

## 1. Einleitung

Das Immunsystem der Wirbeltiere muss auf eine Vielzahl von Pathogenen reagieren können. Diese Fähigkeit wird durch die zwei Hauptarme des Immunsystems, die angeborene und die adaptive Immunität sichergestellt. Die angeborene Immunität sichert die Abwehr gegen zahlreiche Pathogene und wird hauptsächlich durch Zellen, die mit entsprechenden Rezeptoren ausgestattet sind, welche typische Fremdanigene wie zum Beispiel CpG (*Cytosin poly Guanin*) Motive auf bakterieller DNA oder repetitive bakterielle Antigene wie zum Beispiel LPS (Lipopolysaccharid) erkennen, vermittelt. Hierzu zählen zum Beispiel Makrophagen, dendritische Zellen (DC), Natürliche Killer Zellen (NK) und Granulozyten. Letztere können weiterhin in Basophile, Eosinophile als auch Neutrophile unterteilt werden. Diese erste unmittelbare Stufe der Immunität, wie sie auch schon in Invertebraten vorkommt, sichert jedoch den Organismus nicht vor evolutionären Strategien bestimmter Pathogene, wie zum Beispiel Viren und enkapsulierter Bakterien, sich dieser Kontrolle zu entziehen.

Hier setzt die erworbene (adaptive) Immunität ein, die nur in höheren Organismen vorkommt. Das System der adaptiven Immunität ermöglicht dem Organismus, auf fast jedes Pathogen individuell und spezifisch zu reagieren. Diese Eigenschaft basiert hauptsächlich auf B- und T-Lymphozyten und wird aufgrund ihrer besonderen Fähigkeiten und einem Zusammenspiel mit den Zellen der angeborenen Immunität vermittelt. Die Ausprägung von B- (BCR) und T-Zellrezeptoren (TCR) an der Oberfläche dieser Zellen ermöglicht die Erkennung von Antigenen und die Einleitung einer spezifischen Immunreaktion, welche in der Regel zu einer lebenslangen Immunität, bei Reinfektion mit dem gleichen Erreger, dem „immunologischen Gedächtnis“ führen kann.

Beide Zelltypen übernehmen unterschiedliche Aufgaben im Immunsystem von Vertebraten. T-Zellen erkennen ausschließlich Antigene, welche zusammen mit körpereigenen Proteinen (MHC; *major histocompatibility complex*) auf Zellen präsentiert werden. Die T-Zell vermittelte Immunreaktion wird daher als „zelluläre Immunantwort“ bezeichnet. T-Zellen prägen membranständige TCR aus, welche sich aus zwei Immunglobulin (Ig) ähnlichen Polypeptidketten, die ein Heterodimer bilden, zusammensetzen. Der BCR setzt sich aus zwei identischen schweren und leichten, über Disulfid-Brücken verbundene Immunglobulin-Ketten zusammen. Der BCR kann neben einer Membranausprägung zusätzlich als Antikörper von B-Zellen in Blut und Lymphe sezerniert werden, wo Antigene gebunden und für weitere

Komponenten des Immunsystems (zum Beispiel: Komplementsystem) markiert werden können (humorale Immunantwort). Um diese Reaktionen zu vermitteln zu können, sind die BCR-Ig Moleküle in konstante und variable Domänen geteilt. Die variablen Domänen (V) ermöglichen die Erkennung und Bindung von Antigenen, während die konstanten Domänen (C) weitere Effektorfunktionen wie zum Beispiel Opsonierung oder Aktivierung des Komplementsystems vermitteln können. Der TCR von T-Zellen ist hier analog strukturiert. Variable und konstante Domänen werden von einzelnen Gensegmenten kodiert, die über somatische Genumlagerungen (V(D)J-Rekombination), vermittelt durch die lymphozytenspezifischen Rekombinasen RAG1 und RAG2 (*recombinase activating gene1* und 2), verknüpft werden. Durch diesen Mechanismus ist es T- als auch B-Lymphozyten erlaubt, ein fast unbegrenztes Repertoire von TCR oder BCR mit verschiedenen Spezifitäten zu produzieren. Diese Eigenschaft bietet die Voraussetzung für die adaptive Immunität und ermöglicht die Erkennung von theoretisch fast allen Fremdan antigenen.

Das zentrale Prinzip der adaptiven Immunität wurde schon um 1950 von Burnet unter dem Begriff der „klonalen Selektion“ weitgehend richtig postuliert (zur Übersicht siehe (1, 2)). Die Hauptaussagen seiner damaligen Theorie konnten bis heute zum Großteil durch die moderne Wissenschaft bestätigt werden. Die vier wichtigsten Aussagen beinhalten i) jeder Lymphozyt trägt eine individuelle und einzigartige Rezeptorspezifität, ii) nur ein hochspezifischer Kontakt zwischen Antigen und Rezeptor aktiviert den Lymphozyten, iii) aktivierte Lymphozyten bilden klonale Nachkommen mit der gleichen Rezeptorspezifität und iv) Rezeptorspezifitäten, welche Autoantigene erkennen, werden frühzeitig aus dem Repertoire eliminiert.

### **1.1 Immunologische Selbst-Toleranz**

Aufgrund der praktisch unbegrenzten Anzahl an möglichen Rezeptorspezifitäten bei der B- und T-Zell Entwicklung und deren zufälligen Assemblierung, erscheint es wahrscheinlich, dass auch häufig Rezeptoren mit autoreaktiver Spezifität generiert werden. Schon vor über 100 Jahren wurde dieses potentielle Risiko von Paul Ehrlich als „Horror Autotoxikus“ vermutet (zur Übersicht siehe (3)). Da autoreaktive T- oder B-Zellen für den Organismus ein hohes Risiko darstellen (eine unkontrollierte „Selbst-Erkennung“ von Autoantigenen würde zwangsweise in zahlreichen Autoimmunerkrankungen münden), müssen autoreaktive

Rezeptorspezifitäten von B- als auch T-Zellen eliminiert werden (immunologische Selbst-Toleranz). Dieser Vorgang, von Burnet als „klonale Deletion“ postuliert, ist essentiell für das Überleben des Individuums und die Funktion der adaptiven Immunität. Der Mechanismus der Toleranz, d.h. die Kontrolle und Vermeidung von Zellen mit autoreaktiven Rezeptorspezifitäten, ist für B- als auch T-Zellen ein komplexer Prozess und erfordert zahlreiche Kontrollmechanismen des Immunsystems.

Toleranz kann in zwei Punkte unterteilt werden: Die zentrale Toleranz überwacht die Reifung von B- und T-Zellen in den primären (zentralen) lymphoiden Organen im Knochenmark und Thymus und verhindert zum großen Teil eine Entstehung von Lymphozyten mit autoreaktiven Rezeptorspezifitäten. Dieser Zell-intrinsische Prozess (auch rezessive Toleranz) ist allerdings nicht völlig fehlerfrei und lässt somit zum Teil die Entstehung von Lymphozyten mit autoreaktiven Rezeptorspezifitäten zu. Dieses konnte zum Beispiel durch Experimente gezeigt werden, die eine autoreaktive T-Zellantwort durch Immunisierung mit Selbst-Antigen in Kombination mit starken Adjuvanzen in naiven Versuchstieren hervorrufen konnten (4). Weiterhin kann durch eine transgene Überexpression von Kostimulatoren und Zytokinen in unterschiedlichen Geweben eine Autoimmunattacke hervorgerufen werden (5). Zur Kontrolle dieser potentiell gefährlichen Zellen sind weitere Mechanismen gefordert, die unter dem Begriff der peripheren Toleranz zusammengefasst werden.

### 1.1.1 Zentrale Toleranz

Die zentrale Toleranz bezeichnet die Kontrolle der Rezeptorspezifitäten bei der Lymphozytenreifung. Diese findet für B-Zellen im Knochenmark und für T-Zellen im Thymus statt. Für beide Zelltypen geht sie einher mit der somatischen Umlagerung der Ig-Gene. Die Selbst-Toleranz bei der T-Zell Reifung wird durch zwei zentrale Aspekte kontrolliert.

Die T-Zell Reifung durchläuft unterschiedliche Stufen. Ausgehend von pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen entstehen im Knochenmark Pro-T-Zellen, welche über das Blut in den Thymus einwandern. Zunächst werden hier die TCR-Gene (V- (*variability*), D- (*diversity*) und J-Elemente (*joining*)) der  $\beta$ -Kette umgelagert, welche zu einer Expression von einer TCR- $\beta$  Kette zusammen mit dem preT $\alpha$  Molekül an der Oberfläche führen (preTCR). Nach erfolgreicher preTCR Expression, wird der Pre-T-Zelle ermöglicht, ebenfalls die Genelemente der  $\alpha$ -Kette des TCR umzulagern (V- und J-Elemente). Über den so genannten Vorgang des „Allelen-Ausschluss“ (6) wird in beiden Fällen garantiert, dass vorwiegend nur

jeweils eine TCR- $\beta$  oder TCR- $\alpha$  Kette von der Zelle ausgeprägt wird (zur Übersicht siehe (7)). Nach erfolgreicher Ausprägung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zum T-Zellrezeptor (TCR), durchläuft der Thymozyt dann die zwei Kontrollmechanismen der zentralen Toleranz.

