

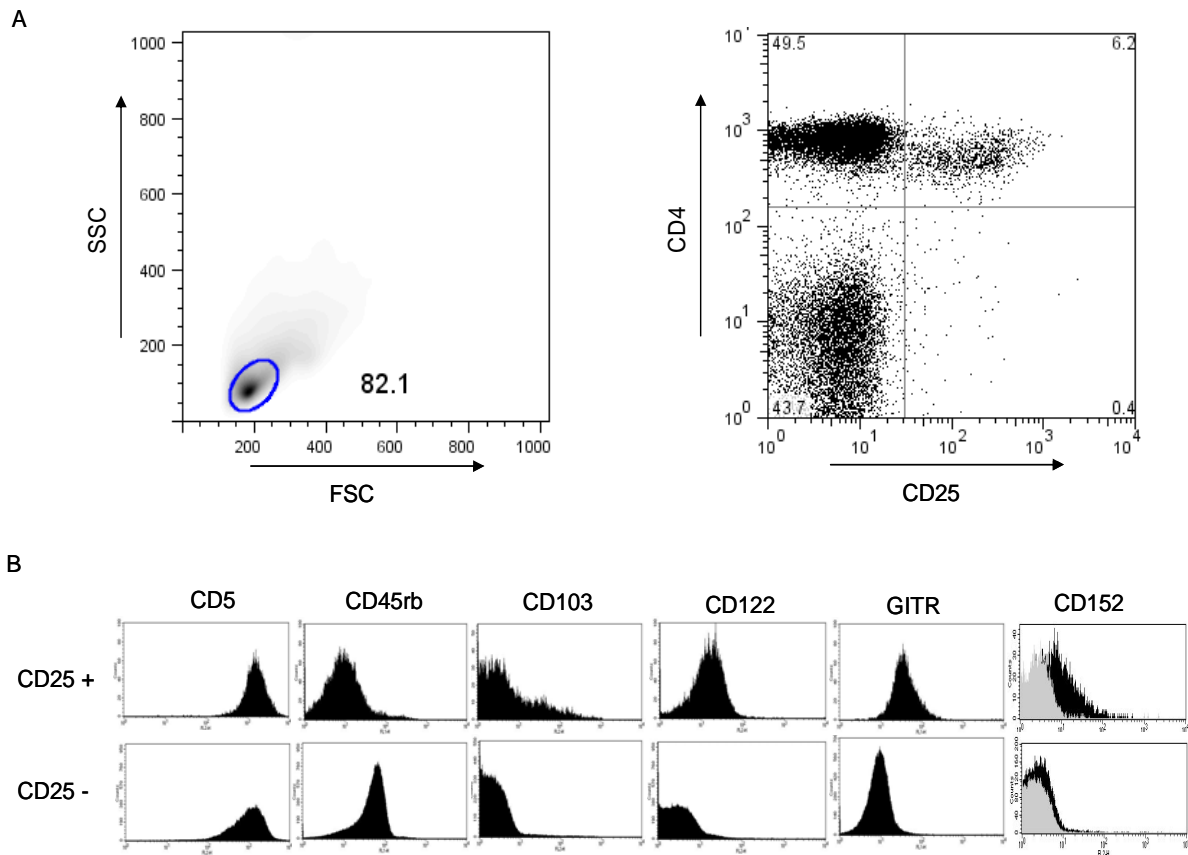
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Genexpressionsanalyse von CD25+ CD4+ T-Zellen

Die Existenz regulatorischer T-Zellen war mangels eines zuverlässigen Oberflächenmarkers lange fraglich und experimentell nicht eindeutig nachzuweisen (siehe 1.2). So wurden regulatorische CD4+ T-Zellen zunächst als CD5 hoch-exprimierend (118), dann als CD45RB schwach-exprimierend beschrieben (zur Übersicht siehe (18)). Sakaguchi und Kollegen konnten dann CD25, die alpha Kette des Interleukin 2 Rezeptors als bisher besten Oberflächenmarker von CD4+ T-Zellen mit regulatorischen Potential beschreiben (34). Murine CD4+ T-Zellen aus Blut, Lymphknoten oder Milz prägen zu ca. 5-15% CD25+ an der Oberfläche aus. Diese Zellen zeichnen sich weiterhin durch eine konstitutive CD152 und CD122 (die  $\beta$ -Kette des IL-2 Rezeptors) Expression, hohe CD5 Expression und geringe CD45RB Expression aus (34).

In Abbildung 2A ist ein typisches Fluoreszenzprofil von CD4 gegen CD25 auf Lymphknoten (LN) Zellen dargestellt. Aufgrund des Fluoreszenzprofils ist deutlich zu erkennen, dass diese Zellen ca. 10% der gesamt CD4+ T-Zellpopulation im Lymphknoten ausmachen. Der Anteil in der Milz ist ungefähr vergleichbar, wobei im peripheren Blut (PBMC) nur etwa 5% der CD4+ T-Zellen CD25 ausdrücken (Daten nicht gezeigt). Allerdings variieren die Anteile nicht nur in unterschiedlichen Geweben, sondern können auch in verschiedenen Mausstämmen erhebliche Unterschiede aufweisen; so konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Mäuse mit einem C57BL/6 Hintergrund bedeutend weniger CD25+ Treg im Vergleich zu Tieren mit einem BALB/c Hintergrund besitzen (119). Im Laufe dieser Arbeit konnten aber bisweilen weitere Treg spezifische Marker identifiziert werden, soweit die Zellen aus naiven Mäusen gewonnen wurden (siehe 1.2). Hervorzuheben sind hier zum Beispiel GITR, welcher konstitutiv auf allen CD25+ Treg exprimiert ist (46, 47) und das Integrin  $\alpha$ E (CD103), das jedoch nur auf einer kleinen Untergruppe der CD25+ Zellen ausgeprägt ist (46, 50). Untersucht man im speziellen die CD25+ CD4+ und die CD25- CD4+ T-Zellpopulationen aus naiven Tieren auf die Expression der o.g. bisher identifizierten Marker, kann man tatsächlich erhebliche Unterschiede in der Expression von zum Beispiel CD45RB, CD103, CD122,

CD152 und GITR feststellen. Der Unterschied der CD5 Expression ist jedoch nur geringfügig (Abbildung 2B).

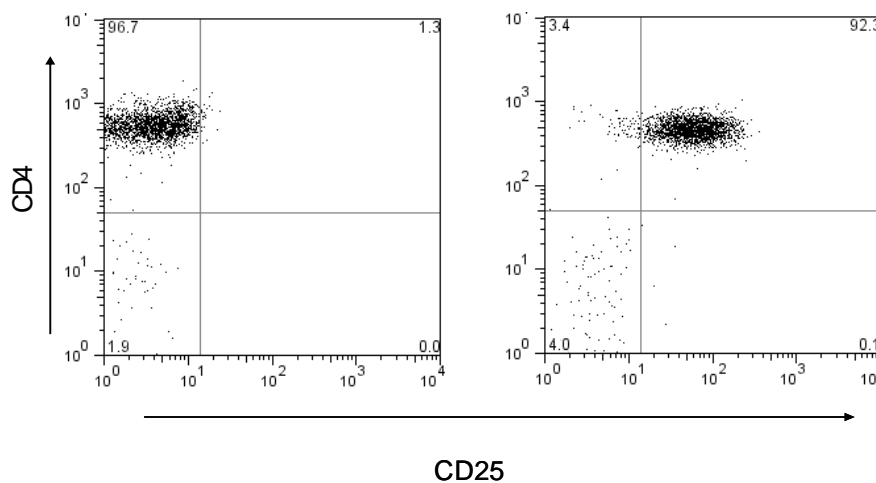


**Abbildung 2: Durchflusszytometrische Analyse von murinen CD25+ CD4+ regulatorischen T-Zellen.** A) Typisches Profil von *ex vivo* isolierten Lymphknotenzellen aus naiven BALB/c Mäusen. Links: Darstellung der Zellen im Rechtwinkelstreulicht (SSC) gegen Vorwärtstreulicht (FSC) als Dichte-Diagramm. Das Fenster (blau) bezeichnet die Lymphozytenpopulation. Rechts: CD4 und CD25 Expression innerhalb der Lymphozytenpopulation, dargestellt als Punktwolkendiagramm. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. B) Expression von den Molekülen CD5, CD45RB, CD103, CD122, GITR und CD152 auf CD25+ CD4+ (obere Zeile) oder CD25- CD4+ LN Zellen (untere Zeile), dargestellt als Histogramm. Bei der intrazellulären CD152 Färbung bezeichnet die graue Fläche jeweils die Isotyp-Kontrolle.

Zu Beginn dieser Arbeit wiesen jedoch alle bisher bekannten Proteine zur Identifizierung von Treg einen Nachteil auf: Sie werden auch auf CD25- CD4+ T-Zellen nach Aktivierung entsprechend hoch- oder runterreguliert (24). Daher eignet sich keiner der o.g. Treg Marker für eine eindeutige Diskriminierung von regulatorischen zu aktivierten CD4+ T-Zellen in nicht naiven Mäusen. Die Identifizierung von zuverlässigen Treg Markern, erschien daher dringend notwendig, gerade vor dem Hintergrund der Übertragbarkeit auf das humane System, um diese Zellen im Detail charakterisieren zu können (19). Um neue Gene zu identifizieren, die spezifisch von Treg exprimiert werden, wurde daher eine Genexpressionsanalyse vorgenommen. Hierfür wurde die Affymetrix Technologie verwendet

(siehe 2.2.9). Die Genexpressionsanalyse sollte einen Überblick über Treg spezifische hoch- oder runterregulierte Gene im Vergleich zu naiven CD25- CD4+ T-Zellen liefern. Die Daten aus der Genexpressionsanalyse sollten daher zum einen eine bessere Charakterisierung von Treg ermöglichen, zum anderen könnte diese Analyse möglicherweise Hinweise auf deren Abstammung und auf Mechanismen der Treg vermittelten Suppression liefern und somit auch einen tieferen Einblick in die Biologie von Treg bieten.

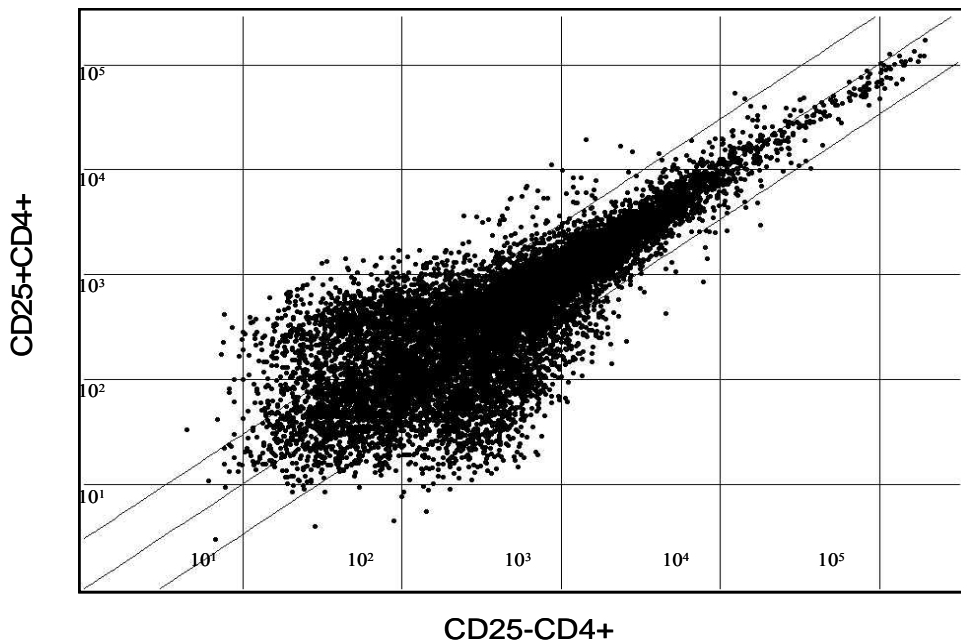
Zur Genexpressionsanalyse wurde RNA aus magnetisch sortierten Zellpopulationen isoliert (siehe 2.2.5-6). Die aus Lymphknoten von naiven SJL/J Mäusen isolierten Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CD25 und CD4 markiert (vgl. Abbildung 2A) und anschließend mit anti-Fluorochrom gekoppelten, ferromagnetischen Beads über eine MACS Säule aufgereinigt. In Abbildung 3 sind die CD25- (links) und CD25+ (rechts) CD4+ T-Zellpopulationen nach der MACS Isolation gezeigt. Der Aufreinigungsgrad liegt bei dieser Methode standardisiert bei über 90% Reinheit.



**Abbildung 3: Reinheitsgrad von MACS isolierten murinen CD4+ T-Zellpopulationen.** Links: Fluoreszenzprofil der über MACS isolierten CD25- CD4+ T-Zellen aus der Milz einer naiven BALB/c Maus. Rechts: Fluoreszenzprofil von CD25+ CD4+ T-Zellen nach der MACS Aufreinigung aus der Milz einer naiven BALB/c Maus. X-Achse: CD25, Y-Achse: CD4. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

In Abbildung 4 ist die Genexpressionsanalyse für einen Affymetrix U74Av2 *Chip* graphisch dargestellt. Die gewonnene, mit Biotin-markierte cRNA von CD25+ und CD25- CD4+ T-Zellen wurde jeweils an einen U74Av2 *Chip* hybridisiert und nach anschließenden Färben und *Scannen* mithilfe von Affymetrix Analyse Software ausgewertet und anhand von Genespring Software im Detail analysiert. Die murine U74v2 Serie deckt ca. 36.000 Transkripte ab, wobei der U74Av2 *Chip* mit ca. 12.000 Transkripten den Großteil der bekannten Gene abdeckt. Die *Chips* U74Bv2 und U74Cv2 tragen mehrheitlich so genannte

*expression tags* (EST) die bekannte Transkripte, erhalten aus cDNA Bibliotheken, mit bisher unbekannter Funktion beinhalten. Gezeigt ist ein *scatter plot*, hier werden alle detektierten Gene der einen Probe gegen die der anderen Probe graphisch dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert jeweils ein detektiertes Transkript, wobei der *scatter plot* jedoch ohne weitere Filter erstellt wurde. Auffällig ist, dass mehr hochregulierte Gene im Vergleich zu runterregulierten Genen gefunden wurden (nur ca. 1/3 der deregulierten Gene im Vergleich von CD25+ zu CD25- CD4+ T-Zellen sind runterreguliert), wobei dieses Phänomen auch schon in früheren Analysen beobachtet werden konnte (46, 120-122).



**Abbildung 4: Graphische Darstellung einer Affymetrix Genexpressionsanalyse von CD25+ gegen CD25- CD4+ T-Zellen aus naiven SJL/J Lymphknotenzellen.** Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der Genexpressionsprofile von beiden Zellgruppen; dargestellt im *Scatterplot*. X-Achse: CD25- CD4+ T-Zellen. Y-Achse: CD25+ CD4+ T-Zellen. Die Achsenbeschriftung bezeichnet die relative Expression. Die Linien bezeichnen einen 3-fachen Unterschied in der relativen Expression ausgehend vom Ursprung.

Zusammenfassend sind in Tabelle 8 die jeweils am stärksten hoch- und runterregulierten Gene aufgelistet. Diese Tabelle wurde anhand der Affymetrix und Genespring Software erstellt und beinhaltet weitere Filter. So werden in Tabelle 8 nur Transkripte angezeigt, die über den Affymetrix Logarithmus als „anwesend“ gewertet wurden; weiterhin liegt die Expression der gezeigten Gene über der relativen Einheit 500 und es sind nur Gene gezeigt, die mindestens dreifach dereguliert sind. Über diese Filter erhält man in der Analyse 56 Gene, die in CD25+ gegenüber CD25- T-Zellen hochreguliert sind, wobei nur 21 Gene in CD25- gegenüber CD25+ T-Zellen höher exprimiert werden. Da auf beiden *Chips* ca. ~45% aller analysierten Gene als „anwesend“ erkannt wurden (welches dem Affymetrix Richtwert

erfüllt), entsprechen die 77 deregulierten Gene ca. 1,4%, wobei dieses früheren Analysen entspricht (46, 122). Die Filterung schließt allerdings nicht aus, dass tatsächlich eine höhere Anzahl von Genen dereguliert ist, insbesondere im Bereich einer geringen relativen Expression (<500) wie es sich in der *scatter plot* Darstellung andeutet. So liegt die Expression für CD25 zum Beispiel unter diesem Filter, ist aber über sechsfach erhöht in CD25+ CD4+ T-Zellen und als „anwesend“- somit als signifikant gewertet (Daten nicht gezeigt), wobei dieses auch in früheren Analysen beobachtet werden konnte (46). Zur Validierung der Ergebnisse wurde versucht, eine Deregulation auf Protein- oder zumindest RNA-Ebene auf den entsprechenden Zellpopulationen reproduzierbar nachzuweisen. Dieses wurde, soweit Antikörper vorhanden waren, durchflusszytometrisch oder über *Western blotting* versucht. In dem Fall, dass keine Antikörper erhältlich waren, wurde ein Nachweis über Realtime RT-PCR angestrebt. Für manche Gene scheiterte der Nachweis einer differentiellen Proteinexpression, welches andeutet, dass manche Transkripte entweder artifiziell, zum Beispiel über das Aufreinigungs-Verfahren induziert wurden oder weiterhin auf Translations-Ebene reguliert sind. Hierzu zählt zum Beispiel das Histon H2A. Anhand eines nativen Proteingels (durchgeführt in Zusammenarbeit mit Dr. Manfred Gossen, MDC Berlin) konnte keine unterschiedliche Ausprägung des Gens auf Proteinebene festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte zum Beispiel der Rezeptor CD83, welcher zu den am höchsten deregulierten Genen zählt, nur sehr schwach erhöht auf CD25+ Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 8 A) CD25+CD4+ &gt; CD25-CD4+

Ratio	Gen Nr.	Gen	Gen ID
16.38	M55181	Preproenkephalin 2	Penk1
14.71	AF065947	Mus musculus strain NOD	Ccl5
14.09	AJ222714	Mus musculus CCR6 gene	CCR6
13.12	AF079528	Mus musculus IER5 (Ier5) gene, complete cds	-
12.61	D50086	Neuropilin	Nrp1
12.31	X05719	CTLA-4	Ctla4
12.11	U88327	Mus musculus suppressor of cytokine signalling-2 (SOCS-2) mRNA, complete cds	Socs2
12.05	AI853444	UI-M-BH0-ajy-d-09-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	2610042L04Rik
10.69	X54511	M.musculus mbh1 gene for Myc basic motif homologue-1 (mbh1)	Capg
10.6	AI853444	UI-M-BH0-ajy-d-09-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	2610042L04Rik
10.45	M18070	Mouse (with short incubation period) prion protein (PRNP) gene, complete cds	-
10.31	U20949	Mus musculus lymphoid-specific interferon regulatory factor (LSIRF) gene, complete cds	-
9.9	U12236	Integrin, alpha E, epithelial-associated	CD103
9.7	M64085	Mouse spi2 proteinase inhibitor (spi2)	Serpina3g

9.36	U13371	Mus musculus (C57BL UI-M-AK0-adc-d-02-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	Kdt1
8.8	AI837100		Cd83
8.43	AA681998	vr45a06.s1 Mus musculus cDNA, 5 end	Cks2
8.22	U05245	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	Tiam1
7.81	M80423	Mus castaneus IgK chain gene, C-region, 3 end	-
7.78	M36579	S100 calcium-binding protein A4 UI-M-BH1-all-g-04-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	-
7.48	AW047476		-
7.32	AF037366	CD39 antigen	Entpd1
7.16	X87128	M.musculus p75 TNF receptor DNA	-
6.98	X82786	Antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	Mki67
6.86	X66449	Calcyclin UI-M-AP1-agn-a-03-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	S100a6
6.83	AI847050		Lycat
6.56	M12302	GranzymeB UI-M-BH2.1-apr-b-09-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	Gzmb
6.21	AW124113		Basp1
5.96	AA797989	ub60d04.r1 Mus musculus cDNA, 5 end	Ms4a1
5.95	U52951	Mus musculus putative transcriptional regulator mEnx-1 mRNA, complete cds	Ezh2
5.78	Z21674	Tax-transcriptionally activated glycoprotein 1	Tnfrsf4
5.27	D26090	Mouse mRNA for mCDC46 protein, complete cds	Mcm5
5.26	AB031386	Mus musculus mRNA for Clast1, complete cds	1810009M01Rik
4.77	X59769	Interleukin 1 receptor, type II Mouse Ig kappa chain V-region mRNA, partial cds, clone 3H9	Il1r2
4.75	M18237		-
4.64	X66032	M.musculus mRNA for cyclin B2	Ccnb2
4.52	M21285	Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 UI-M-AL0-abv-e-12-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	-
4.4	AI838080		-
4.33	AA981725	ua28h11.r1 Mus musculus cDNA, 5 end	2810036L13Rik
4.23	X16834	Mouse mRNA for Mac-2 antigen UI-M-AH1-agn-e-02-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	Lgals3
4.18	AI848671		Sh3bgrl
4.07	AV138783	AV138783 Mus musculus cDNA Mus musculus hematopoietic-specific early- response A1-b protein (A1b) gene	Gadd45b
4.02	U23778		-
3.97	X72310	Transcription factor Dp 1 Mouse mRNA fragment for immunoglobulin mu encoding the C-terminus of the membrane-bound form	Tfdp1
3.74	V00821		Igh-6
3.62	M33988	Mouse histone H2A.1 gene, complete cds Mouse calpactin I heavy chain (p36) mRNA, complete cds	-
3.6	M14044		Anxa2
3.47	Y13089	M.musculus mRNA for caspase-11	Casp4
3.34	M26270	Stearoyl-coenzyme A desaturase 2 Mus musculus glucocorticoid induced TNFR family related protein precursor, mRNA, complete cds	Scd2
3.22	U82534	Mouse 3 mRNA for beta-galactoside specific lectin (14kDa)	GITR
3.17	X15986		Lgals1
3.15	AV327760	AV327760 Mus musculus cDNA, 3 end	Scd2
3.14	AA657044	vr25h02.r1 Mus musculus cDNA, 5 end	2310047C17Rik
3.14	AF045146	Chemokine (C-X-C) receptor 3 Mouse tumor necrosis factor-beta mRNA, complete cds	Cxcr3
3.05	M16819		Lta
3.02	L35302	Tnf receptor-associated factor 1	Traf1

Tabelle 8 B) CD25+CD4+ &lt; CD25-CD4+

Ratio	Gen Nr.	Gen Name	Gen ID
13.4	Y08361	M.musculus mRNA for RIL protein	Pdlim4
10.15	AI846549	UI-M-AN1-aff-h-05-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	2610019F03Rik
9.7	D21831	Retinoid X receptor beta	-
5.73	AI464718	mz74c01.y1 Mus musculus cDNA, 5 end	Ebi2
5.52	AW047875	UI-M-BH1-als-g-03-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	1500005K14Rik
5.35	D16503	Lymphoid enhancer binding factor 1	Lef1
4.44	U25096	Mus musculus Kruppel-like factor LKLF mRNA, complete cds	Klf2
4.42	AI854144	UI-M-BH0-ajw-g-04-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	BC004636
4.12	AI846023	UI-M-AP1-agl-g-02-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	Arl7
3.85	X85991	M.musculus mRNA for semaphorin B	Sema4a
3.83	AF038995	Mus musculus putative RNA helicase RCK mRNA, partial cds	Ddx6
3.7	AW046181	UI-M-BH1-akw-d-06-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	Sgk
3.57	AI848723	UI-M-AJ1-ahf-c-03-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	BC026744
3.45	AI839232	UI-M-AK0-adh-d-11-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	-
3.41	AA691445	vs11h05.r1 Mus musculus cDNA, 5 end	Stk38
3.3	C85523	C85523 Mus musculus cDNA, 3 end	-
3.25	U05252	Mus musculus nuclear matrix attachment DNA-binding protein SATB1 mRNA, complete cds	Satb1
3.25	AI850948	UI-M-BH0-akd-e-05-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	Ibtk
3.09	AI847661	UI-M-AP1-agm-a-04-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	Dscr112
3.05	D43963	Mouse adult male liver mRNA for protein tyrosine kinase, complete cds	Txk
3.02	AA682091	vu13g02.s1 Mus musculus cDNA, 3 end	-

**Tabelle 8: Tabellarische Zusammenfassung der Genexpressionsanalyse.** A) Gene die über dreifach erhöht in CD25+ gegenüber CD25- CD4+ T-Zellen gefunden wurden. B) Gene, die mindestens dreifach erniedrigt in CD25+ gegenüber CD25- CD4+ T-Zellen detektiert wurden. Spalte 1 (Ratio) bezeichnet den relativen Unterschied in der Genexpression. Spalte 2 (Gen Nr.) zeigt die internationale Gen-Identifikations-Nr. (*Accession No*<sup>o</sup>). Spalte 3 (Gen) bezeichnet den Gennamen. In Spalte 4 (Gen ID) ist das Gen-Kürzel (soweit vorhanden) dargestellt. Die Tabelle wurde anhand von Microarray Suite und Genespring Software erstellt.

Das Gros der deregulierten Gene konnte jedoch zuverlässig auf Protein- oder RNA-Ebene nachgewiesen werden. So konnte zum Beispiel die Expression von CCR6, CD103, OX-40, GITR, CTLA-4, Ki67, Neuropilin-1, Galectin-1, CD39 oder Lef1 einwandfrei im Einklang mit der Genexpressionsanalyse validiert werden (siehe 3.2 und Daten nicht gezeigt).

Die identifizierten Gene können in verschiedene, funktionelle Gruppen eingeteilt werden. Zunächst wurden Treg spezifische Gene, wie zum Beispiel verschiedene TNF (*tumor necrosis factor*) Rezeptoren gefunden. Besonders Ox-40, TNFp75 und GITR gehören dieser Gruppe an. Weiterhin fällt auf, dass verschiedene Oberflächenrezeptoren (CD83, Neuropilin1, CCR6, CXCR3, Interleukin 1 Rezeptor, CD103, CD39) oder sezernierte Moleküle (Galectin-1/Lgals1, Galectin-3/Lgals3, Rantes/CCL5, GranzymB) differentiell reguliert sind. Zusätzlich scheinen auch zahlreiche Transkriptionsfaktoren dereguliert zu sein (Satb1, Lef1, Socs2, Dp1). Der kürzlich identifizierte Schlüssel-Transkriptionsfaktor für CD25+ T-Zellen Foxp3

(siehe 1.2) konnte über diese Analyse jedoch nicht nachgewiesen werden, da das Foxp3 Transkript nur auf dem U74Bv2 Chip der U74v2 Serie enthalten ist. Das Auftreten einiger B-Zell spezifischer Gene (zum Beispiel: IgH, IgL) könnte allerdings darauf hindeuten, dass sich innerhalb der CD25+ T-Zellpopulation eine geringe Menge an kontaminierenden B-Zellen befunden hat. Theoretisch kann dieses durchaus möglich sein, da die CD25+ Zellen nicht im speziellen auf CD4+ angereichert wurden und ein geringer Teil an B-Zellen ebenfalls CD25 exprimiert. Allerdings liegt die mögliche Kontamination unter 5% (siehe Abbildung 3) und bei der Analyse von sortierten Zellen konnte keine Proteinexpression von Ig Genen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren konnte auch von einer anderen Arbeitsgruppe, welche CD4+ T-Zellen aus stabilen Zelllinien zur RNA Gewinnung nutzte und somit eine B-Zell Kontamination sehr unwahrscheinlich ist, eine erhöhte Expression verschiedener B-Zell Transkripte auf CD25+ T-Zellen nachgewiesen werden (121). Auffällig ist weiterhin die erhöhte Expression von zahlreichen zellzyklus- oder proliferationsassoziierten Transkripten auf CD25+ Treg, wie zum Beispiel Ki67 oder Cyclin B2, im Vergleich zu CD25- Zellen. Dieses deutet daraufhin, dass die CD25+ Population proliferierende Zellen beinhaltet.

Im Gesamtbild ähnelt die Genexpression der Treg im Vergleich zu den naiven CD25- CD4+ T-Zellen daher tatsächlich sehr stark dem Profil von Antigen aktivierten T-Zellen (121), welches im Einklang mit der erhöhten Expression von charakteristischen T-Zell Aktivierungsmarkern und proliferationsassoziierten Markern auf Treg Zellen steht (siehe Abbildung 2B).

Im Bezug auf das o.g. Problem, von lediglich aktivierungsassoziierten Treg Markern wie zum Beispiel CD25 und GITR, erscheinen die an der Oberfläche ausgeprägten und bisher noch uncharakterisierten Gene für weitere Analysen besonders interessant. Hier fällt der Chemokinrezeptor CCR6 als eines der am höchsten differentiell regulierten Transkripte auf. Da zum Zeitpunkt der Analyse bisher nur wenig über die Homöostase und das Migrationverhalten von Treg bekannt war, dieser Aspekt jedoch für zukünftige klinische Anwendungen und das Verständnis von Treg essentiell erschien, sollte die Rolle von CCR6 für Treg im weiteren Verlauf der Arbeit genauer untersucht werden. Insbesondere könnte eine spezielle Chemokinrezeptor Expression von Treg einen neuen funktionellen Marker oder eine spezielle Subpopulation definieren, da schon zuvor gezeigt werden konnte, dass Chemokinrezeptoren geeignete Marker für bestimmte funktionelle Subgruppen von T-Zellen darstellen können (123).



### **3.2 CCR6 definiert Effektor-Gedächtniszell ähnliche regulatorische CD25+ CD4+ T-Zellen in der Maus ( $T_{REM}$ )**

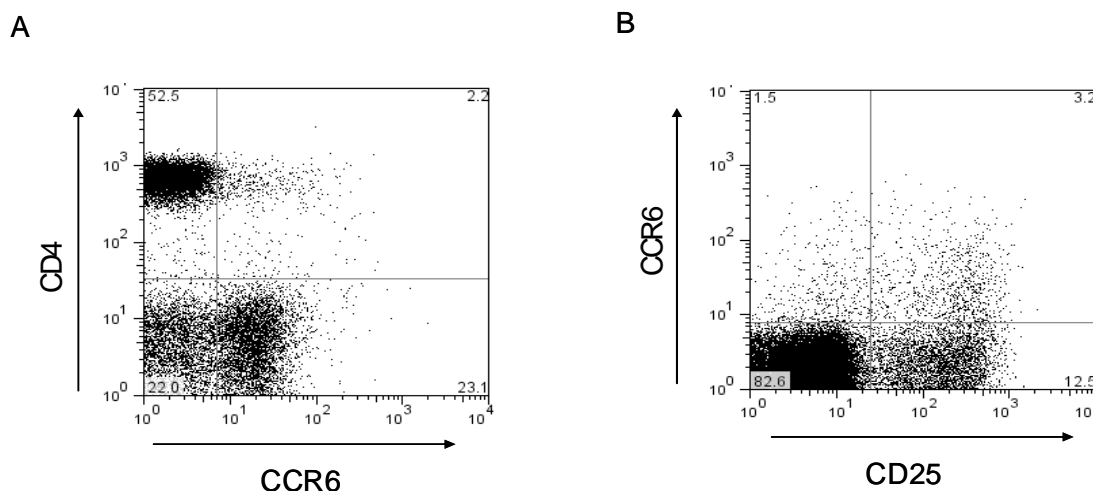
Im Laufe einer Immunreaktion müssen Lymphozyten zum Ort der Entzündung wandern, um dort Effektorfunktionen zu übernehmen. Weiterhin zeigen viele Lymphozyten ein homöostatisches Wanderungsverhalten während ihrer Reifung und Auswanderung von den primären zu den sekundären lymphatischen Organen und der Rezirkulation in der Lymphe und im Blutkreislauf (zur Übersicht siehe (124)). Die Migration von Lymphozyten erfolgt über Chemokin-Chemokinrezeptor und Adhäsionsmolekül vermittelte Interaktionen. Chemokine können aufgrund der Abfolge von Cystein Motiven in zwei Hauptgruppen (CC und CXC) und zwei Untergruppen (C und CX<sub>3</sub>C) unterteilt werden. Alternativ können sie auch als homöostatische (konstitutive) oder inflammatorische (induzierbare) Chemokine nach Funktion eingeteilt werden. Erstere ermöglichen die Wanderung von Lymphozyten unter homöostatischen Bedingungen (Reifung/Zirkulation), während die inflammatorischen Chemokine spezifisch an Orten der Entzündung hochreguliert und sezerniert werden. Diese Chemokine stehen im Zusammenhang mit einer spezifischen Rekrutierung von unterschiedlichen Lymphozyten zum Ort der Entzündung und ermöglichen somit auch den räumlichen Kontakt von verschiedenen Effektorzellen, wie zum Beispiel dendritischen , B- und T-Zellen (zur Übersicht siehe (124, 125)).

Auf humanen regulatorischen T-Zellen konnte bisher eine selektive Expression von den Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR8 festgestellt werden (76). Über die Chemokinrezeptor-Expression von murinen Treg war jedoch zum Zeitpunkt der Analyse bisher wenig bekannt. Eine CCR6 Expression wurde zuvor auf Gedächtnis CD4+ T-Zellen im Menschen beschrieben (126, 127). Weiterhin ist der Rezeptor auf B-Zellen und bestimmten DC exprimiert (111, 126, 128, 129). Die Tatsache, dass bisher nur ein Chemokinligand (CCL20) für CCR6 bekannt ist, wobei die meisten Chemokinrezeptoren häufig redundant gegenüber mehreren Chemokinliganden sind, macht den Rezeptor besonders interessant (130). Der Ligand CCL20 erscheint konstitutiv im Thymus und innerhalb der Darmmukosa exprimiert, weiterhin konnte aber auch eine CCL20 Expression unter spezifischen Entzündungsbedingungen zum Beispiel in der Haut (Psoriasis) und im zentralen Nervensystem (Multiple sclerose) beobachtet werden (131-134). Untersuchungen mit CCR6 defizienten Mäusen konnten eine bedeutende Rolle für diesen Rezeptor bei der Organisation von den Peyerschen Plaques und in unterschiedlichen Entzündungsmodellen beschreiben (135-137). Vor dem Hintergrund der in der Genexpressionsanalyse erhöhten CCR6

Expression auf Treg Zellen in der Maus und der zuvor beschriebenen Expression des Liganden CCL20 und dem Phänotyp von CCR6 gendefizienten Tieren, erschien die weitere Charakterisierung der CCR6 Expression von Treg als hochinteressant. Wenn auch kein direkter Hinweis auf eine Beeinträchtigung von Treg in den CCR6<sup>-/-</sup> Tieren beschrieben wurde, weist doch die Tatsache, dass insbesondere unreife, Toleranz erzeugende DC und tolerogene IDO+ DC ebenfalls eine CCR6 Expression zeigen, auf eine mögliche Bedeutung dieses Rezeptors für die Regulation peripherer Toleranz auch unter Beteiligung regulatorischer CD4+ T-Zellen hin (3, 22, 128).

### 3.2.1 Die CCR6 Expression auf CD4+T-Zellen in der Maus

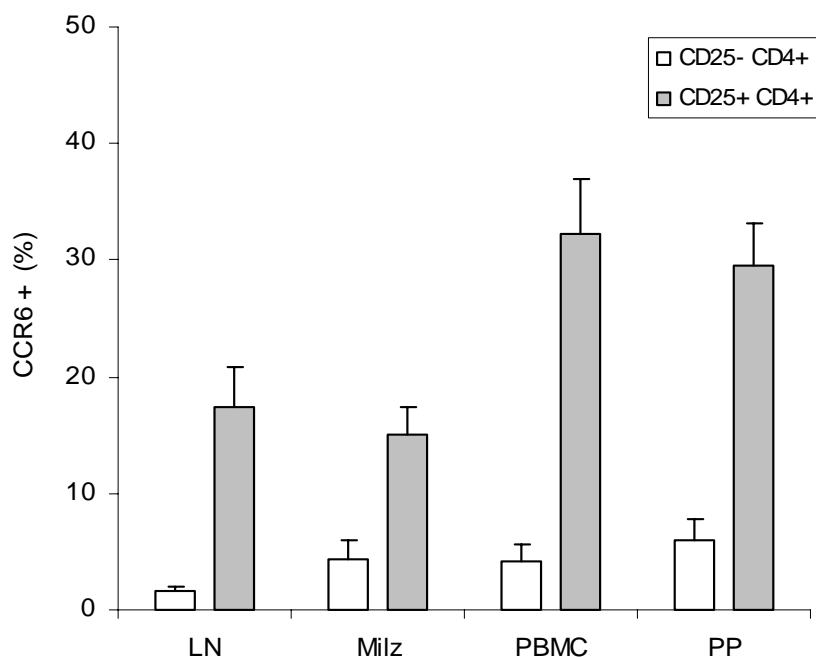
Um die erhöhte CCR6 Expression in CD25+ T-Zellen im Vergleich zu CD25- CD4+ T-Zellen zu überprüfen, wurde der Chemokinrezeptor mit Hilfe von spezifischen Antikörpern an der Oberfläche gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. .



