellen denkbar.

Interessanterweise führte die Inaktivierung von NR4A1 und NR4A2 in Mäusen, entweder medikamentös oder durch genetische Modifikation, zu einer besseren Immunantwort gegen Tumoren, ohne dass die Mäuse Autoimmunerkrankungen entwickelten (120). Neben potenziellen Anwendungen in der Tumorthherapie bleiben NR4A-Rezeptoren auch für die Transplantation interessant. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von NR4A1 in Mäusen zu einem erhöhten Verhältnis von Tregs zu anderen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen führte. Dies ging mit einer erhöhten Expression von Foxp3 und anderen Treg-assoziierten Genen und letztlich einer besseren Transplantatakzeptanz einher (179). Um die mögliche Rolle der NR4A-Faktoren in Menschen zu prüfen, könnte im ersten Schritt evaluiert werden, ob diese sich zwischen verschiedenen Gruppen von Transplantierten (mit stabiler Transplantatfunktion, mit akuter oder chronischer Abstoßung, operational tolerante) und Gesunden unterscheiden. Die oben genannten Beispiele deuten darauf hin, dass ein besseres Verständnis dieser Regulatoren im Immunsystem weitere therapeutische Optionen eröffnen könnte, möglicherweise auch in der Transplantationstoleranz.

5.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Frequenzen der Gesamt-Tregs, aktivierten Tregs sowie die TSDR-Demethylierung der Referenzgruppe der ONE Study über die gesamte Studie untersucht. Die Ergebnisse bilden die Grundlage für die Auswertung der Zelltherapiegruppe. Da Treg-Zellen in der Transplantatakzeptanz eine wichtige Rolle spielen, ist eine vergleichende Untersuchung der Zelltherapiegruppe von großem Interesse. Ob die Zelltherapie eine Minimierung oder gar Verzicht auf immunsuppressive Medikation erlaubt und auf lange Sicht das Transplantat- und Patientenüberleben verbessert, muss noch evaluiert werden. Auch muss geprüft werden, wie sich die verschiedenen Zelltherapieprodukte auf lange Sicht auf das Immunsystem auswirken.

Die ersten Erkenntnisse aus der ONE Study zeigen, dass die Immunzelltherapie in der Nierentransplantation von Lebendspenden eine sichere Option darstellt und darüber hinaus mit weniger Infektionen assoziiert ist. Die Abstoßungsrate war in der Zelltherapiegruppe und

Referenzgruppe vergleichbar. Außerdem konnte in 40% der Teilnehmenden der Zelltherapiegruppe im Verlauf MMF erfolgreich abgesetzt und Tacrolimus als Monotherapie fortgeführt werden. Dies zeigt, dass eine Reduktion der Immunsuppression im Rahmen der Zelltherapie und somit Reduktion der unerwünschten Nebenwirkungen potenziell möglich ist. Darüber hinaus zeigte die Zelltherapie positive Effekte auf das Immunsystem. Die Zelltherapiegruppe hatte beispielsweise keine Reduktion der TSDR-demethylierten, stabilen Tregs. Die Zusammensetzung einiger Immunzellen (z. B. der *marginal zone-like* B-Zellen) ähnelte der von gesunden Proband*innen (136). Dies deutet darauf hin, dass die Immunzelltherapie das Immunsystem potenziell weniger beeinträchtigt als die konventionelle Immunsuppression.

Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse könnten zu einem besseren Verständnis der beteiligten Mechanismen in der Transplantationsimmunität beitragen. Die ONE Study bietet darüber hinaus die Möglichkeit, beide Therapiegruppen nach Abschluss der Studie im Hinblick auf mögliche Zusammenhänge zwischen Treg-Zellen und klinischen sowie laborchemischen Ergebnissen zu untersuchen. Dies könnte Hinweise auf potenziellen Nutzen von Tregs als Marker für die Überwachung, Prognose oder die Identifizierung von toleranten Transplantierten liefern. Im nächsten Schritt sollten diese Erkenntnisse in größeren Studien untersucht werden. Auch Beobachtungen aus anderen Studien an Nierentransplantierten, beispielsweise die Korrelation von TSDR-Demethylierung mit dem Kreatinin-Wert, einem Maß für die Nierenfunktion, könnte in dieser Kohorte überprüft werden (48).

Es sollte berücksichtigt werden, dass Tregs allein nicht das gesamte Immunsystem eines Menschen widerspiegeln. Es gibt mehrere Immunzelltypen mit regulatorischen Funktionen, die vermutlich an der Toleranzentstehung im Rahmen der Nierentransplantation beteiligt sind. Beispielsweise häuft sich zunehmend die Evidenz dafür, dass die B-Zellen hierfür eine maßgebliche Rolle spielen [zusammengefasst in (180)]. Die Ergebnisse aus der Untersuchung von Tregs sollten stets auch unter Berücksichtigung der anderen immunregulatorischen Zelltypen betrachtet werden.

Die Heterogenität der Treg-Subpopulationen, deren Plastizität und das Fehlen von spezifischen Markern sind Herausforderungen in der Erforschung von Tregs. Es ist daher unabdingbar, stabile, suppressive Tregs zu identifizieren, die diese Eigenschaften auch bei Einsatz als Zelltherapieprodukte *in vivo* behalten. Dazu gehört die stabile Foxp3-Expression, deren Regulation auf epigenetischer Ebene durch die Tet- und NR4A-Faktoren in dieser Arbeit untersucht wurde. Künftige Studien in diesem Bereich sollten bevorzugt in sortierten Zellen durchgeführt werden und größere Stichproben untersuchen, um die Rolle dieser Faktoren in

verschiedenen Treg-Subpopulationen zu erläutern. Hierzu könnten beispielsweise Tregs *in vitro* expandiert und die Genexpression, Wechselwirkungen und mögliche beeinflussende Faktoren, wie Medikamente oder extrazelluläre Signale, untersucht werden. Im Hinblick auf die Transplantation ist u. a. die Erforschung der Auswirkungen von Immunsuppressiva auf die epigenetischen Regulatoren von Interesse. Eine bessere Kenntnis der epigenetischen Regulation der stabilen Foxp3-Expression könnte Möglichkeiten zur *in vitro*-Generierung stabiler Tregs eröffnen und somit deren Einsatz als Zelltherapieprodukt erleichtern und das Risiko der Umwandlung in proinflammatorische Zellen reduzieren. Dies setzt voraus, dass neben Tet- und NR4A-Faktoren auch andere epigenetische Regulatoren mitberücksichtigt werden, die in Interaktion mit diesen Faktoren an der Foxp3-Expression in Tregs beteiligt sind.