Im Laufe dieses Prozesses erfolgt zunächst eine positive, dann eine negative Selektion der Rezeptorspezifität des Thymozyten. Zunächst werden im Thymus alle Thymozyten auf die Funktionalität ihres TCR hin überprüft, welches anhand von Peptid-MHC ausprägender Thymusepithelzellen erfolgt (positive Selektion). Hier wird auch die weitere Differenzierung der T-Zelle, abhängig von der Korezeptor Expression, bestimmt. Erkennt die Zelle einen MHC-Selbst-Peptid Komplex mit Hilfe des Korezeptors *cluster of differentiation* (CD) 8, erfolgt eine weitere Entwicklung zur CD8+ CTL (*cytotoxic T lymphocyte*). Bindet er MHC-Selbst-Peptid im Zusammenhang mit CD4, reift die Zelle zur CD4+ Th-Zelle (Helferzelle). Wird kein MHC-Selbst-Peptid Komplex erkannt, besteht für die Zellen die Möglichkeit ihre Rezeptorspezifität durch sekundäre Genumlagerungen zu editieren (8, 9). Der zweite Schritt der Selektion (negative Selektion) wird erneut durch Thymusepithelzellen vermittelt. Erkennt eine CD4+ oder CD8+ Zelle Selbst-Peptid-MHC mit zu hoher Avidität, leitet ein zelluläres Signal den gesteuerten Zelltod (Apoptose) ein. Durch diese beiden Mechanismen wird ein Großteil von potentiell autoreaktiver Rezeptorspezifitäten schon bei der Reifung von T-Zellen vermieden. Nachdem die Thymozyten diese Prozesse durchlaufen haben, können sie den Thymus als reife, naive CD4+ oder CD8+ T-Zellen verlassen und in die Peripherie einwandern und die sog. sekundären (peripheren) lymphoiden Organe, wie zum Beispiel Milz und Lymphknoten besiedeln.

Obwohl bestimmte Epithelzellen sogar einen speziellen Transkriptionsfaktor ausprägen, der ihnen ermöglicht zahlreiche Selbst-Antigene zu exprimieren um sie T-Zellen zu präsentieren (AIRE, *autoimmune regulator*), wird tatsächlich nicht jedes Autoantigen im Thymus exprimiert (10, 11). Da der Allele-Ausschluss der TCR $\alpha$  Ketten im Vergleich zur Ig leichten Kette des BCR (12) nicht sehr stringent ist, können weiterhin bis zu ~20% der T-Zellen auch zwei unterschiedliche TCR $\alpha$  Ketten ausprägen (13, 14). Dieses könnte theoretisch dazu führen, dass eine T-Zelle mit einem autoreaktiven Rezeptor der negativen Selektion entkommen könnte. Beide o.g. Punkte können also zur Entstehung von potentiell autoreaktiven und für den Körper gefährlichen T-Zellen in der Peripherie beitragen (zur Übersicht siehe (15)).

### 1.1.2 Periphere Toleranz

Da die zentrale Toleranz nicht vollständig ist (s.o.), müssen weitere Mechanismen vorhanden sein, potentiell autoreaktive T-Zellen in der Peripherie zu vermeiden oder zu kontrollieren, um mögliche Autoimmunreaktionen zu verhindern. Hier wirken hauptsächlich drei weitere Mechanismen, die eine ungewollte Aktivierung von autoreaktiven Zellen in der Peripherie kontrollieren. Diese Prozesse können in aktive oder passive Mechanismen eingeordnet werden: i) Jede T-Zelle benötigt zur Aktivierung neben der TCR-Komplex MHC-Peptid Bindung ein zweites Signal (Kostimulus), der von der antigenpräsentierenden Zelle (APC) geliefert wird. Dieses Signal der APC wird in der Regel nur im Umfeld einer Entzündung effektiv durch bestimmte Faktoren, wie zum Beispiel durch pro-inflammatorische Zytokine induziert. Ein Beispiel für diesen passive Kontrollmechanismus stellen unreife DC dar. Im ruhenden, nicht aktivierten Zustand exprimieren sie nur wenige kostimulatorische Moleküle, wie zum Beispiel CD80 und CD86, und induzieren daher bei Kontakt mit antigenspezifischen T-Zellen Anergie, wenn sie nicht vorher durch bestimmte Faktoren während einer Entzündung zur Reifung angeregt wurden. Auch zu späteren Zeitpunkten können diese anergischen T-Zellen nicht mehr unter normalen Bedingungen aktiviert werden. ii) Weiterhin kann eine wiederholende und andauernde Stimulation mit Selbst-Antigen den Aktivierungsinduzierten-Zelltod (AiCD) hervorrufen und somit autoreaktive Zellen eliminieren. iii) Kommt es in manchen Situationen dennoch zu einer Aktivierung von autoreaktiven Zellen, können auch aktive Mechanismen eine Autoimmunreaktion kontrollieren. Die aktive Kontrolle von peripheren, autoreaktiven Lymphozyten kann von spezialisierten Zellen des Immunsystems ausgeübt werden. Zu diesen Zelltypen, die in der Regel Regulatorische- oder Suppressorzellen genannt werden und eine dominante tolerogene Rolle ausüben, d.h. aktiv andere Zellen regulieren, können bestimmte Gruppen von T-Zellen, B-Zellen aber auch dendritische Zellen gehören (zur Übersicht siehe (3, 16-20)).

Diese Zelltypen sind je nach Stimulation und Ursprung in der Lage, autoreaktive Zellen nach Aktivierung zu kontrollieren. Hierfür scheint häufig auf ähnliche Strategien zurückgegriffen zu werden. So verwenden manche Zelltypen die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel Interleukin 10 (IL-10) oder *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), andere greifen auf zellkontaktabhängige Suppressionsmechanismen zurück. So konnten zum Beispiel neben IL-10 exprimierenden regulatorischen CD4+ T-Zellen auch IL-10 sezernierende B-Zellen bei der Kontrolle von Autoimmunkrankheiten im Mausmodell identifiziert werden (21). Weiterhin wurde vor kurzem eine DC Population mit regulatorischen Potential im Menschen beschrieben (22). Diese Population kontrolliert die T-

Zell Stimulation durch die Ausschüttung des für proliferierende T-Zellen toxischen Tryptophan Kataboliten Kynurein, welches durch die Expression eines spezifischen Enzyms (*indoleamine 2,3-dioxygenase* / IDO) gesteuert wird (23). Eine besondere Rolle scheinen jedoch regulatorische T-Zellen bei der Erhaltung der peripheren Toleranz zu spielen. Insbesondere CD4+ regulatorische T-Zellen scheinen selbst oder im Zusammenspiel mit weiteren Zellpopulationen, wie zum Beispiel den IDO+ DC, eine zentrale Aufgabe bei der Vermeidung von peripheren Autoimmunreaktionen einzunehmen (zur Übersicht siehe (24)).

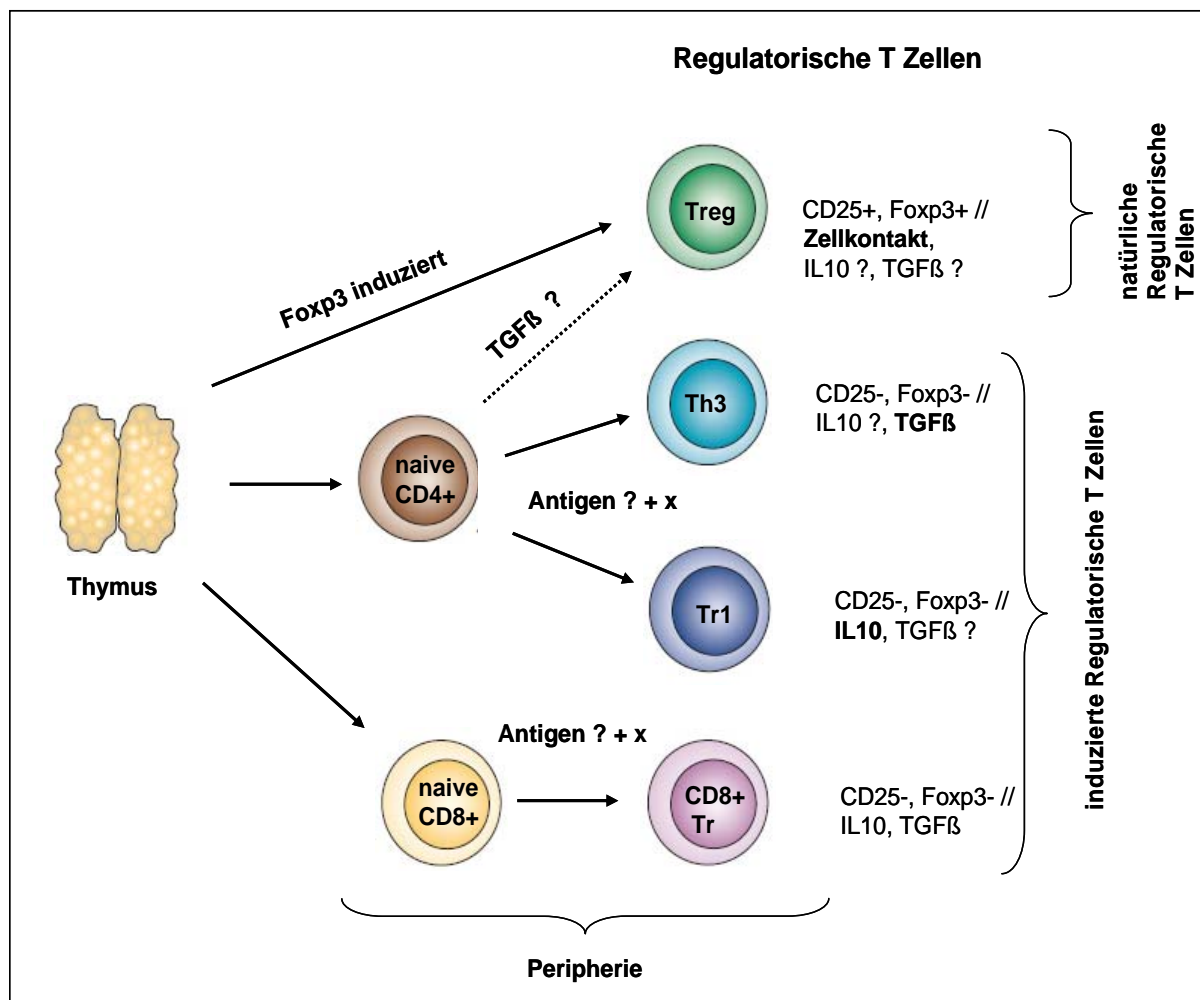
## **1.2 Regulatorische T-Zellen zur Aufrechterhaltung peripherer Toleranz**