**Abbildung 5: CCR6 Oberflächenausprägung auf murinen Lymphozyten.** A) Fluoreszenzprofil innerhalb des Lymphozytenfensters von *ex vivo* isolierten Lymphknotenzellen aus naiven BALB/c Mäusen. X-Achse: CCR6, Y-Achse: CD4. B) Fluoreszenzprofil innerhalb der CD4+ T-Zellpopulation von *ex vivo* isolierten Lymphknotenzellen aus naiven BALB/c Mäusen. X-Achse: CD25, Y-Achse: CCR6. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

Abbildung 5A zeigt die CCR6 Expression im Vergleich zur CD4 Expression. Anhand dieses Profils wird deutlich, dass nur ein geringer Anteil an CD4+ T-Zellen den Chemokinrezeptor ausprägt, wohingegen ein Großteil der nicht CD4+ T-Zellen CCR6 exprimiert. Weitere Analysen haben ergeben, dass CCR6 praktisch nicht auf CD8+ T-Zellen, aber auf einem Großteil von B220+ B-Zellen in der Milz und im Lymphknoten ausgeprägt wird (Daten nicht gezeigt), welches im Einklang mit vorherigen Beobachtungen steht (126). In Abbildung 5B ist

eine repräsentative CCR6 Färbung auf CD4+ T-Zellen aus naiven BALB/c Lymphknoten im Verhältnis zur CD25 Oberflächenfärbung gezeigt. Aufgrund der durchflusszytometrischen Analyse kann prinzipiell eine erhöhte Proteinexpression auch auf der Oberfläche von Treg bestätigt werden. Allerdings wird CCR6 nicht exklusiv auf Treg ausgeprägt, ein geringer Anteil von CD25- T-Zellen exprimiert dieses Molekül ebenfalls (Abbildung 5B). Um ein besseres Bild zu erlangen, wurden weitere Gewebe und Organe auf den Anteil an CCR6 exprimierenden CD4+ T-Zellen hin untersucht. In Abbildung 6 ist die relative Verteilung von CCR6 positiven CD4+ T-Zellen in Peyerschen Plaques (PP), peripheren Blut (PBMC), Milz und Lymphknoten (LN) gezeigt. Auffällig ist hier die erhöhte Expression im Blut (~30-40% CCR6+ Treg) und innerhalb der PP (~30% CCR6+ Treg). Die höchste relative Anzahl von CCR6+ CD25- CD4+ T-Zellen (>5%) konnte im Blut, in der Milz und in den PP beobachtet werden.



**Abbildung 6: Relative CCR6 Ausprägung auf CD25+ und CD25- CD4+ T-Zellen in verschiedenen Geweben.** Die relative Ausprägung von CCR6 in Lymphknoten (LN), Milz, Blut (PBMC) und Peyerschen Plaques (PP) aus *ex vivo* isolierten Zellen aus naiven BALB/c Mäusen wurde über durchflusszytometrische Analysen wie in Abbildung 4B berechnet. Weiße Balken bezeichnen CD25- CD4+ T-Zellen, graue Balken CD25+ CD4+ T-Zellen. Die Graphen bezeichnen die berechneten Mittelwerte aus 5-9 unabhängigen Experimenten.

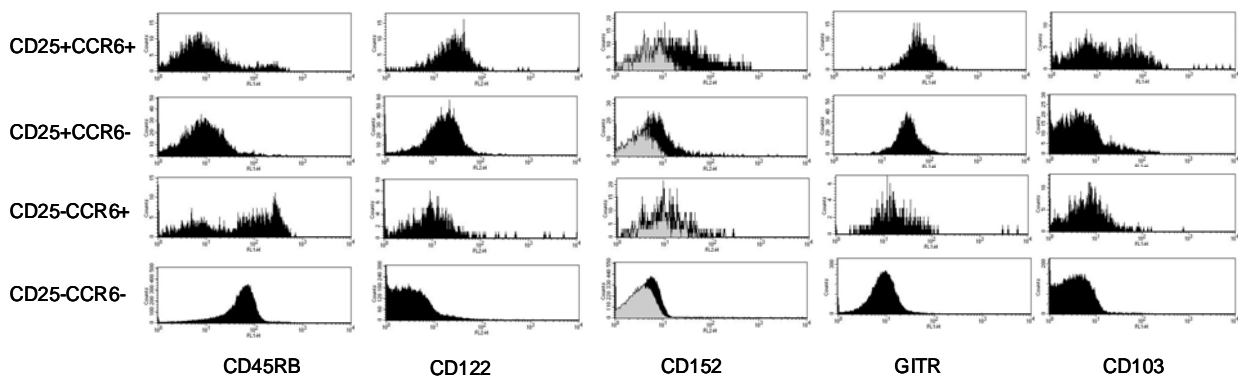
Zuvor konnte anhand von CCR6 KO Mäusen eine Relevanz von CCR6 tragenden Zellen für die PP Organisation gezeigt werden, ebenfalls konnte hier eine konstitutive CCL20 Expression nachgewiesen werden (135). Der hohe Anteil von CCR6+ CD25+ T-Zellen in den PP erscheint daher nicht erstaunlich. Die erhöhte Anzahl von CCR6+ Treg im Blut steht

ebenfalls mit der zuvor beschriebenen Rolle für das inflammatorische Chemokin CCL20 im Einklang.

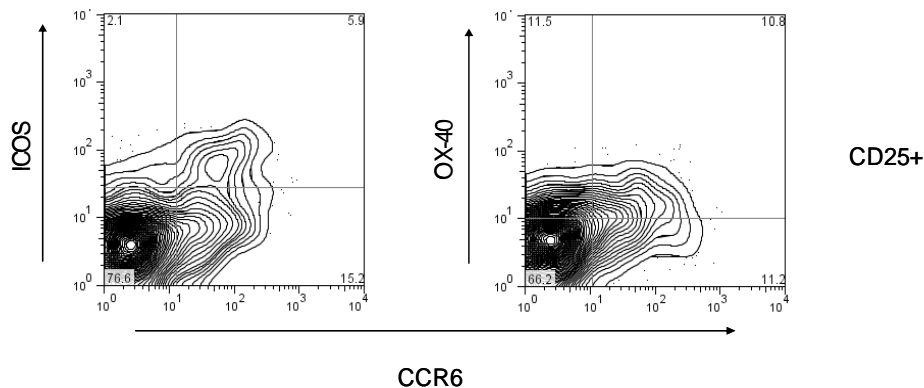
### 3.2.2 CCR6 als Treg Marker

CD25+ Treg Zellen zeichnen sich durch die Ausprägung weiterer charakteristischer Proteine aus, welche allerdings nach Stimulation auch von Effektor T-Zellen exprimiert werden können (siehe 3.1). Zur Kontrolle, ob diese Moleküle auch mit der Expression von CCR6 korrelieren, wurden naive CD4+ T-Zellen auf ihre Ausprägung von Treg charakteristischen Molekülen CD152, CD122, CD45RB, CD103, OX-40 (CD134), ICOS (*inducible costimulator of T cell stimulation*) und GITR im Zusammenhang mit CD25 und CCR6 hin durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 7).

A

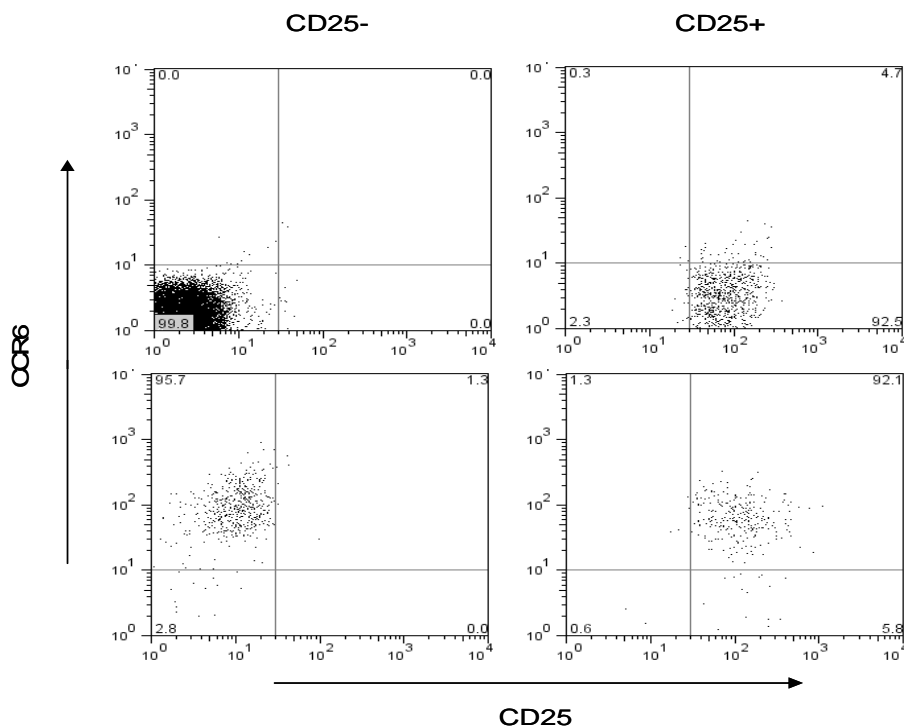


B



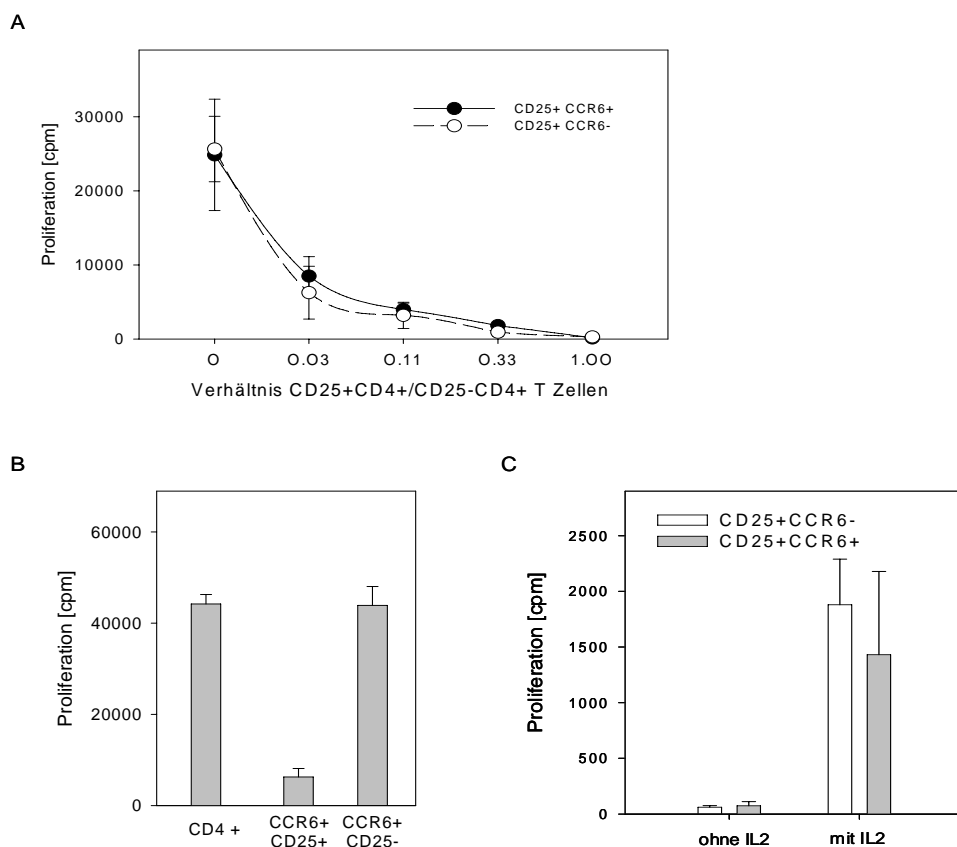
**Abbildung 7: Ausprägung von Treg Zellmarkern auf CD25+ CD4+ CCR6+ T-Zellen.** Abbildung 7 zeigt die durchflusszytometrische Analyse von *ex vivo* isolierten LN Zellen aus naiven BALB/c Mäusen. A) Repräsentative Expression von CD45RB, CD122, CD152, GITR und CD103 auf den 4 verschiedenen Untergruppen von CD4+ T-Zellen (CCR6+ CD25+, CCR6- CD25+, CCR6+ CD25-, CCR6- CD25-), dargestellt als Histogramm. B) ICOS und OX-40 Expression auf CD25+ CD4+ T-Zellen. Links: ICOS gegen CCR6. Rechts: OX-40 gegen CCR6. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

Alle Treg charakteristischen Marker werden auch auf CCR6+ CD25+ Zellen ausgeprägt. Die Expression von CD122 und CD45RB erscheint relativ ähnlich auf beiden CCR6+ und CCR6- CD25+ T-Zellen. Beide Populationen sind positiv für CD122 und exprimieren CD45RB nur schwach. Die Ausprägung von CTLA-4 und GITR ist ähnlich, beide CD25+ Populationen sind positiv, allerdings ist die Expression der beiden Marker auf CCR6+ CD25+ Zellen am höchsten (Abbildung 7A). Die Expression von CD134 und CD103 folgt diesem Trend, fast 50% der CCR6+, im Gegensatz zu <15% der CCR6- CD25+ Zellen exprimieren CD134 und CD103 (Abbildung 7A und 7B rechts). Auffällig ist die Expression von ICOS; sie korreliert fast vollständig mit einer CCR6 Expression (Abbildung 7B links). Anhand von Abbildung 7, zeigen CCR6+ CD25+ T-Zellen tatsächlich einen typischen Treg Zell Phänotyp, wobei die stärkste Expression der Marker auf den CCR6+ Zellen zu finden ist. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass CCR6+ CD25+ T-Zellen möglicherweise eine aktivierte oder besonders aktive Subpopulation von Treg darstellen. Auch auf den CCR6+ CD25- T-Zellen kann eine leicht erhöhte Expression von CD122, CD103 und GITR beobachtet werden, allerdings zeigen diese Zellen keine CTLA-4 und eine gemischte CD45RB Ausprägung (Abbildung 7A). Somit zeigen auch die CCR6+ CD25- Zellen einen aktivierten Phänotyp, obwohl sie nicht den typischen Treg Zell Phänotyp präsentieren.



**Abbildung 8: FACS Sortierung von CD4+ T-Zellen aufgrund einer CD25+ und CCR6+ Oberflächenexpression.** Gezeigt sind repräsentative Fluoreszenzprofile von CCR6+ CD25+ (unten rechts), CCR6- CD25+ (oben rechts), CCR6+ CD25- (unten links) und CCR6- CD25- (oben links) CD4+ T-Zellen aus *ex vivo* isolierten LN Zellen von naiven BALB/c Mäusen nach erfolgter FACS Sortierung. X-Achse: CD25, Y-Achse: CCR6. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

Um zu überprüfen, ob CCR6 tragende CD4+ T-Zellen tatsächlich funktionelle Treg Zellen sind, welches aufgrund der Expression von Treg charakteristischer Moleküle plausibel erscheint (Abbildung 7), wurden CCR6+ Zellen auf ihre Funktionalität hin untersucht. Treg sind in der Lage *in vitro* eine Effektor T-Zell Proliferation nach polyklonaler oder antigenspezifischer Stimulation zu inhibieren. Diese Inhibition ist zellkontaktabhängig und scheint *in vitro* unabhängig von einer Zytokin Sekretion zu sein (zur Übersicht siehe (19)).



**Abbildung 9: Funktionelle Eigenschaften von CD25+ CD4+ CCR6+ T-Zellen.** A) Suppressions-Assay mit *ex vivo* sortierten CCR6+ und CCR6- CD25+ CD4+ T-Zellen aus den LN von naiven BALB/c Mäusen. Im Standard *in vitro* Suppressions-Assay zum Nachweis von Treg wurden wie in Abbildung 8 über FACS sortierte CCR6+ und CCR6- CD25+ T-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen eingesetzt, um die anti-CD3 stimulierte CD25- CD4+ Effektor T-Zell Proliferation zu supprimieren. Die Proliferation wurde über <sup>3</sup>H-Thymidin bestimmt. B) Suppressions-Assay mit CD25+ und CD25- CCR6+ CD4+ T-Zellen. Gleicher Assay wie in A) jedoch wurden zum Vergleich CCR6+ CD25+ und CCR6+ CD25- CD4+ T-Zellen zur Inhibition der CD4 T-Zell Proliferation im Verhältnis 0,33 eingesetzt Die Graphen von A) und B) zeigen repräsentativ ein Experiment von drei unabhängig gemachten Versuchen mit Zellen aus jeweils 8-10 Tieren. C) Hohe Dosen von IL-2 brechen den anergischen Status von CCR6+ (graue Balken) und CCR6- CD25+ T-Zellen (weiße Balken). Anti-CD3 vermittelter Proliferations-Assay in An- oder Abwesenheit von IL-2. Die Proliferation wurde über <sup>3</sup>H-Thymidin bestimmt. Links: beide Treg Untergruppen ohne IL-2 Zugabe. Rechts: mit 20U/ml IL-2 nach 72h Proliferation. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängig gemachten Versuchen mit Zellen aus jeweils 10 Tieren.

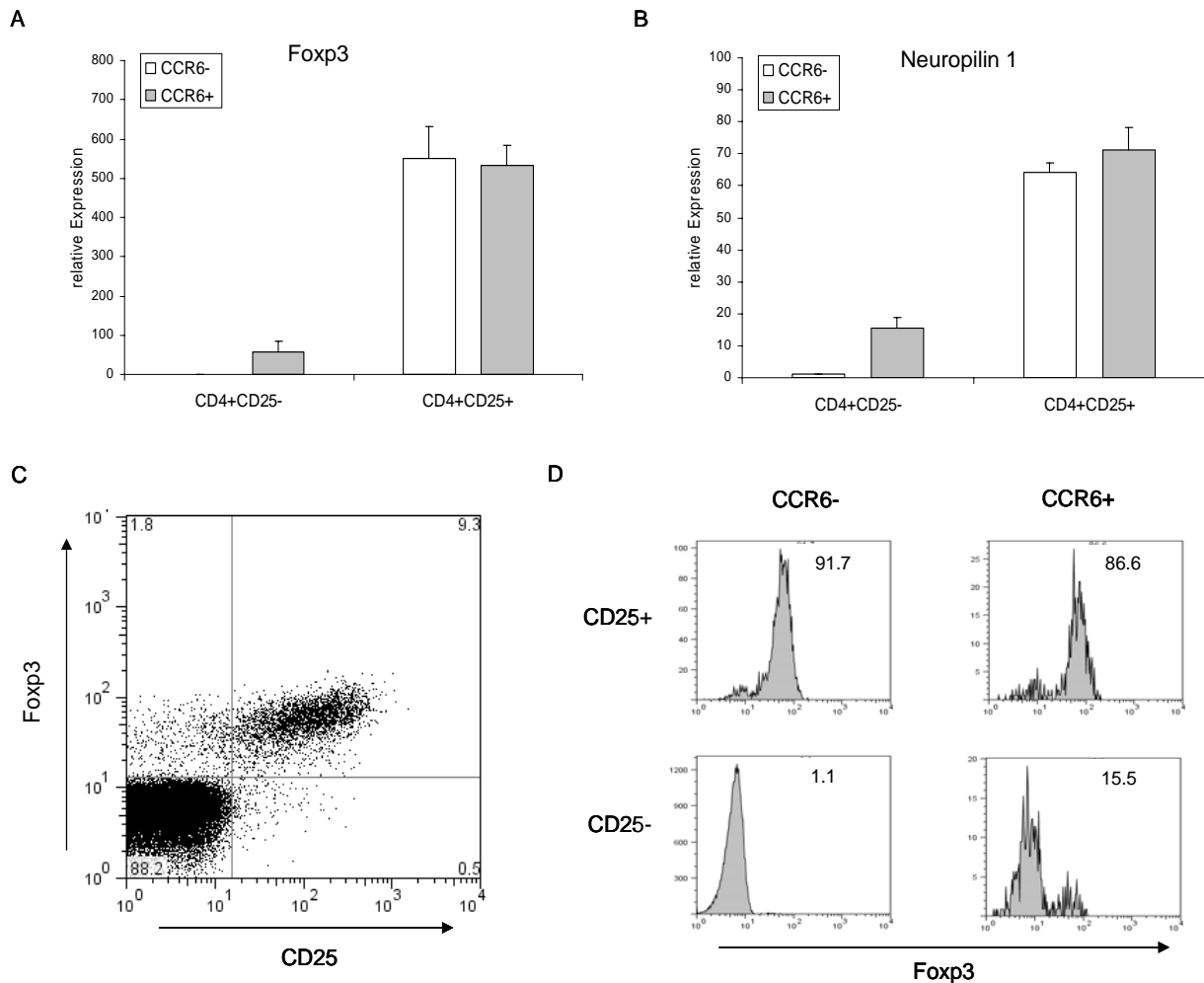
Um die Funktionalität von CCR6+ Treg zu überprüfen, wurden über MACS angereicherte CD25+ Zellen aus BALB/c Mäusen per Durchflusszytometrie, abhängig von einer CD25 und CCR6 Expression sortiert (siehe 2.2.4.2) und in einem Standard Suppressions-Assay eingesetzt (siehe 2.2.10.1). Abbildung 8 zeigt repräsentativ die Zellpopulationen nach der FACS Sortierung, die im Suppressions-Assay mit bestrahlten APC eingesetzt wurden. Der erhaltene Reinheitsgrad der Populationen nach FACS Sortierung betrug mit dieser Methode standardisiert über 90%. Wie in Abbildung 9A gezeigt, inhibieren beide CCR6+ und CCR6- CD25+ CD4+ T-Zellen im gleichem Maße eine CD4+ Effektorzell-Proliferation. CCR6+ Treg scheinen daher im Suppressions-Assay eine vergleichbare suppressive Wirkung zu haben. Demzufolge zeigen CCR6+ CD25+ T-Zellen neben dem typischen Treg Phänotyp (Abbildung 7) auch die Funktion von Treg Zellen *in vitro*. Um zu überprüfen, ob möglicherweise auch die CCR6+ CD25- CD4+ T-Zellen ein regulatorisches Potential besitzen, welches vom Phänotyp nicht auszuschließen ist (Abbildung 7A), wurden auch diese Zellen im Suppressions-Assay getestet (Abbildung 9B). Aus diesem Versuch geht hervor, dass CD25- CCR6+ T-Zellen *in vitro* keine suppressive Wirkung zeigen.

Ein weiteres Charakteristikum von CD25+ Treg ist ihr anergisches Verhalten, d.h. sie zeigen keine Proliferation nach polyklonaler oder antigenspezifischer Stimulation *in vitro*. Der anergische Status der Treg Zellen lässt sich aber durch Zugabe hoher Konzentrationen von Interleukin 2 (IL-2) zur Kultur brechen (zur Übersicht siehe (19)). Zur Überprüfung dieses Charakteristikums wurden wiederum FACS sortierte Zellpopulationen (siehe Abbildung 8) in An- oder Abwesenheit von IL-2 zusammen mit anti-CD3 *in vitro* stimuliert (Abbildung 9C). Wie deutlich in Abbildung 9C zu erkennen ist, verhalten sich beide CCR6+ und CCR6- Treg ähnlich. Nur in Anwesenheit von IL-2 zeigen beide Populationen eine anti-CD3 stimulierte Proliferation *in vitro*.

Vor Kurzem wurde ebenfalls anhand von Genexpressionsanalysen Foxp3 als Schlüssel Transkriptionsfaktor von CD25+ CD4+ Treg identifiziert (45, 138, 139). Zur Überprüfung, ob Foxp3 auch auf CCR6+ CD25+ Zellen exprimiert ist, wurde die Foxp3 Expression von FACS sortierten CCR6+ und CCR6- Zellen zunächst über Realtime RT-PCR (siehe 2.2.8) untersucht. Wie in Abbildung 10A zu erkennen ist, zeigen beide Subpopulationen eine vergleichbar hohe Foxp3 Ausprägung auf mRNA Ebene. Überraschenderweise zeigt die CCR6+ CD25- T-Zellpopulation auch eine geringe Foxp3 Expression.

Weiterhin konnte in der Genexpressionsanalyse eine erhöhte Expression für Neuropilin-1 (Nrp1) nachgewiesen werden (Tabelle 8). Eine kürzlich veröffentlichte Publikation konnte zeigen, dass Nrp1 Foxp3 abhängig reguliert wird und somit möglicherweise einen

verlässlichen Marker für Foxp3+ Treg definiert (51). Als Problematisch erweist sich jedoch, dass Nrp1 auch auf einer Vielzahl von weiteren Zelltypen exprimiert wird und derzeit noch kein monoklonaler Antikörper gegen Nrp1 erhältlich ist (140). Die Realtime RT-PCR mit Nrp1 spezifischen Oligonukleotiden zeigt, dass in der Tat beide Treg Populationen, unabhängig von CCR6 eine hohe Nrp1 Expression aufweisen (Abbildung 10B).



**Abbildung 10: Foxp3 und Neuropilin-1 Expression von CCR6+ CD25+ CD4+ T-Zellen.** A) Realtime RT-PCR für Foxp3 von CD25+ und CD25- CD4+ T-Zellen aus *ex vivo* isolierten LN Zellen von naiven BALB/c Mäusen. Weiße Balken CCR6-, graue Balken CCR6+ wie in Abb. 8 FACS sortierte CD4+ T-Zellen. B) Realtime RT-PCR für Neuropilin-1 von CD25+ und CD25- CD4+ T-Zellen aus *ex vivo* isolierten LN Zellen von naiven BALB/c Mäusen. Weiße Balken CCR6-, graue Balken CCR6+ wie in Abb. 8 FACS sortierte CD4+ T-Zellen. Die Graphen von A) und B) zeigen repräsentativ ein Experiment von 2-4 unabhängigen Versuchen mit Zellen aus jeweils 8-10 Tieren. C) Fluoreszenzprofil von *ex vivo* isolierten Lymphknoten CD4+ T-Zellen aus naiven BALB/c Mäusen. X-Achse CD25, Y-Achse Foxp3. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. D) Foxp3 Expression von CCR6+ und CCR6- CD25+ und CD25- T-Zellen (wie in 10C), dargestellt als Histogramm. Die Zahlen bezeichnen den relativen Anteil (%) an Foxp3+ Zellen innerhalb der Population.

Allerdings exprimieren auch hier die CCR6+ CD25- eine geringe aber signifikante Menge an Nrp1 (Abbildung 10B). Somit wird in der Tat ein ähnliches Bild für die Nrp1 Expression

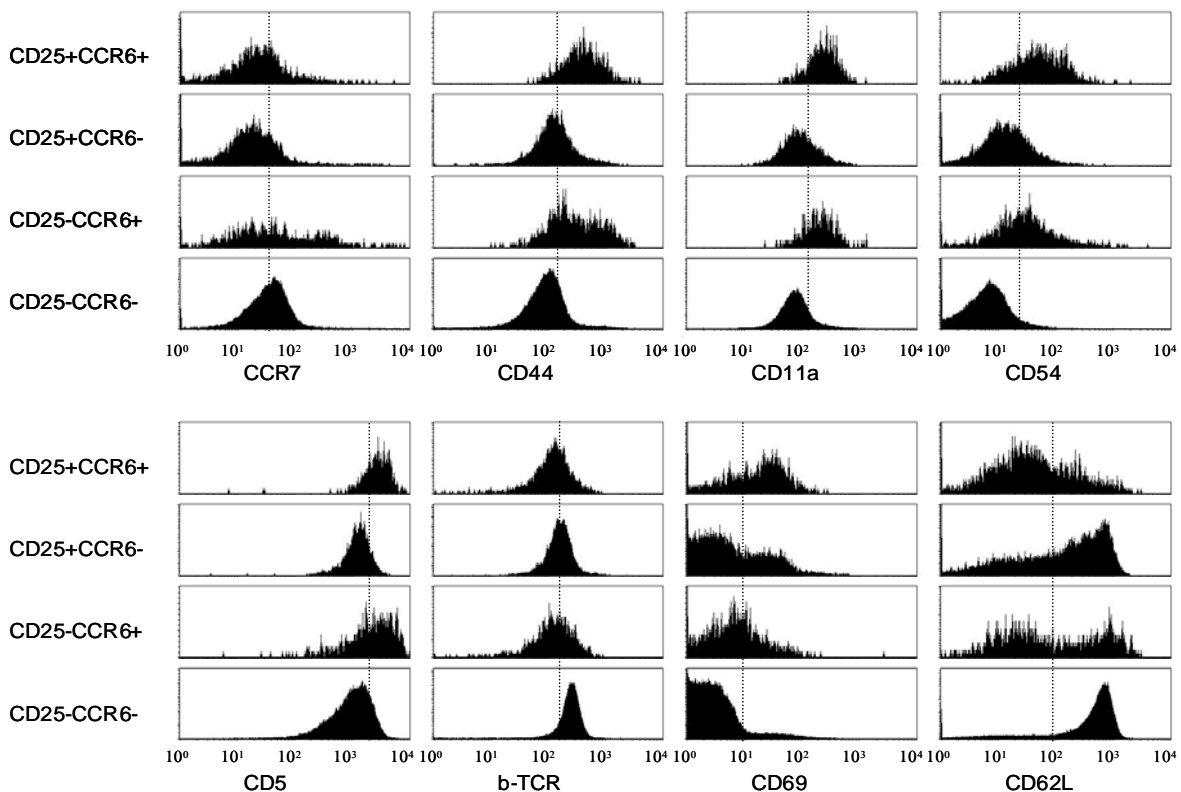


erhalten wie für den Treg spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3. Unter Zuhilfenahme des erst kürzlich kommerziell zur Verfügung stehenden anti-Maus-Foxp3 Antikörpers, konnte die Foxp3 Expression auf Proteinebene durchflusszytometrisch bestimmt werden (Abbildung 10C und D). In Abbildung 10C ist ein repräsentatives Fluoreszenzprofil von CD4+ Zellen aus LN mit der CD25 Expression im Vergleich zur Foxp3 Expression gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass tatsächlich der Großteil der Foxp3 Expression auf CD25 exprimierenden Zellen zu finden ist. Nur ein sehr geringer Anteil der CD25+ Zellen scheint kein Foxp3 zu exprimieren (<1%). Weiterhin findet sich nur auf einem Bruchteil der CD25- CD4+ T-Zellen eine Foxp3 Expression (<2%), welches in gutem Einklang mit den kürzlich veröffentlichten Untersuchungen von Foxp3-GFP (*green fluorescent protein*) oder -RFP (*red fluorescent protein*) knockin (KI) Mäusen steht. Allerdings bestehen auch hier gewisse Varianzen in unterschiedlichen Geweben ((141, 142), Daten nicht gezeigt). Abbildung 10D zeigt die spezifische Foxp3 Ausprägung auf den vier unterschiedlichen Subpopulationen, abhängig von CD25 und CCR6. Während beide CD25+ Populationen positiv für Foxp3 sind, zeigt auch ein geringer Anteil von CCR6+ CD25- CD4+ T-Zellen eine Foxp3 Expression auf Proteinebene (~15%), wobei faktisch alle CCR6- CD25- T-Zellen negativ sind (~1%).

Aufgrund dieser Ergebnisse können CCR6+ CD25+ CD4+ T-Zellen als eine Subpopulation von CD25+ Treg definiert werden. Außer einer zum Teil erhöhten Ausprägung von Treg charakteristischen Molekülen, scheint sich diese Treg Zellpopulation jedoch nicht von den CCR6- Treg zu unterscheiden. Die Beobachtung, dass ein geringer Anteil an CCR6+ CD25- T-Zellen Foxp3 und Nrp1 exprimieren, deutet darauf hin, dass ein Teil dieser Zellen möglicherweise ebenfalls eine CD25 negative Treg Zell Subpopulation darstellt. Aufgrund der Tatsache, dass alle Foxp3+ CD4+ T-Zellen CD45RB schwach ausprägen (Daten nicht gezeigt), könnte dies die differentielle Expression von CD45RB innerhalb dieser Population erklären (vgl. Abbildung 7). Für diese mögliche regulatorische CD25- Population könnte somit CD45RB als Marker herangezogen werden. Hier können allerdings nur weitere Experimente einen klaren Zusammenhang liefern. Festzuhalten bleibt, dass der Großteil der CCR6+ CD25- T-Zell Subpopulation kein regulatorisches Potential *in vitro* hat (Abbildung 9B) und somit nicht als Treg Population gelten kann.

### 3.2.3 Die CCR6 Expression segregiert mit einem aktivierten Effektor-Gedächtniszell Phänotyp

Vorausgegangene Publikationen stellten eine CCR6 Expression nur auf bestimmten CD4+ Gedächtniszellen fest (126). Auch der Phänotyp in CCR6 defizienten Mäusen suggerierte einen Einfluss auf spezielle CD4+ T-Zellpopulationen, wobei ein kausaler Zusammenhang schwer zu erstellen war, da CCR6 zu einem großen Teil auch auf B-Zellen und Subpopulationen von dendritischen Zellen exprimiert ist (136). Ferner steht erst seit kurzem ein CCR6 spezifischer monoklonaler anti-Maus Antikörper kommerziell zur Verfügung, welches eine frühere Analyse der CCR6 Expression innerhalb des murinen Systems erschwerte. Somit standen zum Zeitpunkt der Analyse hauptsächlich Erkenntnisse aus dem Menschen zur Verfügung.



**Abbildung 11: CCR6+ Treg zeigen einen aktivierten Effektor-Gedächtniszell Phänotyp.** Abbildung 11 zeigt repräsentative Fluoreszenzprofile von *ex vivo* isolierten Lymphknotenzellen aus naiven BALB/c Mäusen. Gezeigt ist die Expression von CCR7, CD44, CD11a und CD54 (obere Reihe) und CD5,  $\beta$ -TCR, CD69 und CD62L (untere Reihe) auf CD4+ T-Zellen. Die Gruppen sind wie in Abbildung 7 auf die vier Populationen, abhängig von der CCR6 und CD25 Expression, fokussiert und als Histogramm dargestellt. Die Linie dient jeweils zur optischen Orientierung.

Zur Überprüfung, ob tatsächlich eine CCR6 Ausprägung ebenfalls in der Maus nur auf Gedächtniszellen gefunden wird, wurde eine 4-Farben durchflusszytometrische Analyse

durchgeführt, wobei neben CD4, CD25 und CCR6 noch weitere charakteristische Aktivierungs- oder Gedächtniszell Marker benutzt wurden (Abbildung 11).

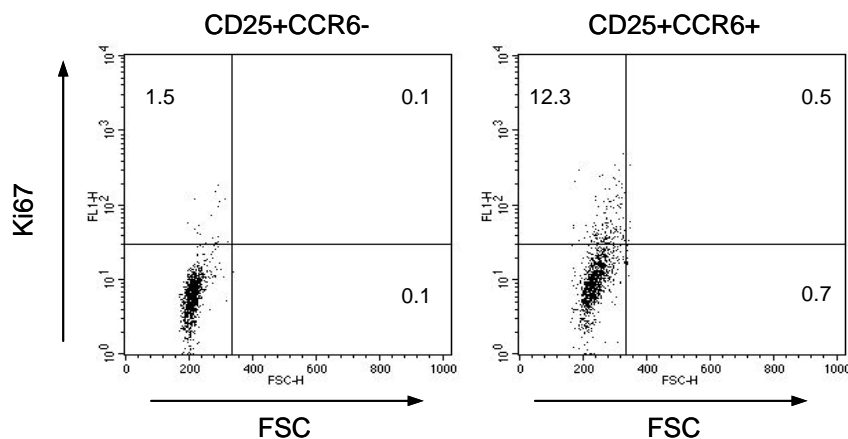
Analysiert wurde die Expression von CD5, CD11a (LFA-1), CD44, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-Selektin), CD69 sowie CCR7. Die Expression von CD44 wird in der Maus häufig als typischer Gedächtniszell Marker eingesetzt (143). Weiterhin werden aufgrund von Studien an humanen PBMC die Moleküle L-Selektin und CCR7 zur Charakterisierung von zwei unterschiedlichen Gedächtniszell-Typen herangezogen. Eine hohe CCR7 und CD62L Expression wird hier auf Zentralen-Gedächtniszellen (*central-memory T cells*,  $T_{CM}$ ), eine niedrige CCR7 und CD62L Expression auf Effektor-Gedächtniszellen (*effector-memory T cells*,  $T_{EM}$ ) beobachtet (123).  $T_{EM}$  werden vermehrt in der Peripherie gefunden, welches durch den Verlust von der Expression der LN *homing* Marker CCR7 und CD62L begünstigt wird. Weiterhin zeichnen sie sich durch eine erhöhte Zytokin Produktion nach einer Antigen Restimulation *in vitro* aus (123). Im Gegensatz dazu zirkulieren  $T_{CM}$  hauptsächlich im LN und scheinen den Großteil der ruhenden Gedächtniszellen darzustellen (zur Übersicht siehe (143)). Der Zusammenhang zwischen beiden Zellpopulationen ist noch nicht völlig aufgeklärt, zumal eine Übertragung auf das Mausmodell nicht zu 100% übernommen werden kann (144-146), allerdings scheinen  $T_{EM}$  möglicherweise aus  $T_{CM}$  hervorzugehen (143, 146). Eine Hochregulation von CD5, CD11a, CD54 und CD69 segregiert typischerweise mit aktivierten Zellen, wobei alle Marker in der Regel auch auf Gedächtniszellen eine höhere Expression zeigen (143). In Abbildung 11 ist klar zu erkennen, dass die Expression von CCR6 auf CD4+ T-Zellen mit einem aktivierten und Effektor-Gedächtniszell Phänotyp einhergeht. So zeigen beide CCR6+ Zellpopulationen eine hohe CD5, CD54, CD11a und CD44 Expression, wobei jeweils die CCR6 negativen Populationen eine geringere Expression aufweisen. Eine vergleichbar geringe CCR7 Expression ist auf beiden Treg und der CCR6+ CD25- Population zu beobachten. Herausragend ist jedoch der Unterschied innerhalb der CD25+ Population bezüglich der Aktivierungs- oder Gedächtniszell-Marker CD62L und CD69. Die CCR6+ Population zeigt hier mehrheitlich eine CD69 Expression bei dem fast gänzlichen Verlust der L-Selektin Expression. Die Expression von CCR6+ tragenden CD25-Zellen scheint auch hier eine Mischpopulation zu beinhalten (vgl. CD45RB, Abbildung 7A), sie prägen zum Teil hohe und niedrige Mengen L-Selektin aus.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die CCR6+ CD25+ Treg Population einen aktivierten Effektor-Gedächtniszell Phänotyp zeigt. So sind viele Adhäsionsmoleküle und Integrine hochreguliert, weiterhin ermöglicht eine geringe L-Selektin und CCR7 Expression

das Verlassen der Lymphe und den Eintritt in die Peripherie, welches indirekt gut mit der Beobachtung der höchsten CCR6+ Anzahl in den PP und im Blut in Einklang gebracht werden kann (vgl. Abbildung 6).