Neben Experimenten *in vitro* sollte untersucht werden, wie sich die epigenetischen Regulatoren in Treg-Zellen *in vivo* zwischen Gesunden und Transplantierten, oder auch in Tumor- und Autoimmunerkrankungen, unterscheiden. Neben einem besseren Verständnis dieser Erkrankungen könnten diese Erkenntnisse bei verschiedenen Fragestellungen therapeutische Bedeutung erlangen.

Literaturverzeichnis

1. DSO. Deutsche Stiftung Organtransplantation: Statistiken zur Organspende 2020 [Available from: <https://dso.de/organspende/statistiken-berichte/organspende>].
2. Moreau A, Varey E, Anegon I, Cuturi MC. Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(11).
3. Bröker B SC, Fleischer B. *Grundwissen Immunologie 4. Auflage ed: Springer Spektrum;* 2019.
4. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Front Immunol.* 2016;7:582.
5. Wiebe C, Pochinco D, Blydt-Hansen TD, Ho J, Birk PE, Karpinski M, Goldberg A, Storsley LJ, Gibson IW, Rush DN, Nickerson PW. Class II HLA epitope matching-A strategy to minimize de novo donor-specific antibody development and improve outcomes. *Am J Transplant.* 2013;13(12):3114-22.
6. Philogene MC, Zhou S, Lonze BE, Bagnasco S, Alasfar S, Montgomery RA, Kraus E, Jackson AM, Leffell MS, Zachary AA. Pre-transplant Screening for Non-HLA Antibodies: Who should be Tested? *Hum Immunol.* 2018;79(4):195-202.
7. Nieto T, Inston N, Cockwell P. Renal transplantation in adults. *Bmj.* 2016;355:i6158.
8. Kessar N, Mukherjee D, Chandak P, Mamode N. Renal transplantation in identical twins in United States and United Kingdom. *Transplantation.* 2008;86(11):1572-7.
9. Kalluri HV, Hardinger KL. Current state of renal transplant immunosuppression: Present and future. *World J Transplant.* 2012;2(4):51-68.
10. Jardine AG, Hartmann A, Holdaas H. Long-term renal allograft survival: a quiet revolution. *Kidney Int.* 2018;94(5):853-5.
11. Scherer MN, Banas B, Mantouvalou K, Schnitzbauer A, Obed A, Kramer BK, Schlitt HJ. Current concepts and perspectives of immunosuppression in organ transplantation. *Langenbecks Arch Surg.* 2007;392(5):511-23.
12. Baron D, Giral M, Brouard S. Reconsidering the detection of tolerance to individualize immunosuppression minimization and to improve long-term kidney graft outcomes. *Transpl Int.* 2015;28(8):938-59.
13. Hameed AM, Yao J, Allen RDM, Hawthorne WJ, Pleass HC, Lau H. The Evolution of Kidney Transplantation Surgery Into the Robotic Era and Its Prospects for Obese Recipients. *Transplantation.* 2018;102(10):1650-65.
14. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, Hidalgo LG, Famulski K, Matas A, Halloran PF. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant.* 2012;12(2):388-99.
15. Coemans M, Susal C, Dohler B, Anglicheau D, Giral M, Bestard O, Legendre C, Emonds MP, Kuypers D, Molenberghs G, Verbeke G, Naesens M. Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int.* 2018;94(5):964-73.
16. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant.* 2011;11(3):450-62.
17. Merion RM, Goodrich NP, Johnson RJ, McDonald SP, Russ GR, Gillespie BW, Collett D. Kidney transplant graft outcomes in 379 257 recipients on 3 continents. *Am J Transplant.* 2018;18(8):1914-23.
18. Van Loon E, Senev A, Lerut E, Coemans M, Callemeyn J, Van Keer JM, Daniels L, Kuypers D, Sprangers B, Emonds MP, Naesens M. Assessing the Complex Causes of Kidney Allograft Loss. *Transplantation.* 2020.