Vor über 30 Jahren wurde erstmals die Idee von Suppressor T-Zellen zur Ausübung dominanter Toleranz postuliert (25). Zahlreiche Beobachtungen unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen unterstützten diese Hypothese und eröffneten in den 1970er und 80er Jahren eine intensive Forschungsarbeit auf diesem Gebiet. Vermutet wurde eine aktive Suppression aufgrund von spezifischen Zellpopulationen und löslichen Faktoren, wobei es jedoch niemals gelang, diese Faktoren reproduzierbar zuzuordnen oder zu isolieren. Als sich dann herausstellte, dass zentrale Punkte der Theorie nachweislich inkorrekt waren (der postulierte Genlocus für Suppressorfaktoren: MHC I-J war nicht existent), wurde weitestgehend Abstand von der Theorie der Suppressorzellen genommen. Die Entdeckung von Th1- und Th2-Zellen konnte dann auch eine plausible Erklärung für die zuvor beobachteten Phänomene liefern. Diese wurden somit durch eine Th1 und Th2 geprägte Immundeviation erklärt (zur Übersicht siehe (26-28)).

Zur etwa gleichen Zeit wurden aber auch erstmals tatsächlich experimentelle Beweise für die Existenz von dominanter T-Zell vermittelter Toleranz geliefert, auf denen die heutige Renaissance auf dem Feld der Suppressor T-Zell Forschung basiert. Im Jahre 1969 konnte erstmals gezeigt werden, dass eine neonatale Thymektomie um Tag 3 aber nicht zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 7) nach Geburt, zu einer autoimmun- vermittelten Eierstock Abstoßung in naiven Mäusen führt (29). Penhale und Kollegen konnten 1973 von einem ähnlichen Phänomen berichten. Hier führte eine Thymusresektion in adulten Ratten, gefolgt von subletaler Röntgenbestrahlung zur Autoimmun-Thyroiditis (30). Beide Autoimmunkrankheiten konnten durch den Transfer von normalen T-Zellen, insbesondere

CD4+ T-Zellen verhindert werden, so dass die Depletion von Suppressorzellen als Grund für die Autoimmunreaktion vermutet wurde. (31, 32). Diese zentralen Beobachtungen und die Entdeckung von Zelloberflächenproteinen auf T-Zellen (Marker), die mit der regulatorischen Kapazität segregieren, eröffneten dem Feld der regulatorischen T-Zellen eine neue Basis (zur Übersicht siehe (24, 33)).

Der entscheidende Durchbruch auf dem Feld gelang dann aber 1995 Sakaguchi und Kollegen mit der Entdeckung, dass CD25 (die  $\alpha$ -Kette vom Interleukin 2 (IL-2) Rezeptor) konstitutiv auf CD4+ regulatorischen Zellen exprimiert wird (34). Aufgrund der Entstehung im Thymus werden diese CD25+ CD4+ regulatorischen T-Zellen auch natürliche CD25+ regulatorische T-Zellen (Treg) genannt (zur Übersicht siehe (18)).



**Abbildung 1: Regulatorische T-Zellen.** Das Diagramm zeigt schematisch die bisher bekannten Hauptpopulationen von CD4+ oder CD8+ regulatorischen T-Zellen und ihren Ursprung und Wirkungsweise. Treg= CD25+ CD4+ natürliche regulatorische T-Zelle, Th3= T Helfer 3 Zelle, Tr1= regulatorische Typ 1 Zelle CD8+ Tr= CD8+ regulatorische T-Zelle. In der rechten Spalte ist der Phänotyp und die Wirkungsweise angezeigt. Fettgedruckt ist die jeweils vorherrschende Art der Suppression. Übernommen in veränderter und ergänzter Form aus (17).

Neben den CD25+ Treg konnten jedoch noch weitere regulatorische T-Zellpopulationen definiert werden. Zu diesen erst kürzlich sicher identifizierten regulatorischen T-Zellpopulationen zählen auch die sogenannten Tr1 (T regulatorisch 1) Zellen, welche große Mengen an IL-10 produzieren können. Dieser Suppressor T-Zelltyp scheint jedoch über bestimmte Stimuli in der Peripherie zu entstehen (zur Übersicht siehe (35)). Weiterhin konnten TGF- $\beta$  sezernierende Th3-Zellen (T Helfer 3), ebenfalls peripher induziert, beobachtet werden. Auch unter den Korezeptor CD8 tragenden T-Zellen konnte eine bestimmte Subpopulation an Zellen mit regulatorischen Potential ausgemacht werden, wobei diese Zellen eher selten vorzukommen scheinen (zur Übersicht siehe (17)). Ferner konnte zum Teil für bestimmte NKT-Zellen (natürliche *killer* T-Zellen) eine immunoregulatorische Bedeutung manifestiert werden. Allerdings zeigen diese Zellen eine Vielzahl von weiteren speziellen Funktionen (17). Wie schon zuvor angedeutet (s.o.), können auch Th1- und Th2-Zellen unter bestimmten Bedingungen durch eine selektive Sekretion von Zytokinen Immunantworten regulieren (zur Übersicht siehe (36)).

Die größte Bedeutung zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz in Wirbeltieren scheinen jedoch natürliche CD25+ regulatorische T-Zellen und induzierbare, IL-10 produzierende Tr1-Zellen oder TGF- $\beta$  sezernierende Th3-Zellen zu haben. Abbildung 1 zeigt schematisch die bisher charakterisierten Suppressor T-Zelltypen im Vergleich zueinander. Im Folgenden soll auf die drei CD4+ Suppressor T-Zelltypen, mit einem Schwerpunkt auf den CD25+ Treg Zellen im Besonderen, eingegangen werden.

### 1.2.1 Tr1 und Th3 CD4+ regulatorische T-Zellen

IL-10 produzierende Tr1- und TGF- $\beta$  produzierende Th3-Zellen unterscheiden sich in drei Haupteigenschaften von natürlichen CD25+ Treg: i) Sie reifen nicht im Thymus, sondern können peripher induziert werden (Abbildung 1), ii) Sie zeigen eine immunsuppressorische Wirkung vorwiegend durch die Sekretion von immunomodulatorischen Zytokinen und iii) Können beide Zelltypen unter bestimmten Bedingungen auch *in vitro* aus naiven CD4+ T-Zellen induziert werden.

Tr1-Zellen wurden erstmals 1997 beschrieben. Groux und Kollegen konnten zeigen, dass chronisch, im Beisein von IL-10, aktivierte CD4+ T-Zellen sich anergisch verhalten und selbst hohe Mengen an IL-10 produzieren (37). Diese Zellen haben das Potential, antigenspezifisch eine durch den Transfer von CD4+ CD45RB hochexprimierende Zellen in B- und T-Zell defizienten SCID Mäusen (*severe combined immunodeficiency*) induzierte Kolitis IL-10 abhängig zu kontrollieren. Über das gleiche Protokoll konnten Tr1-Zellen auch aus



humanen CD4+ T-Zellen generiert werden. Zellen mit ähnlichen Eigenschaften konnten ebenfalls durch die Stimulation von CD4+ T-Zellen über unreife dendritische Zellen im Beisein von IL-10 induziert werden, oder in Anwesenheit von immunomodulatorischen Drogen aus naiven CD4+ T-Zellen polarisiert werden (zur Übersicht siehe (35, 38, 39)). Obwohl Tr1-Zellen auch nach Aktivierung CD25 exprimieren und *in vitro* eine Effektor T-Zell Proliferation ähnlich wie Treg Zellen IL-10 unabhängig supprimieren, scheinen sie nicht im direktem Zusammenhang mit CD25+ Treg zu stehen. Experimente konnten zeigen, dass Tr1-Zellen auch aus transgenen CD4+ T-Zellen auf einem RAG (negativen Hintergrund induziert werden können, welche nachweislich keine CD25+ Treg produzieren. Weiterhin scheinen Tr1-Zellen nicht den CD25+ Treg spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 auszuprägen (zur Übersicht siehe (40-42)).