### 3.2.4 Die CCR6 Expression definiert T-Zellen mit einer hohen Proliferationsrate

Der in 3.2.3 beschriebene Phänotyp deutet darauf hin, dass CCR6+ Treg Antigenkontakt erfahren und daraufhin eine Zellteilung eingeleitet haben. Insbesondere die Hochregulation von CD69 und die verminderte Expression vom TCR Komplex und CD62L belegen diese These (Abbildung 11). CD69 wird nach dem Antigenkontakt schnell hochreguliert, wobei die TCR Expression sich entgegengesetzt verhält. L-Selektin wird ebenfalls auf normalen CD4+ Effektorzellen relativ schnell über zelleigene Proteasen gespalten und so von der Zelloberfläche entfernt (*shedding*), später dann aber auch auf mRNA Ebene herunterreguliert. Ein Antigenkontakt mit entsprechender Kostimulation leitet in der Regel die Proliferation von CD4+ T-Zellen ein. Zur Überprüfung, ob CCR6+ T-Zellen ebenfalls proliferierende Zellen darstellen, wurde eine intrazelluläre Färbung gegen das Proliferations-assoziierte nukleäre Antigen Ki67 vorgenommen (147).

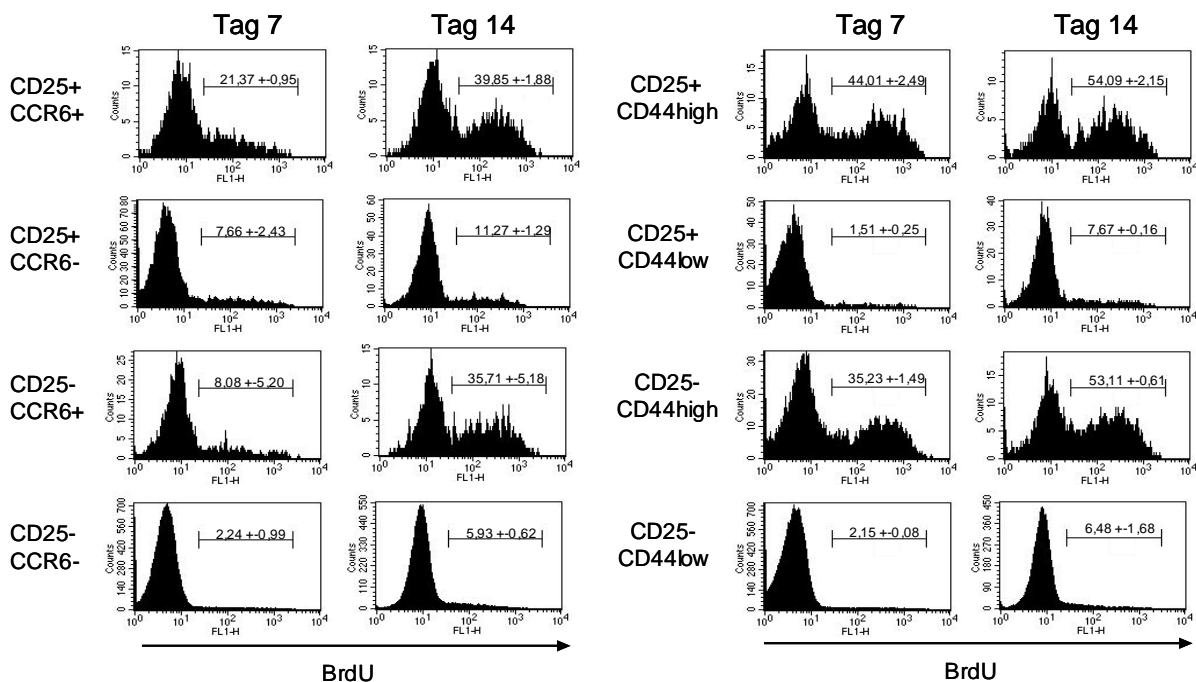


**Abbildung 12: Ki67 Expression von CCR6+ Treg.** Durchflusszytometrische Analyse von CCR6- (links) und CCR6+ (rechts) CD25+ CD4+ T-Zellen aus *ex vivo* isolierten Lymphknotenzellen von naiven BALB/c Mäusen nach intrazellulärer Ki67 Färbung. X-Achse: FSC (Vorwärtsstreuung), Y-Achse: Ki67. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

In Abbildung 12 ist deutlich zu erkennen, dass unter den CCR6+ Zellen ein wesentlich größerer Teil im Vergleich zu den CCR6- Zellen Ki67 positiv ist (12.3% zu 1.5%). Weiterhin zeigen die Zellen auch ein generell größeres Zellvolumen, eindeutig im höheren

Fluoreszenzprofil von Vorwärtsstreulicht (FSC) Signal zu erkennen (Abbildung 12). Einhergehend mit einer Proliferation verändern T-Zellen auch ihre Größe und werden zu sog. T-Zell *Blasten*. CCR6+ Treg scheinen daher in der Tat zum Grossteil proliferierende Zellen zu sein. Der beobachtete Phänotyp könnte daher die Folge von spezifischem Antigenkontakt sein. Außerdem zeigen diese Ergebnisse, dass die in der Genexpressionsanalyse gefundene erhöhte mRNA Expression von Ki67 fast ausschließlich von CCR6+ CD25+ T-Zellen herrührt (vgl. Tabelle 8).

Da vor kurzem eine hohe Proliferationsrate als Charakteristikum für Effektor-Gedächtniszellen beschrieben wurde (148), sollte über *in vivo* BrdU (5-Bromo-2-Desoxyuridin) Markierungen die relative Proliferationsrate der CCR6+ Treg bestimmt werden (siehe 2.2.11). Hierfür wurde naiven Mäusen BrdU im Trinkwasser (0,8mg/ml) über einen Zeitraum von 7 bis 14 Tagen verabreicht. Anschließend wurden die Lymphknoten isoliert und die CD4+ T-Zellen im Durchflusszytometer untersucht (Abbildung 13).



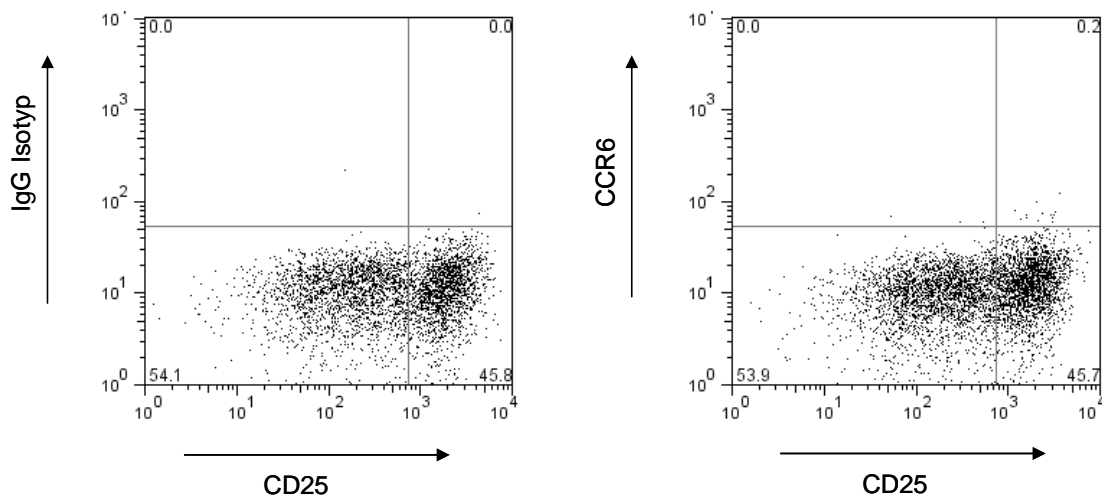
**Abbildung 13: CCR6+ CD4+ T-Zellen zeigen eine erhöhte Proliferation *in vivo*.** Naiven BALB/c Mäusen wurde BrdU für 7 (jeweils linke Spalte) oder 14 Tage (jeweils rechte Spalte) im Trinkwasser verabreicht. Anschließend wurden die CD4+ Lymphknotenzellen durchflusszytometrisch auf BrdU, CD25 und CCR6 (linke Spalte) oder BrdU, CD25 und CD44 (rechte Spalte) untersucht. Die BrdU Expression der jeweiligen CD4+ Population (CD25+ CCR6+, CD25+ CCR6-, CD25- CCR6+ und CD25- CCR6-) ist als Histogramm dargestellt. Die relativen Anteile (%) an BrdU positiven Zellen sind angedeutet und entsprechen dem Mittelwert von zwei unabhängig untersuchten Tieren. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängig gemachten Versuchen.

In Abbildung 13 ist eindeutig zu erkennen, dass nach 7 Tagen ein großer Teil von CCR6+ CD4+ T-Zellen BrdU positiv ist. Dieses gilt für die CD25+ als auch die CD25- Population.

Nach weiteren 7 Tagen haben bereits über die Hälfte der Zellen BrdU inkorporiert. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte anhand von CD44 als Marker zeigen, dass die Treg Proliferation in naiven Mäusen Antigen vermittelt ist (149). In Abbildung 13 ist daher zum Vergleich auch das Verhalten von CD44+ T-Zellen analysiert worden. Auch hier verhalten sich die CD44+ CD25+ und CD25- Populationen ähnlich. Eine BrdU Inkorporation von >40% ist allerdings schon nach 7 Tagen im Gegensatz zu den CCR6+ Zellen zu erkennen. Offensichtlich scheint die CCR6 Expression leicht verzögert zu sein, während CD44 sehr rasch nach Antigenkontakt hochreguliert wird.

### 3.2.5 Eine CCR6 Expression wird nach Antigenkontakt *in vivo* induziert

Um zu Überprüfen ob CCR6, ähnlich wie zum Beispiel CD25 oder CD5, einen typischen Aktivierungs-Marker darstellt, der nach einer anti-CD3 vermittelten *in vitro* Stimulation von CD4+ T-Zellen hochreguliert wird, wurden CD4+ T-Zellen über MACS sortiert und für CCR6 depletiert und über einen längeren Zeitraum *in vitro* kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde dann die CCR6 Expression der kultivierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.



**Abbildung 14: Der Chemokinrezeptor CCR6 wird auf CD4+ T-Zellen nicht nach *in vitro* Stimulation hochreguliert.** Über MACS aufgereinigte CD25+ CCR6- CD4+ T-Zellen aus LN von naiven BALB/c Mäusen wurden für 3-6 Tage in Anwesenheit von 1µg/ml anti-CD3 und 20U IL-2 *in vitro* stimuliert. Anschließend wurde eine FACS Analyse bezüglich der CCR6 Expression durchgeführt. Links: Isotyp-Kontrolle gegen CD25, rechts: CCR6 Färbung gegen CD25. Gezeigt ist die Färbung am Tag 6 nach Stimulation. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen mit Zellen aus mindestens 5 Tieren.

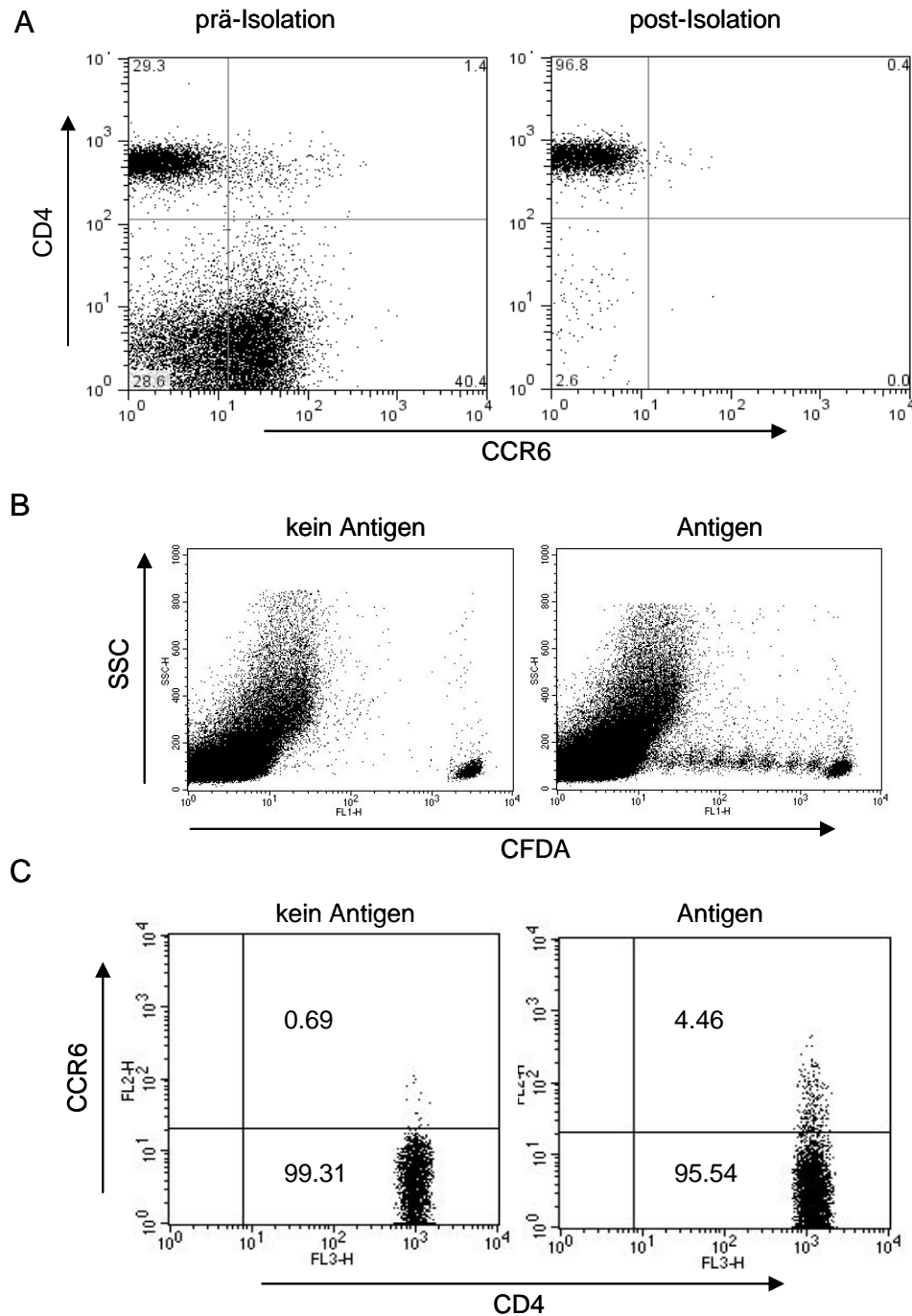
Aus Abbildung 14 geht hervor, dass eine *in vitro* Stimulation von CD4+ T-Zellen mit anti-CD3 und IL-2 nicht zu einer CCR6 Hochregulation führt. Sowohl bei CD25+ als auch bei

CD25- CD4+ T-Zellen (Daten nicht gezeigt) kann eine Expression des Rezeptors nach Aktivierung für bis zu 6 Tage *in vitro* nicht induziert werden. Eine CCR6 Hochregulation konnte auch nicht auf CD4+ T-Zellen unter gleichen Bedingungen, ohne CCR6 Depletion, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen sind übereinstimmend mit publizierten Ergebnissen von humanen PBMC (115, 126). Hier konnte nur in einer gemischten Lymphozyten Kultur eine CCR6 Hochregulation beobachtet werden (115). Da diese Kulturen *in vitro* möglicherweise mehr die physiologische Situation *in vivo* simulieren, deutet dieses auf eine Beteiligung von zusätzlichen Wachstumsfaktoren hin, die für eine CCR6 Induktion benötigt werden. Daher sollte überprüft werden, ob eine CCR6 Hochregulation *in vivo* induziert werden kann.

Zu diesem Zweck wurde ein adoptives Transferexperiment im Mausmodell durchgeführt (in Zusammenarbeit mit Fabiola Puentes, MDC). Hierfür wurden CD4+ T-Zellen aus T-Zell Rezeptor transgenen Tieren (TG4 oder DO11.10) über MACS isoliert. Daraufhin wurden die CCR6 positiven Zellen über MACS depletiert und anschließend mit dem Zell-Farbstoff CFDA-SE gefärbt (siehe 2.2.12). CFDA+ CCR6- CD4+ T-Zellen (Abbildung 15A, rechts) wurden dann in syngene Tiere über eine intravenöse Injektion transferiert. Gezeigt ist ein Experiment mit Tg4 Mäusen als transgene Donoren (transgen für MBP spezifischen TCR) und B10.PL als syngene Empfänger. Anschließend wurden die Tiere mit dem TCR-Transgen spezifischem Peptid in CFA stimuliert. Das *Priming* (Antigengabe) erfolgte hier mit MBP AC<sub>1-11</sub> Peptid.

Die transferierten Zellen sollten dann aufgrund des Antigenkontaktes eine Proliferation einleiten, welches über die Verdünnung des CFDA-SE in den Zellen *ex vivo* verfolgt werden kann. Abbildung 15B zeigt das Verhalten der T-Zellen nach Transfer und antigenspezifischer Aktivierung (Abbildung 15B, rechts) im Vergleich zu transferierten Zellen ohne Peptid Gabe (Abbildung 15B, links). Es ist deutlich zu erkennen, dass nur nach antigenspezifischer Aktivierung die transferierten Zellen eine Proliferation einleiten, zu verfolgen an der Verdünnung von CFDA-SE mit jeder Zellteilung (Abbildung 15B).

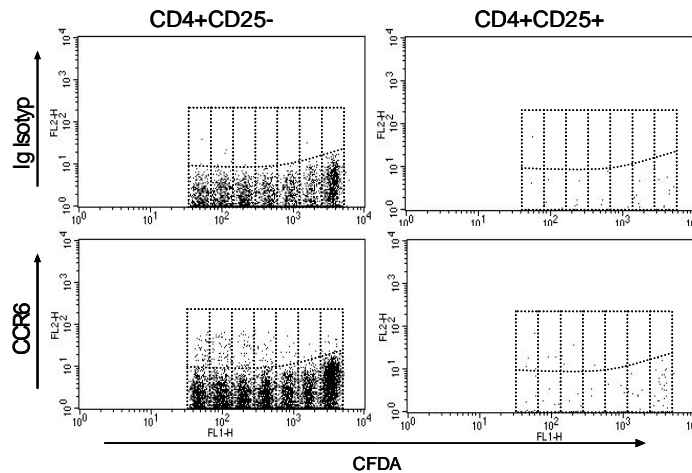
Weiterhin wurde das Verhalten von CCR6 untersucht. Abbildung 15C zeigt die durchflusszytometrische Analyse für CCR6 von Zellen mit oder ohne Antigengabe. Es ist zu erkennen, dass lediglich die Zellen aus Tieren mit Antigengabe CCR6 exprimieren (vgl. Abbildung 15C, rechts und links).



**Abbildung 15: CCR6 wird auf CD4+ T-Zellen nach Antigenkontakt *in vivo* induziert.** A) Fluoreszenzprofil von *ex vivo* isolierten Lymphozyten aus Milz und LN von TG4 transgenen Mäusen vor (links) und nach erfolgter CCR6 Depletion und CD4 T-Zell Isolation über MACS (rechts), X-Achse: CCR6, Y-Achse: CD4. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. B) Fluoreszenzprofil von CFDA-SE markierten TG4 transgenen CD4+ T-Zellen nach *ex vivo* Isolierung aus den LN von B10.PL Empfänger-Mäusen, 9 Tage nach adoptiven Transfer. Links: ohne Antigengabe, rechts: mit Antigengabe am Tag 0. X-Achse: CFDA-SE, Y-Achse: SSC. C) Fluoreszenzprofil von TG4 transgenen CFDA-SE+ CD4+ Zellen aus B) für CCR6. X-Achse: CD4, Y-Achse: CCR6. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von 4 unabhängigen Versuchen.



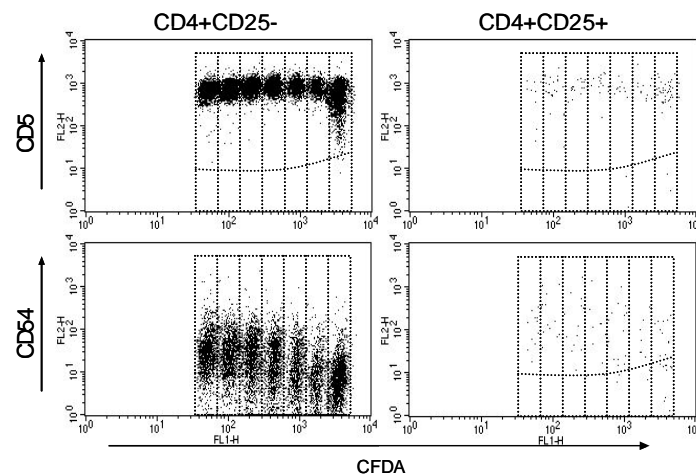
Zusätzlich zeigt dieses Experiment, dass keine spontane oder homöostatisch induzierte CCR6 Hochregulation eintritt und dass die CD4+ T-Zellen in der Lage sind, CCR6 *de novo* zu exprimieren. Außerdem bleibt festzuhalten, dass nach 9 Tagen (ab Antigengabe) nur ein geringer Teil der proliferierten Zellen CCR6 hochreguliert hat (<5%).



**Abbildung 16: Verzögerte CCR6 Expression nach Antigenkontakt *in vivo*.** Repräsentative FACS Analyse für CFDA-SE+ transferierte Tg4 transgene CD4+ CCR6- T-Zellen (wie in Abbildung 15A, rechts) 9 Tage nach Transfer in B10.PL Mäuse mit Antigengabe am Tag 0. Die Zellen wurden aus den LN der B10.PL Empfänger-Mäuse isoliert und *ex vivo* analysiert. CD25- (linke Spalte) oder CD25+ (rechte Spalte) Zellen wurden mit CCR6 (untere Reihe) oder der entsprechenden Isotyp-Kontrolle (obere Reihe) gefärbt. Dargestellt ist jeweils die CFDA-SE+ CD4+ Population. X-Achse: CFDA-SE, Y-Achse: CCR6. Die Gitternetze deuten die jeweiligen Tochterpopulationen an. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von 4 unabhängigen Versuchen.

Bei einer genaueren Betrachtung der CCR6 Expression kann festgestellt werden, dass die CCR6 Induktion nicht direkt nach Antigenkontakt erfolgt, sondern mehrere Zellteilungen später erfolgt. Abbildung 16 zeigt die CFDA+ Zellpopulation 9 Tage nach Transfer und *Priming*. Es ist deutlich zu erkennen, dass die CCR6 Expression sowohl auf den CD25+ als auch auf den CD25- Zellen erst eindeutig ab der 3. Teilung erscheint. Die gezeigte Isotyp-Kontrolle zeigt die Spezifität der Antikörperfärbung.

Eine weitere Untersuchung der *in vivo* proliferierenden Zellen wurde mit zwei Oberflächenproteinen durchgeführt, die charakteristisch für den Gedächtniszell-Phänotyp sind (Abbildung 11). CD5 wird offenbar direkt nach Antigenkontakt hochreguliert und scheint stabil innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 9 Tagen auf der Oberfläche von CD25+ als auch CD25- exprimiert zu bleiben (Abbildung 17). CD54 (ICAM-1) zeigt allerdings eine stetige Erhöhung mit jeder Zellteilung und hat nach der 6. Teilung sein Maximum erreicht (Abbildung 17). Eine weitere Verfolgung der transferierten Zellen ist bei dieser Methode leider nicht möglich, da nach 6-8 Teilungen das CFDA-SE vollständig aus den Zellen ausgeschieden ist.

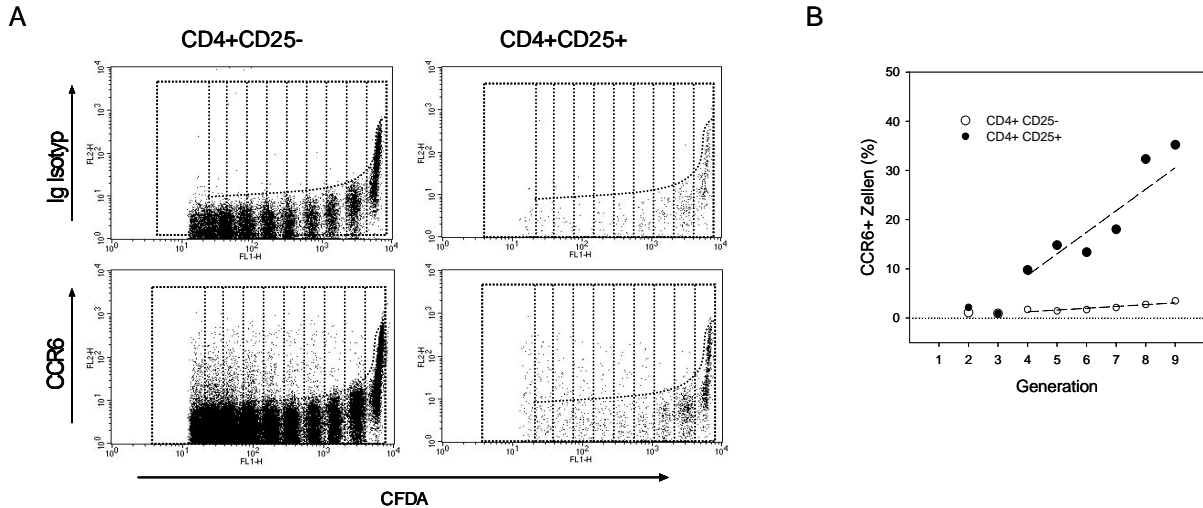


**Abbildung 17: Induktion von CD5 und CD54 nach Antigenkontakt *in vivo*.** Repräsentative FACS Analyse für CFDA-SE+ transferierte Tg4 transgene CD4+ CCR6- T-Zellen (wie in Abbildung 15A, rechts) 9 Tage nach Transfer und Antigengabe wie in Abbildung 16. CD25- (linke Spalte) oder CD25+ (rechte Spalte) Zellen wurden mit CD5 (obere Reihe) oder CD54 (untere Reihe) spezifischen Antikörpern gefärbt. Dargestellt ist jeweils die CFDA-SE+ CD4+ Population. X-Achse: CFDA-SE, Y-Achse: CD5 oder CD54. Die Gitternetze deuten die jeweiligen Tochterpopulationen an. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von 4 unabhängigen Versuchen.

Zur genaueren Untersuchung des Phänomens und zur besseren Charakterisierung der Fraktion an CCR6 positiven CD25+ Zellen, die nach Zellteilung entstehen, wurde das Experiment in einem weiteren TCR transgenen Modell durchgeführt. Hierfür wurden DO11.10 TCR transgene Tiere verwendet. DO11.10 transgene Tiere haben einen spezifischen TCR für das OVA<sub>323-339</sub> Peptid und sind auf dem BALB/c Hintergrund. Da TG4 Mäuse erheblich weniger CD25+ Zellen als DO11.10 besitzen (Daten nicht gezeigt), sollte die CD25+ Fraktion einfacher zu detektieren sein. Grundsätzlich kann auch in diesem Modell das gleiche Phänomen reproduzierbar beobachtet werden (Abbildung 18A). Eine signifikante Hochregulation von CCR6 tritt erst nach der 3. Teilung auf, wobei sich CD25+ und CD25-transferierte T-Zellen analog zu verhalten scheinen. Aufgrund der größeren CD25+ Zellmengen, kann aber ein genaueres Bild vom Anteil der CCR6+ Zellen innerhalb beider Populationen erhalten werden. Unter CD25+ T-Zellen steigt der relative Anteil an CCR6+ Zellen stark an und erreicht nach 8 Teilungen bis zu 40%. Unter den CD25- CD4+ T-Zellen ist der Anstieg jedoch geringer und erreicht nur bis zu 5% in der 9. Generation (Abbildung 18B).

Diese Daten deuten an, dass gewisse Unterschiede zwischen beiden CD4+ T-Zellpopulationen existieren. Die effizientere Konversion zum CCR6+ Phänotyp unter CD25+

Zellen könnte aber möglicherweise auch auf eine bessere Zugänglichkeit innerhalb des Milieus hinweisen.



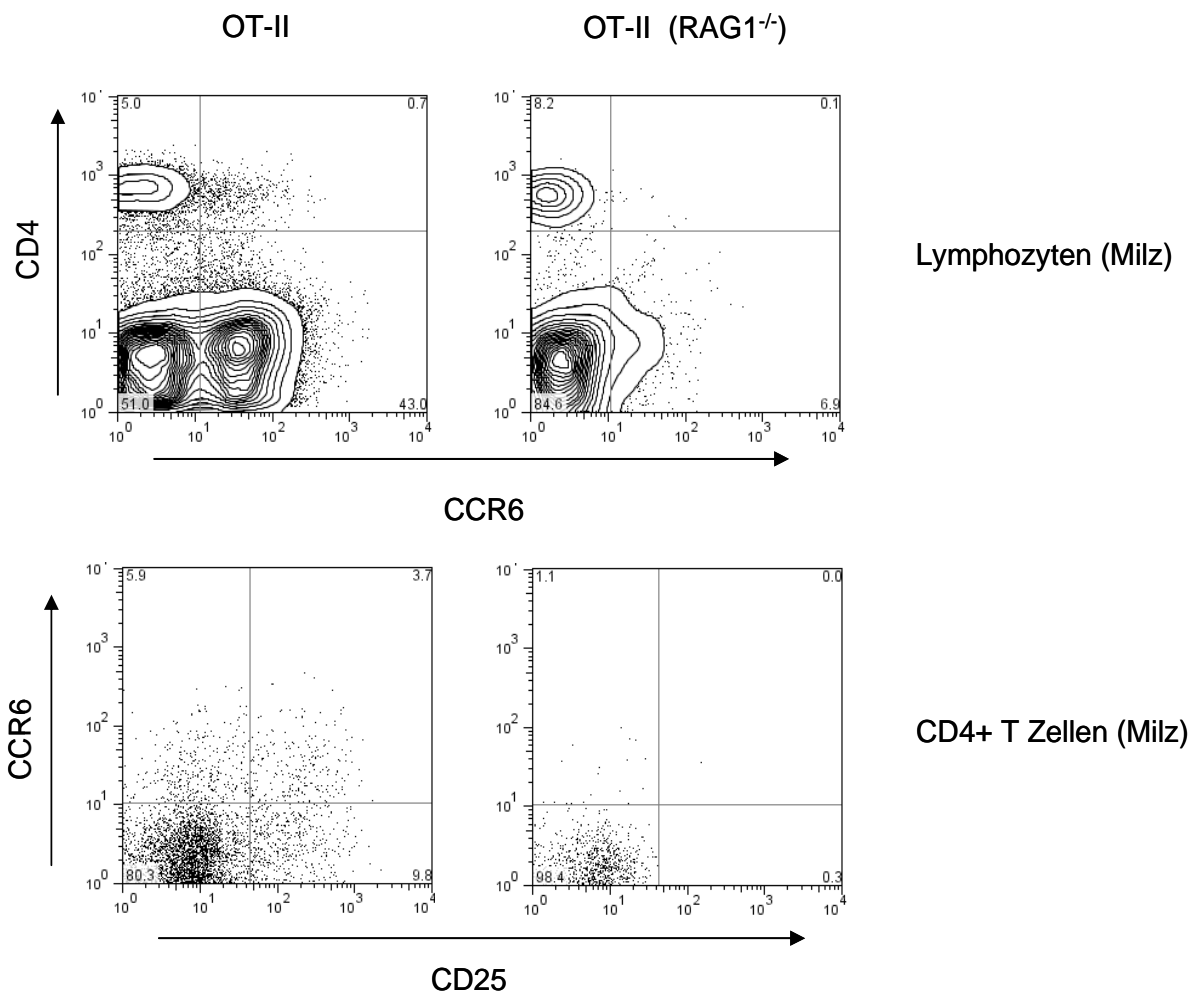
**Abbildung 18: Verzögerte CCR6 Expression nach Antigenkontakt *in vivo* im TCR transgenen DO11.10 Modell.** A) Repräsentative FACS Analyse für CFDA-SE+ transferierte DO11.10 CD4+ CCR6- T-Zellen 9 Tage nach Antigenapplikation und Transfer in BALB/C Mäuse. CD25- (linke Spalte) oder CD25+ (rechte Spalte) Zellen wurden mit CCR6 (untere Reihe) oder der entsprechenden Isotyp-Kontrolle (obere Reihe) gefärbt. Dargestellt ist jeweils die CFDA-SE+ CD4+ Population. X-Achse: CFDA-SE, Y-Achse: CCR6/Ig Isotyp. Die Gitternetze deuten die jeweilige Tochterpopulation an. B) Graphische Darstellung des relativen Anteils an CCR6+ Zellen in den jeweiligen Tochtergenerationen. Weiße Punkte: CD25- Zellen, schwarze Punkte: CD25+ Zellen. Die gestrichelten Linien geben den Trend an. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von 3 unabhängigen Versuchen.

Diese Beobachtung würde indirekt in gutem Einklang mit der Beobachtung stehen, dass der CCR6+ Anteil an CD25+ in naiven Mäusen ebenfalls viel höher ist (3.2.1). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass zum Beispiel ein größerer Anteil von CD25- CCR6+ konvertierten Zellen schneller den LN nach Aktivierung verlässt, bzw. dass CD25+ Zellen länger in diesem Milieu verweilen.

Die Erkenntnisse zur *in vivo* Regulation der CCR6 Expression, stehen im Einklang mit Beobachtungen in RAG1<sup>-/-</sup> Mäusen. RAG gendefiziente Mäuse haben keine CD25+ Treg ((18, 19) und Abbildung 19). Dieses liegt wahrscheinlich an der fehlenden Möglichkeit, weitere endogene TCR $\alpha$  Ketten umzulagern und somit die richtige Affinität für eine Treg Selektion im Thymus zu erfüllen (15, 150).

Zur Überprüfung, ob in diesen Tieren auch keine CCR6+ T-Zellen existieren, wurden Milzzellen aus OT-II transgenen Mäusen und aus OT-II transgenen Tieren mit einem RAG1<sup>-/-</sup> Hintergrund, auf ihre CCR6 Expression hin untersucht. In Abbildung 19 ist deutlich zu erkennen, dass in OT-II transgene Tieren eine typische CCR6 Expression auf Lymphozyten

und CD4+ T-Zellen zeigen. OT-II transgene Tiere ohne RAG1 zeigen dagegen auf Lymphozyten nur eine geringe CCR6 Expression, da sie keine B-Zellen besitzen und praktisch keine CCR6 Expression auf CD4+ T-Zellen zeigen. Diese Beobachtungen stützen die o.g. Erkenntnisse (3.2.5). Eine CCR6 Expression kann auf CD4+ T-Zellen nur nach Antigenkontakt *in vivo* in einem bestimmten Milieu erhalten werden. Da OT-II transgene Mäuse mit einem RAG1<sup>-/-</sup> Hintergrund, ohne die Möglichkeit endoge TCR $\alpha$  Ketten zu nutzen, nur OVA spezifische TCR ausprägen, jedoch kein Ovalbumin (d.h. kein Antigen), können hier keine CD4+ T-Zellen aktiviert werden.



**Abbildung 19: RAG1 gendefiziente OT-II transgene Mäuse haben keine CCR6+ CD4+ T-Zellen.** Durchflusszytometrische Analyse von OT-II transgenen (links) oder OT-II (RAG1<sup>-/-</sup>) Mäusen (rechts). In der oberen Zeile ist das Fluoreszenzprofil von *ex vivo* isolierten Lymphozyten aus der Milz gezeigt. X-Achse: CCR6, Y-Achse: CD4. Darstellung als Kontur-Diagramm. Die untere Zeile zeigt das Fluoreszenzprofil innerhalb der CD4+ T-Zellpopulation der Milzzellen, dargestellt als Punktwolken-Diagramm. X-Achse: CD25, Y-Achse: CCR6. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen mit Zellen aus jeweils zwei Tieren.