19. Kinnunen S, Karhapaa P, Juutilainen A, Finne P, Helantera I. Secular Trends in Infection-Related Mortality after Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(5):755-62.
20. Farrugia D, Mahboob S, Cheshire J, Begaj I, Khosla S, Ray D, Sharif A. Malignancy-related mortality following kidney transplantation is common. *Kidney Int*. 2014;85(6):1395-403.
21. Conte C, Secchi A. Post-transplantation diabetes in kidney transplant recipients: an update on management and prevention. *Acta Diabetol*. 2018;55(8):763-79.
22. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaité L, Moal MC, Mondragon-Ramirez GA, Kothari J, Polinsky MS, Meier-Kriesche HU, Munier S, Larsen CP. Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2016;374(4):333-43.
23. Lerut JP, Pinheiro RS, Lai Q, Stouffs V, Orlando G, Juri JM, Ciccarelli O, Sempoux C, Roggen FM, De Reyck C, Latinne D, Gianello P. Is minimal, [almost] steroid-free immunosuppression a safe approach in adult liver transplantation? Long-term outcome of a prospective, double blind, placebo-controlled, randomized, investigator-driven study. *Ann Surg*. 2014;260(5):886-91; discussion 91-2.
24. Thierry A, Le Meur Y, Ecotiere L, Abou-Ayache R, Etienne I, Laurent C, Vuiblet V, Colosio C, Bouvier N, Aldigier JC, Rerolle JP, Javaugue V, Gand E, Bridoux F, Essig M, Hurault de Ligny B, Touchard G. Minimization of maintenance immunosuppressive therapy after renal transplantation comparing cyclosporine A/azathioprine or cyclosporine A/mycophenolate mofetil bitherapy to cyclosporine A monotherapy: a 10-year postrandomization follow-up study. *Transpl Int*. 2016;29(1):23-33.
25. Cantarovich D, Vistoli F, Soullillou JP. Immunosuppression minimization in kidney transplantation. *Front Biosci*. 2008;13:1413-32.
26. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, Subra JF, Legendre C, Noel C, Pillebout E, Brouard S, Soullillou JP. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6(4):736-46.
27. Massart A, Ghisdal L, Abramowicz M, Abramowicz D. Operational tolerance in kidney transplantation and associated biomarkers. *Clin Exp Immunol*. 2017;189(2):138-57.
28. Sachs DH. Transplantation tolerance through mixed chimerism: From allo to xeno. *Xenotransplantation*. 2018;25(3):e12420.
29. Brouard S, Pallier A, Renaudin K, Foucher Y, Danger R, Devys A, Cesbron A, Guillot-Guegen C, Ashton-Chess J, Le Roux S, Harb J, Roussey G, Subra JF, Villemain F, Legendre C, Bemelman FJ, Orlando G, Garnier A, Jambon H, Le Monies De Sagazan H, Braun L, Noel C, Pillebout E, Moal MC, Cantarell C, Hoitsma A, Ranbant M, Testa A, Soullillou JP, Giral M. The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am J Transplant*. 2012;12(12):3296-307.
30. Behnam Sani K, Sawitzki B. Immune monitoring as prerequisite for transplantation tolerance trials. *Clin Exp Immunol*. 2017;189(2):158-70.
31. Kawai T, Sachs DH, Sprangers B, Spitzer TR, Saidman SL, Zorn E, Tolkoff-Rubin N, Preffer F, Crisalli K, Gao B, Wong W, Morris H, LoCascio SA, Sayre P, Shonts B, Williams WW, Jr., Smith RN, Colvin RB, Sykes M, Cosimi AB. Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant*. 2014;14(7):1599-611.
32. Zuber J, Sykes M. Mechanisms of Mixed Chimerism-Based Transplant Tolerance. *Trends Immunol*. 2017;38(11):829-43.
33. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi G. Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2019;10:43.
34. Geissler EK. The ONE Study compares cell therapy products in organ transplantation: introduction to a review series on suppressive monocyte-derived cells. *Transplant Res*. 2012;1(1):11.

35. Streitz M, Miloud T, Kapinsky M, Reed MR, Magari R, Geissler EK, Hutchinson JA, Vogt K, Schlickeiser S, Kverneland AH, Meisel C, Volk HD, Sawitzki B. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res.* 2013;2(1):17.
36. Schlickeiser S, Streitz M, Sawitzki B. Standardized Multi-Color Flow Cytometry and Computational Biomarker Discovery. *Methods Mol Biol.* 2016;1371:225-38.
37. Kverneland AH, Streitz M, Geissler E, Hutchinson J, Vogt K, Boes D, Niemann N, Pedersen AE, Schlickeiser S, Sawitzki B. Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study protocol. *Cytometry A.* 2016;89(6):543-64.
38. Maecker HT, McCoy JP, Jr., Amos M, Elliott J, Gaigalas A, Wang L, Aranda R, Banchereau J, Boshoff C, Braun J, Korin Y, Reed E, Cho J, Hafler D, Davis M, Fathman CG, Robinson W, Denny T, Weinhold K, Desai B, Diamond B, Gregersen P, Di Meglio P, Nestle FO, Peakman M, Villanova F, Ferbas J, Field E, Kantor A, Kawabata T, Komocsar W, Lotze M, Nepom J, Ochs H, O'Lone R, Phippard D, Plevy S, Rich S, Roederer M, Rotrosen D, Yeh JH. A model for harmonizing flow cytometry in clinical trials. *Nat Immunol.* 2010;11(11):975-8.
39. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009;9 Suppl 3:S1-155.
40. Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions. *Autoimmun Rev.* 2015;14(2):105-16.
41. Zwang NA, Leventhal JR. Cell Therapy in Kidney Transplantation: Focus on Regulatory T Cells. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(7):1960-72.
42. Walker MR, Kasprovicz 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.
43. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2018;19(7):665-73.
44. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* 2016;37(11):803-11.
45. Tang Q, Vincenti F. Transplant trials with Tregs: perils and promises. *J Clin Invest.* 2017;127(7):2505-12.
46. Moraes-Vieira PM, Silva HM, Takenaka MC, Monteiro SM, Lemos F, Saitovitch D, Kalil J, Coelho V. Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. *Hum Immunol.* 2010;71(5):442-50.
47. Ashton-Chess J, Giral M, Soulillou JP, Brouard S. Can immune monitoring help to minimize immunosuppression in kidney transplantation? *Transpl Int.* 2009;22(1):110-9.
48. Braza F, Dugast E, Panov I, Paul C, Vogt K, Pallier A, Chesneau M, Baron D, Guerif P, Lei H, Laplaud DA, Volk HD, Degauque N, Giral M, Soulillou JP, Sawitzki B, Brouard S. Central Role of CD45RA- Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(8):1795-805.
49. San Segundo D, Galvan-Espinoza LH, Rodrigo E, Irure J, Ruiz JC, Fernandez-Fresnedo G, Riesco L, Bada J, Belmar L, Lopez-Hoyos M. Regulatory T-cell Number in Peripheral Blood at 1 Year Posttransplant as Predictor of Long-term Kidney Graft Survival. *Transplant Direct.* 2019;5(3):e426.
50. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer.* 2010;127(4):759-67.
51. Tanaka A, Sakaguchi S. Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2019;49(8):1140-6.