Th3-Zellen wurden initial im Zusammenhang mit oraler Toleranz beschrieben. Die orale Gabe von geringen Dosen MBP (*myelin basic protein*), einer Komponente der Myelinscheide im ZNS (zentrales Nervensystem), konnte eine immunsuppressorische Zellpopulation induzieren, die über die Sekretion von großen Mengen an TGF- $\beta$  und Interleukin 4 (IL-4) in der Lage war, eine experimentell induzierte autoimmune Entzündung des ZNS zu kontrollieren (EAE, *experimental autoimmune ecephalomyelitis*) (43). Ähnlich wie Tr1-Zellen, können auch diese Zellen aus humanen oder murinen, naiven CD4+ T-Zellen *in vitro*, im Beisein von TGF- $\beta$  und IL-4 induziert werden (zur Übersicht siehe (17, 39, 43)).

Der Zusammenhang dieser Zellpopulationen mit CD25+ Treg ist noch weitgehend unverstanden, möglicherweise ergänzen sich jedoch die drei Populationen synergistisch bei der Kontrolle unterschiedlicher Immunreaktionen (39). Ein wesentlicher Vorteil von Th3 und vor allem von Tr1-Zellen ergibt sich allerdings daraus, dass beide Populationen aus naiven T-Zellen *in vitro* generiert und weiter expandiert werden können. Diese Protokolle bieten somit einen großen Vorteil für eine mögliche klinische Anwendung von antigenspezifischen regulatorischen T-Zellen.

### 1.2.2 Natürliche CD25+CD4+ regulatorische T-Zellen

Natürliche CD25+ regulatorische T-Zellen (Treg) spielen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren immunologischen Selbst-Toleranz. Analoge Populationen von CD25+ Treg wurden sowohl in Nagetieren als auch im Menschen beschrieben. Sie stellen die zurzeit am besten erforschte Gruppe von regulatorischen CD4+ T-Zellen dar. Primär scheinen CD25+ Treg einen thymalen Ursprung zu haben und scheinen eine früh spezifizierte, unabhängige CD4+ T-Zelllinie, mit der Fähigkeit zur eigenen Selbsterneuerung,

darzustellen. Diese Erkenntnis lieferte die kürzlich gemachte Entdeckung des mutmaßlichen Treg spezifischen Schlüssel-Transkriptionsfaktor Foxp3 (zur Übersicht siehe (42, 44)). Es wurde allerdings auch gezeigt, dass in manchen Situationen CD25+ regulatorische T-Zellen ebenfalls peripher erzeugt werden können. Diese Zellen scheinen in der Tat den gleichen Phänotyp wie im Thymus generierte Treg Zellen zu haben. Allerdings lässt sich durch experimentelle Einschränkungen nicht immer ausschließen, ob diese induzierten Zellen nicht möglicherweise aus einer Expansion von wenigen, kontaminierenden natürlichen Treg hervorgehen (zur Übersicht siehe (24)).

CD25+ Treg Zellen benötigen im Allgemeinen eine antigenspezifische Aktivierung, um ihre Wirkung entfalten zu können. Der Mechanismus der Suppression scheint dann jedoch antigenunspezifisch zu erfolgen (19). Da die intensive Forschung an Treg Zellen erst seit kurzem rasant fortschreitet, d.h. viele der Erkenntnisse erst in den letzten Jahren gewonnen wurden und zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vorlagen, soll im Folgendem ein kurzer Überblick über den aktuellen Stand der bisher wichtigsten publizierten Merkmale dieser Zellen vorgestellt werden.

### 1.2.2.1 Phänotyp von CD25+ regulatorischen T-Zellen

Der Phänotyp von CD25+ Treg ähnelt sehr dem Erscheinungsbild von aktivierten Effektorzellen. Dieses drückt sich durch die konstitutive Expression von zahlreichen aktivierungsassoziierten Molekülen aus. Treg zeigen eine erhöhte Zelloberflächen-Expression von CD25 und CD122, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des IL-2 Rezeptors, welcher sie mit einem hochaffinen IL-2 Rezeptor ausstattet. Weiterhin zeigen diese Zellen eine erhöhte CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte activation-4*, CD152) Expression. CTLA-4 wird ebenfalls auf Effektorzellen nach Aktivierung hochreguliert, allerdings erscheint die Regulation auch durch Foxp3 induzierbar zu sein (45). Mäuse mit einer gezielten Gendelektion (KO, *knockout*) von CTLA-4 zeigen zum Beispiel einen ähnlichen Phänotyp wie Foxp3 KO Mäuse. Weiterhin exprimieren CD25+ T-Zellen konstitutiv GITR (*glucocorticoid induced tumor necrosis factor (TNF) receptor*) (46, 47). Auch dieser Oberflächenrezeptor wird nach Aktivierung von naiven T-Zellen hochreguliert und kann als Kostimulator dienen (48). Allerdings wurde GITR exprimierenden CD4+ CD25- T-Zellen aus naiven Mäusen ebenfalls ein regulatorisches Potential zugeschrieben (49). Auch in Foxp3 retroviral transduzierten, naiven CD4+ T-Zellen konnte eine GITR Hochregulation, ähnlich wie für CTLA-4, beobachtet werden (45). Weitere aktivierungsassoziierte Treg Marker sind CD45RB, LAG3 und CD5 (zur Übersicht siehe (19, 24)).

Über Genexpressionsanalysen wurde eine erhöhte Expression vom Integrin  $\alpha E\beta 7$  (CD103) auf CD25+ CD4+ T-Zellen identifiziert (46). Bei genauerer Analyse konnte jedoch eine CD103 Expression nur auf einer Subgruppe von CD25+ Treg nachgewiesen werden. CD103 wird von fast allen intraepithelialen T-Zellen exprimiert und wird auf naiven CD4+ T-Zellen nicht nach Standardaktivierung *in vitro* hochreguliert, allerdings konnte hier ein Einfluss von TGF- $\beta$  beobachtet werden. Die CD103 Expression auf CD25- CD4+ T-Zellen soll auch eine Population mit regulatorischen Potential identifizieren (50).

Ebenfalls über Genexpressionsanalysen wurde eine erhöhte Expression von Neuropilin-1 (Nrp1) auf CD25+ T-Zellen gemessen. Der zur Semaphorin Familie gehörende Rezeptor, scheint auch in Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimiert zu werden. Weiterhin wird Nrp1, ähnlich wie CD103, nicht auf naiven T-Zellen nach *in vitro* Aktivierung hochreguliert. Dieses zeichnet Neuropilin-1 möglicherweise als einen weiteren Oberflächenmarker von murinen CD25+ Treg Zellen aus (51). Allerdings ist bislang noch kein monoklonaler Antikörper zur detaillierteren Analyse in der Durchflusszytometrie erhältlich. Ein weiterer Nachteil von Nrp1 ist, dass dieses Molekül auch von anderen Zelltypen, wie zum Beispiel von Zellen des Nervensystems, exprimiert wird.

Der bisher zuverlässigste Marker für Treg Zellen scheint somit der linienspezifische Transkriptionsfaktor Foxp3 zu sein. Eine dominante Rolle von Foxp3 für Treg wurde erst vor kurzem aufgeklärt. Im Menschen wurde das IPEX Syndrom (*X-linked syndrome of immunodysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy*) mit funktionellen Mutationen im Foxp3 Gen assoziiert. Die *scurfy* Maus zeigt ein ähnlich starkes autoimmun Syndrom, auch hier wurde das verantwortliche Gen identifiziert: Foxp3/Scurfin. Foxp3 gehört zur *winged helix* Familie spezifischer Transkriptionsfaktoren und wurde zunächst als Repressor der Transkription beschrieben (zur Übersicht siehe (42, 44)). Kürzlich publizierte Experimente konnten aber tatsächlich zeigen, dass Foxp3 vorwiegend in CD25+ T-Zellen exprimiert wird. Ein geringer Teil der CD45RB schwach exprimierenden CD4+ T-Zellen und einige CD8+ T-Zellen zeigen aber ebenso eine Foxp3 Ausprägung. Foxp3 kann sogar allein ausreichend sein, um naive CD4+ CD25- T-Zellen in regulatorische T-Zellen zu konvertieren (zur Übersicht siehe (24, 42)). Allerdings scheint Foxp3 auch unter bestimmten Umständen für nicht regulatorische T-Zellen von Bedeutung zu sein (52). Weiterhin konnte eine induzierte Foxp3 Expression unter speziellen Bedingungen, zum Beispiel in Anwesenheit von TGF- $\beta$ , für CD4+ T-Zellen gezeigt werden (53). Momentan besteht jedoch kein Zweifel daran, dass Foxp3 den bisher besten Marker für Treg darstellt. Über die tatsächlichen Zielgene des Transkriptionsfaktors und dessen Wirkungsweise ist aber erstaunlicherweise

noch nicht viel bekannt. Daher bedarf es weiterer umfassender Experimente zur Aufklärung dieser Sachverhalte (zur Übersicht siehe (24, 42)). Die Identifizierung eines zuverlässigen Oberflächenmarkers für Treg, der nicht aktivierungsassoziiert ist, steht daher zurzeit noch aus.