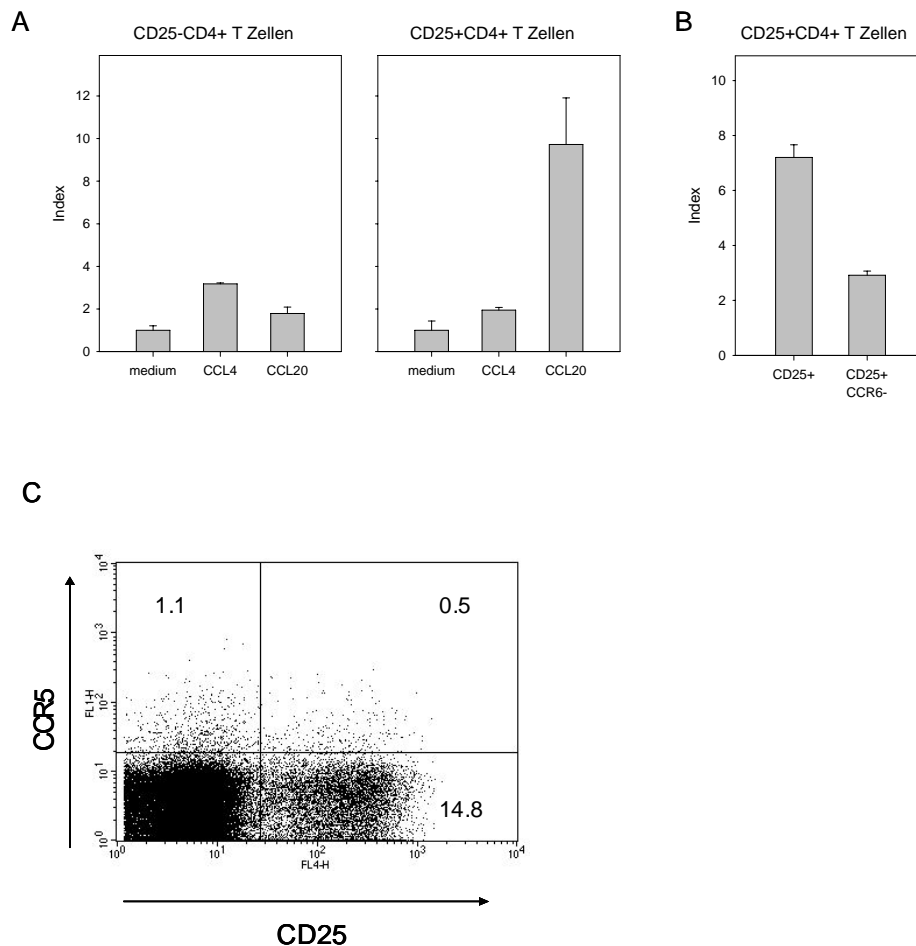
### 3.2.6 CCR6+ Treg können auf das Chemokin CCL20 reagieren

Bisher wurden drei Chemokinrezeptoren beschrieben, die vornehmlich von CD25+ Treg exprimiert werden und deren Liganden insbesondere Treg anziehen sollten. Für humane Zellen sind dies CCR4 und CCR8 mit den jeweiligen Liganden CCL22, CCL1 und CCL17 (76) und in der Maus CCR5 mit dem Liganden CCL4 (68). Wobei fast alle bisher identifizierten Chemokinrezeptoren eine gewisse Redundanz gegenüber bestimmten Chemokinen aufweisen. So ist zum Beispiel ein weiterer Ligand neben CCL4 von CCR5 auch das pro-inflammatorische Chemokin RANTES (CCL5) (124). CCR6 unterscheidet sich in dieser Hinsicht von den anderen Rezeptoren, da bisher nur ein Chemokinligand bekannt ist: CCL20. Es konnte jedoch auch eine hohe Affinität von CCR6 zu dem antimikrobiellen Peptid  $\beta$ -Defensin festgestellt werden, welches strukturell CCL20 sehr ähnlich ist (151).

Um zu überprüfen, ob CCR6+ Treg auch in der Lage sind, funktionell auf den einzigen bisher identifizierten Chemokinliganden CCL20 zu reagieren, wurde ein *in vitro* Transmigrations-Assay durchgeführt. Dieses war insbesondere für den Rezeptor CCR6 wichtig, da zuvor unter bestimmten Bedingungen, für zum Beispiel B-Zellen, trotz Rezeptor Expression keine Migration beobachtet werden konnte, sondern andere Effekte wie zum Beispiel Calcium-Flux oder ein besserer Endothel-Arrest nach einer CCR6 Ligation beschrieben wurden (126, 152). Über MACS isolierte CD25+ CD4+ und CD25- CD4+ T-Zellen wurden daher für 3 Stunden in der Präsenz von dem Chemokine CCL20 über eine Transwell Kammer inkubiert. Anschließend wurde der Anteil an migrierten Zellen per Durchflusszytometrie bestimmt (siehe 2.2.10.2). Als Kontrolle wurde das Chemokin CCL4 eingesetzt, welches zuvor als ein potentes Chemokin für murine Treg beschrieben wurde (68). Auch der Rezeptor CCR5 wurde in dieser Publikation als hoch exprimiert auf naiven *ex vivo* isolierten Treg beschrieben. Eine Färbung auf *ex vivo* isolierten Zellen aus LN und Milz von BALB/c Mäusen ergab allerdings ein anderes Bild (Abbildung 20C).

Wie aus Abbildung 20C hervorgeht, scheint offensichtlich nur ein geringer Anteil von Treg aus naiven BALB/c Mäusen den Rezeptor CCR5 zu exprimieren. Weiterhin zeigen ebenfalls CD25- T-Zellen eine geringe CCR5 Expression. Abbildung 20A zeigt ein repräsentatives Migrationsexperiment. CD25- Zellen werden von beiden Chemokinen nur mäßig mobilisiert, zu erkennen am geringen chemotaktischen Index, der das Verhältnis von spezifisch migrierten Zellen zu spontan migrierten Zellen angibt. Im Gegensatz dazu vermag CCL20 effizient CD25+ Treg zu mobilisieren (Abbildung 20A, rechts). Hier wird ein Index von ~10 erreicht. CCL4 hat dahingegen wenig Einfluss auf die Migration von CD25+ Treg, welches allerdings im Einklang mit der geringen Oberflächenexpression von CCR5 (Abbildung 20C) und

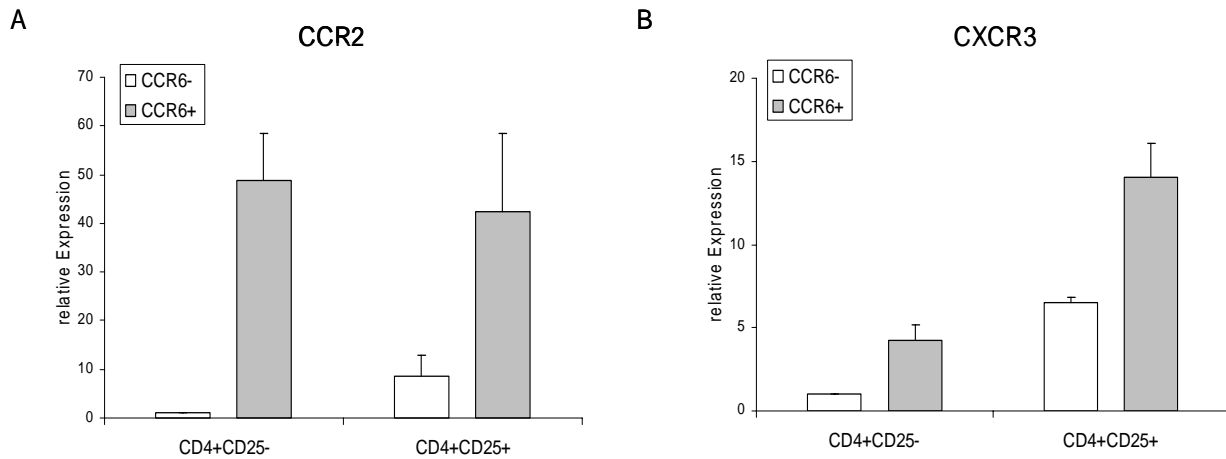
weiteren kürzlich publizierten Arbeiten steht (70, 153). Dass tatsächlich der CCR6 Rezeptor für die Treg Migration auf CCL20 verantwortlich ist, zeigt Abbildung 20B. Hier wurden CCR6+ Zellen zuvor über MACS depletiert, welches in einer signifikant geringeren Migration auf CCL20 bis hin zu Hintergrundwerten führt. CCR6 tragende Treg können also zu einem hohen Maße spezifisch auf den Liganden CCL20 reagieren.



**Abbildung 20: CCL20 induzierte Chemotaxis von CD25+ CD4+ T-Zellen.** A) Die Chemotaxis von MACS sortierten CD25- (links) oder CD25+ (rechts) Lymphknotenzellen aus naiven BALB/c Mäusen wurde *in vitro* anhand eines Transwell Chemotaxis Versuchs ermittelt. Als Kontrolle wurde nur Medium oder das Chemokin CCL4 eingesetzt. Der Index bezeichnet den chemotaktischen Index, berechnet aus der Anzahl der migrierten Zellen in Anwesenheit vom Chemokin im Verhältnis zur unspezifischen Migration der Zellen ohne Chemokin. B) Chemotaxis Assay wie in A), durchgeführt mit CD25+ (links) und CD25+ CCR6- (rechts) CD4+ T-Zellen aus der Milz. Die Graphen von A) und B) stehen repräsentativ für drei unabhängig gemachte Experimente. C) Repräsentatives Fluoreszenzprofil von Lymphknoten CD4+ T-Zellen für die CCR5 Expression. X-Achse: CD25, Y-Achse: CCR5. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 4 unabhängigen Versuchen mit Zellen aus mindestens zwei Tieren.

Die Genexpressionsanalyse (siehe 3.1) hat zudem gezeigt, dass möglicherweise der Chemokinrezeptor CXCR3 eine Rolle für CD25+ Treg spielt. Daher wurde die Expression dieses Rezeptors auf RNA Ebene auf den unterschiedlichen Untergruppen von CCR6+ und

CCR6- CD4+ T-Zellen verglichen. Hierfür wurde cDNA von FACS sortierten Zellen aus naiven BALB/c Mäusen in einer Realtime RT-PCR eingesetzt. Abbildung 21B zeigt die Expression von CXCR3 auf den verschiedenen Untergruppen.



**Abbildung 21: CCR2 und CXCR3 Expression von CD25+ CCR6+ T-Zellen.** Repräsentative Realtime RT-PCR Analyse von FACS sortierten CD4+ T-Zellsubgruppen wie in Abbildung 8 gezeigt (CCR6+ CD25+, CCR6- CD25+, CCR6+ CD25- und CCR6- CD25-). Weiße Balken CCR6-, graue Balken CCR6+. A) CCR2 mRNA Expression der verschiedenen T-Zell Untergruppen im Vergleich zur HPRT Expression, normalisiert zur Expression von CCR2 von CCR6- CD25- Zellen. B) CXCR3 mRNA Expression der verschiedenen T-Zell Untergruppen im Vergleich zur HPRT Expression, normalisiert zur Expression des Gens von CCR6- CD25- Zellen. Die Graphen stehen repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit Zellen aus 8-10 Tieren pro Versuch.

Es wird deutlich, dass CCR6+ Treg in einem hohem Maße CXCR3 exprimieren, wobei die Expression ca. 2-fach erhöht gegenüber CCR6- Zellen ist. CCR6+ CD25- Zellen exprimieren nur geringfügig mehr CXCR3 gegenüber den naiven T-Zellen. Gerade die CXCR3 Expression könnte daher ein weiteres Unterscheidungsmerkmal, neben den Treg spezifischen Genen, wie zum Beispiel Foxp3, CTLA-4 und CD25, zwischen CCR6+ Effektor und regulatorischen Zellen darstellen. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation konnte eine CCR2 Expression auf murinen Treg nachgewiesen werden (154). Es wurde daher versucht, auch die CCR2 Expression über Realtime RT-PCR auf den verschiedenen CD4+ T-Zell Untergruppen, abhängig von CCR6 und CD25, nachzuweisen. Abbildung 21A zeigt das Profil der CCR2 Expression innerhalb der FACS sortierten Untergruppen. Offensichtlich liegt eine Segregation von CCR2 mit der CCR6 Expression vor, zumindest auf mRNA Ebene. Beide CCR6+ CD4+ T-Zellpopulationen exprimieren ähnlich viel CCR2, wobei innerhalb der CCR6- Zellpopulationen nur eine geringe CCR2 Expression detektiert werden kann. CCR6+ CD4+ T-Zellen prägen daher auch zu einem hohen Maße CCR2 aus. Eine Beobachtung, die mit dem beschriebenen Phänotyp der CCR2+ Treg Population im Einklang steht (154). Auch

diese Zellen scheinen vornehmlich einen aktivierten Effektor-Gedächtniszell Phänotyp zu tragen und exprimieren teilweise das Integrin CD103 (vgl. 3.2.2). Vermutlich können daher auch murine CCR6+ Treg, ähnlich wie Effektor T-Zellen, situationsbedingt auf mehrere Chemokine reagieren.

### 3.2.7 CCR6+ Treg unterscheiden sich funktionell von CCR6- Treg

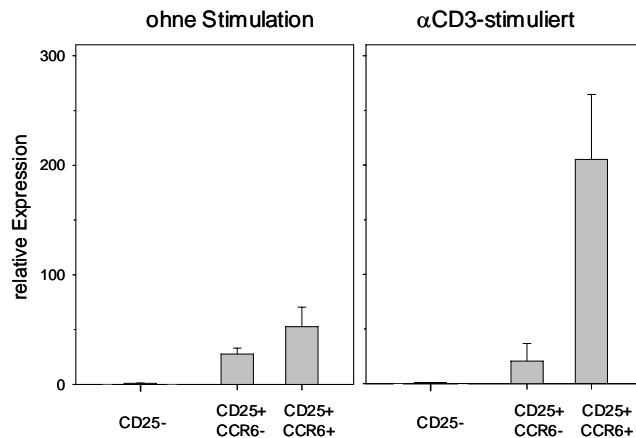
CD25+ Treg stellen eine Zellpopulation dar, die nach Stimulation *in vitro* keine Zytokinproduktion zeigen. Weiterhin ist die Suppression im *in vitro* Suppressions-Assay Zytokin unabhängig. Eine Blockade von zahlreichen Zytokinen über Antikörper hat keinen Einfluss auf die Suppression von Effektorzellen (19). In manchen Fällen wurde jedoch eine TGF- $\beta$  oder IL-10 Sekretion von Treg beobachtet (155-157). Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse scheinen gerade in verschiedenen *in vivo* Experimenten deutlich zu werden. So wurde zum Teil eine IL-10 abhängige Wirkungsweise von Treg im Kolitis-Modell nachgewiesen werden, wobei in weiteren Modellen IL-10 keine Bedeutung für Treg zu haben schien (zur Übersicht siehe (24, 158)).

Phänotyp und bisherige Beobachtungen zum Verhalten von CCR6+ Treg weisen eindeutig darauf hin, dass diese Zellen eine ähnliche Entwicklung vollzogen haben, wie zuvor beschriebene Effektor-Gedächtniszellen. So exprimieren diese Zellen alle üblichen Gedächtniszell Marker, wie zum Beispiel CD44, CD5 oder CD54. Ebenfalls weisen sie eine geringe CD62L sowie CCR7 Expression auf (3.2.3). Des Weiteren zeigen diese Zellen eine offensichtlich Antigen vermittelte, hohe Proliferationsrate. CCR6+ Treg werden zudem *in vivo* nur nach Antigenkontakt induziert, wobei hier vermutlich weitere Faktoren wie zum Beispiel ein besonderes Zytokin Milieu benötigt werden, da nur ein gewisser Teil der Zellen CCR6+ wird (3.2.4 und 3.2.5). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass CCR6+ Treg analog zu den zuvor beschriebenen T<sub>EM</sub> im Menschen, eine Population von Effektor-Gedächtniszellen darstellen (123).

Neben dem besonderen Phänotyp scheint ein wichtiges funktionelles Charakteristikum dieser Zellen aber insbesondere eine schnelle Sekretion von Zytokinen nach wiederholtem Antigenkontakt zu sein. So sind insbesondere T<sub>EM</sub> in der Lage, unverzüglich große Mengen an Zytokinen (zum Beispiel IFN $\gamma$ ) nach Antigenrestimulation *in vitro* auszuschütten (123). Daher stellte sich die Frage, ob CCR6+ Treg ebenfalls in der Lage sind, unverzüglich auf einen wiederholten Antigenkontakt zu reagieren. Aufgrund der beschriebenen Fähigkeiten von Treg, unter bestimmten Umständen IL-10 zu produzieren (50, 155, 156, 159), wurde



versucht, die IL-10 Produktion von *ex vivo* isolierten Zellen nach Restimulation *in vitro* zu messen.

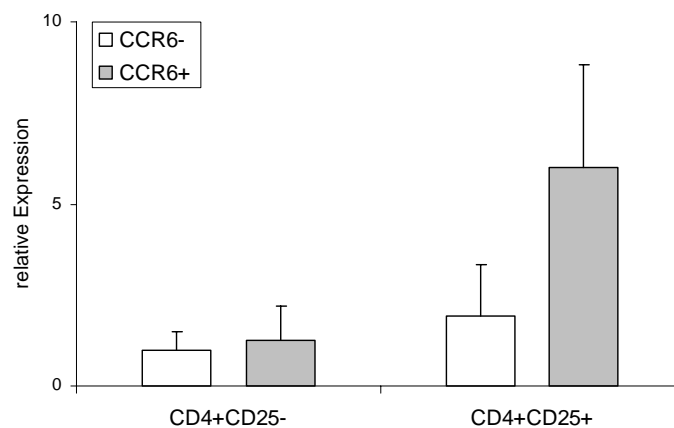


**Abbildung 22: Interleukin 10 Expression von CD25+ CCR6+ Treg.** Repräsentative Realtime RT-PCR Analyse von FACS sortierten CD4+ T-Zellsubgruppen aus den LN von naiven BALB/c Mäusen wie in Abbildung 8 (CCR6+ CD25+, CCR6- CD25+ und CD25- CD4+ T-Zellen) für Interleukin 10. Links: IL-10 Produktion von *ex vivo* isolierten Zellen, rechts: IL-10 Produktion nach einer *in vitro* Restimulation mit anti-CD3. Gezeigt ist die relative Expression von HPRT Expression, jeweils normalisiert zur relativen IL-10 Expression von CD25- CD4+ T-Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentativ ein Experiment von 4 unabhängigen Versuchen mit Zellen aus jeweils 8-10 Tieren.

Der Nachweis erfolgte hier auf mRNA Ebene über Realtime RT-PCR. Abbildung 22 zeigt die IL-10 mRNA Produktion der angedeuteten FACS sortierten CD4+ T-Zellpopulationen. Unstimulierte *ex vivo* isolierte Zellen zeigen nur eine geringe IL-10 Produktion im Vergleich zu den CD4+ CD25- Zellen (Abbildung 22, links), welches früheren Analysen entspricht (50, 155, 156, 159). Nach einer *in vitro* Stimulation von 4h mit anti-CD3 zeigen jedoch nur die CCR6+ Treg eine erhöhte IL-10 mRNA Expression, wohingegen bei der CCR6- Population keine Unterschiede zu beobachten sind (Abbildung 22, rechts). Alle weiter untersuchten Zytokine zeigten sich allerdings unbeeinflusst. So konnte auf beiden CD25+ Treg Subpopulationen keine IFN $\gamma$  oder IL-2 Produktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise konnte in einer früheren Studie ein Zusammenhang zwischen einer IL-10 Produktion und ICOS Expression in peripheren Geweben beobachtet werden (155). Wie in Abbildung 7B deutlich zu erkennen ist, segregiert die ICOS Expression auf Treg praktisch vollständig mit der CCR6 Expression, welches indirekt darauf hinweist, dass diese Populationen möglicherweise identisch sind.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass sich CCR6+ Treg sogar funktionell ähnlich wie konventionelle Effektor-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ ) verhalten. Neben dem zuvor beschriebenen typischen Phänotyp (3.2.3) und charakteristischen hohen Proliferation (3.2.4), zeigen diese

Zellen auch eine Effektor-Gedächtniszell typische Reaktion auf „wiederholten Antigenkontakt“ (simuliert durch die anti-CD3 Stimulation): Sie reagieren mit einer erhöhten Zytokin Produktion. In diesem Fall konnte jedoch nur die Induktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 beobachtet werden.



**Abbildung 23: IDO Induktion durch Ko-Kultivierung von CD25+ CCR6+ Treg und DC.** Repräsentative Realtime RT-PCR Analyse nach Ko-Kultivierung von FACS sortierten CD4+ T-Zellsubgruppen, isoliert aus LN und Milz von naiven BALB/c Mäusen, wie in Abbildung 8 (CCR6+ CD25+, CCR6- CD25+ und CD25- CD4+ T-Zellen) und MACS angereicherten CD11c+ DC aus Milzzellen von naiven BALB/c Mäusen für IDO. Links: IDO Produktion von DC mit CD4+ CD25- Zellen, rechts: IDO Produktion von DC mit CD4+ CD25+ Zellen. Weiße Balken: DC mit CCR6- Zellen, graue Balken: DC mit CCR6+ Zellen. Gezeigt ist die relative Ausprägung zur HPRT Expression, normalisiert auf die Expression von IDO der Ko-Kultivierung von DC mit CD25- CD4+ T-Zellen. Die Abbildung zeigt repräsentativ ein Experiment von zwei unabhängigen Versuchen.

Ein weiteres Charakteristikum von Treg ist ihre Fähigkeit, die Induktion von IDO in dendritischen Zellen stimulieren zu können. IDO greift in den Tryptophan Katabolismus ein und erzeugt u.a Kynurein, welches ein toxisches Milieu für Effektorzellen bedingen kann. Dieser erst vor kurzem genauer untersuchte Regulations-Mechanismus von Immunreaktionen entsteht durch ein Zusammenspiel von CD4+ T-Zellen und dendritischen Zellen (22, 23). Eine Studie, die den Nachweis für einen direkten Einfluss von Treg auf diesen Zyklus erbrachte, wurde kürzlich publiziert (61). IDO+ DC im Menschen prägen offensichtlich CCR6 aus (22), weiterhin kann eine IDO Expression in DC von Treg über CTLA-4 und IL-10 induziert werden (61).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass möglicherweise die CCR6+ Treg Population für die IDO Induktion von DC spezialisiert ist. Einzig die CCR6+ Treg Population produziert hohe Mengen an IL-10 nach Restimulation *in vitro* (Abbildung 22), wobei zusätzlich auch die CTLA-4 Expression auf den CCR6 tragenden Treg am höchsten ist (Abbildung 7A).

Zur Überprüfung dieser Theorie wurden wie in Abbildung 8 FACS sortierte CD4+ T-Zellpopulationen zusammen mit dendritischen Zellen ko-kultiviert (siehe 2.2.10.5). Anschließend wurde über Realtime RT-PCR dieIDO Induktion gemessen. In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass tatsächlich nur die CCR6+ Treg Population eine deutliche IDO Produktion der DC, im Vergleich zu den CD25- T-Zellen, anregen kann. Allerdings ist die gemessene Expression von IDO relativ schwach, so dass möglicherweise die Bedingungen der Ko-Kultivierung über weitere Experimente optimiert werden könnten. Vor diesem Hintergrund kann vermutlich der Einsatz von speziellen DC Subpopulationen (CD123+ CCR6+) zur Ko-Kultivierung, welche nachweislich zur IDO Produktion befähigt sind, den *read-out* verstärken. Dennoch scheinen CCR6+ Treg zumindest *in vitro*, im Gegensatz zu CCR6- Treg, tatsächlich eine besondere Rolle bei der IDO Induktion von DC zu spielen.

### **3.2.8 CCR6+ Treg akkumulieren in peripheren Geweben im Verlauf von Entzündungen**

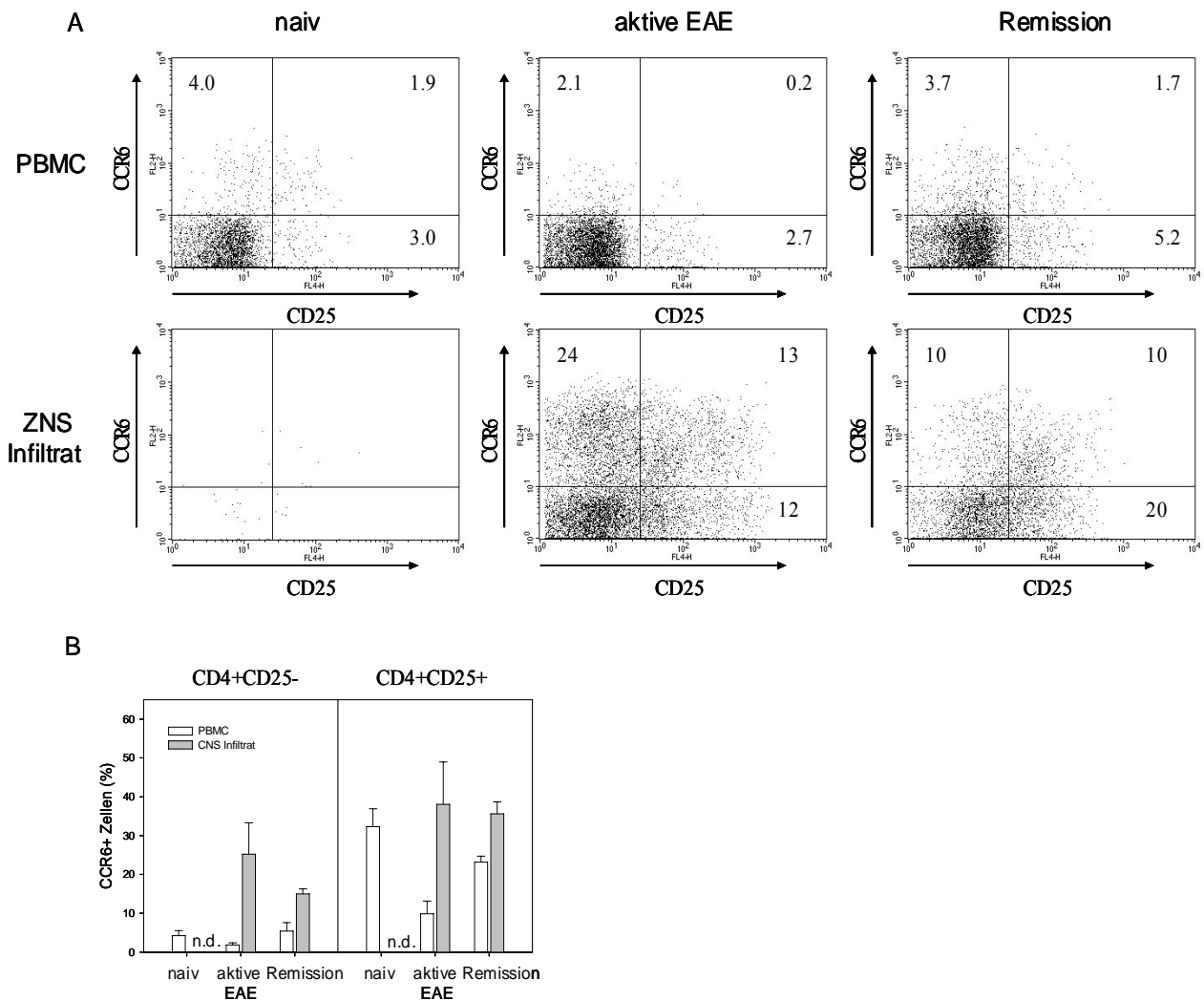
Der Phänotyp und Aktivierungsstatus der zuvor beschriebenen CCR6+ Effektor-Gedächtniszell ähnlichen Tregs deutet darauf hin, dass diese Zellen sich vermutlich anders verhalten und an anderen Orten ihre Wirkung entfalten als CCR6- Treg, welche eher einen naiven Phänotyp zeigen. Die höchste Anzahl von CCR6+ Treg kann im peripheren Blut und in den Peyerschen Plaques beobachtet werden (siehe 3.2.1). Weiterhin zeigt sich die niedrige CD62L und CCR7 Expression permissiv, um die Lymphe zu verlassen und kann so eine Auswanderung in die Peripherie erleichtern (siehe 3.2.3). Der Phänotyp und die tatsächliche Verteilung von CCR6+ Treg *in vivo* deuten daher indirekt auf eine verstärkte Rolle dieser Subpopulation bei der Kontrolle von peripheren Inflammationen, direkt im entzündeten Gewebe, hin.

#### **3.2.8.1 CCR6+ Treg akkumulieren im zentralen Nervensystem während des Verlaufs von EAE**

In kürzlich veröffentlichten Arbeiten konnte eine erhöhte CCL20 Ausschüttung von Astrozyten im ZNS während des Verlaufs der EAE beobachtet werden (133, 160). Daher sollte es sich als interessant gestalten, das ZNS-Infiltrat während der EAE auf eine CCR6 Expression hin zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke wurde in weiblichen SJL/J Mäusen EAE mittels Injektion von PLP<sub>139-151</sub> Peptid induziert (in Zusammenarbeit mit Fabiola Puentes, MDC, siehe 2.2.13). Anschließend

wurde der Anteil von CCR6+ CD4+ T-Zellen im Blut und im ZNS von kranken Tieren und von Tieren, die sich bereits nach erfolgter Krankheit wieder in der Remissions-Phase (zum Zeitpunkt ohne klinische Symptome) befanden, durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurde Blut und ZNS von naiven, gesunden Tieren analysiert. Abbildung 24 zeigt repräsentative FACS Analysen vom peripheren Blut und ZNS-Infiltraten von naiven Tieren oder Tieren mit aktiver EAE und von Tieren in der Remission.



**Abbildung 24: Akkumulation von CCR6+ CD4+ T-Zellen im ZNS während der EAE.** A) Repräsentative Fluoreszenzprofile von peripherem Blut (PBMC) und ZNS-Infiltrat aus naiven Mäusen (linke Spalte), Tieren mit aktiver EAE (Tag 15 nach EAE Induktion, mittlere Spalte) oder Tieren nach aktiver EAE in der Remission ohne sichtbare Symptome (Tag 25 nach EAE Induktion, rechte Spalte) für CCR6 und CD25. X-Achse: CD25, Y-Achse: CCR6. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 4 unabhängigen Versuchen. B) Zusammenfassung des relativen CCR6 Anteils an CD25+ CD4+ T-Zellen (rechts) oder CD25- CD4+ T-Zellen (links) von 4 unabhängigen Experimenten (akute EAE: Tag 14-16 nach EAE Induktion, Remission: Tag 22-29 nach EAE Induktion). Weiße Balken: PBMC, graue Balken: ZNS-Infiltrat, n.d.: nicht detektiert.

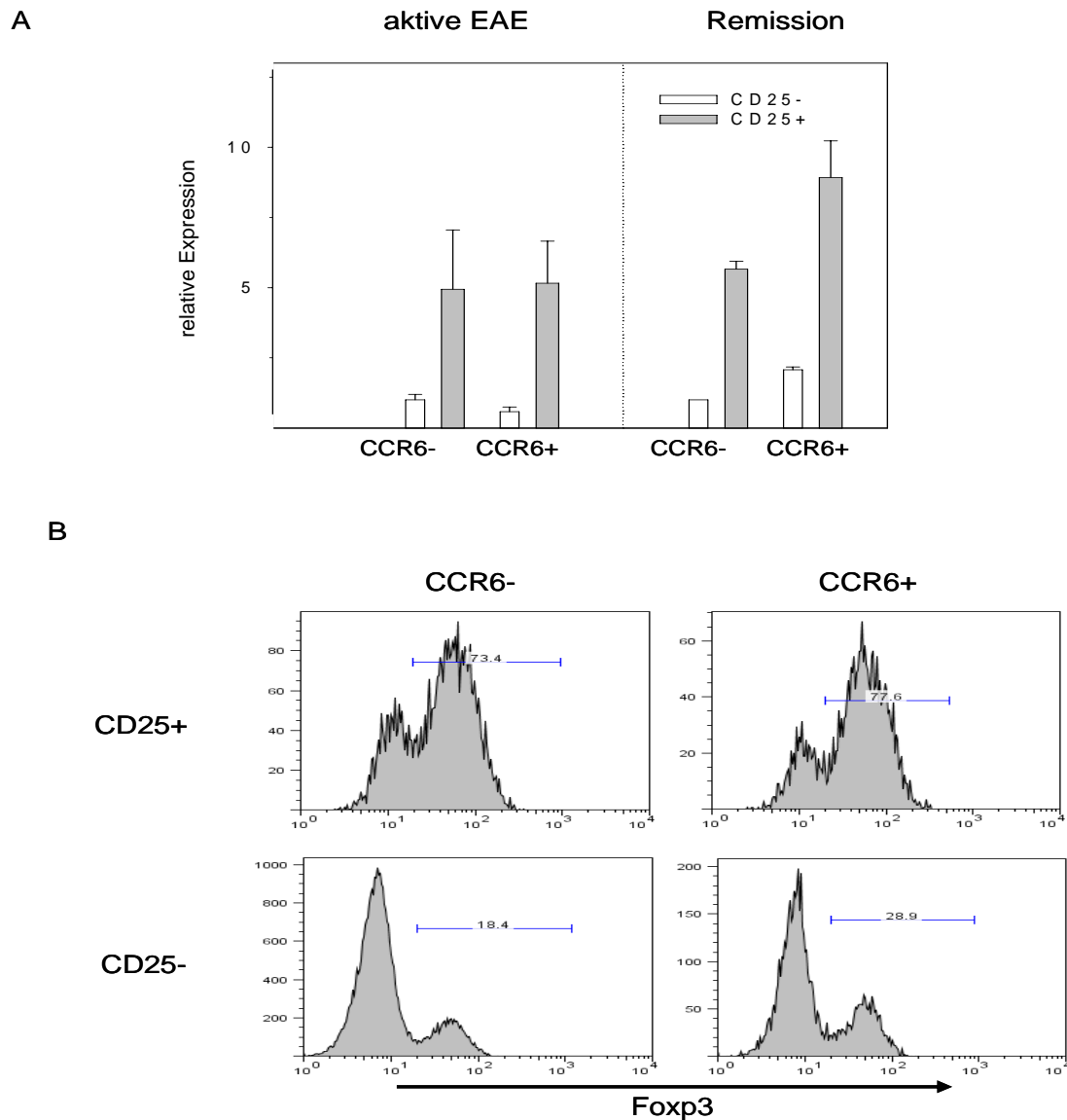
Wie deutlich in Abbildung 24A zu erkennen ist, findet sich tatsächlich ein sehr hoher Anteil von CCR6+ CD4+ T-Zellen im ZNS. Auffällig ist, dass während der akuten EAE (Wertung 4, siehe 2.2.13) eine massive Infiltration von CCR6+ CD25- Effektorzellen zu erkennen ist, die bis zu 35% ausmacht. Der Anteil an CCR6+ CD25+ Zellen steigt ebenfalls auf bis zu 50% an. In der Phase der Remission (Wertung 0), sinkt der Anteil an CCR6+ CD25- T-Zellen dann wieder rapide auf ~ 15% ab. Während die Menge an CCR6+ Treg relativ stabil bleibt. Im peripheren Blut der Tiere aus den jeweiligen Versuchsgruppen verhält sich der Anteil an CCR6+ Zellen genau umgekehrt: Während aktiver EAE nimmt der Anteil beider Populationen rapide ab, während dieser in der Remission wieder auf die Ebene von naiven Mäusen ansteigt. Die Umverteilung (Abbildung 24B), spiegelt möglicherweise den Transit von CCR6+ Zellen aus dem Blut in das ZNS während akuter Phasen der EAE wider.

Definitiv kann aber bestätigt werden, dass während verschiedener Phasen der EAE CCR6+ Zellen im ZNS akkumulieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit über sezerniertes CCL20 angelockt werden.

Um sicher zu stellen, ob die gemessenen CCR6+ CD25+ T-Zellen in der Tat regulatorische T-Zellen repräsentieren, wurde eine Realtime RT-PCR für Foxp3 mit RNA aus FACS sortierten Zellen vom ZNS-Infiltrat durchgeführt. Aus Abbildung 25A geht hervor, dass beide CD25+ Populationen eine erhöhte Foxp3 mRNA Expression zeigen. Die CCR6+ CD25+ T-Zellen scheinen somit tatsächlich Foxp3+ regulatorische T-Zellen darzustellen.

Auffällig ist allerdings, dass die Expressionsstärke von Foxp3 auf CD25+ Zellen relativ gering ist. Auch in diesem Fall konnten die RT-PCR Ergebnisse auf Proteinebene durch den Gebrauch des Foxp3 spezifischen Antikörpers bestätigt werden. In Abbildung 25B ist die Foxp3 Expression innerhalb der vier CD4+ Populationen in Abhängigkeit von CD25 und CCR6 gezeigt. Der Großteil der CD25+ T-Zellen exprimiert Foxp3 tatsächlich auch auf Proteinebene weitestgehend unabhängig von einer CCR6 Expression. Überraschenderweise kann aber eine recht hohe Foxp3 Proteinexpression auf CD25- T-Zellen (~20%), wiederum relativ unabhängig von CCR6, beobachtet werden.

Ob diese Zellen tatsächlich auch regulatorische CD25- T-Zellen darstellen, kann nur durch weitere Experimente aufgeklärt werden, allerdings könnte der hohe Anteil an Foxp3 in der CD25- Population das Ergebnis der schwachen Foxp3 Expression in der RT-PCR Analyse erklären (Abbildung 25A).