52. Wolf D, Sopper S, Pircher A, Gastl G, Wolf AM. Treg(s) in Cancer: Friends or Foe? *J Cell Physiol.* 2015;230(11):2598-605.
53. Mohr A, Malhotra R, Mayer G, Gorochov G, Miyara M. Human FOXP3(+) T regulatory cell heterogeneity. *Clin Transl Immunology.* 2018;7(1):e1005.
54. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med.* 2014;20(1):62-8.
55. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martinez-Llordella M, Ashby M, Nakayama M, Rosenthal W, Bluestone JA. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2009;10(9):1000-7.
56. Vaikunthanathan T, Safinia N, Boardman D, Lechler RI, Lombardi G. Regulatory T cells: tolerance induction in solid organ transplantation. *Clin Exp Immunol.* 2017;189(2):197-210.
57. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev.* 2011;241(1):260-8.
58. 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+ T reg cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1701-11.
59. Ferreira LMR, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. Next-generation regulatory T cell therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(10):749-69.
60. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, Osaki M, Tanaka Y, Yamashita R, Nakano N, Huehn J, Fehling HJ, Sparwasser T, Nakai K, Sakaguchi S. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity.* 2012;37(5):785-99.
61. Iizuka-Koga M, Nakatsukasa H, Ito M, Akanuma T, Lu Q, Yoshimura A. Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications. *J Autoimmun.* 2017;83:113-21.
62. Shevach EM. Foxp3(+) T Regulatory Cells: Still Many Unanswered Questions-A Perspective After 20 Years of Study. *Front Immunol.* 2018;9:1048.
63. 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+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 2009;30(6):899-911.
64. Wang L, Simons DL, Lu X, Tu TY, Solomon S, Wang R, Rosario A, Avalos C, Schmolze D, Yim J, Waisman J, Lee PP. Connecting blood and intratumoral Treg cell activity in predicting future relapse in breast cancer. *Nat Immunol.* 2019;20(9):1220-30.
65. Arroyo Hornero R, Betts GJ, Sawitzki B, Vogt K, Harden PN, Wood KJ. CD45RA Distinguishes CD4+CD25+CD127-/low TSDR Demethylated Regulatory T Cell Subpopulations With Differential Stability and Susceptibility to Tacrolimus-Mediated Inhibition of Suppression. *Transplantation.* 2017;101(2):302-9.
66. Haseda F, Imagawa A, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Hanafusa T. CD4(+) CD45RA(-) FoxP3high activated regulatory T cells are functionally impaired and related to residual insulin-secreting capacity in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2013;173(2):207-16.
67. Duhon T, Duhon R, Lanzavecchia A, Sallusto F, Campbell DJ. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood.* 2012;119(19):4430-40.
68. Kordasti S, Costantini B, Seidl T, Perez Abellan P, Martinez Llordella M, McLornan D, Diggins KE, Kulasekararaj A, Benfatto C, Feng X, Smith A, Mian SA, Melchiotti R, de Rinaldis E, Ellis R, Petrov N, Povolieri GA, Chung SS, Thomas NS, Farzaneh F, Irish JM, Heck S, Young

- NS, Marsh JC, Mufti GJ. Deep phenotyping of Tregs identifies an immune signature for idiopathic aplastic anemia and predicts response to treatment. *Blood*. 2016;128(9):1193-205.
69. Halim L, Romano M, McGregor R, Correa I, Pavlidis P, Grageda N, Hoong SJ, Yuksel M, Jassem W, Hannen RF, Ong M, McKinney O, Hayee B, Karagiannis SN, Powell N, Lechler RI, Nova-Lamperti E, Lombardi G. An Atlas of Human Regulatory T Helper-like Cells Reveals Features of Th2-like Tregs that Support a Tumorigenic Environment. *Cell Rep*. 2017;20(3):757-70.
70. Koizumi SI, Ishikawa H. Transcriptional Regulation of Differentiation and Functions of Effector T Regulatory Cells. *Cells*. 2019;8(8).
71. Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jager E, Sakaguchi S. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(44):17945-50.
72. Ihara F, Sakurai D, Horinaka A, Makita Y, Fujikawa A, Sakurai T, Yamasaki K, Kunii N, Motohashi S, Nakayama T, Okamoto Y. CD45RA(-)Foxp3(high) regulatory T cells have a negative impact on the clinical outcome of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(10):1275-85.
73. Ureshino H, Shindo T, Nishikawa H, Watanabe N, Watanabe E, Satoh N, Kitaura K, Kitamura H, Doi K, Nagase K, Kimura H, Samukawa M, Kusunoki S, Miyahara M, Shin IT, Suzuki R, Sakaguchi S, Kimura S. Effector Regulatory T Cells Reflect the Equilibrium between Antitumor Immunity and Autoimmunity in Adult T-cell Leukemia. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(8):644-9.
74. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
75. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007;27(4):635-46.
76. Aiello S, Rocchetta F, Longaretti L, Faravelli S, Todeschini M, Cassis L, Pezzuto F, Tomasoni S, Azzollini N, Mister M, Mele C, Conti S, Breno M, Remuzzi G, Noris M, Benigni A. Extracellular vesicles derived from T regulatory cells suppress T cell proliferation and prolong allograft survival. *Sci Rep*. 2017;7(1):11518.
77. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, Flores M, Li N, Schweighoffer E, Greenberg S, Tybulewicz V, Vignali D, Clynes R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol*. 2008;180(9):5916-26.
78. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192(2):303-10.
79. Martin-Moreno PL, Tripathi S, Chandraker A. Regulatory T Cells and Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(11):1760-4.
80. Busse D, de la Rosa M, Hobiger K, Thurley K, Flossdorf M, Scheffold A, Hofer T. Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(7):3058-63.
81. Rueda CM, Jackson CM, Chougnet CA. Regulatory T-Cell-Mediated Suppression of Conventional T-Cells and Dendritic Cells by Different cAMP Intracellular Pathways. *Front Immunol*. 2016;7:216.
82. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6.

83. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):337-42.
84. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-61.
85. Bacchetta R, Barzaghi F, Roncarolo MG. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1417(1):5-22.
86. Kitagawa Y, Wing JB, Sakaguchi S. Transcriptional and Epigenetic Control of Regulatory T Cell Development. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;136:1-33.
87. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature.* 2007;445(7130):936-40.
88. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(1):129-38.
89. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, Chatila TA. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol.* 2007;8(4):359-68.
90. Yurchenko E, Shio MT, Huang TC, Da Silva Martins M, Szyf M, Levings MK, Olivier M, Piccirillo CA. Inflammation-driven reprogramming of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells into pathogenic Th1/Th17 T effectors is abrogated by mTOR inhibition in vivo. *PLoS One.* 2012;7(4):e35572.
91. Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol Rev.* 2014;259(1):192-205.
92. Huehn J, Beyer M. Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells. *Semin Immunol.* 2015;27(1):10-8.
93. Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenbon A, Hirota K, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M, Taniuchi I, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S. Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat Immunol.* 2017;18(2):173-83.
94. Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Saika S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J Immunol.* 2010;185(2):842-55.
95. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature.* 2010;463(7282):808-12.
96. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, Olek S, Hamann A, von Boehmer H, Huehn J. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol.* 2008;38(6):1654-63.
97. Sekiya T, Nakatsukasa H, Lu Q, Yoshimura A. Roles of transcription factors and epigenetic modifications in differentiation and maintenance of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2016;18(6):378-86.
98. Feng Y, van der Veecken J, Shugay M, Putintseva EV, Osmanbeyoglu HU, Dikiy S, Hoyos BE, Moltedo B, Hemmers S, Treuting P, Leslie CS, Chudakov DM, Rudensky AY. A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature.* 2015;528(7580):132-6.
99. Yang R, Qu C, Zhou Y, Konkel JE, Shi S, Liu Y, Chen C, Liu S, Liu D, Chen Y, Zandi E, Chen W, Zhou Y, Shi S. Hydrogen Sulfide Promotes Tet1- and Tet2-Mediated Foxp3

- Demethylation to Drive Regulatory T Cell Differentiation and Maintain Immune Homeostasis. *Immunity*. 2015;43(2):251-63.
100. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011;333(6047):1300-3.
 101. Nair VS, Song MH, Ko M, Oh KI. DNA Demethylation of the Foxp3 Enhancer Is Maintained through Modulation of Ten-Eleven-Translocation and DNA Methyltransferases. *Mol Cells*. 2016;39(12):888-97.
 102. Yue X, Trifari S, Aijo T, Tsagaratou A, Pastor WA, Zepeda-Martinez JA, Lio CW, Li X, Huang Y, Vijayanand P, Lahdesmaki H, Rao A. Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity. *J Exp Med*. 2016;213(3):377-97.
 103. Sasidharan Nair V, Song MH, Oh KI. Vitamin C Facilitates Demethylation of the Foxp3 Enhancer in a Tet-Dependent Manner. *J Immunol*. 2016;196(5):2119-31.
 104. Lio CJ, Rao A. TET Enzymes and 5hmC in Adaptive and Innate Immune Systems. *Front Immunol*. 2019;10:210.
 105. Wakamatsu E, Omori H, Kawano A, Ogawa S, Abe R. Strong TCR stimulation promotes the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells induced in vitro through increasing the demethylation of Foxp3 CNS2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(4):2597-602.
 106. Nair VS, Oh KI. Down-regulation of Tet2 prevents TSDR demethylation in IL2 deficient regulatory T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450(1):918-24.
 107. Ma H, Gao W, Sun X, Wang W. STAT5 and TET2 Cooperate to Regulate FOXP3-TSDR Demethylation in CD4(+) T Cells of Patients with Colorectal Cancer. *J Immunol Res*. 2018;2018:6985031.
 108. Tsiouplis NJ, Bailey DW, Chiou LF, Wissink FJ, Tsagaratou A. TET-Mediated Epigenetic Regulation in Immune Cell Development and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:623948.
 109. An J, Rao A, Ko M. TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers. *Exp Mol Med*. 2017;49(4):e323.
 110. Rodriguez-Calvo R, Tajés M, Vazquez-Carrera M. The NR4A subfamily of nuclear receptors: potential new therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(3):291-304.
 111. Hamers AA, Hanna RN, Nowyhed H, Hedrick CC, de Vries CJ. NR4A nuclear receptors in immunity and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2013;24(5):381-5.
 112. Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NP, Perlmann T. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*. 2003;423(6939):555-60.
 113. Sekiya T, Kashiwagi I, Inoue N, Morita R, Hori S, Waldmann H, Rudensky AY, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Nat Commun*. 2011;2:269.
 114. Sekiya T, Hibino S, Saeki K, Kanamori M, Takaki S, Yoshimura A. Nr4a Receptors Regulate Development and Death of Labile Treg Precursors to Prevent Generation of Pathogenic Self-Reactive Cells. *Cell Rep*. 2018;24(6):1627-38.e6.
 115. Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, Mathis D, Benoist C. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity*. 2007;27(5):786-800.
 116. Sekiya T, Kashiwagi I, Yoshida R, Fukaya T, Morita R, Kimura A, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Yoshimura A. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat Immunol*. 2013;14(3):230-7.