### 1.2.2.2 Entstehung von CD25+ regulatorischen T-Zellen

CD25+ Treg sind erst ca. 3 Tage nach Geburt in der Peripherie nachzuweisen. Wie schon oben erwähnt, zeigt insbesondere eine neonatale Thymektomie in der Zeitspanne zwischen Tag 2 und 4 den Effekt von massiven Autoimmunsyndromen. Folglich entstehen CD25+ Treg im Thymus, wobei hier die neonatale Phase besonders kritisch zu sein scheint. Obwohl gezeigt werden konnte, dass CD25+ Treg kontinuierlich über das gesamte Leben im Thymus generiert werden, erscheint die Phase zwischen Tag 2 und Tag 4 am wichtigsten. Experimente mit T-Zell Rezeptor transgenen Tieren konnten zeigen, dass eine spätere Thymektomie keinen Einfluss mehr auf die Entwicklung der CD25+ Treg Population hat. Dieses ist erstaunlich und deutet darauf hin, dass zwischen Tag 2 und 4 nach Geburt die CD25+ Treg Zellen produziert werden, die zur Selbsterneuerung befähigt, den Organismus während seiner gesamten Lebenszeit schützen. Hinsichtlich dieses Phänomens ist leider zur Zeit noch sehr wenig bekannt und die Bedeutung der kontinuierlich produzierten Treg Zell Vorläufer im Thymus bleibt mysteriös (zur Übersicht siehe (19, 33)).

Die CD25+ Treg Zellen im Thymus entsprechen etwa 5% der gesamt einzelpositiven (SP) CD4+ Thymozyten Population. Sie besitzen schon den Phänotyp von peripheren Treg, d.h. sie sind Foxp3+, CTLA-4+, GITR+ und haben weiterhin schon die Fähigkeit andere T-Zellen *in vitro* zu inhibieren. Wichtig zur Reifung der Treg Vorläuferzellen scheint die MHC-II vermittelte Selektion zu sein. Hier konnte über TCR transgene Mausstämmen gezeigt werden, dass eine relativ hohe Affinität für MHC-Selbst-Peptid vorliegen muss, um CD25+ Treg zu selektionieren (zur Übersicht siehe (42, 44)). Ein Indiz hierfür ist zusätzlich die Tatsache, dass in den meisten TCR transgenen Mäusen auf einem RAG defizienten Hintergrund keine CD25+ Treg gefunden werden können. Treg scheinen also vermehrt endogene TCR $\alpha$  Ketten zu benutzen, um die benötigte spezielle Affinität zu erlangen (zur Übersicht siehe (15, 42)). Es konnte gezeigt werden, dass cortikale Epithelzellen für die Selektion von Treg entscheidend sind. Die neben positiver und negativer Selektion für einzelpositive CD4 oder CD8 T-Zellen zusätzlich vorhandene intermediäre Selektion für relativ hochaffine TCR für MHC-Selbst-Peptid, wurde kürzlich auch als dritte Funktion des Thymus bezeichnet (54). Ob CD25+ Treg im Besonderen auch von AIRE exprimierenden Epithelzellen selektioniert werden, konnte jedoch bisher nicht bestätigt werden (55). Dieses stützt die These, dass die

TCR von Treg Zellen vermehrt gegen ubiquitäre Autoantigene gerichtet sind. Es konnte gezeigt werden, dass Treg Zellen wie konventionelle CD4+ T-Zellen ein vergleichbar diverses Repertoire an TCR Genen nutzen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte tatsächlich bestätigen, dass hauptsächlich ubiquitäre Selbst-Antigene, die in hohen Kopierzahlen vorliegen, erkannt werden (56).

Neben dem thymalen Ursprung, scheinen aber auch noch weitere Wege zu existieren, um CD25+ Treg zu induzieren. Über eine langanhaltende, milde Immunisierung mit Ovalbumin Peptid (Ova), konnte eine regulatorische T-Zellpopulation in TCR transgenen Mäusen auf einem RAG defizienten Hintergrund erzeugt werden, die sonst keine CD25+ Treg besitzen. Diese induzierten Treg hatten den gleichen Phänotyp, inklusive einer hohen Foxp3 Expression, wie natürliche CD25+ Treg (57). Weiterhin konnten zahlreiche unabhängige Studien eine TGF- $\beta$  Abhängigkeit von Treg Zellen zeigen. Im TGF- $\beta$  reichen Milieu konnte aus naiven CD4+ T-Zellen CD25+ Foxp3+ Treg erzeugt werden. Diese experimentellen Beobachtungen stehen nicht im direktem Einklang mit der Theorie einer früh spezifizierten Treg Zelllinie, sondern unterstützen eher die Auffassung einer plastisch, dynamischen Treg Zell Entwicklung (58, 59). Hier können nur zukünftige Studien den Zusammenhang zwischen im Thymus gereiften und in der Peripherie erzeugten Treg weiter aufklären. Aufgrund der vorhandenen Daten aus Tierexperimenten, scheinen allerdings peripher *de novo* generierte Treg Zellen eher eine Nebenrolle zu spielen. Für zukünftige klinische Anwendungen erscheint die Möglichkeit, antigenspezifische Treg *in vivo* zu induzieren, allerdings ein hohes Potential zu haben.

### 1.2.2.3 Wirkungsweise von CD25+ regulatorischen T-Zellen

Trotz einer intensiven Forschung an regulatorischen CD25+ T-Zellen in den letzten Jahren, konnte bisher nur wenig über den tatsächlichen Ablauf der regulatorischen Mechanismen *in vivo* herausgefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass CD25+ Treg in der Lage sind sowohl B-Zellen, CD8+ T-Zellen als auch CD4+ T-Zellen direkt zu kontrollieren. Somit müssen Treg die Fähigkeit besitzen, auf verschiedene Zielzellen unterschiedlich zu reagieren. Weiterhin scheint die Suppression *in vitro* zellkontaktabhängig und unabhängig von immunmodulatorischen Zytokinen zu sein. Allerdings konnte eine Zytokinabhängigkeit in verschiedenen Krankheitsmodellen *in vivo* beobachtet werden. Daher scheinen die Mechanismen der Suppression *in vivo* weitaus komplexer als *in vitro* zu sein, welches die Aufklärung der tatsächlichen Abläufe erheblich erschwert. Möglicherweise spielen hier mehrere, unterschiedliche Suppressionsmechanismen gleichzeitig eine Rolle. Weiterhin

deuten zahlreiche Befunde auf eine situations- und ortsabhängige Wirkungsweise hin. Diese Heterogenität könnte aber ebenfalls auf verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen hinweisen.

Entscheidend für die Aktivierung der Treg Zelle ist jedoch die antigenspezifische Stimulation. Wichtig scheint hier neben der TCR-MHC-Peptid Bindung auch der Kostimulus zu sein. Es wurde gezeigt, dass Effektor T-Zellen, gendefizient für CD80 oder CD86, sich schlechter supprimieren lassen. Somit scheint auch die CTLA-4-B7 Molekül Kostimulation nicht unerheblich zu sein (zur Übersicht siehe (24, 44)). Nach einer *in vitro* Aktivierung von drei Tagen supprimieren CD25+ Treg um einige Faktoren besser, welches auch in *in vivo* Transferexperimenten beobachtet werden konnte. Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass möglicherweise erst mit einer Verzögerung zusätzliche Suppressorfaktoren nach Aktivierung induziert werden können (zur Übersicht siehe (19, 24)). Ein weiterer möglicher Suppressionsmechanismus scheint auch der kompetitive IL-2 Konsum zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Suppression mittels IL-2 Antikörper blockiert werden kann, zumindest in diesem Modellsystem ist daher ein kompetitiver IL-2 Konsum von CD25+ Treg Zellen über ihre hochaffinen IL-2 Rezeptoren wahrscheinlich. Somit werden Effektorzellen (Teff) im Wachstum durch fehlendes IL-2 gehemmt und Treg Zellen über IL-2 weiter expandiert (zur Übersicht siehe (24, 44)). Diese Art der Suppression kann aber auch nicht der dominante Mechanismus sein, da Treg auch IL-2 Rezeptor defiziente T-Effektorzellen *in vitro* und *in vivo* supprimieren können (24). Als sicher gilt allerdings, dass Effektor T-Zellen auch durch eine selektive Inhibition der IL-2 Transkription gehemmt werden.

