

4. Diskussion

Die im Abschnitt 3 gezeigten Ergebnisse dieser Arbeit werden im folgendem Kapitel noch einmal im Detail diskutiert. Im Zentrum stehen hier die Einordnung der Daten in den aktuellen Stand der CD25+ Treg Forschung und die zukünftigen Möglichkeiten, die sich aus den gewonnenen Ergebnissen dieser Arbeit ergeben können.

Aufgrund des vermutlich großen Potentials von regulatorischen T-Zellen für zukünftige klinische Anwendungen, die auf eine Kontrolle des Immunsystems abzielen, wie zum Beispiel für Therapien gegen Autoimmunkrankheiten oder Krebs, ist seit der „Wiederentdeckung“ von Treg (siehe Abschnitt 1) dieses Feld eines der am intensivsten erforschten Bereiche der Immunologie. Trotz der Menge an Daten bleiben aber bisher immer noch zentrale Gesichtspunkte der Treg Biologie unverstanden. So konnte bisher noch kein eindeutiger Mechanismus bezüglich der Suppression identifiziert werden. Weiterhin sind die gravierenden Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Verhalten dieser Zellen weitestgehend unverstanden. Auch der Bezug zwischen natürlichen, im Thymus gereiften und induzierten CD25+ Treg, konnte bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden. Ein weiteres Manko ist die z.T. fehlende Integration der im Mausmodell gefundenen Ergebnisse auf den Menschen, da viele Gruppen ausschließlich im Tiermodell oder nur mit humanen Zellen arbeiten. Dieser Aspekt wird häufig ignoriert, obwohl es sich gezeigt hat, dass doch gravierende Unterschiede zwischen beiden Spezies bestehen, so dass nicht alle in der Maus gefundenen Daten direkte Rückschlüsse auf Treg Zellen im Menschen zulassen. Ein Großteil der Studien basiert weiterhin auf der Annahme, dass CD25+ Treg phänotypisch und funktionell eine homogene Population darstellen, welches aufgrund dieser und weniger anderer Studien jedoch widerlegt werden kann.

So bleiben zahlreiche Fragen bezüglich CD25+ Treg weitestgehend ungeklärt und eine Übertragbarkeit auf das humane System scheint aufgrund fehlender integrativer Forschung bei vielen Fragestellungen zweifelhaft.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die grundsätzlich als CD25+ Treg klassifizierte Population tatsächlich eine Mischung aus verschiedenen Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften darstellt und somit eine ähnlich heterogene Zellpopulation bezeichnet, wie sie auch unter CD25- CD4+ Effektorzellen gefunden werden kann. Allerdings

haben diese Subpopulationen vermutlich den gleichen Ursprung in der naiven, im Thymus gereiften CD25+ CD4+ regulatorischen T-Zelle. Diese Erkenntnis scheint übertragbar auf den Menschen zu sein und mag somit unter anderem eine Erklärung für zahlreiche widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Eigenschaften und Funktionen von Treg aus verschiedenen Studien liefern.

4.1 Expressionsprofil von CD25+CD4+ regulatorischen T-Zellen

Obwohl die Methode der Genexpressionsanalyse zahlreiche Unterschiede bezüglich des Transkriptoms aufdecken kann, hat auch diese Technik ihre Grenzen. Die Validierung der gefundenen deregulierten Gene konnte zeigen, dass nicht alle Unterschiede sich auch in der Proteinexpression widerspiegeln (3.1). Beispielsweise können posttranslationale Modifikationen nicht mit dieser Methode erfasst werden. Ein weiterer Nachteil ist die Sensitivität. So können viele deregulierte Gene im unteren Expressionsbereich nicht eindeutig detektiert werden. Ein prominentes Beispiel ist hier zum Beispiel die Expression von CD25, welches trotz der nachweislich hohen Proteinexpression nur relativ schwach auf mRNA Ebene ausgeprägt wird und somit an der Grenze des statistisch signifikanten Bereiches fällt (siehe 3.1).