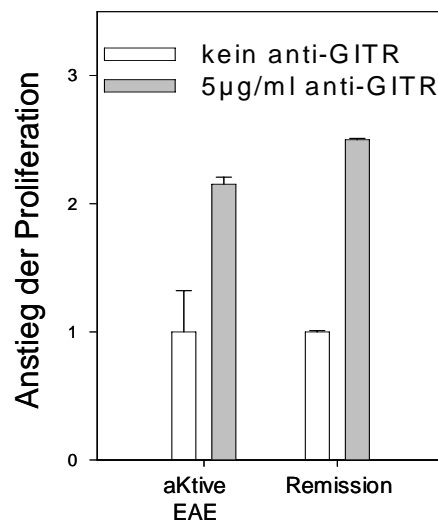


**Abbildung 25: Foxp3 Expression im ZNS-Infiltrat.** A) Realtime RT-PCR Analyse für Foxp3 von FACS sortierten CD4<sup>+</sup> T-Zellsubgruppen (CCR6<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, CCR6<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> und CCR6<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen) aus dem ZNS-Infiltrat von Tieren mit aktiver EAE (Tag 15 nach Induktion, links) oder in Remission (Tag 27 nach Induktion, rechts). Weiße Balken: CD25<sup>-</sup> Zellen, graue Balken: CD25<sup>+</sup> Zellen. Gezeigt ist die relative Expression von Foxp3 zur HPRT Expression, normalisiert auf die Foxp3 Expression der CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt ist ein Experiment mit Zellen aus 9-10 Tieren pro Gruppe. B) Repräsentatives Fluoreszenzprofil für Foxp3 von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit der CD25 und CCR6 Oberflächenexpression aus dem ZNS-Infiltrat von SJL/J Mäusen mit aktiver EAE (Tag 15 nach Induktion), dargestellt als Histogramm. Die Zahlen zeigen den relativen Anteil (%) an Foxp3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der Population. Gezeigt ist ein Experiment von 4 unabhängigen Versuchen.

Weiterhin wurde versucht, die Treg Zellen funktionell zu testen. Hierfür wurde ZNS-Infiltrat *in vitro* mit anti-CD3 stimuliert. Zur Inhibition der Treg Aktivität wurden dann polyklonale anti-GITR Antikörper zur Kultur gegeben. Neue Arbeiten konnten zeigen, dass anti-GITR die CD4<sup>+</sup> Effektor T-Zellen „immun“ gegen eine Treg vermittelte Inhibition werden lässt (zur

Übersicht siehe (161)). Ein Anstieg der Proliferation würde somit auf die Anwesenheit von aktiven Treg im ZNS-Infiltrat hinweisen.

Abbildung 26 zeigt einen mit anti-GITR durchgeführten Proliferations-Assay mit ZNS-Infiltraten. Während aktiver EAE und in der Remission kann tatsächlich ein vergleichbarer Anstieg der Proliferation bei Anwesenheit von anti-GITR in der Kultur vom ZNS-Infiltrat beobachtet werden. Dieses ist somit ein weiterer Hinweis auf das Vorkommen von funktionellen Treg im ZNS-Infiltrat. Allerdings kann mit diesem Versuch nicht geklärt werden, ob tatsächlich beide Treg (CCR6+ und CCR6-) Populationen für die Inhibition verantwortlich sind. Dieses scheint jedoch sehr wahrscheinlich, da beide Populationen gleichermaßen viel Foxp3 exprimieren.



**Abbildung 26: Anwesenheit von suppressiven Treg im ZNS-Infiltrat.** Repräsentative anti-GITR induzierte Neutralisierung der Suppressorwirkung. ZNS-Infiltrat von Tieren mit aktiver EAE (Tag 15 nach Induktion, links) oder Tieren in der Remission (Tag 25 nach Induktion, rechts) wurde *in vitro* in Anwesenheit von anti-CD3 kultiviert. Weiße Balken: ohne anti-GITR, graue Balken: mit 5 µg/ml anti-GITR. Gezeigt ist der relative Anstieg der Proliferation im Vergleich zur Kultur ohne anti-GITR Antikörper. Die Proliferation wurde über <sup>3</sup>H-Thymidin bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 2 unabhängigen Versuchen mit Zellen aus jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass CCR6+ Effektor-Gedächtniszell ähnliche T-Zellen tatsächlich in peripheren Geweben während akuter Entzündungsreaktionen akkumulieren. Eine Beobachtung, die mit dem zuvor beschriebenen Phänotyp im Einklang steht. Zudem scheinen diese Zellen aufgrund der im Vergleich zu den sekundären lymphatischen Organen wie zum Beispiel der Milz oder den Lymphknoten, erhöhten relativen Anzahl einen wichtigen Beitrag zu spielen. Ein Indikator hierfür kann in der Tat die Umverteilung von CCR6+ Effektor und Treg Zellen während der Remission sein (Abbildung 24). Beide Zellpopulation, Effektor-Gedächtniszell ähnliche CD25- Zellen und Tregs,

scheinen über eine CCR6 Expression in das ZNS geführt zu werden. Hier stehen die CCR6+ CD25- Zellen möglicherweise direkt mit der aktiven EAE in Verbindung, da diese Zellen nach dem Erreichen der Remissions-Phase fast gänzlich verschwunden sind. Diese Beobachtungen stehen in guter Übereinstimmung mit einer kürzlich veröffentlichten Publikation, die eine Rolle für den Chemokinrezeptor CCR6 bei der Induktion der EAE beschreibt (162). Weiterhin deutet diese Beobachtung darauf hin, dass der CCR6 Rezeptor auf zwei offensichtlich antagonistischen CD4+ T-Zellpopulationen induziert wird. Somit würden über CCL20 Gradienten konventionelle T<sub>EM</sub> Zellen und CCR6+ Treg angelockt, die je nach Situation die Richtung der Immunreaktion bestimmen würden.

Ob CCR6+ Treg jedoch tatsächlich eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der EAE spielen, kann über diese Experimente nicht eindeutig gezeigt werden. Hierfür müssten weitere Analysen zum Beispiel in der CCR6<sup>-/-</sup> Maus im Zusammenhang mit adoptiven T-Zell Transfers durchgeführt werden.

### **3.2.8.2 CCR6+ Treg akkumulieren im Tumor-Infiltrat**

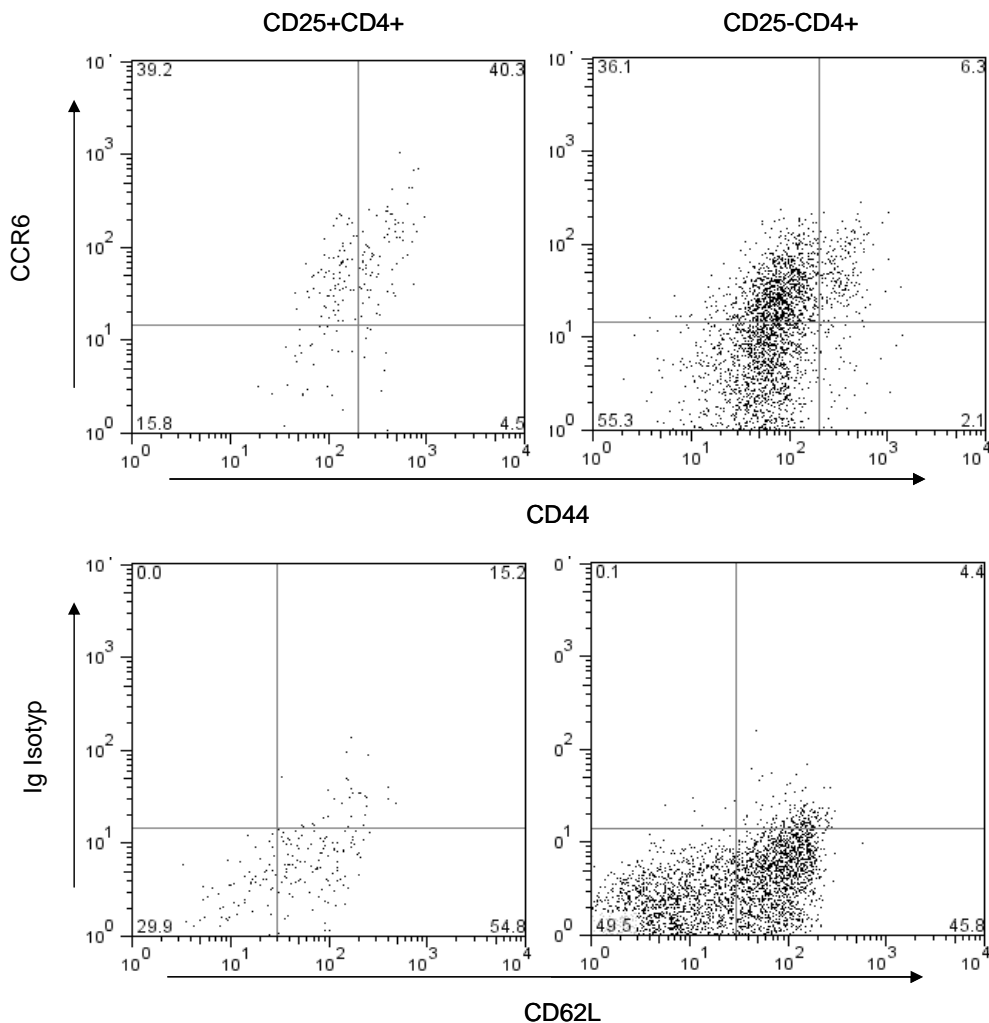
Zahlreiche Publikationen konnten schon einen Zusammenhang zwischen Tumorummunität und Treg Zellen nachweisen (siehe 1.3.2, zur Übersicht siehe (24, 44)). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von CD25+ Treg in manchen Modellen die Tumor Vakzinierung erleichtert oder sogar eine spontane, vom Immunsystem vermittelte, Abstoßung des Tumors ermöglicht (zur Übersicht siehe (24, 44)). Eine kürzlich publizierte Studie konnte in einem Tumormodell zeigen, dass ein hoher Anteil des CD4+ Tumor-Infiltrates sich aus regulatorischen CD25+ Zellen zusammensetzt. Experimentelle Ergebnisse aus dieser Studie weisen darauf hin, dass gerade die tumorinfiltrierenden Treg entscheidend für eine Toleranzerzeugung gegenüber dem Tumor zu sein scheinen und dass sogar nur eine lokale Inhibition der Treg eine Abstoßung ermöglichen kann (104).

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob auch in der Tumorummunologie CCR6+ Treg eine entscheidende Rolle spielen. Der Phänotyp von CCR6+ Treg Zellen lässt vermuten, dass auch im Falle eines Tumors insbesondere die aktivierten Effektor-Gedächtniszell ähnlichen Treg in den Tumor und das angrenzende Gewebe einwandern können.

Bei der Untersuchung von Tumor-Infiltraten vom Plasmazytom J558L in BALB/c Mäusen, konnte tatsächlich eine Anreicherung von CCR6+ Effektor-Gedächtniszell ähnlicher CD4+ T-Zellen beobachtet werden. Bei Mäusen die mit  $2 \times 10^6$  Tumorzellen s.c. injiziert wurden (in Zusammenarbeit mit Dr. Mireille Starke, MDC) entsteht im Verlauf von 1-2 Wochen ein ca. 1cm großer, solider Tumor (siehe 2.2.15). Bei der Analyse am Tag 13 nach Injektion wurde



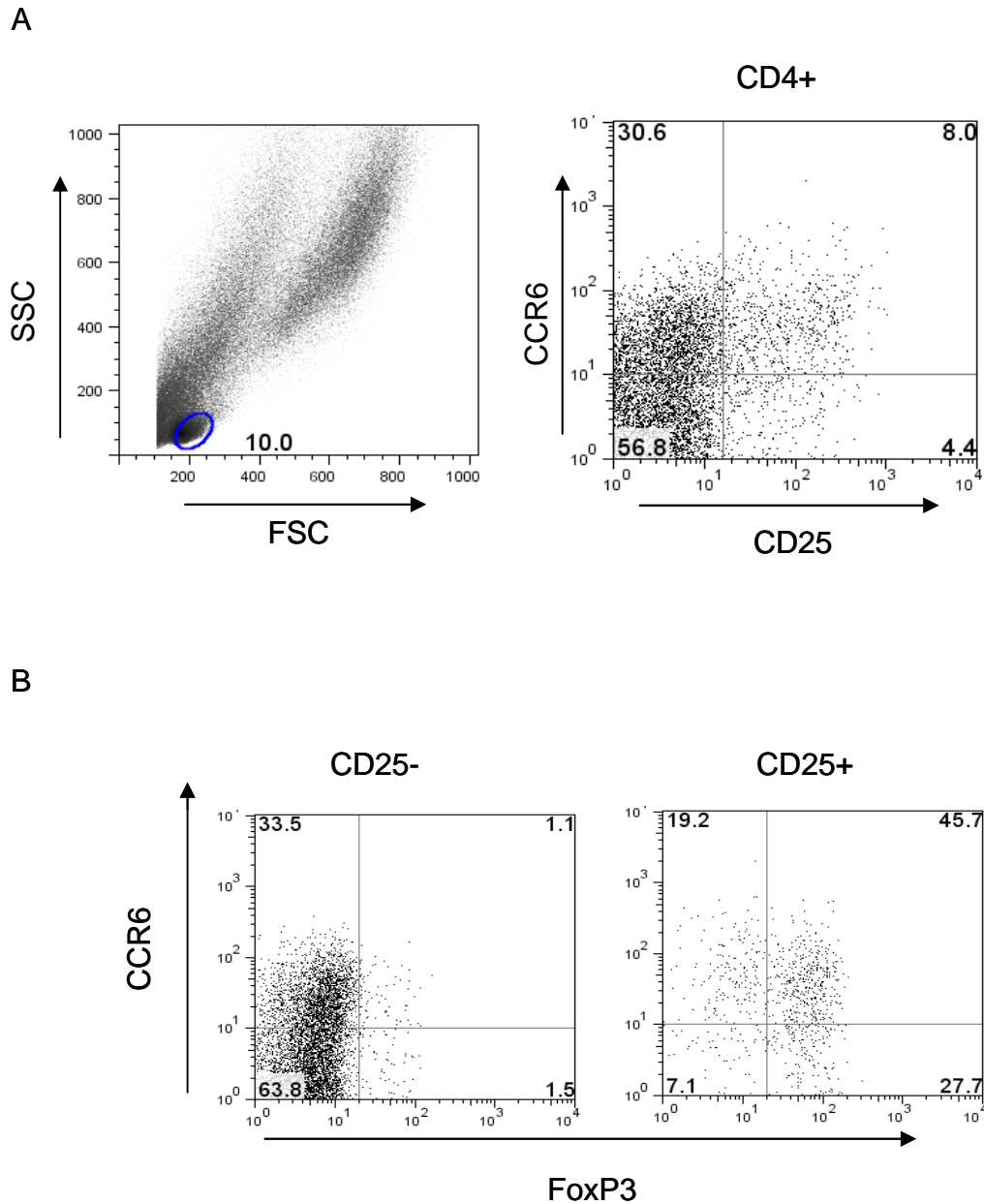
das Tumor-Infiltrat durchflusszytometrisch mit verschiedenen Fluorochrom gekoppelten Antikörpern analysiert. Abbildung 27 zeigt ein aus einem Tumor-Infiltrat am Tag 13 nach der Injektion der Plasmazytom-Zellen im Bereich der Kniefalte erhaltenes Fluoreszenzprofil.



**Abbildung 27: Akkumulation von CCR6+ CD4+ T-Zellen im Tumor-Infiltrat.** Repräsentative Fluoreszenzprofile von J558L Plasmazytom Tumor-Infiltraten aus BALB/c Mäusen für die CCR6 und CD25 Expression am Tag 13 nach Tumor-Induktion. Links: CD25+ CD4+ T-Zellen, rechts: CD25- CD4+ T-Zellen. X-Achse: CD44 oder CD62L, Y-Achse: CCR6 oder Isotyp-Kontrolle. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. Gezeigt ist ein Experiment von 5 unabhängigen Versuchen mit Zellen aus mindestens zwei Tieren.

Anhand der Isotyp-Kontrolle kann eine deutliche Anreicherung von CCR6+ CD4+ T-Zellen beobachtet werden. Beide Populationen, regulatorische (CD25+) als auch Effektor (CD25-) CD4+ T-Lymphozyten zeigen eine hohe CCR6 Expression, wobei die Situation ähnlich der im ZNS (3.2.8.1) zu sein scheint. Beide Zellpopulationen zeigen auch zu großen Teilen den charakteristischen aktivierten Phänotyp für die Marker CD44 und CD62L (Abbildung 27 und Daten nicht gezeigt).

Bei genauerer Betrachtung, kann auch hier die CD25 Ausprägung an der Oberfläche klar mit einem regulatorischen Phänotyp korreliert werden, wenn man zur Kontrolle die intrazelluläre Foxp3 Expression heranzieht (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Foxp3 Expression von CCR6+ CD25+ CD4+ T-Zellen im Tumor-Infiltrat.** Repräsentative Fluoreszenzprofile für Foxp3 von J558L Plasmazytom Tumor-Infiltraten aus BALB/c Mäusen für die CCR6 und CD25 Expression wie in Abbildung 25. A) Links: Tumor-Infiltrat im SSC/FSC Profil, dargestellt als Dichte-Diagramm. Das Fenster (blau) bezeichnet die Lymphozyten. Rechts: Fluoreszenzprofil von CD4+ T-Zellen aus dem Tumor-Infiltrat innerhalb der Lymphozytenpopulation. X-Achse: CD25, Y-Achse: CCR6. B) Foxp3 Expression von CD25- (links) oder CD25+ CD4+ T-Zellen (rechts). X-Achse: Foxp3, Y-Achse: CCR6. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil innerhalb des Quadrantenfensters. Gezeigt ist ein Experiment von 5 unabhängigen Versuchen mit Zellen aus mindestens zwei Tieren.

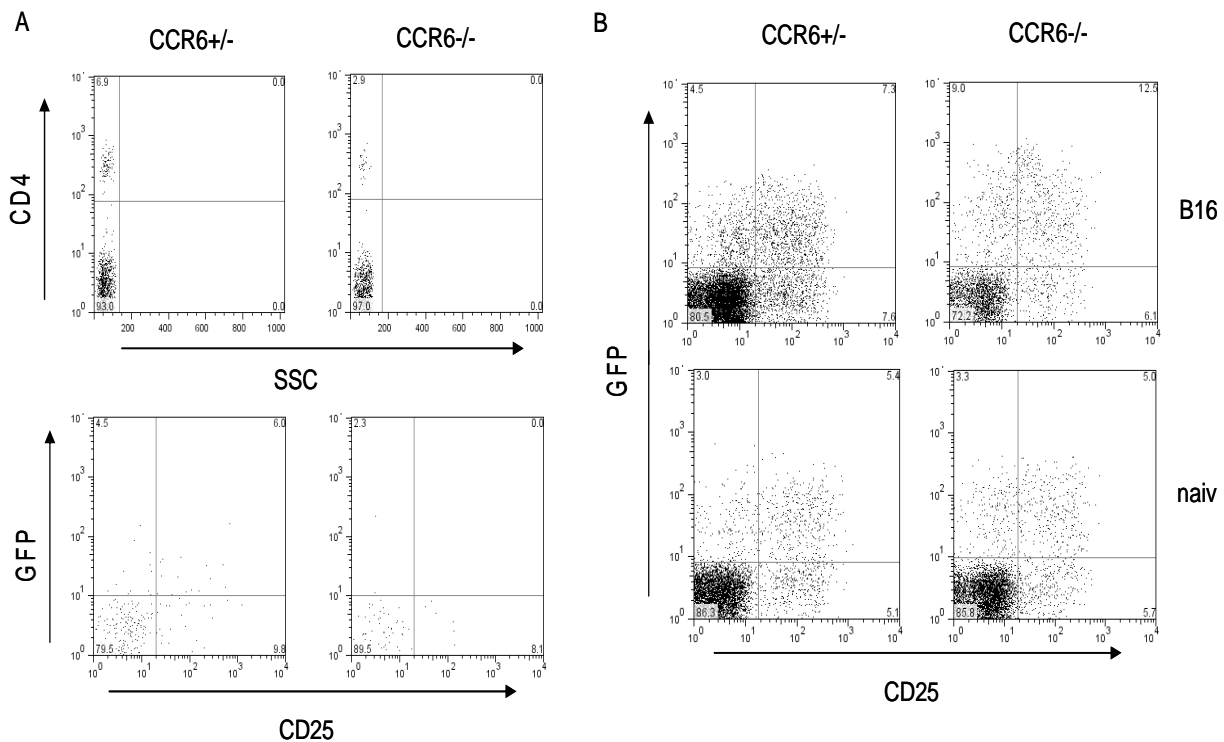
Wie aus Abbildung 28 hervor geht, scheint daher in beiden untersuchten Fällen von peripheren „Entzündungen“ (EAE und Tumor), eine CCL20 Sekretion induziert zu werden, welche wiederum die antagonistischen CCR6 tragenden Effektoren und Regulatoren anziehen vermag.

Eine induzierte CCL20 Sekretion konnte schon im entzündeten ZNS nachgewiesen werden (133). Der Nachweis im J558L Tumormodell steht allerdings noch aus, die verstärkte CCR6+ Treg Infiltration könnte daher auch von anderen chemotaktischen Polypeptiden herrühren, wie zum Beispiel CCL2 dem Liganden für CCR2 (siehe 3.2.6). Allerdings konnte schon für zahlreiche Tumormodelle eine erhöhte CCL20 Expression von den Tumorzellen selbst nachgewiesen werden, welches somit auch für das J558L Plasmazytom zutreffen könnte (163-165). Eine erhöhte CCL20 Produktion vermag somit eine Erklärung für die Aggressivität bestimmter Tumore bieten. Die Situation scheint im Fall von CCL20 jedoch komplizierter, da sowohl Effektoren als auch Regulatoren offensichtlich über das Chemokin mobilisiert werden können. Zusätzlich können aber auch CCR6 ausprägende DC oder B-Zellen auf CCL20 reagieren und somit die Immunreaktion beeinflussen (siehe 3.2.1). Im Gegensatz dazu wurde durch eine kürzlich veröffentlichte Analyse im humanen System ein direkter Zusammenhang zwischen einer gezielten Treg Attraktion über CCR4 und einer Tumorabstoßung postuliert (103).

Um direkt zu überprüfen, ob der Rezeptor CCR6 für die Infiltration ins Tumorgewebe entscheidend ist, wurde ein weiteres Tumormodell in CCR6 gendefizienten Mäusen getestet. Das B16 Melanom bildet nach s.c. Applikation ebenfalls solide Tumoren in C57BL/6 Mäusen aus (siehe 2.2.16). B16 Melanoma Zellen wurden s.c. in homo- (<sup>-/-</sup>) oder heterozygote (<sup>+/-</sup>) CCR6 EGFP-KI Mäuse (*enhanced green fluorescent protein knockin*) injiziert (111) (in Zusammenarbeit mit Dr. Mireille Starke, MDC). Nach 10 Tagen wurden die Tumore und LN der Tiere isoliert und durchflusszytometrisch analysiert.

Hetero- als auch homozygote Tiere zeigen einen normalen Treg Phänotyp, so prägen die CCR6<sup>-/-</sup> Tiere sogar in gleichem Maße GFP auf CD4+ T-Zellen (anstelle von CCR6) aus, wie die heterozygoten CCR6 tragenden Mäuse (Abbildung 29). Eine GFP Expression ist somit auch in homozygoten CCR6 EGFP-KI Tieren ein Indikator für die „normale“ Aktivität des CCR6 Genabschnittes, welches andeutet, dass die Expression vom CCR6 Gen auf CD4+ T-Zellen unabhängig von der eigentlichen Chemokinrezeptor-Expression reguliert ist. Abbildung 29A zeigt die durchflusszytometrische Analyse vom Tumor-Infiltrat aus hetero- (links) und homozygoten CCR6 EGFP-KI Mäusen (rechts). Es ist zu erkennen, dass die Tumore aus CCR6<sup>-/-</sup> Tieren gegenüber den Tumoren aus CCR6<sup>+/-</sup> Tieren eine deutlich

verringerte Infiltration von CD4+ T-Zellen zeigen. CCR6<sup>-/-</sup> Tiere zeigen nur ca. 40% der CD4+ T-Zell Infiltration, verglichen mit CCR6<sup>+/-</sup> Tieren. Betrachtet man die Zusammensetzung der infiltrierenden CD4+ T-Zellen anhand der CD25 und GFP Expression (für CCR6), kann man feststellen, dass in den Tumoren aus CCR6<sup>-/-</sup> Tieren praktisch keine GFP+ Zellen unabhängig von der CD25 Expression zu finden sind, welches möglicherweise die verringerte Infiltration erklärt (Abbildung 29A). Somit sind im CCR6<sup>-/-</sup> Tumor-Infiltrat keine GFP+ Effektor-Gedächtniszell ähnlichen Treg nachzuweisen.



**Abbildung 29: B16 Melanoma Tumor-Infiltrat in CCR6 gendefizienten Mäusen.** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von *ex vivo* isolierten Zellen aus LN und B16 Melanoma Tumor-Infiltrat von CCR6 EGFP-KI Mäusen, 10 Tage nach Tumor-Induktion. A) Fluoreszenzprofil vom B16 Tumor-Infiltrat. Links: Tumor-Infiltrat aus CCR6 EGFP-KI heterozygoten Mäusen (<sup>+/-</sup>). Rechts: Tumor-Infiltrat aus CCR6 EGFP-KI homozygoten Mäusen (<sup>-/-</sup>). Obere Zeile: X-Achse: SSC, Y-Achse: CD4. Untere Zeile CD4+ Zellen: X-Achse: CD25, Y-Achse: GFP. B) Fluoreszenzprofil von CD4+ Lymphknotenzellen aus tumortragenden oder naiven CCR6 EGFP-KI<sup>+/-</sup> oder <sup>-/-</sup> Mäusen. Links: <sup>+/-</sup>, Rechts: <sup>-/-</sup>. Obere Reihe: LN aus B16 tumortragenden Mäusen wie in A). Untere Reihe: LN aus naiven Mäusen. X-Achse: CD25, Y-Achse: GFP. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) von Zellen innerhalb des Quadrantenfensters. Gezeigt ist ein Experiment von zwei unabhängigen Versuchen mit Zellen aus mindestens zwei Tieren.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Expression von CCR6 essentiell für die Tumor-Infiltration von Effektor-Gedächtniszell ähnlichen Treg als auch Effektor T-Zellen im B16 Tumormodell zu sein scheint. Die weitere Konsequenz für das Tumorwachstum und die Initiation einer Tumorimmunabstoßung kann aber nur durch weitere Experimente aufgeklärt werden.

Betrachtet man zum gleichen Zeitpunkt die Situation im LN der B16 tumortragenden Mäuse kann ebenfalls eine interessante Beobachtung gemacht werden. In Abbildung 29B sind die Fluoreszenzprofile für CD25 gegen GFP für die CD4+ Populationen im LN von tumortragenden CCR6<sup>+/-</sup> und CCR6<sup>-/-</sup> (B16) und naiven CCR6<sup>+/-</sup> und CCR6<sup>-/-</sup> Mäusen (naiv) dargestellt. Während die naiven Mäuse, unabhängig von CCR6 die gleiche CD25/GFP Verteilung zeigen, haben beide tumortragenden Tiere eine erhöhte Anzahl von CD25+ Zellen und einen erhöhten Anteil von GFP+ CD25- Zellen im LN. Während die CCR6<sup>+/-</sup> Tiere ein ähnliches Verhältnis zwischen GFP+ und GFP- CD25+ T-Zellen im Vergleich zu den naiven Tieren zeigen, hat sich der Anteil an GFP+ CD25+ in den tumortragenden CCR6<sup>-/-</sup> Tieren verdoppelt (Abbildung 29B). Diese gilt ebenfalls für die GFP+ CD25- Population. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass in den CCR6<sup>-/-</sup> tumortragenden Mäusen sowohl die GFP+ Effektor-Gedächtniszell ähnlichen Treg als auch die Effektor T-Zellen im LN nach Antigenkontakt zwar induziert werden können, dann aber im LN akkumulieren und aufgrund der fehlenden CCR6 Expression nicht in die Peripherie auswandern können. Dieses steht im Einklang mit dem Fehlen der GFP+ Population im Tumor-Infiltrat (Abbildung 29A).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass eine CCR6 Expression unabhängig von einer CD25 Expression phänotypisch als auch funktionell Effektor-Gedächtniszell ähnliche CD4+ T-Zellen in der Maus charakterisiert. Die CCR6+ Treg Population scheint demgemäß tatsächlich eine klar abgegrenzte Subpopulation von CD25+ T-Zellen mit charakteristischen Eigenschaften zu sein und wird daher fortlaufend in Anlehnung an die bisher beschriebene Effektor-Gedächtniszell CD4+ Population (T<sub>EM</sub>) (123) als Effektor-Gedächtniszell ähnliche Treg (*regulatory effector-memory like*, T<sub>REM</sub>) Population bezeichnet.

### **3.3 CCR6+ Effektor-Gedächtniszell ähnliche regulatorische CD25+ T Zellen im Menschen**

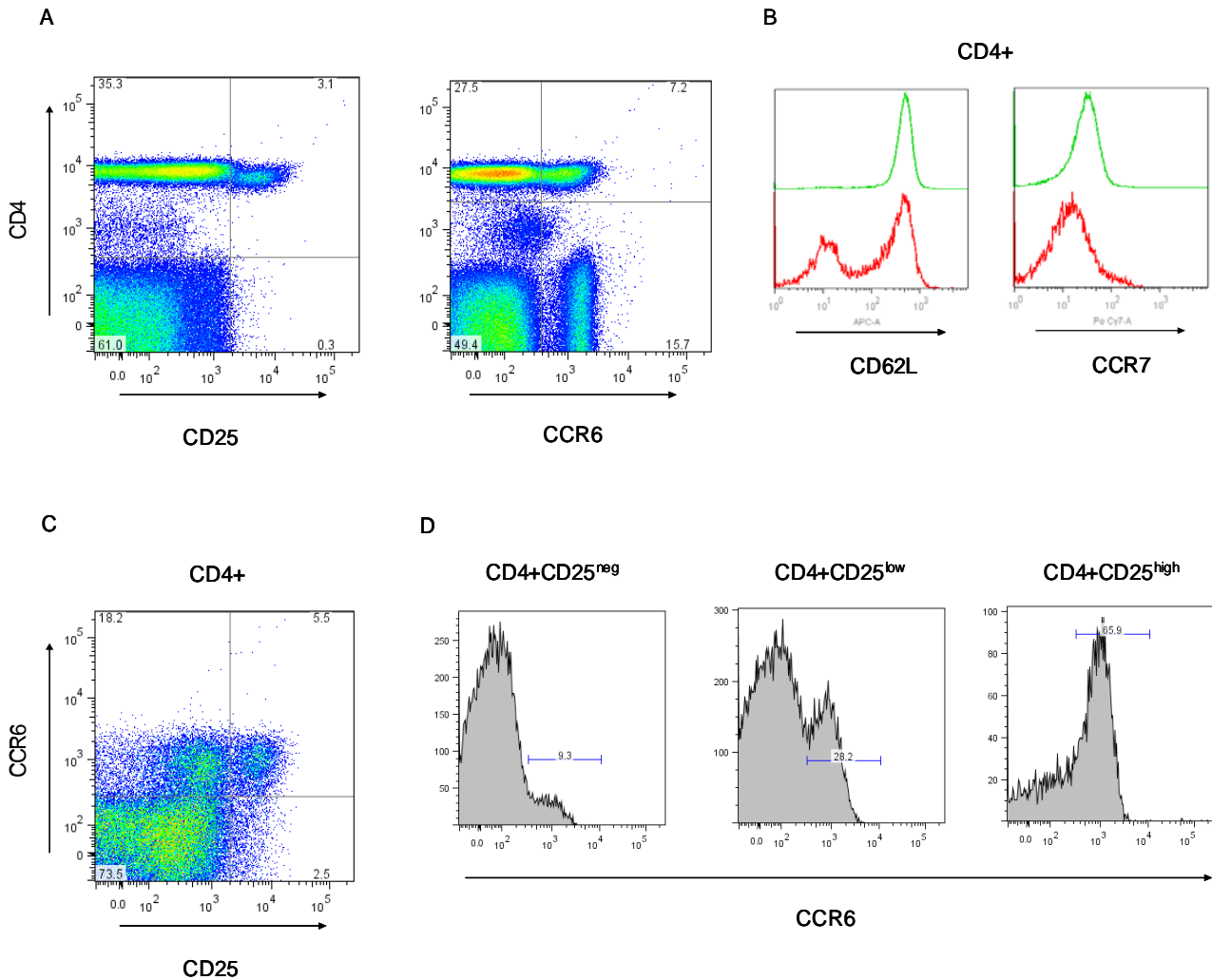
Um zu überprüfen, ob die gefundenen Erkenntnisse bezüglich CCR6+ Effektor-Gedächtniszell ähnlicher Treg Zellen ( $T_{\text{REM}}$ ) in der Maus auch auf den Menschen übertragbar sind, wurde die Analyse auf das humane System ausgedehnt.

Im Menschen findet sich eine analoge Treg Population wie in Nagetieren, allerdings ist die Definition von Treg Zellen im Menschen aufgrund der CD25 Expression komplexer. Anhand der Expression von der Interleukin 2 alpha Kette (CD25) auf humanen CD4+ T-Zellen können abhängig von der CD25 Expressions-Stärke zwei unterschiedliche Populationen definiert werden. Zellen, die CD25 nur schwach exprimieren ( $CD25^{\text{low}}$ ) und Zellen, die CD25 stark exprimieren ( $CD25^{\text{high}}$ ). Es konnte gezeigt werden, dass nur die  $CD25^{\text{high}}$  CD4+ T-Zellen die analoge Treg Population im Menschen darstellen (73). Der Anteil an  $CD25^{\text{low}}$  Zellen kann neben  $CD25^{\text{high}}$  Zellen in humanen PBMC relativ hoch sein (>50%), welches die Handhabung von humanen Treg sehr erschwert, da eine sichere Isolation nur über FACS Sortierung möglich ist.

#### **3.3.1 CCR6 Expression auf CD4+T-Zellen im Menschen**

Um die CCR6 Expression auf humanen PBMC zu untersuchen, wurde das Blut von freiwilligen Donoren durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 30). Abbildung 30A (links) zeigt die CD25 und CCR6 Expression gegenüber der CD4 Expression auf humanen PBMC. Es ist klar zu erkennen, dass sich die CD25 Expression auf CD4+ T-Zellen in 3 Populationen einteilen lässt:  $CD25^{\text{high}}$ ,  $CD25^{\text{low}}$  und  $CD25^{\text{neg}}$  (keine CD25 Expression). Ähnlich wie in der Maus, kann auch im Menschen die  $CD25^{\text{high}}$  Treg Population durch eine leicht verringerte CD4 Expression klar abgegrenzt werden (vgl. Abbildung 2A). Ebenfalls die CCR6 Expression von humanen PBMC ähnelt sehr der Expression in der Maus (Abbildung 30A, rechts). Eine deutliche CCR6 Expression kann auf CD4+ T-Zellen beobachtet werden (~20%), wobei der Anteil hier weitaus höher ist als der Anteil in naiven Mäusen (vgl. Abbildung 5A). Die CCR6 exprimierenden CD4- Zellen können ähnlich wie in der Maus, fast alle CD19+ B-Zellen zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt). Abbildung 30B zeigt die Expression der typischen Effektor-Gedächtniszell Marker CCR7 und CD62L (123) in Beziehung zur CCR6 Expression auf humanen CD4+ T-Zellen. Alle CCR6+ CD4+ T-Zellen

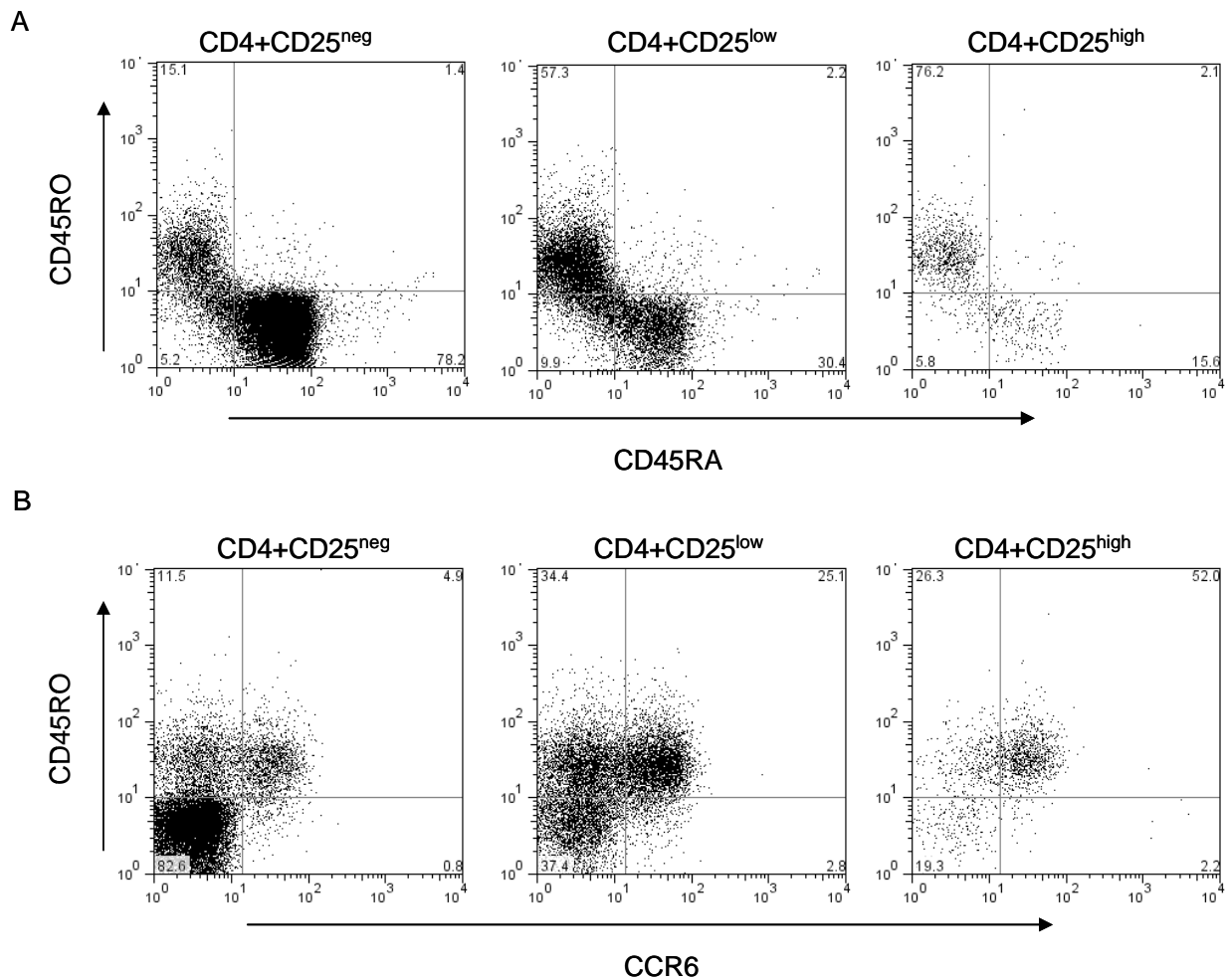
exprimieren im Vergleich zu CCR6- CD4+ T-Zellen geringere Mengen an CCR7 (Abbildung 30B, rechts). Dahingegen lässt sich nur innerhalb der CCR6+ Population eine Subpopulation ausmachen, die keine CD62L Expression zeigt (Abbildung 30B, links).