Eine erst kürzlich publizierte Studie konnte eine Rolle für den lytischen Granzym/Perforin Weg bei der Treg vermittelten Suppression identifizieren. In der Maus vermag daher insbesondere bei der Kontrolle von B-Zellen, eine direkte GranzymB vermittelte Lyse entscheidend zu sein. Bei der Kontrolle von CD4+ T-Zellen scheint dieser Weg allerdings nicht dominant zu sein, da sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keine erhöhte Apoptose von Zielzellen beobachtet werden konnte (zur Übersicht siehe (33, 44, 60)).

Trotz zahlreicher Genexpressionsanalysen konnte bisher noch kein spezifischer Faktor für die Suppression *in vitro* ausgemacht werden, weitere Studien können hier vielleicht neue Erkenntnisse liefern. Es gibt aber auch zahlreiche Hinweise auf eine indirekte Wirkungsweise von Treg im Zusammenspiel mit weiteren Zellpopulationen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass CD25+ Treg über CTLA-4 und IL-10 Ausschüttung eineIDO Aktivität in dendritischen Zellen stimulieren können (61). Eine weitere beschriebene Möglichkeit indirekter Regulation ist die Induktion von weiteren regulatorischen T-Zellen. Diese so

genannte infektiöse Toleranz wurde *in vitro* und *in vivo* beobachtet. CD25+ Treg Zellen konnten hier naive T-Zellen Zytokin vermittelt zur Differenzierung in Tr1 ähnliche, IL-10 produzierende Zellen stimulieren (62). In bestimmten Krankheitsmodellen konnte auch die Abhängigkeit von Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe (63)). Diese Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich zu den *in vitro* erhaltenen Ergebnissen und zeigen deutlich, dass die Suppressionsmechanismen *in vivo* wesentlich komplexer sind. So konnte gezeigt werden, dass CD25+ Treg IL-10 abhängig die Entwicklung von IFB (*inflammatory bowel disease*) oder Gastritis kontrollieren. Ein ähnlicher Befund konnte auch für TGF- $\beta$  *in vivo* gezeigt werden. Hier steht bisher jedoch noch nicht fest, welche Zellpopulation als TGF- $\beta$  Quelle dient (zur Übersicht siehe (64)).

#### 1.2.2.4 Kontrolle von CD25+ regulatorischen T-Zellen

Die Kontrolle über regulatorische T-Zellen scheint enorm wichtig für den Organismus. Ohne eine situationsabhängige Kontrolle der hoch effizienten, aber einmal aktiviert, Antigen unabhängigen Suppressor Zellen, könnte kaum noch eine wirksame Immunabwehr gegen verschieden Pathogene initiiert werden. Durch zahlreiche Beobachtungen wird die Vorstellung gestützt, dass Effektoren und Regulatoren einen *Status quo* der Balance erhalten, dieses Gleichgewicht aber im Falle von Autoimmunität oder Infektionen dynamisch reguliert wird (zur Übersicht siehe (19, 24)). Vorstellbare Mechanismen könnten hier zum Beispiel räumliche Trennung, initiiert durch unterschiedliche Signalmoleküle wie zum Beispiel Chemokine sein. Aber auch eine aktive Kontrolle auf Seiten von Effektoren oder Regulatoren scheint vor dem Hintergrund des Potentials dieser Zellen von Nöten zu sein .

Beide o.g. Mechanismen konnten tatsächlich schon beobachtet werden. So konnte zum Beispiel für GITR eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Treg nachgewiesen werden. GITR, welcher auch nach Aktivierung auf Effektor T-Zellen hochreguliert wird, scheint nach Ligation die Effektorzellen unzugänglich für eine Suppression durch CD25+ Treg werden zu lassen (65). Ein weiterer Kontrollmechanismus konnte für antigenpräsentierende Zellen gezeigt werden. Im Beisein von LPS verloren Treg ihre suppressive Wirkung gegenüber T-Effektorzellen. Dieser Vorgang scheint abhängig von einer *Toll-like* Rezeptor (TLR) Ausprägung und deren Polysaccharid vermittelte IL-6 Produktion zu sein (66). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass Treg selber auf mikrobielle Stimuli aufgrund einer TLR Expression reagieren können. So wird vermutet, dass LPS die Proliferation von Treg anregen kann und die suppressive Wirkung potenziert (67). Der Mechanismus einer gezielt gesteuerten Migration von Treg Zellen wurde ebenfalls vermutet. So wurde eine Rolle für das

Chemokin CCL4 bei der selektiven Migration von CD25+ Treg über deren Rezeptor CCR5 gemutmaßt. Quelle für CCL4 sollten unter bestimmten Bedingungen aktivierte APC, in diesem Fall B-Zellen, sein (68). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass bestimmte Subpopulationen für die Kontrolle von unterschiedlichen Autoimmunreaktionen wichtig zu sein scheinen. Für die Typ1 Diabetes im NOD Mausmodell (*non-obese diabetic*) konnte gezeigt werden, dass lediglich CD62L+ Treg Einfluss auf die Kontrolle des Krankheitsverlaufs hatten, obwohl beide CD62L+ und CD62L- Populationen *in vitro* die gleiche supprimierende Wirkung zeigten (69). Auch für die CD103 tragenden CD25+ Treg konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden (50, 70).

So können sowohl aktive als auch passive Mechanismen auf Seiten von Effektoren oder Regulatoren steuernd auf das Gleichgewicht von Treg zu Teff einwirken. Bei dieser für den Organismus überlebenswichtigen Frage mögen daher tatsächlich viele Stufen der Regulation vorhanden sein und synergistisch zu wirken, welches evolutionär gesehen sinnvoll erscheint, da eine fehlende Redundanz bei der Kontrolle von Treg von Pathogenen zum Nachteil des Wirts ausgenutzt werden könnte. Im Fall von Malaria konnten hier schon einige Hinweise gefunden werden, dass diese Strategie zum Teil tatsächlich von Pathogenen verwendet wird. So konnten eine erhöhte TGF- $\beta$  Produktion und erhöhte Treg Zellzahlen im Blut von Malaria Patienten nachgewiesen werden, welches indirekt auf eine Induktion von Treg durch den Erreger hindeutet. Eine zweite Studie konnte im Tiermodell zeigen, dass eine Treg Depletion zu besseren Abwehrreaktionen gegen eine *Plasmodium* Infektion und einer erhöhten Überlebensrate führen kann, welches ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen Treg und dem Malaria-Parasiten hindeutet (71, 72). Diese Studien zeigen, dass die Wirkungsweise und die Kontrolle von Treg möglicherweise tatsächlich von bestimmten Pathogenen ausgenutzt oder manipuliert werden können.

#### **1.2.2.5 Unterschiede von humanen und murinen CD25+ regulatorischen T-Zellen**

Obwohl die gewonnenen Erkenntnisse aus Nagetieren zumeist auch übertragbar auf den Menschen sind, bestehen dennoch zahlreiche Unterschiede zwischen CD25+ regulatorischen T-Zellen von Maus und Mensch. Ein wichtiger Unterschied zur Maus ist, dass im Menschen auch zu einem hohen Anteil CD25+ Gedächtniszellen und CD25+ aktivierte T-Zellen im Blut vorliegen. Diese Tatsache zeigt, dass im Menschen CD25 als Treg Zell Marker nur bedingt zu nutzen ist und erschwert weiterhin die funktionelle Analyse und Isolation von Treg aus humanen PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*). Es konnte gezeigt werden, dass nur in der CD25 hoch exprimierenden Population T-Zellen mit regulatorischen Potential



angereichert sind (73). Ein weiterer gravierender Unterschied scheint auch in der Foxp3 Expression zu liegen. Trotz einer großen Homologie der beiden Gene in den unterschiedlichen Spezies, konnte im Gegensatz zur Maus, in humanen T-Zellen nach einer *in vitro* Aktivierung (IL-2/ $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28) eine Hochregulation von Foxp3 in zuvor naiven CD25- Foxp3- CD4+ T-Zellen beobachtet werden (74). Diese Beobachtung lässt den Wert von Foxp3 als Treg Zell Marker im Menschen zweifelhaft erscheinen. Dieser Punkt wird jedoch gerade in der Literatur kontrovers diskutiert, da es nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, dass in diesen Experimenten lediglich eine selektive Expansion von CD25- Treg Zellen erreicht wurde (zur Übersicht siehe (42, 44, 75)). Neben diesen Besonderheiten existieren auch noch zahlreiche weitere Unterschiede zwischen humanen und murinen Treg. Murine CD4+ T-Zellen zeigen keine MHC Klasse II Expression, im Menschen erscheint jedoch gerade der Treg Phänotyp mit einer erhöhten MHC Klasse II Molekül Expression einher zu gehen. Auch funktionell scheinen Unterschiede zu bestehen. Humane Treg Zellen zeigen eine erhöhte Expression von CCR4 und CCR8 (76). Die Hochregulation oder selektive Expression dieser Chemokinrezeptoren konnte in der Maus bisher nicht beobachtet werden. Auch zeigen CD25+ Treg im Menschen keine CD103 Expression, wobei das Integrin im Mausmodell ein durchaus konstanter Marker für eine Treg Subpopulation zu sein scheint (77). Weiterhin nutzen murine Treg u.a. bei der Zellkontaktabhängigen Suppression den GranzymB Weg, wohingegen aus humanen PBMC isolierte CD25<sup>high</sup> Treg den GranzymA/Perforin Weg einsetzen (78, 79).