Da kurz nach dem Zeitpunkt der Analyse Arbeiten erschienen sind, in der ebenfalls über Genexpressionsanalysen Treg und Teff Zellpopulationen (jedoch anderen Ursprungs) gegenübergestellt wurden, konnten die erhaltenen Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse mit ähnlichen Arbeiten verglichen werden (46, 122). Das Gros der in dieser Analyse detektierten deregulierten Gene stand mit den erwähnten Analysen im Einklang. Ausgehend von diesen und nachfolgenden Arbeiten, kann daher die Genexpression von CD25+ Treg Zellen mittlerweile relativ gut beurteilt werden. Bei der generellen Betrachtung der Ergebnisse ist auffällig, dass der Grossteil der deregulierten Gene in CD25+ Zellen höher exprimiert ist. Nur knapp 30% der deregulierten Gene scheint im Vergleich zu CD25- T-Zellen geringer exprimiert. Die Tatsache, dass das Expressionsprofil von CD25+ Treg große Ähnlichkeiten zu dem Expressionsprofil von aktivierten T-Zellen aufweist (121, 141) deutet darauf hin, dass nur wenige Gene tatsächlich spezifisch für Treg Zellen zu sein scheinen. Offensichtlich wird dieser „chronisch“ aktivierte Status nur von wenigen Genen kontrolliert. Hier scheint die Expression von Foxp3 eine Schlüsselrolle einzunehmen (zur Übersicht siehe

(42)). Die Charakterisierung von Foxp3⁺ Treg im Vergleich zu CD25⁺ Foxp3⁻ T-Zellen ermöglichte eine differenziertere Beurteilung des Treg spezifischen Transkriptoms (141). Allerdings konnte auch diese Studie bislang noch keine eindeutigen Zusammenhänge der Foxp3 Regulation erfassen. Insbesondere die Regelwerke, welche die Expression von Foxp3 kontrollieren, bleiben weiterhin unverstanden. Aufgrund der Heterogenität von Treg mögen hier allerdings zukünftig Ansätze, welche das Transkriptom von Treg Subpopulationen im aktivierten oder ruhenden Status vergleichen, weitere Aufschlüsse liefern. Erste Ergebnisse von experimentell ähnlichen Ansätzen wurden kürzlich veröffentlicht (70, 155).

Neben dem Transkriptionsfaktor Foxp3 konnte aber inzwischen auch für Gene, die in diesem Experiment identifiziert wurden (siehe 3.1) eine funktionelle Bedeutung für Treg Zellen nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind GITR, CD103, OX-40, GranzymB und Neuropilin-1 (zur Übersicht siehe (24)). Interessante, allerdings bisher uncharaktisierte Kandidaten scheinen neben dem Chemokinrezeptor CCR6 auch zum Beispiel Galectin-1 und Galectin-3, CD39 oder Tsk zu sein (siehe Tabelle 8).

Die Überexpression von Galectin-1 und -3 auf Treg ist insbesondere interessant, da Galectine Zucker bindende Lectine mit immunregulatorischen Potential sind und eine Rolle in Autoimmunerkrankungen und in der Tumorummunologie einzunehmen scheinen (zur Übersicht siehe (175, 176)). Derzeit wird die Bedeutung von Galectin-1 und Galectin-3 für Treg und deren Funktion in unserer Arbeitsgruppe genauer untersucht (in Zusammenarbeit mit Dr. Ulf Nilsson und Dr. Hakon Leffler, Lund University, Schweden). Weitere Experimente werden zeigen, ob Galectin-1 oder Galectin-3 tatsächlich eine bedeutende Rolle in der Treg Biologie spielen oder ob sie nur aufgrund des Aktivierungsstatus von Treg, ähnlich zu aktivierten Effektor T-Zellen, höher ausgeprägt sind.

Die Ektonukleotidase CD39 stellt ein ähnlich interessantes Molekül dar. CD39 greift in den extrazellulären ATP Katabolismus ein. Diese Funktion scheint insbesondere für die Blutgerinnung und Migration wichtig zu sein (zur Übersicht siehe (177-179)). Auch im Fall von CD39 konnte eine erhöhte Proteinexpression auf Treg im Einklang mit der Genexpressionsanalyse beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Da CD39 auf der Oberfläche exprimiert wird, könnte dieses Molekül möglicherweise als neuer Treg spezifischer Marker dienen. Die Rolle von CD39 auf humanen und murinen Treg wird ebenfalls gerade im Detail untersucht (in Zusammenarbeit mit Alexander Sternjak, MDC und Dr. Giovanna Borsellino, IRCCS, Rom), so dass zu diesem Zeitpunkt eine genauere Aussage über die Funktion der CD39 Expression auf Treg noch nicht getroffen werden kann.