117. Sekiya T, Kondo T, Shichita T, Morita R, Ichinose H, Yoshimura A. Suppression of Th2 and Tfh immune reactions by Nr4a receptors in mature T reg cells. *J Exp Med*. 2015;212(10):1623-40.
118. Ito M, Iizuka-Koga M, Ando M, Yoshimura A. Development and Functional Modulation of Regulatory T Cells by Transcription Factors and Epigenetics. *Cornea*. 2018;37 Suppl 1:S42-s9.
119. Chen J, Lopez-Moyado IF, Seo H, Lio CJ, Hempleman LJ, Sekiya T, Yoshimura A, Scott-Browne JP, Rao A. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature*. 2019;567(7749):530-4.
120. Hibino S, Chikuma S, Kondo T, Ito M, Nakatsukasa H, Omata-Mise S, Yoshimura A. Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance. *Cancer Res*. 2018;78(11):3027-40.
121. Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, Wilpitz DC, Kurland IJ, Tontonoz P. NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat Med*. 2006;12(9):1048-55.
122. Volakakis N, Kadkhodaei B, Joodmardi E, Wallis K, Panman L, Silvaggi J, Spiegelman BM, Perlmann T. NR4A orphan nuclear receptors as mediators of CREB-dependent neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(27):12317-22.
123. Hellemans R, Bosmans JL, Abramowicz D. Induction Therapy for Kidney Transplant Recipients: Do We Still Need Anti-IL2 Receptor Monoclonal Antibodies? *Am J Transplant*. 2017;17(1):22-7.
124. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med*. 2010;363(15):1451-62.
125. Furukawa A, Wisel SA, Tang Q. Impact of Immune-Modulatory Drugs on Regulatory T Cell. *Transplantation*. 2016;100(11):2288-300.
126. Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, Laszik ZG, Putnam A, Belingheri M, Gross DM, Townsend RM, Vincenti F. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8(10):2086-96.
127. Wang Z, Shi BY, Qian YY, Cai M, Wang Q. Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(3):496-503.
128. Vondran FW, Timrott K, Tross J, Kollrich S, Schwarz A, Lehner F, Klempnauer J, Becker T, Schwinzer R. Impact of Basiliximab on regulatory T-cells early after kidney transplantation: down-regulation of CD25 by receptor modulation. *Transpl Int*. 2010;23(5):514-23.
129. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernandez-Fresnedo G, Gomez-Alamillo C, Merino R, Benito MJ, Cacho E, Rodrigo E, Palomar R, Lopez-Hoyos M, Arias M. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2006;82(4):550-7.
130. Ruggenti P, Perico N, Gotti E, Cravedi P, D'Agati V, Gagliardini E, Abbate M, Gaspari F, Cattaneo D, Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cugini D, Conti S, Remuzzi G. Sirolimus versus cyclosporine therapy increases circulating regulatory T cells, but does not protect renal transplant patients given alemtuzumab induction from chronic allograft injury. *Transplantation*. 2007;84(8):956-64.
131. Jamali S, Sarafnejad A, Ahmadpoor P, Nafar M, Karimi M, Eteghadi A, Yekaninejad MS, Amirzargar AA. Sirolimus vs mycophenolate mofetil in Tacrolimus based therapy following induction with Antithymocyte globulin promotes regulatory T cell expansion and inhibits ROR γ and T-bet expression in kidney transplantation. *Hum Immunol*. 2019;80(9):739-47.

132. Kunisada Y, Eikawa S, Tomonobu N, Domae S, Uehara T, Hori S, Furusawa Y, Hase K, Sasaki A, Uono H. Attenuation of CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment by Metformin, a Type 2 Diabetes Drug. *EBioMedicine*. 2017;25:154-64.
133. Duan W, Ding Y, Yu X, Ma D, Yang B, Li Y, Huang L, Chen Z, Zheng J, Yang C. Metformin mitigates autoimmune insulinitis by inhibiting Th1 and Th17 responses while promoting Treg production. *Am J Transl Res*. 2019;11(4):2393-402.
134. Gatault P, Kamar N, Buchler M, Colosio C, Bertrand D, Durrbach A, Albano L, Rivalan J, Le Meur Y, Essig M, Bouvier N, Legendre C, Moulin B, Heng AE, Weestel PF, Sayegh J, Charpentier B, Rostaing L, Thervet E, Lebranchu Y. Reduction of Extended-Release Tacrolimus Dose in Low-Immunological-Risk Kidney Transplant Recipients Increases Risk of Rejection and Appearance of Donor-Specific Antibodies: A Randomized Study. *Am J Transplant*. 2017;17(5):1370-9.
135. Dugast E, Soullillou JP, Foucher Y, Papuchon E, Guerif P, Paul C, Riochet D, Chesneau M, Cesbron A, Renaudin K, Dantal J, Giral M, Brouard S. Failure of Calcineurin Inhibitor (Tacrolimus) Weaning Randomized Trial in Long-Term Stable Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2016;16(11):3255-61.
136. Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS, Tang Q, Guinan EC, Battaglia M, Burlingham WJ, Roberts ISD, Streitz M, Josien R, Böger CA, Scottà C, Markmann JF, Hester JL, Juerchott K, Braudeau C, James B, Contreras-Ruiz L, van der Net JB, Bergler T, Caldara R, Petchey W, Edinger M, Dupas N, Kapinsky M, Mutzbauer I, Otto NM, Öllinger R, Hernandez-Fuentes MP, Issa F, Ahrens N, Meyenberg C, Karitzky S, Kunzendorf U, Knechtle SJ, Grinyó J, Morris PJ, Brent L, Bushell A, Turka LA, Bluestone JA, Lechler RI, Schlitt HJ, Cuturi MC, Schlickeiser S, Friend PJ, Miloud T, Scheffold A, Secchi A, Crisalli K, Kang SM, Hilton R, Banas B, Blanco G, Volk HD, Lombardi G, Wood KJ, Geissler EK. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *Lancet*. 2020;395(10237):1627-39.
137. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012;64(2):109-30.
138. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;699:1-29.
139. Wiczorek G, Asemisen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, Stauch D, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmuller U, Grutzkau A, Mustea A, Huehn J, Scheibenbogen C, Olek S. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res*. 2009;69(2):599-608.
140. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:541-66.
141. Fujii H, Josse J, Tanioka M, Miyachi Y, Husson F, Ono M. Regulatory T Cells in Melanoma Revisited by a Computational Clustering of FOXP3+ T Cell Subpopulations. *J Immunol*. 2016;196(6):2885-92.
142. Afshan G, Afzal N, Qureshi S. CD4+CD25(hi) regulatory T cells in healthy males and females mediate gender difference in the prevalence of autoimmune diseases. *Clin Lab*. 2012;58(5-6):567-71.
143. Zhao T, Yang C, Xue Y, Qiu YY, Hu L, Qiu Y, Wang X, Yang B, Rong R, Xu M, Zhu T. Impact of basiliximab on the proportion of regulatory T cells and their subsets early after renal transplantation: a preliminary report. *Transplant Proc*. 2012;44(1):175-8.
144. Bouvy AP, Klepper M, Kho MM, Boer K, Betjes MG, Weimar W, Baan CC. The impact of induction therapy on the homeostasis and function of regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(8):1587-97.