Diese zum Teil nicht unerheblichen Unterschiede drängen zur Vorsicht bei der Interpretation und Übertragbarkeit von tierexperimentell erhaltenen Ergebnissen und erfordern auch mit humanen Zellen eine re-Evaluation der zuvor aus Tierexperimenten erhaltenen Ergebnisse *in vitro* und *in vivo*.

### **1.3 Die Rolle von CD25+ regulatorischen T-Zellen in Autoimmunkrankheiten und in der Tumorummunologie**

Trotz zahlreicher offener Fragestellungen bezüglich der Biologie von Treg, steht es außer Frage, dass CD25+ Treg im Menschen und in den bisher untersuchten Modellorganismen, wie zum Beispiel Maus und Ratte, eine herausragende Rolle in der dominanten Kontrolle von peripherer Selbst-Toleranz einnehmen. Die Signifikanz dieser Zellen konnte in vielen

Autoimmunkrankheiten nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe (26)). Zahlreiche Ergebnisse deuten aber auch darauf hin, dass genau diese Zellpopulation eine entscheidende Rolle bei der Tumorummunologie spielt (zur Übersicht siehe (80)). Auch für die Transplantationsmedizin erweisen sich Treg als hochinteressant. Zahlreiche Studien an Tiermodellen konnten hier eine positive Rolle von Treg zur Transplantatakzeptanz aber auch bei der Kontrolle von Transplantat gegen Akzeptor Reaktionen nachweisen (zur Übersicht siehe (81, 82)). Daher scheint es für diese Systeme sehr viel versprechend, den Wirkmechanismus und die Homöostase von Treg in Zukunft besser zu verstehen, um spätere klinische Anwendungen durch eine gezielte Manipulation von Treg zu ermöglichen. Darüber hinaus konnte in einigen kürzlich veröffentlichten Publikationen auch eine Rolle für Treg bei der Kontrolle von klassischen Infektionen aber auch bei der Entstehung von Allergien bewiesen werden, welches die generelle Bedeutung dieser Zellen für das Immunsystem von Wirbeltieren belegt (zur Übersicht siehe (60, 83)). Im Folgendem sollen die bisher gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Rolle von CD25+ Treg für einige Autoimmunkrankheiten und für die Tumorummunologie zusammengefasst werden.

### 1.3.1 CD25+ Treg zur Therapie von Autoimmunkrankheiten

Die Tatsache, dass in Foxp3 defizienten Mäusen schwere organspezifische Autoimmunsyndrome wie XLAAD (*X-linked autoimmunity allergic dysregulation syndrome*) auftreten und im Menschen Foxp3 Mutationen IPEX auslösen und wenige Wochen nach der Geburt zum Tode führen, unterstreicht die Wichtigkeit von CD25+ Foxp3+ Treg zur Aufrechterhaltung peripherer Toleranz (zur Übersicht siehe (24)). In manchen Autoimmunerkrankungen ist es daher plausibel, dass eine Beeinträchtigung oder Defekte in der Funktion von Treg zur Auslösung der Krankheit führen können. Hier scheinen verschiedene Szenarien möglich. Es kann zum Beispiel ein einfaches zahlenmäßiges Ungleichgewicht zwischen Treg und Teff als Auslöser angenommen werden. Ebenso kann eine Beeinträchtigung von Effektorfunktionen oder des Wanderungsverhaltens von Treg eine mögliche Autoimmunreaktion zur Folge haben. Möglich ist aber auch, dass eine „Lücke“ im Treg TCR Repertoire bestimmte Autoantigene nicht erkennt und es somit zur organspezifischen Autoimmunreaktion ohne Kontrolle durch Treg kommt (zur Übersicht siehe (24)).

Allerdings ist über die tatsächliche Entstehung von Autoimmunreaktionen noch sehr wenig bekannt. Insbesondere der direkte Nachweis einer Beteiligung von Treg, außer im Falle vom IPEX-Syndrom, steht hier noch aus. Zahlreiche Möglichkeiten werden derzeit diskutiert: So

wird sowohl eine Abhängigkeit von genetischen Faktoren, als auch der Einfluss von Umweltfaktoren erörtert. Manche Autoimmunkrankheiten scheinen mit bestimmten Klasse II Allelen assoziiert zu sein. Andere Autoimmunkrankheiten treten gehäuft in bestimmten geographischen Regionen auf. Zusätzlich wird eine Ähnlichkeit von Pathogen-Antigenen zu Selbst-Antigenen als möglicher Auslöser vermutet (molekulare Mimikri). Außer Frage steht jedoch, dass viele Autoimmunreaktionen im Zusammenhang mit akuten Infektionen oder Krankheiten auftreten. Somit scheint vor allem eine Veränderung des Gleichgewichts zwischen anti-inflammatorischen und pro-inflammatorischen Faktoren zur Autoimmunreaktion zu führen. Eine Beteiligung von Treg konnte hier zwar noch nicht direkt nachgewiesen werden, gilt aber als wahrscheinlich. Vor allem das hohe Potential von Treg, fast jede organspezifische Autoimmunreaktion über einen spezifischen Treg Zelltransfer im Tiermodell und somit wahrscheinlich über das Gleichgewicht von Treg zu Teff kontrollieren zu können, deutet darauf hin (zur Übersicht siehe (24)).

Ein Beispiel für eine organspezifische Autoimmunerkrankung, welche möglicherweise über ein Ungleichgewicht von Treg zu Teff verursacht wird, stellt die Typ1 Diabetes dar. Die Typ1 Diabetes wird durch autoreaktive T-Zellen, welche die Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen im Pankreas zerstören, ausgelöst. Im Falle der Typ1 Diabetes, konnten einige Hinweise gefunden werden, dass ein Ungleichgewicht von Treg Zellzahlen möglicherweise krankheitsentscheidend ist. Im Mausmodell für Typ1 Diabetes (NOD) konnte eine geringere Zellzahl von Treg gemessen werden, wobei diese Zellen jedoch voll funktionell erschienen. Weiterhin konnte eine Treg Subpopulation, ausgezeichnet durch eine hohe CD62L und CCR7 Expression, als entscheidend zur Kontrolle der Krankheit identifiziert werden (69). Auch im Menschen wurden Unterschiede in Treg Zellzahl und Funktion während der Typ1 Diabetes beschrieben (zur Übersicht siehe (84)). Der Einsatz von humanisierten anti-CD3 Antikörpern zur Behandlung der Typ1 Diabetes (momentan in der klinischen Erprobung) scheint ebenfalls einen Einfluss auf Treg Zellzahlen zu haben, welches möglicherweise ein zentraler Aspekt des Wirkmechanismus ist. Dieses konnte auch im Mausmodell beobachtet werden (85). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte sogar zeigen, dass NOD Mäuse schon nach dem Einsetzen von klinischen Symptomen mit Foxp3 transduzierten antigenspezifischen CD4+ T-Zellen geheilt werden konnten (86). Somit könnten möglicherweise in Zukunft für die Typ1 Diabetes Therapien erfolgreich sein, welche auf die Induktion, Expansion oder den Transfer von antigenspezifischen Treg abzielen würden.

Auch bei der Multiplen Sklerose (MS) wird ebenfalls eine Rolle von Treg bei der Kontrolle der Krankheit diskutiert. Die Multiple Sklerose ist eine demyelinisierende Krankheit, von der

etwa 0,1% der kaukasischen Bevölkerungsgruppen befallen sind, wobei vermutet wird, dass das Immunsystem eine dominante Rolle übernimmt. Autoreaktive Th1 ähnliche CD4+ T-Zellen gegen Komponenten der Myelinscheide von Oligodendrozyten scheinen hauptsächlich die Krankheit über eine Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) oder TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) Sekretion im ZNS auszulösen, welches dann in der Zerstörung der Oligodendrozyten mündet und zu peripheren Lähmungserscheinungen führen kann. Beteiligt sind aber auch CD8+ T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen und Komponenten des Komplementsystems. Eine genetische Kopplung im Menschen konnte bisher nur für das DR2 Allel nachgewiesen werden, welches das Risiko um bis zu 10% erhöht an MS zu erkranken. Das Mausmodell für die humane Erkrankung ist in diesem Fall die EAE (siehe 1.2.), eine CD4+ Th1 Zell abhängige, induzierte Entzündung des ZNS (zur Übersicht siehe (87)). Die Induktion der Krankheit wird in der Regel durch die Immunisierung mit Komponenten der Myelinscheide, wie zum Beispiel MBP, PLP (*proteolipid protein*) oder MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) in Anwesenheit von Adjuvantien vorgenommen. Der Verlauf der Krankheit äußert sich im Menschen als auch im Tiermodell der EAE häufig in einer ab- und zunehmenden, chronischen Erkrankung, im Menschen jedoch häufig mit einer schlechten Prognose. Experimente im Tiermodell der EAE konnten zeigen, dass der Transfer von Treg die Stärke des Krankheitsverlaufs stark einschränkt (88). Weiterhin konnte unter speziellen Bedingungen der Transfer von CD25+ Treg sogar eine manifestierte EAE kontrollieren (89, 90). Zusätzliche Hinweise deuten darauf hin, dass insbesondere das Repertoire von Treg die Empfänglichkeit von verschiedenen Mausstämmen für eine EAE Induktion beeinflusst (91). Indirekt deuten auch Untersuchungen mit TCR transgenen Mäusen auf eine aktive Kontrolle von Treg über die EAE Entwicklung hin. So konnte im Modell von MBP spezifischen TCR transgenen Mäusen keine spontane EAE Entwicklung beobachtet werden, wenn die CD4+ T-Zellen noch die Möglichkeit zur Nutzung endogener TCR $\alpha$ -Ketten hatten um Treg generieren zu können (siehe 1.2). Auf einem RAG defizienten Hintergrund konnte allerdings eine spontane EAE Entwicklung festgestellt werden (92). Auch im Menschen konnten Hinweise auf eine Beteiligung von Treg beobachtet werden. Obwohl keine Unterschiede in Treg Zellzahlen im peripheren Blut von Patienten festgestellt werden konnten, wurde eine Disfunktionalität beobachtet (93). Allerdings besteht auch auf dem Gebiet der MS und der tatsächlicher Relation zu CD25+ Treg Zellen im Menschen noch ein immenser Bedarf an weiterer Forschungsarbeit.