**Abbildung 30: CD25 und CCR6 Expression von humanen PBMC.** A) Repräsentatives Fluoreszenzprofil von Lymphozyten aus humanen peripherem Blut für die CD25 (links) und CCR6 (rechts) Expression. X-Achse: CD25 oder CCR6, Y-Achse: CD4. B) Expression von Effektor-Gedächtnis Zell Marker CD62L und CCR7 auf CCR6+ (rot) und CCR6- CD4+ T-Zellen (grün), dargestellt als Histogramm. Links: CD62L, rechts: CCR7. C) CCR6 Expression auf CD4+ T-Zellen. X-Achse: CD25, Y-Achse: CCR6. Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) von Zellen innerhalb des Quadrantenfensters. D) CCR6 Expression innerhalb der angedeuteten Fenster: CD25<sup>high</sup> (rechts), CD25<sup>low</sup> (Mitte) und CD25- CD4 T-Zellen (links). Die Zahlen über den Regionsmarkern bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb der Region.

In Abbildung 30C und 30D ist die CCR6 Expression auf CD4+ T-Zellen im Vergleich zur CD25 Ausprägung gezeigt. Stellt man im Fluoreszenzprofil CD25 gegen CCR6 dar, kann man einen deutlichen Unterschied zur murinen CCR6 Expression erkennen (Abbildung 30C). Die CCR6 Expression lässt sich auf einem Großteil der CD25<sup>high</sup> Treg Zellen, aber auch auf einem beträchtlichen Anteil der CD25<sup>low</sup> Zellen feststellen, wohingegen die CD25- CD4+ T-Zellen nur geringe Mengen an CCR6 ausprägen. In Abbildung 30D ist der genaue Anteil der

CCR6 Expression innerhalb der drei CD4+ T-Zellpopulationen, in Abhängigkeit von CD25 dargestellt. Über 60% der humanen Treg prägen CCR6 an der Zelloberfläche aus, wobei der Anteil innerhalb der CD25<sup>low</sup> Population noch bei ca. 30% liegt. Die CCR6 Expression von CD25- Zellen liegt allerdings unter 10%. Die Ausprägung innerhalb dieser Populationen kann allerdings donorspezifisch variieren; so konnte in manchen Fällen eine CCR6 Expression auf CD25<sup>high</sup> Treg von über 80% detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 31: Die CCR6 Expression in humanen PBMC korreliert mit einer CD45RO Ausprägung.** Repräsentative Fluoreszenzprofile von PBMC eines gesunden Donors. A) CD45RA und CD45RO Expression auf den drei CD4+ T-Zell Subpopulationen, abhängig von einer CD25 Expression (CD25- (links), CD25<sup>low</sup> (Mitte) und CD25<sup>high</sup> CD4+ T-Zellen (rechts)). X-Achse: CD45RA, Y-Achse: CD45RO. B) CCR6 und CD45RO Expression wie in B). X-Achse: CCR6, Y-Achse: CD45RO. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

Die Expression von CCR6 auf CD4+ T-Zellen deutet auch im Menschen darauf hin, dass CCR6 Gedächtniszell-spezifisch exprimiert wird. Humane Gedächtniszellen werden grundsätzlich durch die Expression von den CD45 *splice*-Varianten CD45RO und CD45RA charakterisiert (143). Gedächtniszellen sind CD45RO+, haben aber die CD45RA Expression verloren. In Abbildung 31A ist die Expression von CD45RO gegen CD45RA auf den drei



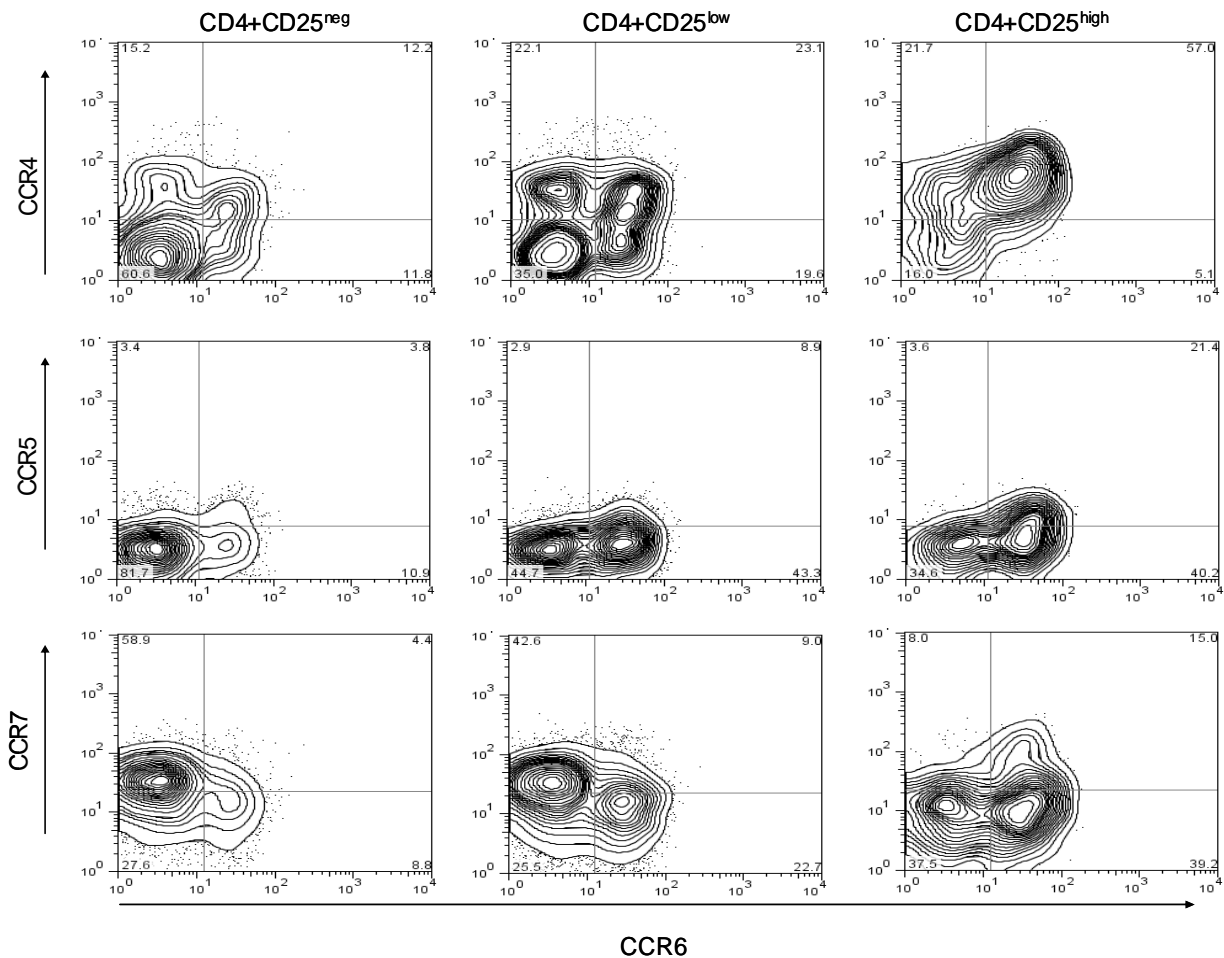
CD4+ T-Zellpopulationen, in Abhängigkeit von CD25 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass CD45RO und CD45RA auf allen Subpopulationen differentiell exprimiert werden. Innerhalb der CD25- Population scheint der größte Teil von naiven CD45RA+ CD45RO- T-Zellen zu existieren (~80%). Der Großteil der CD25<sup>low</sup> Population zeigt allerdings einen CD45RO+ CD45RA- Gedächtniszell-Phänotyp (~60%). Die CD45RO+ CD45RA- Population ist innerhalb der CD25<sup>high</sup> Treg Zellen am größten, hier tragen sogar >75% der Zellen den charakteristischen Gedächtniszell-Phänotyp. In Abbildung 31B ist die CD45RO Expression im Vergleich zur CCR6 Ausprägung dargestellt. Man kann klar erkennen, dass unabhängig von der CD25 Expression die CCR6 Ausprägung eindeutig mit dem Gedächtniszell-Marker CD45RO segregiert, welches im Einklang zu früheren Analysen steht (126). In allen drei Untergruppen kann aber auch eine CCR6- CD45RO+ Population beobachtet werden.

Abbildung 32 zeigt die Expression von verschiedenen Chemokinrezeptoren im Vergleich zur CCR6 Expression auf den drei CD4+ T-Zellpopulationen, in Abhängigkeit von CD25. Humane Treg Zellen wurden zuvor als CCR4+ und CCR8+ beschrieben, die Liganden von CCR4 und CCR8 sollten demnach eine selektive Rekrutierung von humanen Treg Zellen ermöglichen (76, 166). Allerdings wurde in diesen Analysen nicht zwischen CD25<sup>low</sup> und CD25- CD4+ T-Zellen unterschieden.

Das Fluoreszenzprofil für CCR4 (Abbildung 32, obere Reihe) bestätigt, dass der Großteil von CD25<sup>high</sup> Treg tatsächlich CCR4+ ist (~80%), wobei die Expression auf der CD25- Population bei nur ca. 25% liegt. Der tatsächliche Anteil an CCR4+ Zellen innerhalb der CD25<sup>low</sup> Population beträgt aber sogar über 40%. Diese Ergebnisse widerlegen eindeutig, dass eine CCR4 Expression nur selektiv auf CD25<sup>high</sup> Treg zu finden ist. Eine Anreicherung von CCR4+ Zellen, ähnlich wie für CCR6+ Zellen, kann jedoch unter CD25<sup>high</sup> Treg beobachtet werden, welches bei genauerer Betrachtung mit dem Migrationsverhalten von humanen Treg Zellen im Einklang steht (76). Auffällig ist, dass praktisch alle CCR6+ CD25<sup>high</sup> T<sub>REM</sub> positiv für CCR4 sind, während dieses nur für einen Teil der CCR6+ CD25<sup>low</sup> T<sub>EM</sub> zutrifft. Die Expression für CCR5 scheint der Situation in der Maus zu ähneln (Abbildung 32, mittlere Reihe). Insgesamt ist die Expression von CCR5 auf allen Populationen gering, wobei unter CD25<sup>high</sup> Treg relativ der höchste Anteil zu finden ist (vgl. Abbildung 20C). Auch hier scheint die CCR5 Expression mit CCR6 zu segregieren.

Bei einer genaueren Betrachtung der CCR7 Expression auf den drei Populationen (Abbildung 32, untere Reihe) kann man eindeutig feststellen, dass alle CCR6+ Zellen CCR7 nur schwach exprimieren (vgl. Abbildung 30B). Ähnlich der CCR7 Expression in der Maus, zeigen daher auch in humanen PBMC praktisch alle Treg, unabhängig von CCR6, eine schwache CCR7

Ausprägung (vgl. Abbildung 11). Nur ein kleiner Teil der CCR6+ CD25<sup>high</sup> Zellen präsentiert eine hohe CCR7 Expression.

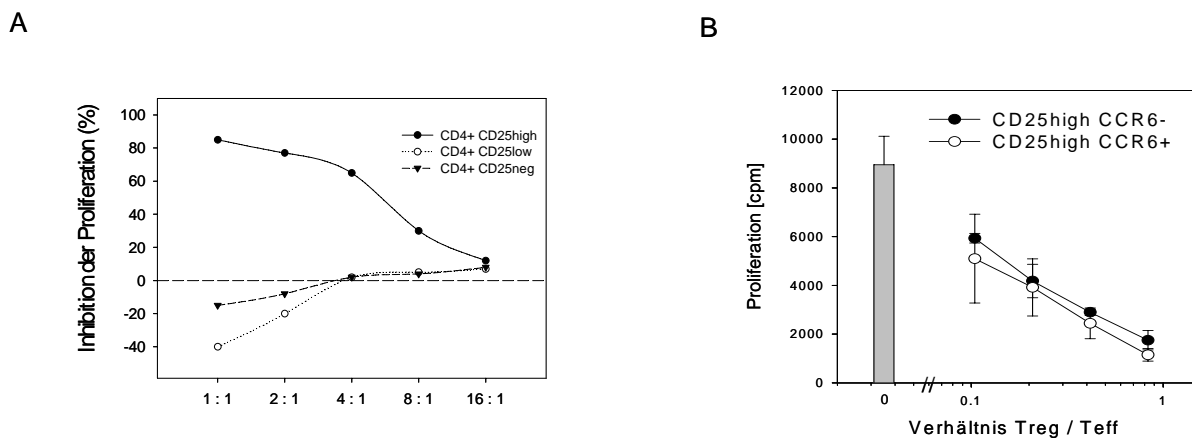


**Abbildung 32: Chemokinrezeptor-Expression auf humanen CD4+ T-Zellen.** Repräsentative Fluoreszenzprofile von CCR4 (obere Reihe), CCR5 (mittlere Reihe) und CCR7 (untere Reihe) von PBMC eines gesunden Donors in Abhängigkeit von CCR6. Gezeigt ist die Expression auf den drei CD4+ T-Zell Subpopulationen, abhängig von einer CD25 Expression (CD25<sup>-</sup> (links), CD25<sup>low</sup> (Mitte) und CD25<sup>high</sup> CD4+ T-Zellen (rechts)). X-Achse: CCR6, Y-Achse: CCR4, CCR5 oder CCR7. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

Der beobachtete Phänotyp deutet darauf hin, dass auch in humanen PBMC eine CCR6 Expression Effektor-Gedächtniszellen definiert, die in der Regel als CCR7 und CD62L schwach exprimierend (siehe Abbildung 30B und Abbildung 32) und CD45RO+ CD45RA-beschrieben werden (siehe Abbildung 31 und 3.2.3). Daher scheinen auch in humanen PBMC analog zur Maus (siehe 3.2) sowohl reguläre CCR6+ T<sub>EM</sub> (zum Großteil CD25<sup>low</sup>) als auch Effektor-Gedächtniszell ähnliche CD25<sup>high</sup> CCR6+ Treg Zellen (T<sub>REM</sub>), zu existieren.

### 3.3.2 CCR6<sup>+</sup> humane CD25<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen sind regulatorische T-Zellen

Untersuchungen mit humanen PBMC haben gezeigt, dass nur die CD25<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen suppressiven Effekt *in vitro* haben (73). Dieses konnte über einen *in vitro* Suppressions-Assay bestätigt werden (in Zusammenarbeit mit Dr. Giovanna Borsellino, IRCCS, Rom) siehe 2.2.10.1). Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die CD25<sup>low</sup> als auch die CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Effektor T-Zell Proliferation verstärken, anstatt sie zu inhibieren (Abbildung 33A). Um zu überprüfen, ob Unterschiede innerhalb der CCR6<sup>+</sup> und CCR6<sup>-</sup> Treg Zellpopulationen bei der Suppression *in vitro* vorliegen, wurden beide Populationen im Suppressions-Assay getestet (Abbildung 33B).



**Abbildung 33: Humane CCR6<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen sind regulatorische T-Zellen.** A) Suppressions-Assay mit CD25<sup>high</sup>, CD25<sup>low</sup> und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Standard *in vitro* Suppressions-Assay zum Nachweis von Treg wurden FACS sortierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen eingesetzt, um die anti-CD3 stimulierte CD25-CD4<sup>+</sup> T-Zell Proliferation zu supprimieren. X-Achse: Verhältnis Effektor:Suppressor, Y-Achse: Inhibition der Effektorzell Proliferation (%). B) Suppressions-Assay wie in A) mit CCR6<sup>+</sup> und CCR6<sup>-</sup> CD25<sup>hoch</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Standard *in vitro* Suppressions-Assay zum Nachweis von Treg wurden FACS sortierte CCR6<sup>+</sup> und CCR6<sup>-</sup> CD25<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen eingesetzt um die anti-CD3 stimulierte CD25-CD4<sup>+</sup> T-Zell Proliferation zu supprimieren. X-Achse: Verhältnis Effektor:Suppressor, Y-Achse: Proliferation (cpm). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Offensichtlich bestehen zwischen den beiden Treg Populationen, ähnlich wie in der Maus (vgl. Abbildung 9), keine großen Unterschiede bezüglich der suppressiven Kapazität *in vitro*. Die CCR6<sup>+</sup> T<sub>REM</sub> Population supprimiert hier nur geringfügig effektiver (Abbildung 33B). Aufgrund dieser Ergebnisse ist der Nachweis erbracht, dass die humanen CD25<sup>high</sup> CCR6<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen tatsächlich regulatorische T-Zellen sind.

### **3.3.3 CCR6+ regulatorische- und Effektor-Gedächtniszell ähnliche Populationen im Menschen unterscheiden sich durch eine differentielle Adhäsionsmolekül-Expression**

Während bisher nur geringe Unterschiede in der Maus zwischen CCR6+ T<sub>EM</sub> und T<sub>REM</sub> bezüglich der Expression von nicht Treg assoziierten Oberflächenmarkern gefunden werden konnten, welches möglicherweise auch mit der sehr geringen Anzahl von CCR6+ CD25- T<sub>EM</sub> Zellen in der Maus zusammenhängt, konnten im Rahmen einer Phänotypisierung von humanen PBMC zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen Effektor- und regulatorischen CCR6+ CD4+ T-Zellpopulationen beobachtet werden (vgl. 3.2.3). Insbesondere konnten Unterschiede bei der Adhäsionsmolekül-Expression detektiert werden.

#### **3.3.3.1 Abwesenheit von CD49d auf CCR6+ CD25<sup>high</sup> Effektor-Gedächtniszell ähnlichen Treg**

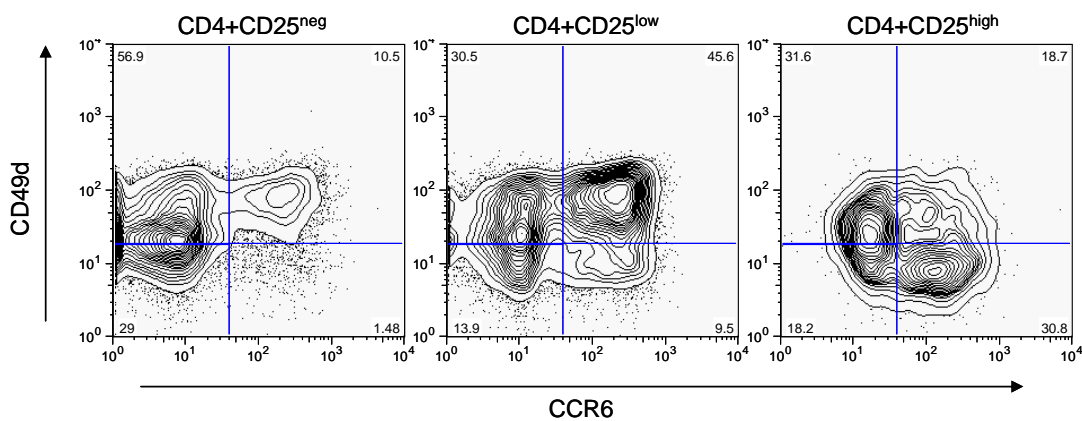
Vergleicht man die Expression von CD49d (Integrin  $\alpha$ 4-Kette), gegen CD25 auf humanen CD4+ T-Zellen aus PBMC, kann man eine unterschiedliche Expression des Moleküls feststellen (Abbildung 34B). Der Großteil der CD4+ T-Zellen exprimiert CD49d, nur ein geringer Teil der CD25<sup>low</sup> und der Hauptteil der CD25<sup>high</sup> Zellen prägen die Integrin Kette nicht aus. Bei genauerer Betrachtung kann die Expression von CD49d in drei, abhängig von der Stärke der Expression, unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden: CD49d<sup>-</sup>, CD49d<sup>low</sup> und CD49d<sup>high</sup>, wobei die hohe CD49d Expression vornehmlich unter CD25<sup>low</sup> Zellen beobachtet werden kann.

Bei der Analyse der drei CD4+ T-Zellpopulationen, abhängig von CD25, im Detail, lässt sich eine interessante Beobachtung machen (Abbildung 34A und 34C). Während die CCR6+ CD25<sup>low</sup> T<sub>EM</sub> vornehmlich hohe Mengen an CD49d ausprägen, erscheinen die CCR6+ CD25<sup>high</sup> T<sub>REM</sub> Zellen vorwiegend als CD49d negativ. Bei der Auswertung von 30 gesunden Donoren zeigt sich, dass der Anteil an CD49d negativen Zellen tatsächlich unter den CD25<sup>high</sup> CCR6+ Zellen am höchsten ist und bei über 55% liegt, während dieser Anteil unter den CD25<sup>low</sup> und CD25- Zellen unter 20% liegt (Abbildung 34C). Somit kann unter Zuhilfenahme von CD49d erstmals ein beträchtlicher Unterschied zwischen den antagonistischen CCR6+ T<sub>EM</sub> und T<sub>REM</sub> Populationen definiert werden (Abbildung 34A und 34C).

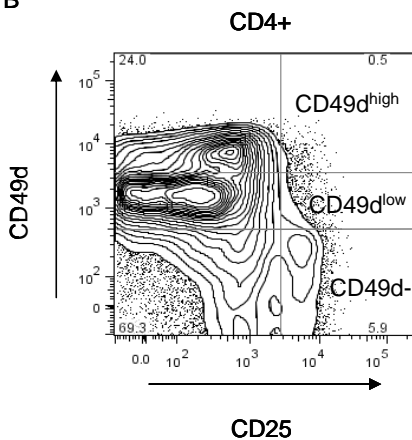
Um zu überprüfen, ob die differentielle CD49d Expression transkriptionell reguliert ist, wurde die CD49d Expression von FACS sortierten CD25-, CCR6+ CD49<sup>high</sup> CD25<sup>low</sup> und CCR6+ CD49d- CD25<sup>high</sup> Populationen über eine Realtime RT-PCR mit CD49d spezifischen

Oligonukleotiden überprüft (Abbildung 34C). Obwohl bei der Regulation der Integrin Expression häufig posttranslationale Mechanismen beobachtet werden können, scheint die differentielle CD49d Regulation auf den o.g. Untergruppen tatsächlich auf Transkriptions-Ebene reguliert zu sein. Wie aus Abbildung 34C hervorgeht, kann faktisch ein über 100-facher Unterschied der CD49d mRNA Expression zwischen den korrespondierenden CCR6+ T<sub>EM</sub> und T<sub>REM</sub> Populationen beobachtet werden.

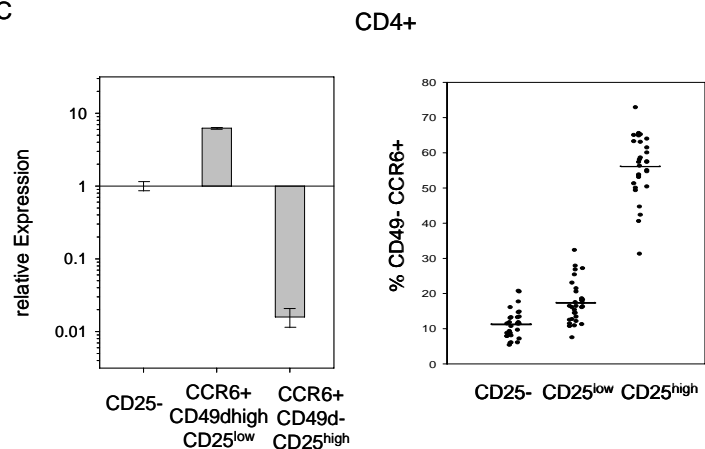
A



B



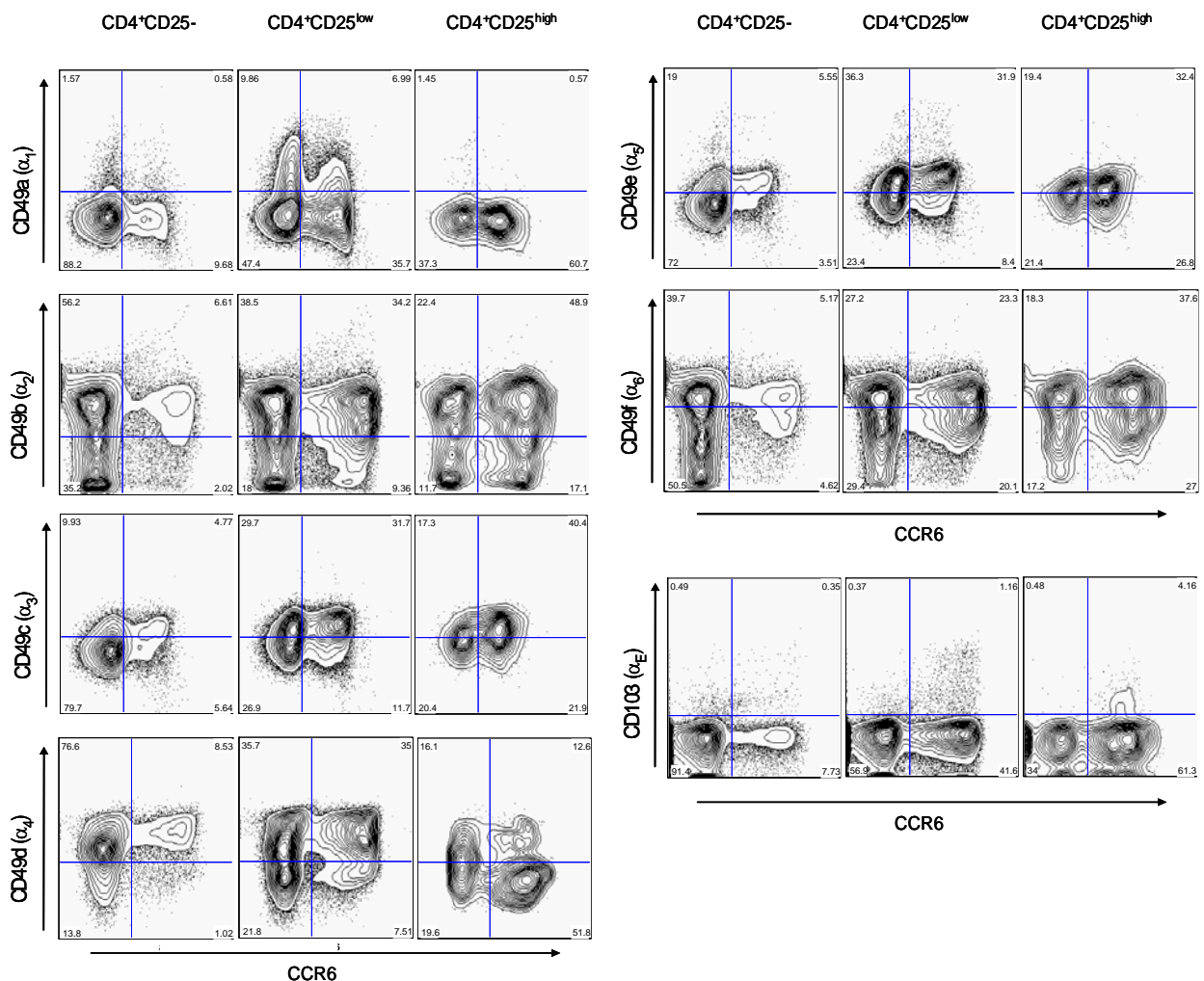
C



**Abbildung 34: CCR6+ CD25<sup>high</sup> und CCR6+ CD25<sup>low</sup> CD4+ T-Zellen unterscheiden sich durch eine gegensätzliche  $\alpha 4$ -Integrin (CD49d) Expression.** A) Repräsentatives Fluoreszenzprofil von PBMC eines gesunden Donors. Die CCR6 und CD49d Expression ist für CD25<sup>-</sup> (links), CD25<sup>low</sup> (Mitte) und CD25<sup>high</sup> CD4+ T-Zellen (rechts) gezeigt. X-Achse: CCR6, Y-Achse: CD49d. B) CD49d Ausprägung in Abhängigkeit von CD25. Repräsentatives Fluoreszenzprofil von CD4+ T-Zellen. X-Achse: CD25, Y-Achse: CD49d. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb der Quadrantenfensters. C) Links: Repräsentative Realtime RT-PCR Analyse für CD49d von FACS sortierten CD4+ T-Zellsubgruppen (CD25<sup>-</sup>, CD49d+ CD25<sup>low</sup> CCR6+, CD49d- CD25<sup>high</sup> CCR6+). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. Gezeigt ist die relative Expression zur HPRT Ausprägung, normalisiert auf die Expression des Gens der CD25<sup>-</sup> T-Zell Population. Rechts: Statistische Analyse. Das Diagramm fasst die Analyse wie in A) von 30 gesunden Donoren für die CCR6 und CD49d Expression zusammen. Gezeigt ist der relative Anteil an CCR6+ CD49d- Zellen unter den CD25<sup>-</sup>, CD25<sup>low</sup> und CD25<sup>high</sup> CD4+ T-Zellen.

### 3.3.3.2 Die Regulation von CD49d steuert die differentielle Expression von VLA-4 auf T<sub>REM</sub> und T<sub>EM</sub>

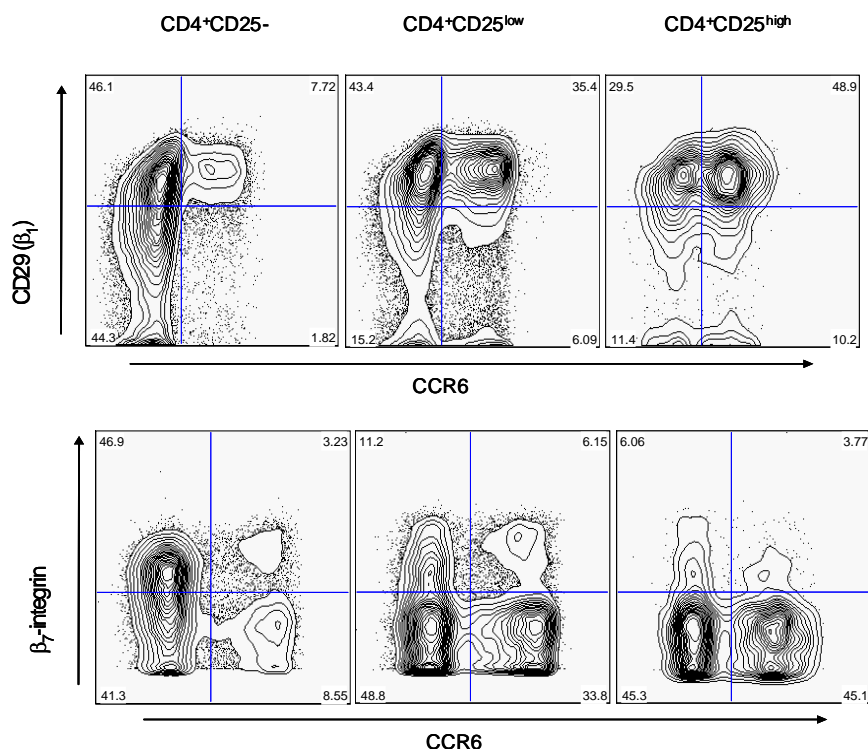
Adhäsionsmoleküle, zu denen auch die Integrine gehören, ermöglichen neben Chemokinrezeptoren die gezielte Migration von Zellen, da sie am Ort der Chemokin-Ausschüttung die Bindung an das Endothel vermitteln und somit die Transmigration an den Ort der Entzündung initiieren zu können. Lymphozyten können abhängig von ihrem funktionellen Status ein spezifisches Repertoire an Adhäsionsmolekülen ausprägen. Aus den bisher bekannten 18  $\alpha$ -Ketten und 8 verschiedenen  $\beta$ -Ketten können kombinatorisch 24 verschiedene  $\alpha\beta$ -Integrine gebildet werden, wobei jedoch nicht alle Ketten funktionell als Heterodimer zum Integrin kombiniert werden können und nicht alle 24 Integrine für CD4+ T-Zellen relevant sind (167).



**Abbildung 35:  $\alpha$ -Integrin Expression auf humanen CD4+ T-Zellen.** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von humanen PBMC. Die CCR6 und  $\alpha$ 1-6- und  $\alpha$ E-Expression ist jeweils für CD25<sup>-</sup> (links), CD25<sup>low</sup> (Mitte) und CD25<sup>high</sup> CD4+ T-Zellen (rechts) gezeigt. X-Achse: CCR6, Y-Achse:  $\alpha$ -Integrine. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

Da für CD49d eine differentielle Expression zwischen  $T_{EM}$  und  $T_{REM}$  beobachtet werden konnte aber auch zwischen CCR6- Treg und  $T_{REM}$  Unterschiede festgestellt wurden (Abbildung 34), sollte die weitere Integrin-Expression auf diesen Zellen untersucht werden. Um zu überprüfen, welche Integrine vornehmlich auf  $CD25^{high}$  Treg exprimiert sind, wurde eine umfassende durchflusszytometrische Analyse zur Charakterisierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrin-Expression auf  $CD4+$  T-Zellen durchgeführt (Abbildung 35 und 36).

Abbildung 35 zeigt die Analyse der  $\alpha$ -Integrin-Expression auf humanen  $CD4+$  T-Zellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine differentielle Expression nur für die  $\alpha4$ -Kette (CD49d) erhalten wird. Alle anderen  $\alpha$ -Ketten zeigen keine wesentlichen Unterschiede. Die  $\alpha1$ -Kette (CD49a) kann nur auf einem geringen Teil der  $CD25^{low}$  Zellen detektiert werden (~15%), dahingegen zeigen die  $\alpha2$ - (CD49b) und  $\alpha6$ -Kette (CD49f) eine ähnliche Expression auf  $T_{EM}$  und  $T_{REM}$  Zellen. Die Expression von  $\alpha3$  (CD49c) und  $\alpha5$  (CD49e) ist auf allen  $CD4+$  T-Zellen in etwa gleich stark. Interessanterweise wird die Integrin  $\alpha E$ -Kette (CD103) auf  $CD25^{high}$  Treg im Menschen praktisch nicht ausgeprägt (<5%), welches einen gravierenden Unterschied zu murinen  $CD25+$  Treg darstellt (vgl. Abbildung 2 und Abbildung 7).



**Abbildung 36:  $\beta$ -Integrin Expression auf humanen  $CD4+$  T-Zellen.** Die CCR6 und  $\beta1$ - und  $\beta7$ -Integrin-Expression ist für  $CD25^-$  (links),  $CD25^{low}$  (Mitte) und  $CD25^{high}$   $CD4+$  T-Zellen (rechts) gezeigt. X-Achse: CCR6, Y-Achse:  $\beta$ -Integrine. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

Die Expression der  $\beta$ -Integrine wurde ebenfalls untersucht (Abbildung 36). Die Expression der  $\beta 1$ -Kette (CD29) ist auf praktisch allen CD25<sup>high</sup> CD4+ T-Zellen zu finden und zu knapp 80% auch auf CD25<sup>low</sup> Zellen exprimiert. Die CD25- Zellen prägen jedoch nur zu ca. 50% CD29 aus, wobei die CCR6+ CD25- Zellen alle CD29 positiv sind. Die  $\beta 7$ -Kette zeigt ein genau entgegengesetztes Expressionsmuster. Ungefähr 50% der CD25- Population ist positiv für das  $\beta 7$ -Integrin, die beiden CD25+ Populationen prägen jedoch nur in geringen Maßen die  $\beta 7$ -Kette aus. Nur ca. 10% der CD25<sup>high</sup> Treg und ca. 15% der CD25<sup>low</sup> exprimieren die  $\beta 7$ -Kette an der Zelloberfläche. Die Expression der beiden  $\beta$ -Ketten scheint daher aktivierungsspezifisch zu sein. Naive Zellen prägen im hohen Maße die  $\beta 7$ -Kette aus, wobei diese möglicherweise nach Aktivierung durch eine CD29 Expression ersetzt wird. Prädominant wird daher auf humanen CD25<sup>high</sup> Treg und CD25<sup>low</sup> Effektor T-Zellen die Integrin  $\beta 1$ -Kette ausgeprägt.