145. Krystufkova E, Sekerkova A, Striz I, Brabcova I, Girmanova E, Viklicky O. Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(6):2576-82.
146. Abadja F, Alamartine E, Berthoux F, Mariat C, Genin C, Lambert C. Quantification of circulating regulatory T cells by flow cytometry in kidney transplant patients after basiliximab induction therapy. *Transplantation*. 2010;89(3):366-8.
147. Alvarez Salazar EK, Cortes-Hernandez A, Aleman-Muench GR, Alberu J, Rodriguez-Aguilera JR, Recillas-Targa F, Chagoya de Sanchez V, Cuevas E, Mancilla-Urrea E, Perez Garcia M, Mondragon-Ramirez G, Vilatoba M, Bostock I, Hernandez-Mendez E, De Rungs D, Garcia-Zepeda EA, Soldevila G. Methylation of FOXP3 TSDR Underlies the Impaired Suppressive Function of Tregs from Long-term Belatacept-Treated Kidney Transplant Patients. *Front Immunol*. 2017;8:219.
148. Hefele F, Ditsch A, Krysiak N, Caldwell CC, Biberthaler P, van Griensven M, Huber-Wagner S, Hanschen M. Trauma Induces Interleukin-17A Expression on Th17 Cells and CD4+ Regulatory T Cells as Well as Platelet Dysfunction. *Front Immunol*. 2019;10:2389.
149. Serve R, Sturm R, Schimunek L, Stormann P, Heftrig D, Teuben MPJ, Oppermann E, Horst K, Pfeifer R, Simon TP, Kalbas Y, Pape HC, Hildebrand F, Marzi I, Relja B. Comparative Analysis of the Regulatory T Cells Dynamics in Peripheral Blood in Human and Porcine Polytrauma. *Front Immunol*. 2018;9:435.
150. Zhang Y, Li XF, Wu W, Chen Y. Dynamic changes of circulating T-helper cell subsets following severe thoracic trauma. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(11):21106-13.
151. Albertsmeier M, Quaiser D, von Dossow-Hanfstingl V, Winter H, Faist E, Angele MK. Major surgical trauma differentially affects T-cells and APC. *Innate Immun*. 2015;21(1):55-64.
152. Litjens NH, van Druningen CJ, Betjes MG. Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naive T lymphocytes. *Clin Immunol*. 2006;118(1):83-91.
153. Litjens NH, Boer K, Zuijderwijk JM, Klepper M, Peeters AM, Verschoor W, Kraaijeveld R, Betjes MG. Natural regulatory T cells from patients with end-stage renal disease can be used for large-scale generation of highly suppressive alloantigen-specific Tregs. *Kidney Int*. 2017;91(5):1203-13.
154. 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.
155. Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3(+) Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity*. 2019;50(2):302-16.
156. Schaier M, Seissler N, Schmitt E, Meuer S, Hug F, Zeier M, Steinborn A. DR(high+)CD45RA(-)-Tregs potentially affect the suppressive activity of the total Treg pool in renal transplant patients. *PLoS One*. 2012;7(3):e34208.
157. Demaret J, Gossez M, Venet F, Monneret G. Intracellular Flow Cytometry Improvements in Clinical Studies. *Methods Mol Biol*. 2017;1524:315-27.
158. Law JP, Hirschhorn DF, Owen RE, Biswas HH, Norris PJ, Lanteri MC. The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in identifying CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Cytometry A*. 2009;75(12):1040-50.
159. Schlickeiser S, Boes D, Streitz M, Sawitzki B. The use of novel diagnostics to individualize immunosuppression following transplantation. *Transpl Int*. 2015;28(8):911-20.
160. Pitoiset F, Barbie M, Monneret G, Braudeau C, Pochard P, Pellegrin I, Trauet J, Labalette M, Klatzmann D, Rosenzweig M. A standardized flow cytometry procedure for the monitoring of regulatory T cells in clinical trials. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(5):621-6.
161. Revilla-Nuin B, de Bejar A, Martinez-Alarcon L, Herrero JI, Martinez-Caceres CM, Ramirez P, Baroja-Mazo A, Pons JA. Differential profile of activated regulatory T cell subsets and microRNAs in tolerant liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2017;23(7):933-45.