Weitere Autoimmunkrankheiten, in denen eine Rolle von Treg im Menschen oder im Tiermodell beobachtet werden konnte, stellen u.a. die rheumatoide Arthritis, Gastritis, Kolitis,

Psoriasis oder Thyroiditis dar. Somit scheinen CD25+ Treg in fast allen erforschten organspezifischen Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen, was auf ein generelles und möglicherweise vom Syndrom unabhängiges Schema bei der Entstehung von organspezifischen Autoimmunreaktionen hinweist. Diese Theorie wurde kürzlich von Sakaguchi und Kollegen postuliert und basiert hauptsächlich auf den Beobachtungen von IPEX Patienten und unterstützenden Untersuchungen in verschiedenen Tiermodellen. Dementsprechend ist ein Defekt in der Treg Population hinreichend, eine Disbalance zwischen Treg und Teff hervorzurufen, welches wiederum abhängig von der genetischen Prädisposition des Individuums zur organspezifischen Autoimmunität führen kann (zur Übersicht siehe (24, 44)).

### **1.3.2 Die Rolle von CD25+ Treg bei der Tumorimmuntherapie**

In der Tumorimmunologie scheinen Treg eine entgegengesetzte Rolle im Vergleich zu ihrer Bedeutung bei Autoimmunkrankheiten zu spielen. Hier vermag die Präsenz von Treg die Immunantwort gegen häufig relativ schwache Autoantigene, so genannte tumorassoziierte Antigene, zu behindern und somit das Wachstum des Tumors zu begünstigen. Erste Hinweise auf einen negativen Einfluß von Suppressor Zellen auf eine erfolgreiche Immunantwort gegen bestimmte Tumore konnten schon zu Beginn der 1980er Jahre gefunden werden (94). Nachfolgende Studien konnten dann die Suppressor Zellen als CD4+ T Zellen identifizieren, welches darauf hinweist, dass möglicherweise auch in diesen Fällen CD25+ CD4+ Treg die eigentliche Suppressor T-Zell Population darstellte (95, 96). Zahlreiche neuere Studien konnten tatsächlich einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von CD25+ Treg und der Tumorimmunität belegen, welches im Einklang zu den o.g. frühen Publikationen aus den 80er Jahren steht. So konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen eine Treg Depletion mit  $\alpha$ CD25 oder  $\alpha$ GITR Antikörpern eine vom Immunsystem vermittelte Tumorabstoßung begünstigte (zur Übersicht siehe (97-99)). Ein negativer Einfluss von Treg auf die Effektorzell-Funktionalität konnte auch *in vitro* mit *ex vivo* isolierten T-Zellen aus Tumorpatienten bestätigt werden (100, 101). Weitere Studien konnten eine Verbesserung der CD25 Depletion im Zusammenhang mit einer CTLA-4 Blockade beobachten, welches möglicherweise auf die Existenz weiterer Treg Populationen und die Bedeutung der Effektorzell-Aktivierung hinweist (102).

Eine aktuelle Arbeit deutet darauf hin, dass bestimmte Tumore selbst durch eine artifizielle Induktion von Chemokinen möglicherweise präferentiell Treg anlocken können, welches eventuell die schlechte Immunogenität mancher Tumore erklären könnte (103). Im Einklang

zu dieser Arbeit, konnte eine weitere aktuelle Studie im Tiermodell zeigen, dass sogar nur eine CD4+ Depletion, direkt im Tumor, hinreichend für eine Immunabstoßung zu sein scheint. Diese Ergebnisse deuten an, dass insbesondere die lokale Wirkung von Treg für die schlechte Immunogenität mancher Tumore entscheidend ist (104).

Generell scheinen somit CD25+ Treg auch im Falle von Krebs das Immunsystem zu kontrollieren und eine Immunantwort zu behindern, allerdings mit fatalen Folgen für den Organismus, da die Anwesenheit von Treg eine effiziente Induktion der Immunabwehr zu verhindern scheint. Bei der Therapie von Tumorerkrankungen könnte somit neben klassischen Ansätzen der Immuntherapie, wie zum Beispiel einer Vakzinierung mit Peptiden von Tumor-assoziierten Antigenen oder dem Transfer von tumorspezifischen Effektor T-Zellen, zukünftig die Manipulation von Treg eine wichtige Rolle spielen (zur Übersicht siehe (99)). Denkbar wären hier Eingriffe, die auf eine gezielte Inaktivierung von Treg oder die Induktion einer Ignoranz von Treg gegenüber der Suppression von Treg, abzielen würden. Ein besseres Verständnis der Biologie von CD25+ regulatorischen T-Zellen könnte somit auch auf dem Gebiet der Tumorimmuntherapie zu bedeutenden Fortschritten beitragen (zur Übersicht siehe (97-99)).

Weitere Anwendungen der gezielten Inaktivierung von Treg zur Stärkung von Immunreaktionen werden auch auf dem Gebiet der Vakzinierung oder Immuntherapie gegen relativ schwache Antigene, wie zum Beispiel bei HIV (*human immunodeficiency virus*) Infektionen diskutiert (105-107).

Zusammengefasst lässt sich somit feststellen, dass CD25+ natürliche regulatorische T-Zellen eine Vielzahl von Immunreaktionen beeinflussen können und möglicherweise eine dominante Rolle sowohl bei der Entwicklung von zahlreichen Autoimmunerkrankungen als auch in der Tumorimmunologie einnehmen. Das Verständnis der Treg Biologie scheint somit ein enormes Potential für zukünftige klinische Therapien zu beinhalten und ist demzufolge derzeit eines der am schnellsten wachsenden Felder im Bereich der aktuellen immunologischen Forschung.

### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die genauere Charakterisierung von CD25+ Treg, um somit eine Grundlage für spätere klinische Anwendungen, basierend auf der Manipulation von Treg, zu legen. Da verschiedene Hinweise auf eine Heterogenität innerhalb der CD25+ Treg Population hindeuteten (siehe 1.2), sollte als Schwerpunkt die Beschaffenheit der CD25+ Treg Population genauer untersucht werden, um existierende funktionelle Subpopulationen innerhalb der CD25+ Treg Fraktion identifizieren und charakterisieren zu können. Um mögliche Angriffspunkte für eine zukünftige Manipulation von Treg zu finden, sollte auf diesem Wege weiterhin versucht werden, neue funktionelle und phänotypische Marker von Treg zu definieren. Aufgrund der Unterschiede zwischen murinen und humanen Treg (siehe 1.2.2.5), sollten die im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse insbesondere auf ihre Übertragbarkeit auf den Menschen hin getestet werden.

Anhand von Genexpressionsanalysen sollten die charakteristischen molekularen Signaturen von CD25+ Treg entschlüsselt werden und mittels Durchflusszytometrie oder Realtime (Echtzeit) RT-PCR (Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion) überprüft werden. Über diesen Weg sollten dann neu identifizierte Marker von Treg auf ihre Relevanz für CD25+ regulatorische T-Zellen im Mausmodell funktionell getestet und phänotypisch charakterisiert werden. Um für den Menschen irrelevante Marker herauszufiltern, sollten die im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse dann im humanen System validiert werden.

Die Ergebnisse der Arbeit könnten somit im Idealfall die Beschaffenheit der Treg Population im Detail aufklären, um eventuelle funktionell unterschiedliche Subpopulationen in der Maus und im Menschen zu identifizieren. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten demzufolge hilfreich sein, die Biologie von Treg besser zu verstehen und sollten somit dazu beitragen, die Basis für eine gezielte Manipulation von Treg Zellen zu liefern, um zukünftige klinische, auf Treg basierende Therapieansätze für Autoimmunerkrankungen oder Krebs zu ermöglichen.