Die Integrin  $\alpha 4$ -Kette (CD49d) kann im Prinzip Heterodimere mit  $\beta 1$ - (CD29) oder  $\beta 7$ -Ketten bilden. Da die  $\beta 7$ -Kette allerdings vorwiegend nur auf naiven CD4+ T-Zellen exprimiert ist, können sich nur hier  $\alpha 4$ - $\beta 7$  Heterodimere bilden. Im Gegensatz dazu wird die  $\beta 1$ -Kette aber auf förmlich allen Effektor und Treg Zellen ausgeprägt, welches daher zwangsläufig zu der Bildung von  $\alpha 4$ - $\beta 1$  Heterodimeren und somit zu Integrinen der VLA-Klasse (*very late antigen*) führt. Die Konsequenz dieser Beobachtung ist daher, dass die differentielle Expression von CD49d auf T<sub>EM</sub> und T<sub>REM</sub> (Abbildung 34) die Bildung von VLA-4 ( $\alpha 4$ - $\beta 1$  Integrin) kontrolliert. Weiterhin können im Gegensatz zur Maus auf Treg keine  $\alpha E$ - $\beta 7$  Heterodimere gebildet werden, da eine CD103 und  $\beta 7$  Expression auf CD25<sup>high</sup> Treg praktisch nur im sehr geringen Umfang nachzuweisen ist (Abbildung 34 und 36).

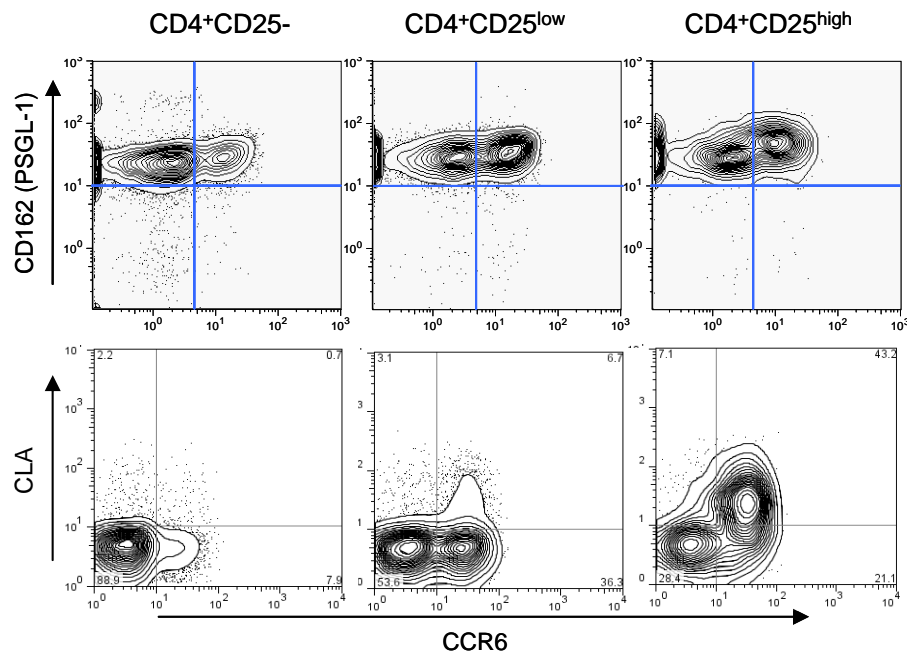
### 3.3.3.3 Gegensätzliche Expression von VLA-4 und CLA auf humanen CD4+ T-Zellen

Die Analyse der Integrin Expression konnte zeigen, dass das Fehlen von VLA-4 auf CCR6+ T<sub>REM</sub> Zellen durch kein anderes Integrin kompensiert wurde (3.3.3.2). Daher sollte überprüft werden, ob weitere Adhäsionsmoleküle existieren, welche möglicherweise selektiv von Treg Zellen exprimiert werden. Ein potentieller Kandidat dafür wäre CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*), welches zuvor auf Treg Zellen detektiert werden konnte (166).

Da CLA eine fucosylierte Variante von PSGL-1 (CD162, *P-selectin glycoprotein ligand1*) ist (168), wurde zunächst die PSGL-1 Expression überprüft. Abbildung 37 (obere Reihe) zeigt die PSGL-1 Expression auf humanen CD4+ T-Zellen, in Abhängigkeit von CD25 und CCR6. Wie in Abbildung 37 deutlich zu erkennen ist, exprimieren alle Untergruppen hohe PSGL-1



Werte, wobei sich diese nur geringfügig unterscheiden. Es kann lediglich auf den CCR6+ CD25<sup>high</sup> T<sub>REM</sub> eine leicht erhöhte Expression von PSGL-1 detektiert werden.

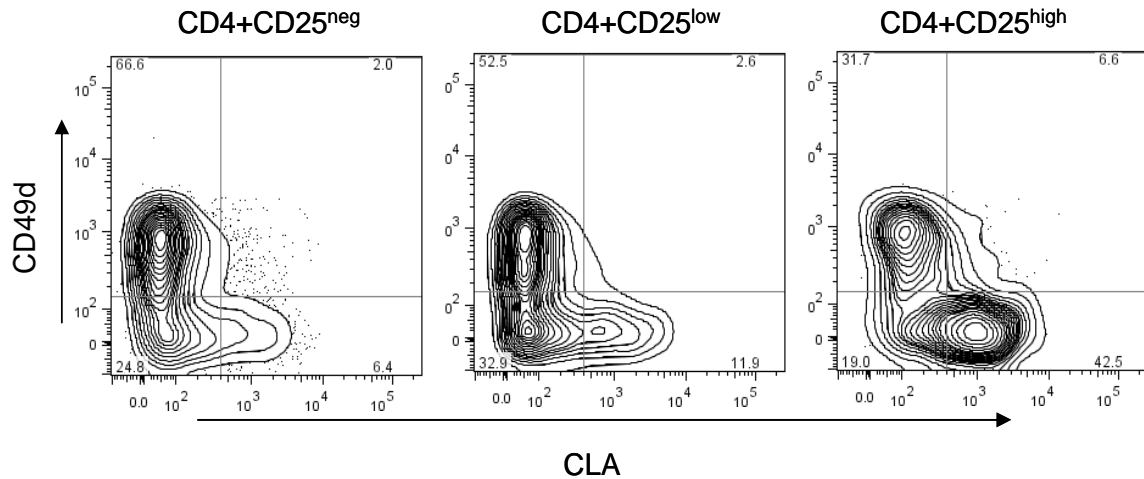


**Abbildung 37: PSGL-1 und CLA Expression von humanen CD4+ T-Zellen.** Repräsentatives Fluoreszenzprofil von PBMC eines gesunden Donors. Die CCR6 und CLA Expression ist für CD25- (links), CD25<sup>low</sup> (Mitte) und CD25<sup>high</sup> CD4+ T-Zellen (rechts) gezeigt. X-Achse: CCR6, Y-Achse: PSGL-1 oder CLA. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

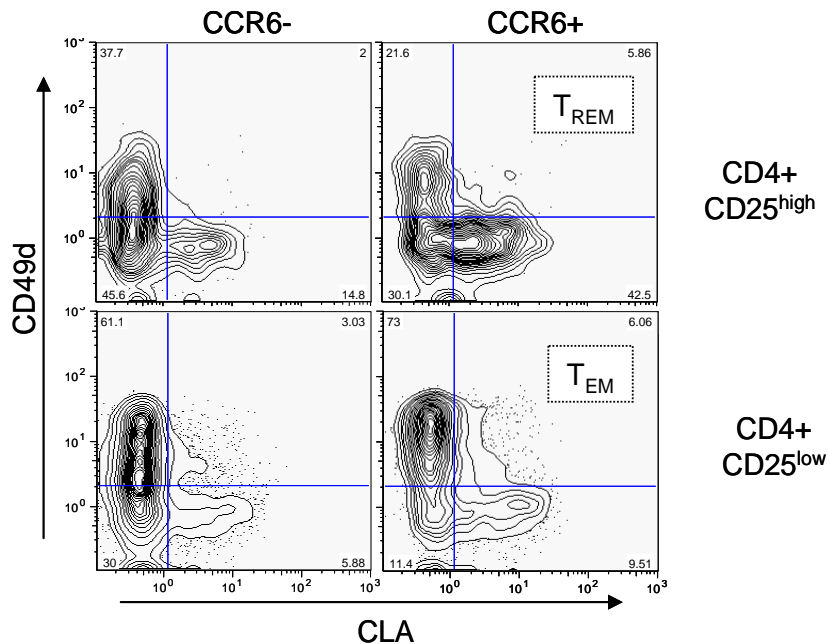
Offensichtlich bestehen daher bei der PSGL-1 Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten T-Zell Subpopulationen. Bei der direkten Analyse der CLA Expression konnten jedoch erhebliche Unterschiede detektiert werden. Wie in Abbildung 37 (untere Reihe) klar zu erkennen ist, segregiert eine CLA Expression auf CD25<sup>high</sup> Treg Zellen mit CCR6. Daher scheinen vornehmlich nur CCR6+ T<sub>REM</sub> Zellen CLA zu exprimieren. Eine CLA Expression könnte daher die fehlende VLA-4 Expression auf T<sub>REM</sub> Zellen kompensieren und somit eine gezielte Steuerung von antagonistischen, CCR6+ exprimierenden T<sub>EM</sub> und T<sub>REM</sub> auf Adhäsionsmolekül-Ebene ermöglichen.

Betrachtet man die CLA Expression auf CD4+ T-Zellen, kann man feststellen, dass CD49d und CLA offensichtlich entgegengesetzt reguliert sind. In Abbildung 38A ist deutlich zu erkennen, dass CD4+ T-Zellen, unabhängig von einer CD25 Expression entweder CD49d oder CLA exprimieren. Bei dem Vergleich von CCR6+ und CCR6- CD25<sup>high</sup> und CD25<sup>low</sup> T-Zell Subpopulationen wird der Unterschied sehr deutlich. Während der Großteil der CCR6+ T<sub>REM</sub> hohe Mengen an CLA ausprägt (>40%) und überwiegend CD49d negativ ist (>70%), exprimieren CCR6+ T<sub>EM</sub> zu über 70% CD49d und nur geringe Mengen CLA (<10%) (Abbildung 38B).

A



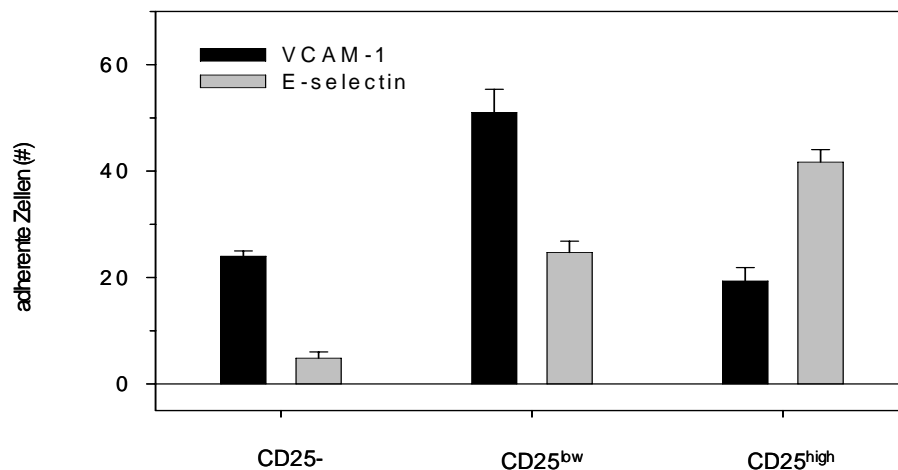
B



**Abbildung 38: Differentielle Expression von CLA und  $\alpha 4$ -Integrin auf humanen CD4+ T-Zellen.** Repräsentatives Fluoreszenzprofil von PBMC eines gesunden Donors. A) Gezeigt ist die CLA und CD49d Expression für CD25<sup>-</sup> (links), CD25<sup>low</sup> (Mitte) und CD25<sup>high</sup> CD4+ T-Zellen (rechts). X-Achse: CLA, Y-Achse: CD49d. B) CLA und 49d Expression von CCR6+ und CCR6- CD25<sup>high</sup> (oben) und CCR6+ und CCR6- CD25<sup>low</sup> CD4+ T-Zellen (unten). X-Achse: CLA, Y-Achse: CD49d. Die beiden antagonistischen CCR6+ Populationen sind mit „T<sub>REM</sub>“ und „T<sub>EM</sub>“ angedeutet. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

Funktionell kann eine unterschiedliche Adhäsionsmolekül-Expression über einen *in vitro* Adhäsions-Assay überprüft werden. Hierzu können Zellen mit dem entsprechenden Adhäsionsmolekül-Liganden inkubiert werden, um anschließend die Adhäsion der Zellen über die spezifische Adhäsionsmolekül-Ligand Wirkung auf Einzelzell-Basis zu bestimmen. Da die entgegengesetzte Adhäsionsmolekül-Expression sich auch funktionell in einer unterschiedlichen Adhäsion widerspiegeln sollte, wurden CD25<sup>high</sup> und CD25<sup>low</sup> T-Zellen im

Adhäsions-Assay verglichen (in Zusammenarbeit mit Dr. Giovanna Borsellino, IRCCS, Rom, siehe 2.2.14). Der VLA-4 Ligand ist VCAM-1, T<sub>EM</sub> sollten demnach signifikant besser an VCAM-1 binden als T<sub>REM</sub>. Alternativ wurde ebenfalls die Adhäsion an E-Selektin, den Liganden für CLA gemessen (zur Übersicht siehe (169)). Um einen Einfluss von Antikörpern auf die Adhäsion zu vermeiden, wurden die CD4+ T-Zellen jedoch nur anhand der CD25 und CD4 Expression über FACS Sortierung aufgereinigt.



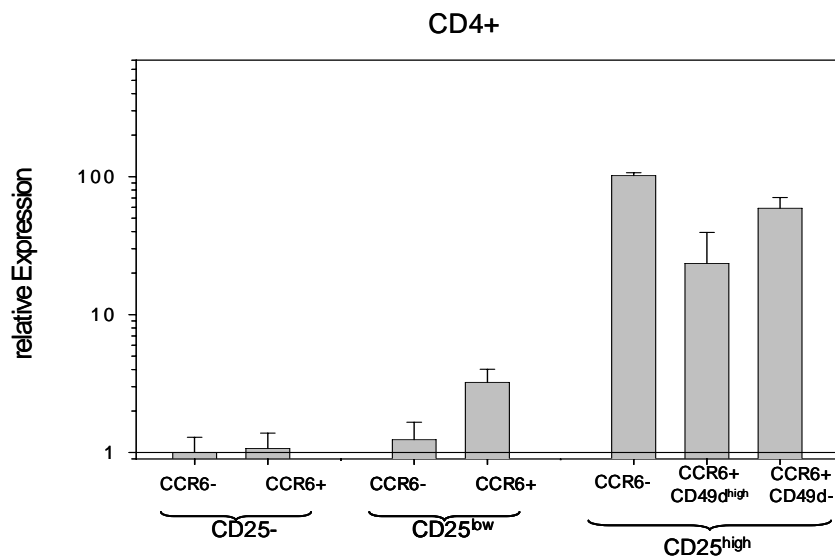
**Abbildung 39: Adhäsion von humanen CD4+ T-Zellen an VCAM-1 und E-Selektin.** Gezeigt ist ein repräsentativer *in vitro* Adhäsions-Assay für FACS sortierte CD25- (links), CD25<sup>low</sup> (Mitte) und CD25<sup>high</sup> CD4+ T-Zellen (rechts) aus humanen PBMC für VCAM-1 (dunkle Balken) und E-Selektin (helle Balken) von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. Gezeigt ist die Anzahl ausgezählter adhärenter Zellen.

Wie in Abbildung 39 deutlich zu erkennen ist, zeigen die CD25<sup>low</sup> Zellen wie erwartet die höchste Adhäsion an gebundenes VCAM-1. Im Gegensatz dazu zeigen CD25<sup>high</sup> Zellen nur eine geringe Adhäsion an VCAM-1. Genau umgekehrt verhält sich die Adhäsion der Zellen an E-Selektin. Hier binden die CD25<sup>high</sup> Zellen am effizientesten, während in beiden Fällen die CD25- Zellen nur eine geringe Adhäsion zeigen.

Die erhaltenen Ergebnisse des Adhäsions-Assay entsprechen somit den aufgrund der durchflusszytometrischen Analyse erwarteten Ergebnissen. Daher scheinen tatsächlich beide antagonistische T<sub>EM</sub> und T<sub>REM</sub> Populationen selektiv über die Adhäsionsmolekül-Expression gesteuert werden zu können.

### 3.3.3.4 CD49d und CCR6 definieren humane Treg mit der höchsten Foxp3 Expression

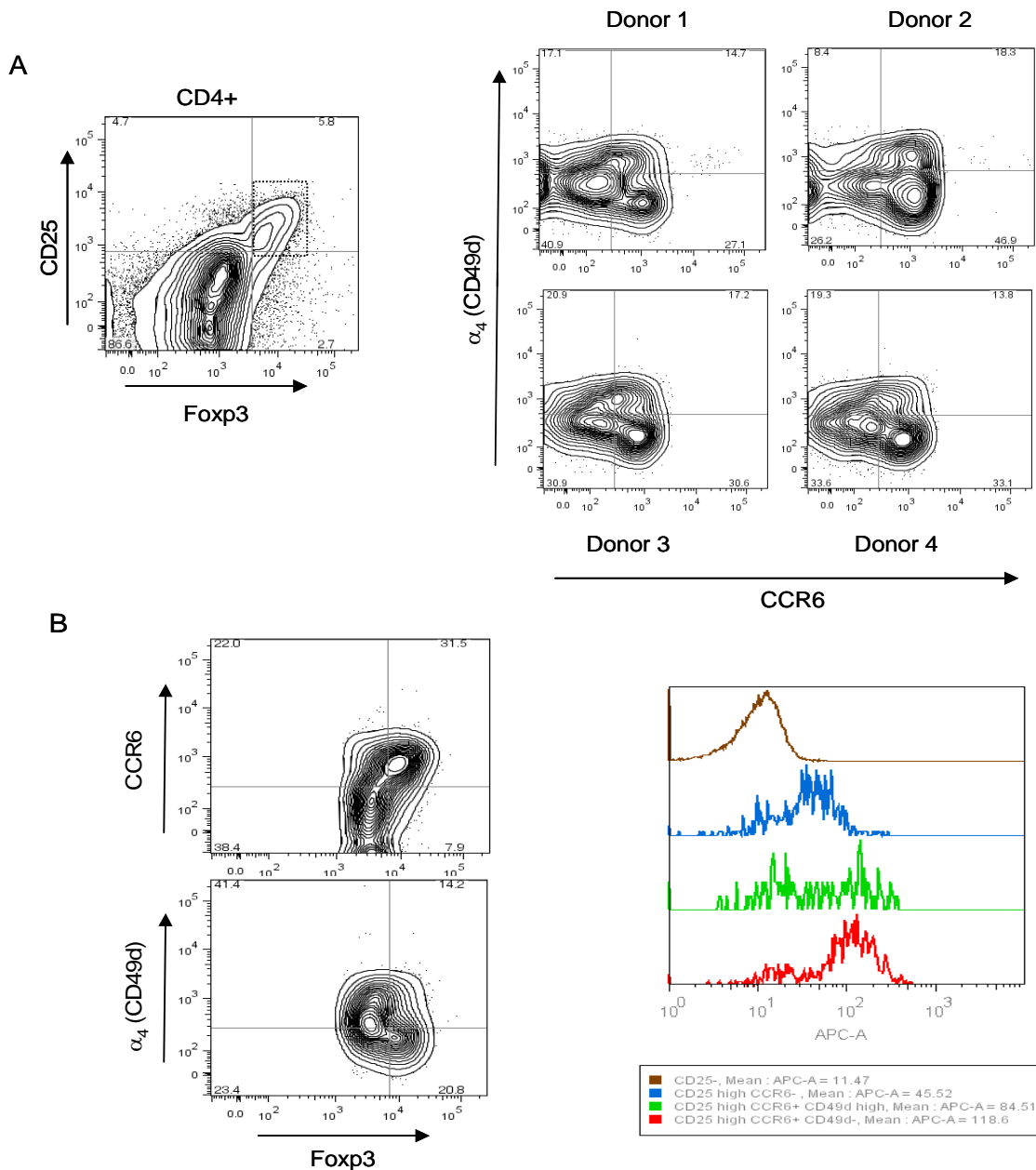
Ausgehend von den o.g. Beobachtungen, können durch die Kombination von CCR6 und CD49d Treg Zellen in zwei Hauptgruppen unterschieden werden: CCR6- CD49d<sup>low</sup> und CCR6+ CD49d- Zellen, wobei letztere regulatorische Effektor-Gedächtniszell ähnliche Treg (T<sub>REM</sub>) darstellen. Allerdings konnte aufgrund der FACS Analyse noch eine dritte kleinere Population identifiziert werden, welche ähnlich den CD25<sup>low</sup> CCR6+ T<sub>EM</sub> hohe Mengen an CD49d ausprägt (Abbildung 34). Um zu überprüfen, ob alle drei Populationen tatsächlich Treg Zellen darstellen, wurde die Foxp3 Expression über Realtime RT-PCR analysiert.



**Abbildung 40: Foxp3 Expression von humanen CD4+ T-Zellen.** Repräsentative Realtime RT-PCR Analyse für Foxp3 von FACS sortierten CD4+ T-Zellsubgruppen aus humanen PBMC in Abhängigkeit von CCR6 und CD25 (CD25- (links), CD25<sup>low</sup> (Mitte) und CD25<sup>high</sup> CD4+ T-Zellen (rechts)) von drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Gezeigt ist die relative Ausprägung von Foxp3 zur HPRT Expression, normalisiert auf die Genexpression von Foxp3 der CCR6- CD25- CD4+ T-Zell Population.

In Abbildung 40 ist deutlich zu erkennen, dass tatsächlich alle CD25<sup>high</sup> Subpopulationen im Gegensatz zu den CD25<sup>low</sup> und CD25- Zellen erhöhte Mengen an Foxp3 ausprägen. Allerdings ist die Foxp3 Expression in der CD49d<sup>high</sup> CCR6+ Population am geringsten. Durch die erst kürzlich kommerziell erhältlichen monoklonalen anti-Foxp3 Antikörper konnte auch die intrazelluläre Foxp3 Proteinexpression durchflusszytometrisch bestimmt werden. In Abbildung 41A (links) ist ein typisches Fluoreszenzprofil von Foxp3 gegen CD25 auf CD4+ T-Zellen aus humanen PBMC dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Foxp3 Expression ähnlich zur Maus mit einer hohen CD25 Expression korreliert (vgl. Abbildung 10C). Setzt man ein elektronisches Fenster, wie in Abbildung 41A (links) angedeutet, auf alle Foxp3+ CD25<sup>high</sup> Zellen, erhält man immer ein ähnliches Bild für die Expression von CD49d

im Vergleich zur CCR6 Expression (Abbildung 41A, rechts). Alle 4 untersuchten Donoren, zeigen drei unterschiedliche Populationen: Die zwei Hauptgruppen von CCR6- CD49d<sup>low</sup> und CCR6+ CD49d- Zellen und eine kleinere CCR6+ CD49d<sup>high</sup> Population, wobei geringe donorspezifische Schwankungen vorliegen können.



**Abbildung 41: Foxp3 Proteinexpression in Abhängigkeit von CCR6 und CD49d auf humanen CD4+ T-Zellen.** A) Repräsentatives Fluoreszenzprofil von PBMC eines gesunden Donors (links). X-Achse: Foxp3, Y-Achse: CD25. Rechts: Darstellung der Foxp3+ CD25+ Population, angedeutet durch das Fenster (links) bezüglich CD49d und CCR6 für 4 gesunde Donoren. X-Achse: CCR6, Y-Achse: CD49d. B) Darstellung der Foxp3+ CD25+ Population (links), angedeutet durch das Fenster in A) bezüglich CD49d (unten) und CCR6 (oben) in Abhängigkeit von Foxp3. X-Achse: Foxp3, Y-Achse: CCR6 oder CD49d. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. Rechts: Darstellung der Foxp3 Expression in Abhängigkeit von CD25, CCR6 und CD49d von CD25<sup>high</sup>-Zellen wie in Abbildung 34 (A, rechts) gezeigt. Rot: CD25<sup>high</sup> CCR6+ CD49d-, grün: CD25<sup>high</sup> CCR6+ CD49d<sup>high</sup>, blau: CD25<sup>high</sup> CCR6-, braun: CD25-. In der Legende ist die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (*Mean*) angezeigt.

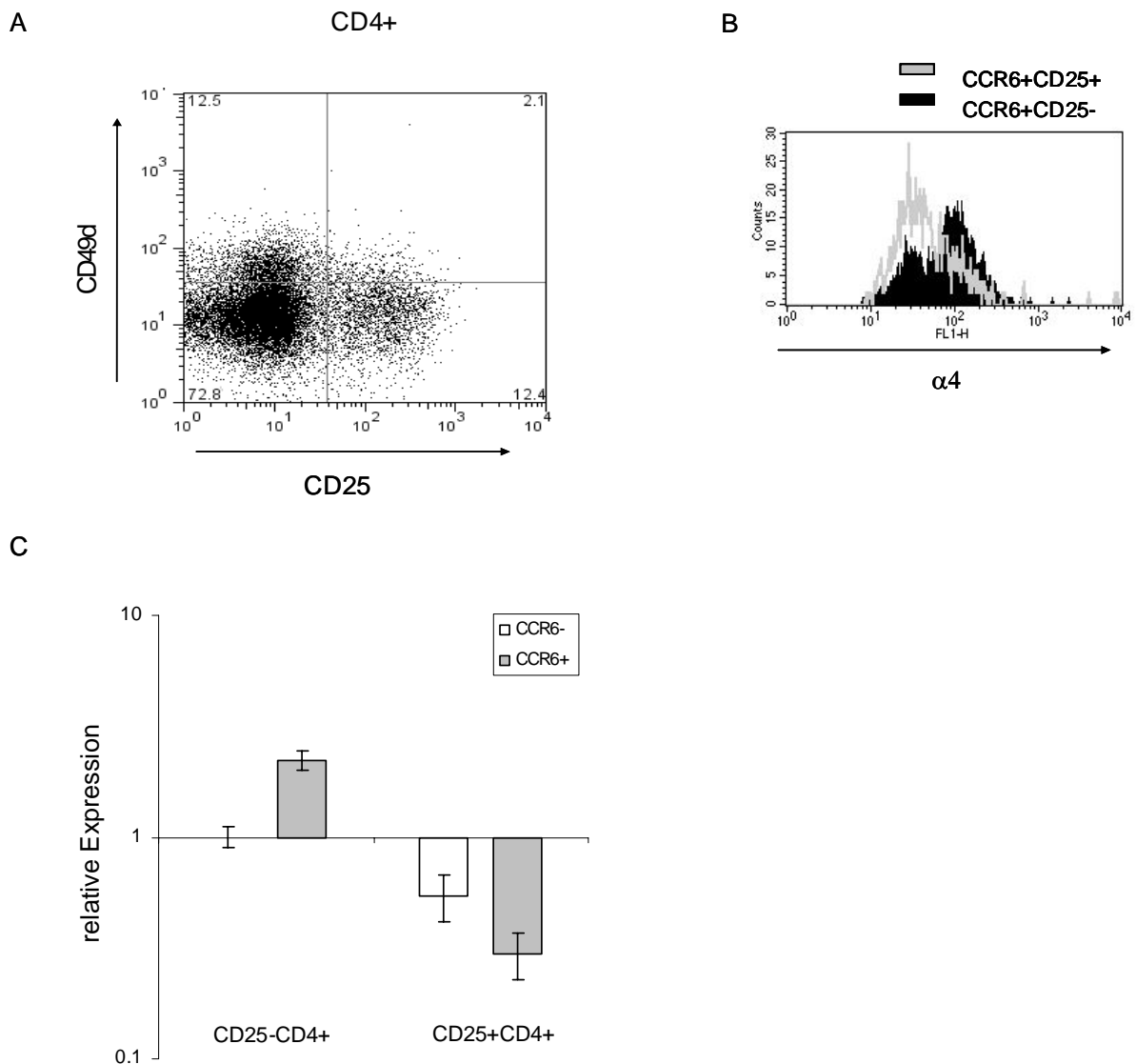
Analysiert man die Foxp3 Expression gegen CCR6 und CD49d auf Foxp3+ Zellen, kann man feststellen, dass die höchste Foxp3 Expression mit einer hohen CCR6 Expression und einer geringen CD49d Expression korreliert (Abbildung 41B, links). Im Einklang mit der RT-PCR Analyse (Abbildung 40) kann auch bei einer direkten FACS Analyse der drei Subpopulationen für die Foxp3 Expression die geringste Foxp3 Expression innerhalb der CCR6+ CD49<sup>high</sup> Population ausgemacht werden, wobei das Fluoreszenzprofil auf eine Mischpopulation von Foxp3+ und Foxp3- Zellen hindeutet (Abbildung 41B, rechts).

Diese Daten zeigen, dass die CCR6+ CD49d- T<sub>REM</sub> Zellen vermutlich das höchste regulatorische Potential besitzen, da Foxp3 auch im Menschen als Treg Schlüssel-Transkriptionsfaktor gilt (170). Erste Versuche mit diesen Zellpopulationen im *in vitro* Suppressions-Assay weisen tatsächlich darauf hin (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.4 CD49d und CCR6 Expression in der Maus

Aufgrund der o.g. Entdeckung im Menschen (siehe 3.3.3), dass CCR6+ T<sub>REM</sub> zusätzlich als CD49 negativ genauer definiert werden können, sollte dieses auch im murinen System überprüft werden. Zur Analyse der 49d Expression von murinen CD4+ T-Zellen wurden daher unterschiedliche Gewebe durchflusszytometrisch untersucht.

Abbildung 42A zeigt ein Fluoreszenzprofil von CD49d gegen CD25 auf murinen CD4+ T-Zellen aus der Milz. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich murine CD25+ und CD25- Zellen nicht wesentlich in ihrer CD49d Expression unterscheiden. Alle CD4+ T-Zellen exprimieren CD49d relativ gleichmäßig, nur eine kleine Population innerhalb der CD25- Zellen scheint höhere CD49d Mengen zu exprimieren. Eine detaillierte Analyse der antagonistischen CCR6+ CD25- T<sub>EM</sub> und CCR6+ CD25+ T<sub>REM</sub> Populationen ist in Abbildung 42B dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die CCR6+ CD25- T<sub>EM</sub> Population an CD49d<sup>high</sup> Zellen angereichert ist, wobei die T<sub>REM</sub> Zellen mehrheitlich eine geringere CD49d Expression zeigen, die sich jedoch in der Intensität nicht prägnant von der CD49d Expression der CCR6- CD25+ Treg und der CCR6- CD25- CD4+ T-Zellen unterscheidet (Daten nicht gezeigt). Vergleicht man die CD49d Expression im LN auf RNA Ebene, erscheint ein etwas deutlicheres Bild, welches der Situation im Menschen nahe kommt (vgl. Abbildung 34C). In Abbildung 42C ist eine Realtime RT-PCR Analyse von FACS sortierten murinen LN CD4+ T-Zellen mit CD49d spezifischen Oligonukleotiden gezeigt. Im Einklang mit der FACS Analyse (Abbildung 42B) zeigen auch hier die CCR6+ CD25- T<sub>EM</sub> Zellen die höchste CD49d Expression, wobei beide CD25+ Populationen, unabhängig von CCR6, nur geringfügig weniger an CD49d exprimieren als die CD25- CD4+ T-Zellen.



**Abbildung 42: CD49d Expression auf murinen CD4+ T-Zellen.** A) Fluoreszenzprofil von Milzzellen aus naiven BALB/c Mäusen. Gezeigt ist die CD49d Expression auf CD4+ T-Zellen. X-Achse: CD25, Y-Achse: CD49d. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters. B) Darstellung der CD49d Expression von CCR6+ CD25- (dunkle Fläche) und CCR6+ CD25+ (helle Fläche) CD4+ T-Zell Subpopulationen der Milz im Histogramm. C) Repräsentative Realtime RT-PCR Analyse für CD49d von FACS sortierten LN CD4+ T-Zell Subgruppen (CCR6+ CD25+, CCR6- CD25+, CCR6+ CD25- und CCR6- CD25- CD4+ T-Zellen) von drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Links: CD25-, rechts: CD25+, weiße Balken: CCR6-, graue Balken: CCR6+. Gezeigt ist die relative Expression zur HPRT Expression, normalisiert auf die CD49d Genexpression der CCR6- CD25- CD4+ T-Zell Population.

Die Daten zeigen, dass die Beobachtungen im Menschen daher nur bedingt auf die Maus übertragen werden können. Einzig die CCR6+ CD25- T<sub>EM</sub> Zellen erscheinen hier analog zum Menschen erhöhte Mengen an CD49d auszuprägen, während sich die Treg Populationen nicht wesentlich unterscheiden. Das relativ deutliche Bild konnte in der Maus auf mRNA-Ebene

allerdings nur mit CD4+ T-Zellen aus dem LN erhalten werden. Die Unterschiede in der Milz auf mRNA-Ebene waren noch geringer oder widersprachen sogar zum Teil der in LN Zellen observierten Tendenz (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde versucht, eine CLA Expression auf murinen CD4+ T Zellen nachzuweisen. Durchflusszytometrische Analysen ergaben jedoch, dass CLA praktisch nicht von murinen CD4+ T Zellen aus naiven Mäusen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Eine Übertragbarkeit der humanen Daten (siehe 3.3.3) auf das murine System erscheint daher zweifelhaft und kann nur über weitere Experimente aufgeklärt werden.



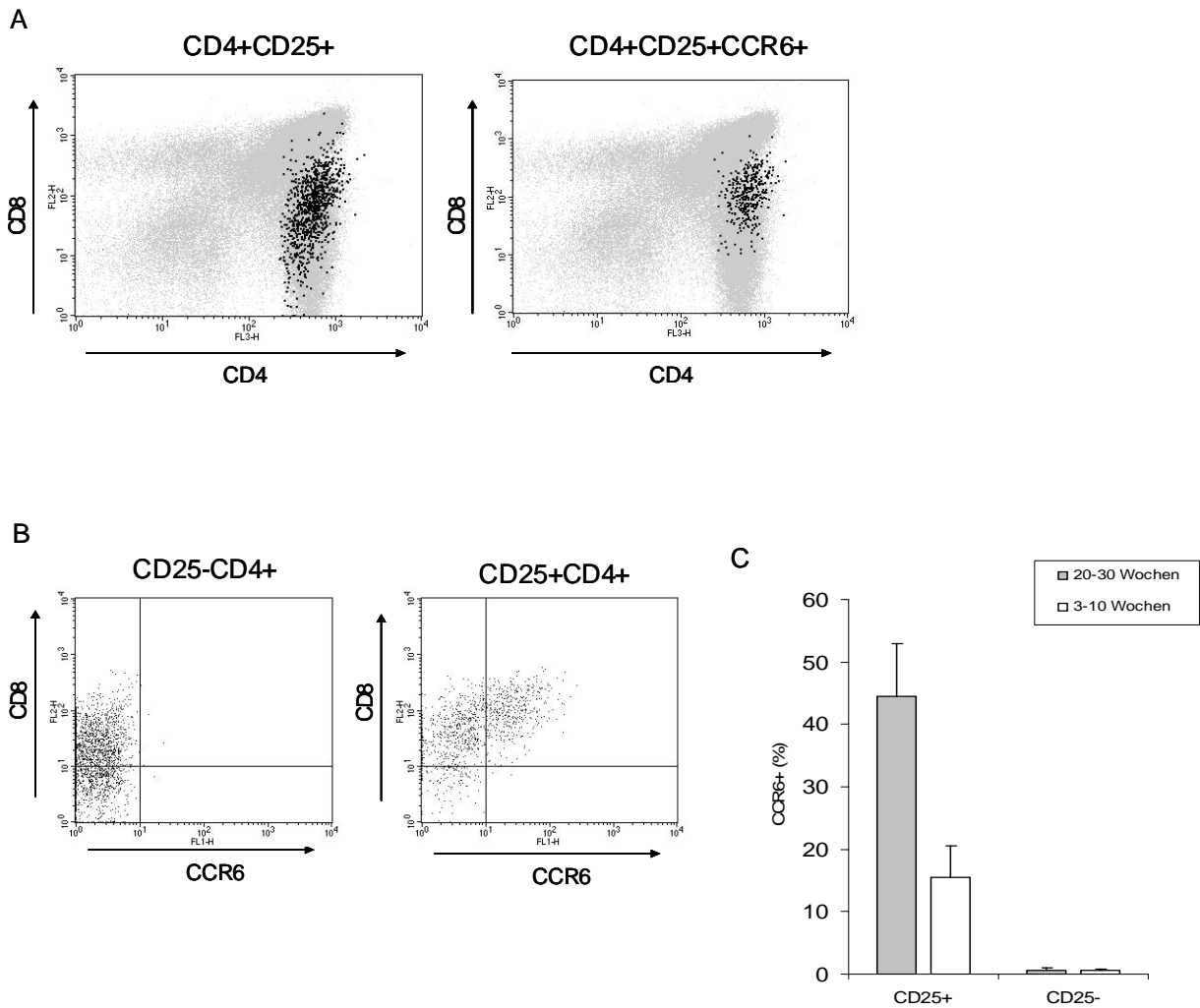
### **3.4 Der Einfluss von dem Chemokinrezeptor CCR6 während der Thymus gesteuerten Entwicklung von CD25+ Treg**

Offensichtlich existieren spezielle Prozesse, welche die Entwicklung von CD25+ regulatorischen T-Zellen im Thymus steuern (150, 171). Während in naiven Mäusen neben den Peyerschen Plaques (135) der Thymus das einzige lymphoide Organ ist, in dem ebenfalls eine CCL20 Expression nachgewiesen werden konnte (132), wurde untersucht, ob auch im Thymus CCR6 exprimierende Zellen detektiert werden können.