162. Akimova T, Kamath BM, Goebel JW, Meyers KE, Rand EB, Hawkins A, Levine MH, Bucuvalas JC, Hancock WW. Differing effects of rapamycin or calcineurin inhibitor on T-regulatory cells in pediatric liver and kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2012;12(12):3449-61.
163. Tatura R, Zeschnigk M, Adamzik M, Probst-Kepper M, Buer J, Kehrmann J. Quantification of regulatory T cells in septic patients by real-time PCR-based methylation assay and flow cytometry. *PLoS One*. 2012;7(11):e49962.
164. Whitehouse G, Gray E, Mastoridis S, Merritt E, Kodela E, Yang JHM, Danger R, Mairal M, Christakoudi S, Lozano JJ, Macdougall IC, Tree TIM, Sanchez-Fueyo A, Martinez-Llordella M. IL-2 therapy restores regulatory T-cell dysfunction induced by calcineurin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(27):7083-8.
165. Tan L, Qiu T, Xiang R, Cao C, Deng Y, Tao Z, Xu Y. Down-regulation of Tet2 is associated with Foxp3 TSDR hypermethylation in regulatory T cell of allergic rhinitis. *Life Sci*. 2020;241:117101.
166. He D, Yang CX, Sahin B, Singh A, Shannon CP, Oliveria JP, Gauvreau GM, Tebbutt SJ. Whole blood vs PBMC: compartmental differences in gene expression profiling exemplified in asthma. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2019;15:67.
167. Gautam A, Donohue D, Hoke A, Miller SA, Srinivasan S, Sowe B, Detwiler L, Lynch J, Levangie M, Hammamieh R, Jett M. Investigating gene expression profiles of whole blood and peripheral blood mononuclear cells using multiple collection and processing methods. *PLoS One*. 2019;14(12):e0225137.
168. BioGPS. 2020 [Available from: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=4929>].
169. Unnikrishnan A, Hadad N, Masser DR, Jackson J, Freeman WM, Richardson A. Revisiting the genomic hypomethylation hypothesis of aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1418(1):69-79.
170. Montarolo F, Perga S, Martire S, Navone DN, Marchet A, Leotta D, Bertolotto A. Altered NR4A Subfamily Gene Expression Level in Peripheral Blood of Parkinson's and Alzheimer's Disease Patients. *Neurotox Res*. 2016;30(3):338-44.
171. Hwang KA, Kim HR, Kang I. Aging and human CD4(+) regulatory T cells. *Mech Ageing Dev*. 2009;130(8):509-17.
172. Lages CS, Suffia I, Velilla PA, Huang B, Warshaw G, Hildeman DA, Belkaid Y, Chougnat C. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J Immunol*. 2008;181(3):1835-48.
173. Yue X, Lio CJ, Samaniego-Castruita D, Li X, Rao A. Loss of TET2 and TET3 in regulatory T cells unleashes effector function. *Nat Commun*. 2019;10(1):2011.
174. Heylen L, Thienpont B, Naesens M, Busschaert P, Depreeuw J, Smeets D, Jochmans I, Monbaliu D, Pirenne J, Lerut E, Ghesquiere B, Kuypers D, Lambrechts D, Sprangers B. Ischemia-Induced DNA Hypermethylation during Kidney Transplant Predicts Chronic Allograft Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(5):1566-76.
175. Someya K, Nakatsukasa H, Ito M, Kondo T, Tateda KI, Akanuma T, Koya I, Sanosaka T, Kohyama J, Tsukada YI, Takamura-Enya T, Yoshimura A. Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation. *Int Immunol*. 2017;29(8):365-75.
176. Kouakanou L, Peters C, Sun Q, Floess S, Bhat J, Huehn J, Kabelitz D. Vitamin C supports conversion of human gammadelta T cells into FOXP3-expressing regulatory cells by epigenetic regulation. *Sci Rep*. 2020;10(1):6550.
177. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*. 2017;18(9):517-34.
178. Perga S, Martire S, Montarolo F, Giordani I, Spadaro M, Bono G, Corvisieri S, Messuti I, Panzica G, Orlandi F, Bertolotto A. The Footprints of Poly-Autoimmunity: Evidence for

Common Biological Factors Involved in Multiple Sclerosis and Hashimoto's Thyroiditis. *Front Immunol.* 2018;9:311.

179. Tao R, Hancock WW. Resistance of Foxp3+ regulatory T cells to Nur77-induced apoptosis promotes allograft survival. *PLoS One.* 2008;3(5):e2321.

180. Newell KA, Adams AB, Turka LA. Biomarkers of operational tolerance following kidney transplantation - The immune tolerance network studies of spontaneously tolerant kidney transplant recipients. *Hum Immunol.* 2018;79(5):380-7.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katayoun Behnam Sani, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Veränderungen in der Frequenz regulatorischer T-Zellen nach Nierentransplantation und epigenetische Regulation stabiler Foxp3-Expression“ (auf Englisch: „Changes in the frequency of regulatory T cells after kidney transplantation and epigenetic regulation of stable Foxp3 expression“) 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.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] 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) 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

Lebenslauf

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

Publikationsliste

- **Behnam Sani K, Sawitzki B.** Immune monitoring as prerequisite for transplantation tolerance trials. *Clinical and Experimental Immunology*. 2017;189(2):158-70.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner Promotion am Institut und auch privat unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Birgit Sawitzki, die das spannende Thema bereitstellte und mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen. Neben der hervorragenden Betreuung waren Ihre Expertise, Ihre Begeisterung für die Wissenschaft sowie Ihr Engagement, auch in anderen Bereichen, stets inspirierend und ein großes Vorbild für mich. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Auch möchte ich allen Mitgliedern der AG Sawitzki danken, für die herzliche Aufnahme in die Gruppe, die schöne Zeit und die unermüdliche Unterstützung, besonders in schwierigen Zeiten. Insbesondere möchte ich Katrin für die TSDR-Analysen und Christine für die FACS-Messungen und FlowJo-Auswertungen danken. Meinen Rettern in der Not, Katharina und Christina, danke ich für ihre Hilfe bei allen Fragen und der Durchführung der Experimente. Franziska danke ich für die Hilfe bei der Probandenrekrutierung. Auch bedanke ich mich bei AG Meisel für die schöne Zeit und toller Zusammenarbeit.

Herrn Mathias Streitz danke ich für die Kompensationen, die Auswertung des BM04-Panels sowie seine Hilfe bei der Auswertung der ONE Study-Daten. Herrn Anders Kverneland danke ich für die Daten und Proben für die Experimente aus Vollblut gesunder Probanden. Dr. Désirée Kunkel und Jens Hartwig danke ich für die Zellsortierungen.

Ein großer Dank an meine Freunde (Mahnoosh, Victor, Sabrin, Darja und Jacqueline) die immer ein offenes Ohr für mich hatten. Ivelina, Amani und Lydia danke ich darüber hinaus für das Lesen der Arbeit und die Verbesserungsvorschläge. Auch danke ich Alex für seine Unterstützung und seine Geduld während aller schwierigen Zeiten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich stets in allen Lebenslagen unterstützt. Meinen Schwestern, Leily und Shirin, danke ich für ihre Geduld und Hilfe in allen möglichen Bereichen. Insbesondere möchte ich meinen Eltern danken, denen diese Arbeit gewidmet ist und ohne sie das Studium und die Promotion nicht möglich gewesen wären. Mama, du bist wahrlich die Beste und Papa, ich vermisse dich.