#### **3.4.1 CCR6 Expression auf murinen Thymozyten**

Es konnte tatsächlich eine CCR6+ Expression auf Teilen von murinen Thymozyten detektiert werden (Abbildung 43). CD25+ CD4+ Thymozyten konnten nur in der CD4 Linie, welche schon einen hohen Reifungsgrad besitzen (zur Übersicht siehe (15)), zum Beispiel den CD4+ CD8 intermediär exprimierenden oder CD4SP (einzelpositiv) Zellen gefunden werden (Abbildung 43A, links). Eine CCR6 Expression konnte im Thymus nur auf Zellen der CD4 Linie nachgewiesen werden, CD8SP Zellen zeigen keine CCR6 Expression (Daten nicht gezeigt). Erst eine Doppelfärbung mit anti-CD25 und anti-CCR6 deckt auf, dass CD25+ CCR6+ Thymozyten eine abgegrenzte Population formen, welche hauptsächlich aus CD4+ und CD8 intermediär exprimierenden Zellen besteht (Abbildung 43A, rechts).

Erstaunlicherweise zeigt sich eine CCR6 Expression praktisch nur auf CD25+ Thymozyten (Abbildung 43B). Das Fluoreszenzprofil von CD25- CD4+ Thymozyten (ohne die CD4+ CD8+ DP (doppelpositiv) Fraktion) zeigt fast keine CCR6+ Zellen, während innerhalb der CD25+ CD4+ Thymozyten über 30% der Zellen CCR6 exprimieren. Wie anhand von Abbildung 43B zu erkennen ist, scheint die Intensität der CD8 Ausprägung auf CD25+ CD4+ Thymozyten mit einem Verlust der CCR6 Expression zu sinken. Der Verlust der CD8 Expression drückt sich klar in der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) aus. CCR6+ CD25+ Zellen zeigen eine MFI von 122, während die CCR6- CD25+ Zellen nur eine MFI von 54 aufweisen. Die erhöhte CD8 Expression deutet möglicherweise darauf hin, dass die CCR6 Expression nur vorübergehend auf CD25+ Thymozyten, während eines bestimmten Reifungsschrittes, erscheint. Andererseits zeigt sich die CD8 Expression auf reifen CD25+ CD4+ Thymozyten generell leicht erhöht im Gegensatz zu reifen CD25- CD4+ Thymozyten (MFI: 29), welches im Einklang mit früheren Analysen steht (141, 150).



**Abbildung 43: Expression von CCR6 auf murinen Thymozyten.** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von murinen Thymozyten, *ex vivo* isoliert aus naiven BALB/c Mäusen. A) Fluoreszenzprofil CD8 gegen CD4. Links: CD25+ CD4+ T-Zellen (schwarze Punkte) im Vordergrund des CD8/CD4 Profils aller Thymozyten (graue Punkte). Rechts: CCR6+ CD25+ CD4+ T-Zellen (schwarze Punkte) im Vordergrund des CD8/CD4 Profils aller Thymozyten (graue Punkte). X-Achse: CD4, Y-Achse: CD8. B) Fluoreszenzprofil von CD25- CD4+ (links) und CD25+ CD4+ Thymozyten (rechts) im CD4 SP Fenster. X-Achse: CCR6, Y-Achse: CD8. C) Relativer Anteil (%) von CCR6+ Zellen an CD25+ (links) und CD25- Thymozyten (rechts) innerhalb der CD4SP Population (jeweils 9 unabhängig untersuchte Tiere pro Gruppe). Graue Balken: Tiere im Alter zwischen 20 und 30 Wochen, weiße Balken: Tiere im Alter zwischen 3 und 10 Wochen.

Interessanterweise konnten bei der Untersuchung von Mäusen verschiedenen Alters gravierende Unterschiede in der Größe der CCR6+ CD25+ Population festgestellt werden (Abbildung 43C). In relativ jungen Tieren, im Alter zwischen 3-10 Wochen, zeigen nur ca. 15% an CD25+ Thymozyten eine CCR6 Expression. Dagegen exprimieren CD25+ CD4+ Thymozyten aus alten Mäusen (20-30 Wochen) zu über 40% CCR6. Dieses Phänomen zeigte sich unabhängig vom getesteten Mausstamm, wobei der Anteil an CCR6+ Zellen nicht wesentlich über 50% bei getesteten Tieren in einem Alter bis zu 48 Wochen steigt (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.2 CCR6+ CD25+ Thymozyten sind Treg-Vorläuferzellen

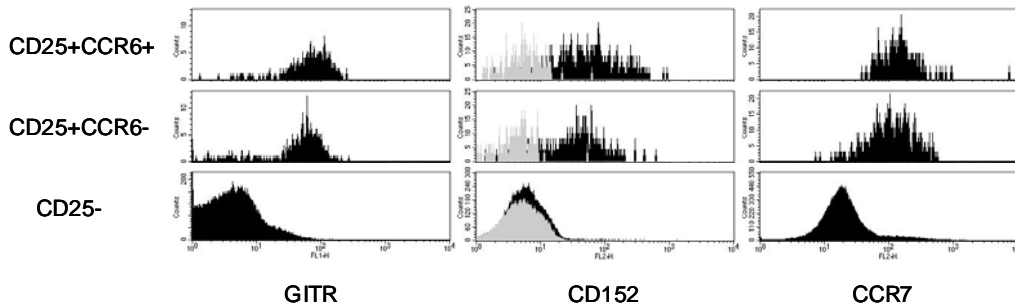
Die Beobachtung, dass CCR6 auf CD4SP Thymozyten fast gänzlich auf CD25+, möglicherweise Treg-Vorläuferzellen exprimiert wird (172), erscheint vor dem Hintergrund der abgegrenzten Expression hochinteressant (Abbildung 43). Es stellt sich daher die Frage, ob die CCR6 Expression eine bestimmte Entwicklungsstufe von CD25+ Treg-Vorläuferzellen oder sogar eine besondere Linie von Treg definiert und im Zusammenhang mit der peripheren CCR6 Expression steht (vgl. 3.2). Zur Klärung dieser Fragestellung wurden zunächst der Phänotyp und das regulatorische Potential dieser Zellpopulation im Vergleich zu CCR6-Treg-Vorläuferzellen bestimmt.

Regulatorische CD25+ Thymozyten zeichnen sich schon im Thymus durch eine hohe CTLA-4 und GITR Expression aus (47, 172). Weiterhin wurde in zahlreichen Publikationen gezeigt, dass diese Zellen bereits in der Lage sind, eine CD4+ T-Effektorzell-Proliferation zu inhibieren (zur Übersicht siehe (24)). Daher wurde die Expression von Treg assoziierten Proteinen auf CCR6+ und CCR6- Thymozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 44A zeigt die Expression von CTLA-4 und GITR auf CD25+ Treg-Vorläuferzellen im Vergleich zu allen CD4+ (CD4SP und CD4+ CD8+ DP) Thymozyten. Es ist deutlich zu erkennen, dass tatsächlich beide CD25+ Populationen eine vergleichbar hohe Expression von CTLA-4 als auch GITR zeigen, wobei die CD25- Population überwiegend negativ ist. Interessanterweise kann im Gegensatz zu reifen Treg Zellen in der Peripherie (vgl. Abbildung 7), auf CD25+ CD4+ Thymozyten eine klare Segregation von CD103 mit der CCR6 Expression festgestellt werden. Nahezu alle CD103+ CD25+ Thymozyten zeigen eine CCR6 Ausprägung (Abbildung 44B).

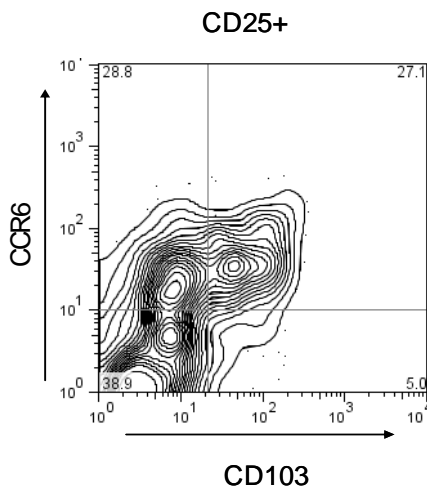
Die CCR7 Expression der Zellen deutet an, dass die CD25+ Thymozyten schon beide, unabhängig von der CCR6 Expression, einen hohen Reifungsgrad besitzen. Eine CCR7 Expression wird auf reifen CD4SP Thymozyten induziert und vermittelt u.a. deren Emigration in die Peripherie (zur Übersicht siehe (173, 174)). Die CCR7 Expression dokumentiert weiterhin eindeutig, dass tatsächlich Thymozyten und keine kontaminierenden Treg Zellen aus der Peripherie analysiert wurden, da diese nur eine geringe CCR7 Expression zeigen (vgl. Abbildung 11), welches im Einklang mit der vornehmlich intermediären CD8 Expression dieser Zellen steht (vgl. Abbildung 43). Der Phänotyp der CCR6+ CD25+ Thymozyten deutet daher eindeutig darauf hin, dass es sich bei dieser Population tatsächlich um Treg-Vorläuferzellen handelt. In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass CD25+ Thymozyten bereits in der Lage sind, eine Effektor T-Zell Proliferation *in vitro* zu inhibieren

und hohe Mengen an Foxp3, dem CD25+ Treg Schlüssel-Transkriptionsfaktor, ausprägen (45, 172).

A



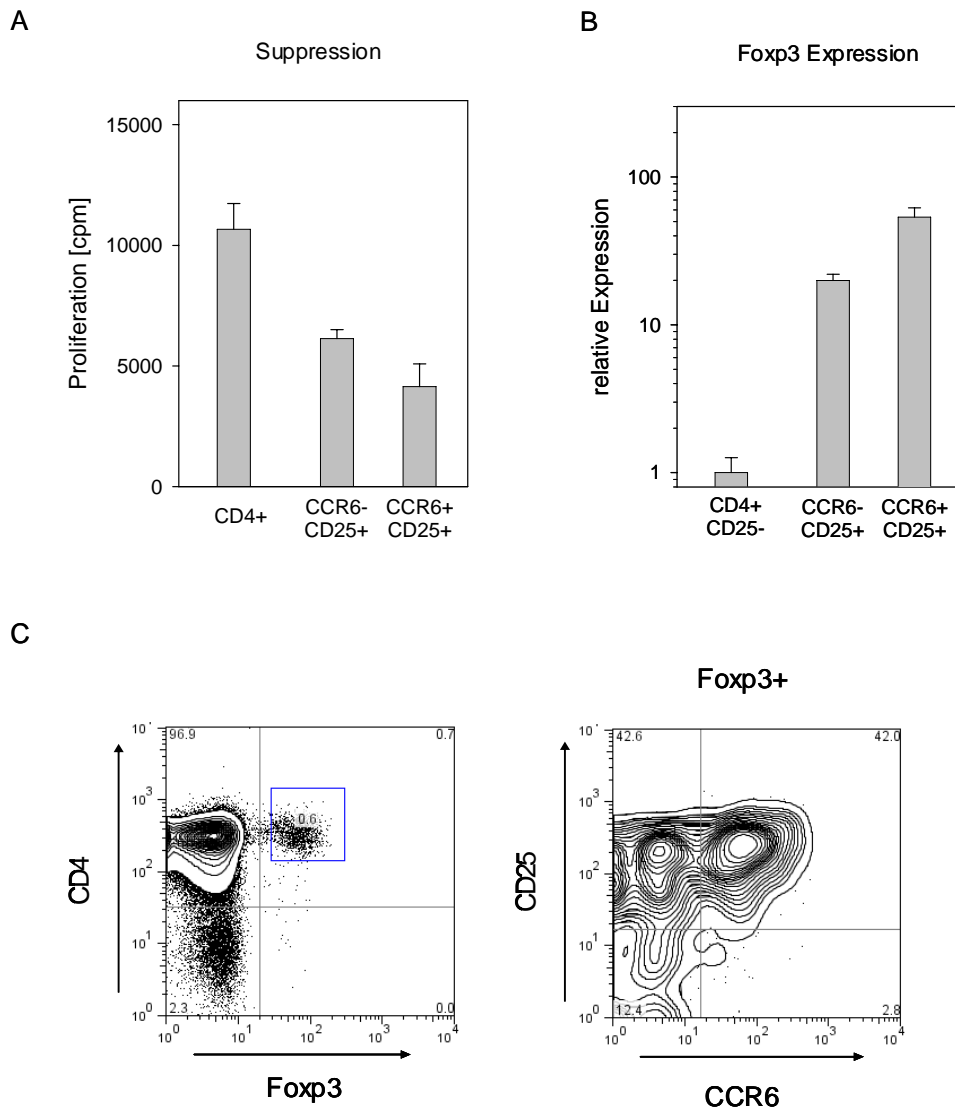
B



**Abbildung 44: Expression von Treg Markern auf CD25+ CD4+ murinen Thymozyten.** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von murinen Thymozyten, *ex vivo* isoliert aus naiven BALB/c Mäusen. A) Gezeigt ist das Fluoreszenzprofil von CCR6+ CD25+ CD4+ (obere Reihe), CCR6- CD25+ CD4+ (mittlere Reihe) und CD25- CD4+ Thymozyten (untere Reihe) für GITR (links), CD152 (Mitte) und CCR7 (rechts), dargestellt als Histogramm. Für CD152 ist die Isotyp-Kontrolle gezeigt (graue Fläche). Die CD25- CD4+ Thymozyten enthalten die CD4+ CD8+ DP Fraktion. B) CCR6 und CD103 Expression auf CD25+ CD4SP Thymozyten, dargestellt als Kontur-Diagramm. X-Achse: CD103, Y-Achse: CCR6. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

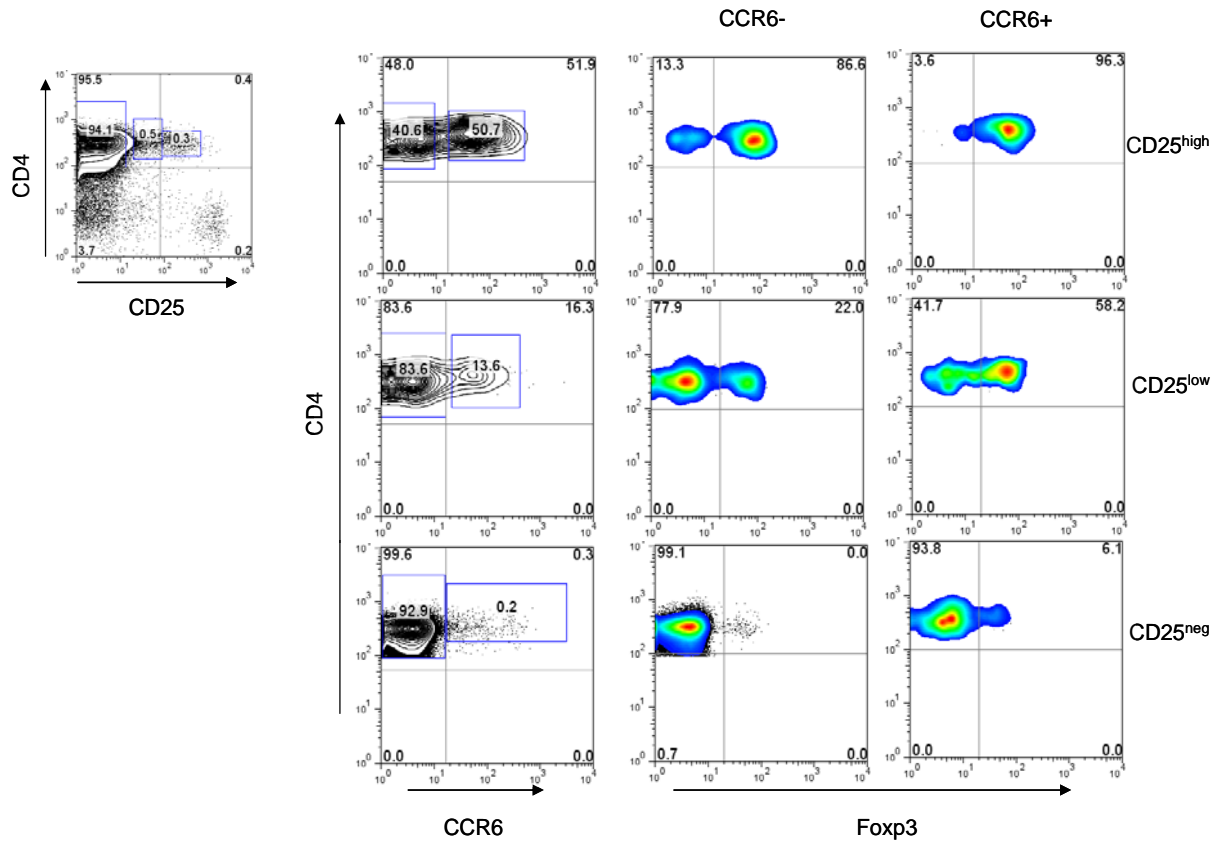
Um zu überprüfen, ob die CCR6+ CD25+ Thymozyten bereits in der Lage sind, eine Effektor T-Zell Proliferation zu inhibieren, wurde ein Suppressions-Assay durchgeführt (Abbildung 45A). Beide CD25+ Thymozyten Populationen zeigen eine deutliche Effektor T-Zell Inhibition, wobei die Suppression der CCR6+ CD25+ Population effizienter ist. Die bessere Inhibition spiegelt sich auch in einer erhöhten Foxp3 Expression wieder. Abbildung 45B zeigt die Foxp3 Expression auf den beiden CD25+ Thymozyten Populationen im Vergleich zur CD25- CD4+ Expression. Während die CCR6- CD25+ Zellen ca. 20 mal mehr Foxp3

exprimieren als die CD25- Thymozyten, zeigt die CCR6+ CD25+ Population eine über 50-fach erhöhte Foxp3 Expression.



**Abbildung 45: Funktionalität und Foxp3 Expression von CD25+ CD4+ Thymozyten.** A) Suppressive Kapazität von *ex vivo* isolierten CD25+ Thymozyten aus naiven BALB/c Mäusen. FACS sortierte CCR6- CD25+ (Mitte) und CCR6+ CD25+ Thymozyten (rechts) wurden im Standard *in vitro* Suppressions-Assay eingesetzt, um die CD25- CD4+ (links) Milzzell-Proliferation im Verhältnis 1:1 zu inhibieren. Gezeigt ist ein Experiment von zwei Versuchen mit FACS sortierten Zellen aus 8-10 Tieren. B) Repräsentative Realtime RT-PCR von FACS sortierten CD25- CD4+ (links), CCR6- CD25+ CD4+ (Mitte) und CCR6+ CD25+ CD4+ Thymozyten (rechts), *ex vivo* isoliert aus naiven BALB/c Mäusen, für Foxp3. Gezeigt ist die relative Foxp3 Expression zur HPRT Expression, normalisiert auf die Foxp3 Genexpression von CD25- CD4+ Thymozyten. Gezeigt ist ein Experiment von zwei Versuchen mit FACS sortierten Zellen aus 8-10 Tieren. C) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von murinen Thymozyten. Gezeigt ist das Fluoreszenzprofil von CD4 gegen Foxp3 (links). X-Achse: Foxp3, Y-Achse: CD4. Rechts: Fluoreszenzprofil innerhalb der Foxp3+ Population, angedeutet durch das Fenster (links). X-Achse: CCR6, Y-Achse: CD25. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

In Abbildung 45C ist die Foxp3 Proteinexpression von murinen Thymozyten gezeigt. Die klar abgegrenzte Foxp3+ Population macht nur ca. 1% der gesamten Zellen im Thymus aus und ist praktisch nur auf CD4+ Zellen zu finden (Abbildung 45C, links).



**Abbildung 46: Foxp3 Expression von CD4+ Thymozyten in Abhängigkeit von CCR6 und CD25.** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von murinen Thymozyten, *ex vivo* isoliert aus naiven BALB/c Mäusen. Links: Gezeigt ist das Fluoreszenzprofil von CD25 gegen CD4 eines Thymus aus einer naiven BALB/c Maus, dargestellt als Kontur-Diagramm. Die 3 blauen Fenster zeigen die 3 Populationen CD25<sup>high</sup>, CD25<sup>low</sup> und CD25<sup>neg</sup> CD4+ Thymozyten. Rechts: Analyse der CCR6 (links, dargestellt als Kontur-Diagramm) und Foxp3 (Mitte und rechts, dargestellt als Farbintensitäts-Diagramm) Expression innerhalb der 3 elektronischen Fenster CD25<sup>high</sup> (obere Zeile), CD25<sup>low</sup> (mittlere Zeile) und CD25<sup>neg</sup> CD4+ (untere Zeile) für CCR6- (mittlere Spalte) und CCR6+ (rechte Spalte) Thymozyten, angedeutet durch die 2 Fenster der linken Spalte. X-Achse: CCR6 oder Foxp3, Y-Achse: CD4. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen Anteil (%) innerhalb des Quadrantenfensters.

Analysiert man die Foxp3+ Population auf CD25 und CCR6 kann man erkennen, dass über 80% der Zellen CD25 positiv sind. Weiterhin ist festzustellen, dass über 40% der Zellen CCR6 exprimieren, welche zu über 90% eine CD25 Ausprägung zeigen (Abbildung 45C, rechts). Analysiert man die Foxp3 Expression im Detail, verglichen zur CD25 und CCR6 Oberflächenexpression, kann man interessante Beobachtungen machen (Abbildung 46). Anhand einer differentiellen Untersuchung von CD4+ Thymozyten aufgrund der CD25 Expression (angedeutet über die Fenster im Fluoreszenzprofil CD25 gegen CD4, links) kann man erkennen, dass die CCR6 Expression eindeutig von der CD25 Expression abhängig ist.

Der Anteil an CCR6+ steigt stetig von nur 0,4% in den CD25- Thymozyten auf über 50% in den CD25<sup>high</sup> Zellen an (Abbildung 46, linke Spalte). Vergleicht man anschließend die Foxp3 Expression auf diesen Populationen in einer Abhängigkeit von CCR6, kann man feststellen, dass offensichtlich die CCR6 Expression neben CD25 auch mit Foxp3 segregiert (Abbildung 46, mittlere und rechte Spalte). Während unter CCR6- CD25<sup>high</sup> Zellen noch ein hoher Anteil an Foxp3 negativen Zellen observiert werden kann (ca. 15%), zeigen die CCR6+ CD25<sup>high</sup> Thymozyten eine Foxp3 Expression von nahezu 100%. Dieser Trend lässt sich auch in den CD25<sup>low</sup> und wenigen CD25 negativen Zellen beobachten. Die CCR6 Expression auf Thymozyten definiert daher CD25+ Treg-Vorläuferzellen mit der höchsten Foxp3 Ausprägung, wobei ein signifikanter Anteil an CCR6- CD25+ Thymozyten nicht aus Foxp3+ Treg-Vorläuferzellen besteht. Diese Beobachtung erklärt offensichtlich auch die unterschiedliche Effizienz im Suppressions-Assay und die beobachteten großen Differenzen bei der Foxp3 Expression auf mRNA Ebene (vgl. Abbildung 45).

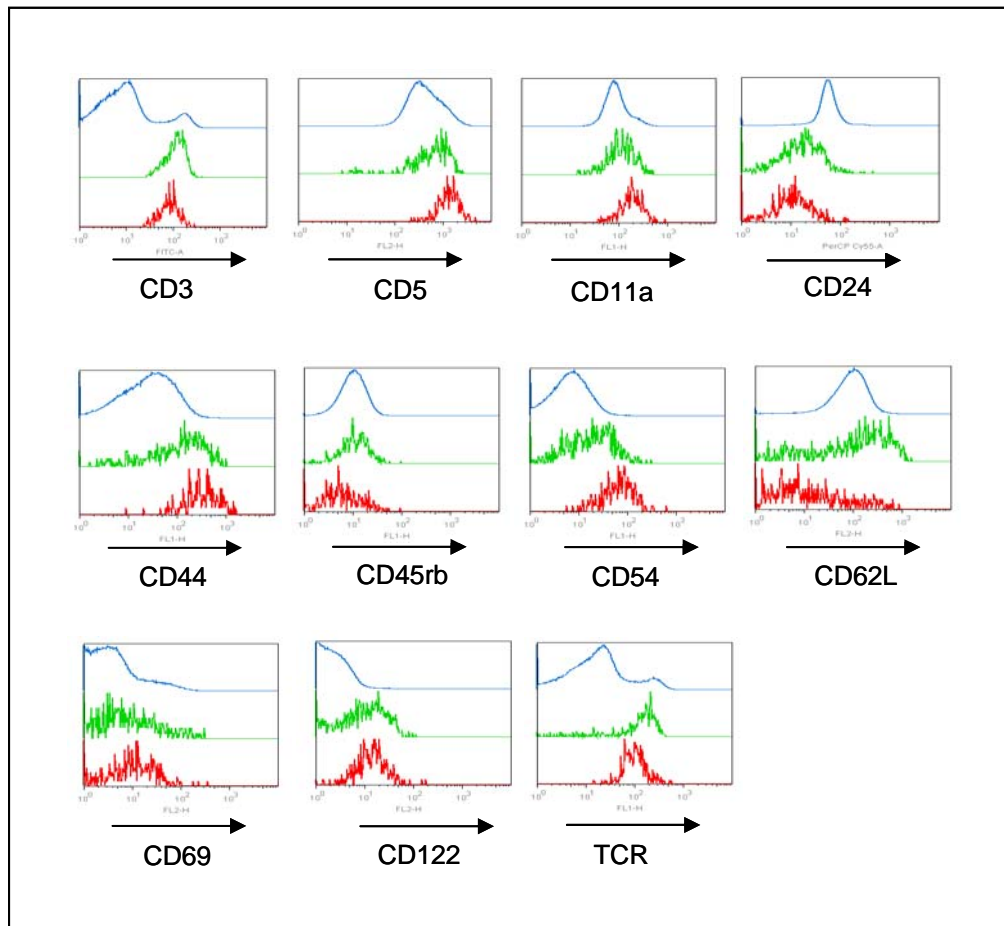
### 3.4.3 Phänotyp von CCR6+ CD25+ Thymozyten

Die o.g. Beobachtungen zeigen eindeutig, dass CCR6+ CD25+ Thymozyten Treg-Vorläuferzellen sind und deutet möglicherweise auf eine Rolle für CCR6 bei der Maturierung von CD25+ Treg im Thymus hin.

Um weitere Unterschiede zwischen beiden CD25+ Populationen im Thymus zu detektieren, wurde eine umfangreiche phänotypische Analyse für zahlreiche weitere Oberflächenmarker durchgeführt (Abbildung 47). Gezeigt ist die Expression von CD3, CD5, CD11a, CD24, CD44, CD45RB, CD54, CD62L, CD69, CD122 und TCR für die beiden CD25+ CD4+ Subpopulationen, im Vergleich zu den CD25- CD4+ Thymozyten. Außer für die CD122 Expression, welche vergleichbar erhöht auf beiden CD25+ Populationen zu finden ist, zeigen die CCR6+ CD25+ Thymozyten einen typischen aktivierten Phänotyp, der sich in einer differentiellen Ausprägung aller anderen analysierten Oberflächenmarker ausdrückt. CCR6+ CD25+ Treg-Vorläuferzellen prägen im Vergleich zu den CCR6- CD25+ Zellen erhöhte Mengen von CD5, CD11a, CD44, CD54 und CD69 aus. Weiterhin zeigen die CCR6+ Zellen eine verminderte CD3, CD45RB und TCR $\alpha\beta$  Expression.

Der vollständige  $\alpha\beta$ -TCR wird erst nach der erfolgreichen Umlagerung von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Ketten an der Oberfläche ausgeprägt. Ähnlich verhält sich die Expression von CD3. Die TCR und CD3 negativen Zellen innerhalb der CD25- Thymozyten Population machen daher den Grossteil der CD4+ CD8+ unreifen DP Zellen im Thymus aus. Besonders deutlich unterscheidet sich die CD24 und CD62L (L-Selektin) Expression innerhalb der beiden

CD25+ Thymozyten Populationen. Zeigen die CD25+ CCR6- Zellen fast einheitlich eine hohe CD62L Expression, vergleichbar mit dem Gros der CD25- Zellen, sind die CCR6+ Thymozyten überwiegend negativ für L-Selektin.



**Abbildung 47: Phänotyp von CD25+ CD4+ Thymozyten in Abhängigkeit von CCR6.** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von *ex vivo* isolierten murinen Thymozyten aus naiven BALB/c Mäusen, dargestellt als Histogramm. Gezeigt ist die Expression von CD3, CD5, CD11a, CD24, CD44, CD45RB, CD54, CD62L, CD69, CD122 und TCR auf CD25-CD4+ Thymozyten (einschließlich der CD8/CD4 DP Population, blau), CD25+ CCR6- CD4SP Thymozyten (grün) und CD25+ CCR6+ CD4SP Thymozyten (rot).

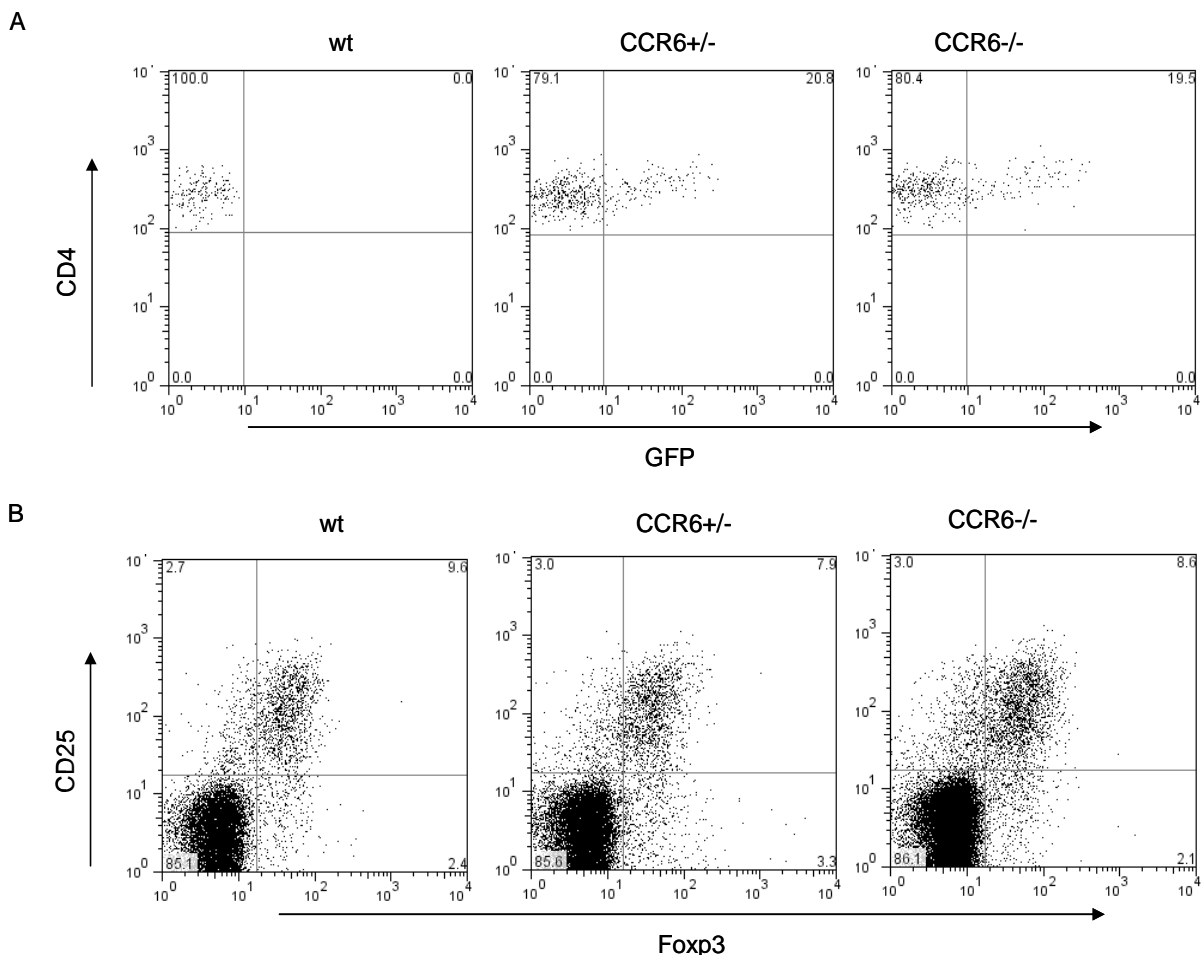
Ähnlich, jedoch nicht ganz so deutlich, verhält sich die Expression von CD24. Die CCR6+ Population hat die CD24 Expression überwiegend verloren, während die CCR6- Population leicht erhöhte Mengen an CD24 ausprägen, wohingegen der Großteil der CD25- Thymozyten eine hohe CD24 Expression zeigt. Insgesamt scheinen daher die CCR6+ CD25+ Treg-Vorläuferzellen eine besonders aktivierte Population mit einem relativ hohen Reifungsgrad im Thymus zu sein. Ähnlich dem erhaltenen Bild in der Peripherie (vgl. Abbildung 11) scheint auch hier die CCR6 Expression indikativ für einen aktivierten Status zu sein, welcher im Thymus möglicherweise tatsächlich mit dem Reifungsgrad und der Selektion von Treg-



Vorläuferzellen im Zusammenhang steht (150). Ausgehend von der CD3, CD24, CD62L und TCR Expression kann sogar vermutet werden, dass die CCR6 Expression Treg-Vorläuferzellen mit einem unterschiedlichen Reifungsgrad im Vergleich zu CCR6- CD25+ Thymozyten charakterisiert (zur Übersicht siehe (174)).

### 3.4.4 CCR6 defiziente Mäuse haben keine offensichtlichen Störungen während der Treg Zell Entwicklung

Die o.g. Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Chemokinrezeptor CCR6 auch eine besondere Rolle während der Maturierung von CD25+ Treg-Vorläuferzellen im Thymus spielt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Treg Zell Entwicklung in CCR6 gendefizienten Mäusen untersucht.



**Abbildung 48: CCR6 gendefiziente Mäuse zeigen keine auffälligen Veränderungen bei der CD25+ Treg Zell Entwicklung.** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von *ex vivo* isolierten Thymozyten und LN Zellen aus naiven C57BL/6 (wt, linke Spalte), CCR6 EGFP-KI<sup>+/-</sup> (CCR6<sup>+/-</sup>, mittlere Spalte) und CCR6 EGFP-KI<sup>-/-</sup> (CCR6<sup>-/-</sup>, rechte Spalte) Mäusen. A) Gezeigt ist das Fluoreszenzprofil von CD25+ CD4 SP Thymozyten (obere Reihe) für CD4 gegen GFP. X-Achse: GFP, Y-Achse: CD4. B) Fluoreszenzprofil von CD4+ LN-Zellen für CD25 gegen Foxp3. X-Achse: Foxp3, Y-Achse: CD25. Die Zahlen in den Quadranten bezeichnen den relativen (%) Anteil innerhalb des Quadrantenfensters.

Die Analyse von CD25+ Treg-Vorläuferzellen im Thymus und von reifen Treg in der Peripherie sollte im Falle von einer bedeutenden Funktion von dem Chemokinrezeptor CCR6 für die Treg Zellreifung im Thymus möglicherweise bereits über Verschiebungen in der Treg Anzahl in der Peripherie oder im Thymus sichtbar werden. Die Analyse von Thymozyten und LN Zellen aus homozygoten CCR6 EGFP-KI Mäusen (111) liefert im Vergleich zu heterozygoten CCR6 EGFP-KI Mäusen oder wt C57BL/6 jedoch keinen Hinweis darauf (Abbildung 48). Untersucht man die relativen CD25+ Zellzahlen im Thymus oder in der Peripherie (Milz und LN) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen CCR6<sup>-/-</sup> und wt Tieren beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung spiegelt sich auch im Phänotyp der Treg Zellen wider. So zeigen periphere CD4+ Zellen aus homozygoten CCR6 EGFP-KI Mäusen keine offensichtlichen Veränderungen in der Foxp3 Expression zu wt Mäusen (Abbildung 48B und vgl. Abbildung 29B). Bei der Analyse von CD25+ Thymozyten konnte ebenfalls kein wesentlicher Unterschied ausgemacht werden. Sogar die GFP Expression von CD25+ Thymozyten, (indikativ für eine Aktivität des CCR6 Genlokus, siehe 3.2.8) zeigte sich in hetero- oder homozygoten CCR6 EGFP-KI Mäusen gleich bleibend (Abbildung 48A). Weiterhin scheint auch die Ausprägung von CCR6 assoziierten Markern im Thymus, wie zum Beispiel CD103 (Abbildung 44) unabhängig von der CCR6 Expression zu sein (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von diesen Beobachtungen scheint es unwahrscheinlich, dass die CCR6 Expression auf CD25+ Thymozyten eine entscheidende Rolle bei der Reifung von CD25+ Treg-Vorläuferzellen im Thymus spielt. Der Phänotyp von CCR6<sup>-/-</sup> Mäusen deutet auf keine wesentliche Beeinflussung von Treg Zellzahlen in der Peripherie oder eine verminderte Treg Reifung im Thymus hin. Um die genaue Bedeutung der CCR6 Expression auf CD25+ Thymozyten zu erklären, bedarf es daher weiterer Experimente. Offensichtlich kann die Expression von CCR6 jedoch als wichtiger Marker von CD25+ Treg-Vorläuferzellen herangezogen werden und ermöglicht zusammen mit CD25 die Identifizierung von funktionellen Foxp3+ Treg-Vorläuferzellen (vgl. Abbildung 46).