Ein weiterer interessanter Kandidat scheint die zur Tec Familie gehörende „Nicht Rezeptor Tyrosinkinase“ Txk zu sein (Tabelle 8). Txk kontrolliert als Transkriptionsfaktor die IFN γ Produktion in Th1 Zellen (180). Die Tyrosinkinase ist in CD25+ Treg im Vergleich zu CD25-Teff herunterreguliert. Interessanterweise konnte auch bei der Genexpressionsanalyse von Tr1-Zellen eine ähnliche Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Damit stellt Txk neben wenigen weiteren Molekülen, wie zum Beispiel Galectin-3, CD230 (Prion Protein) und TCF-7 eine Gemeinsamkeit zu regulatorischen CD4+ T-Zellen anderen Ursprungs dar (Daten nicht gezeigt). Die weitere Rolle von Txk für Treg und IL-10 produzierenden Tr1-Zellen wird gegenwärtig in unserer Arbeitsgruppe im Detail untersucht. Derzeit kann aber noch keine Aussage über die Relevanz von einer Txk Herunterregulation in CD25+ Treg oder Tr1 getroffen werden.

So kann wahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass die detaillierte Analyse von weiteren, bisher uncharakterisierten deregulierten Genen aus der Genexpressionsanalyse neben den o.g. bereits genauer untersuchten Genen möglicherweise weiter zum Verständnis von Treg beitragen wird. Aufgrund der offensichtlichen Heterogenität von CD25 ausprägenden natürlichen regulatorischen T-Zellen, werden aber wahrscheinlich in Zukunft Analysen, die diese Unterschiede berücksichtigen, maßgeblich zum besseren Verständnis beitragen können und eine differentielle Einordnung ermöglichen. Das Hauptaugenmerk dieser Analyse wurde aber auf die weitere Charakterisierung der CCR6 Expression auf Treg Zellen in der Maus und im Menschen gelegt.

4.2 CCR6 definiert Effektor-Gedächtniszell ähnliche regulatorische CD25+ CD4+ T-Zellen in der Maus und im Menschen (T_{REM})

Die über Genexpressionsanalysen gefundene erhöhte Expression von CCR6 auf murinen Treg konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Bei der Untersuchung dieser Population im Detail konnte festgestellt werden, dass die Chemokinrezeptor-Expression Treg mit spezialisierten Eigenschaften definiert, welche aus der naiven, konventionellen Treg Population hervorgehen.

Basierend auf fünf Beobachtungen können CCR6+ Treg analog zu „regulären“ CD4+ Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) als Effektor-Gedächtniszell ähnliche regulatorische Zellen (T_{REM}) bezeichnet werden: i) Sie prägen den gleichen aktivierten und Gedächtniszell

typischen Phänotyp an Oberflächenmolekülen aus (siehe 3.2.3), ii) sie zeigen eine hohe Proliferationsrate (siehe 3.2.4), iii) CCR6+ Treg Zellen entstehen nach Antigenkontakt *in vivo* innerhalb einem bestimmten Milieu und unter Beteiligung zusätzlicher Faktoren (siehe 3.2.5), iv) sie exprimieren nach Restimulation erhöhte Mengen an Zytokinen im Vergleich zu CCR6-Treg (siehe 3.2.7) und v) sie akkumulieren bevorzugt im peripheren Gewebe im Laufe von Entzündungen (siehe 3.2.8). Da diese Population offensichtlich auch im Menschen gefunden werden kann (siehe 3.3), zeigen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, dass eine CCR6 Expression analoge Treg Subpopulationen in der Maus und im Menschen definiert. Dieses soll hier im Detail weiter diskutiert werden.

4.2.1 CD25+ Treg bezeichnen eine heterogene Zellpopulation und können phänotypisch und funktionell in unterschiedliche Subpopulationen unterteilt werden

Frühere Studien bezeichnen CD25+ Treg als eine homogene Zellpopulation. Obwohl auch zuvor eine Heterogenität bezüglich der Expression von bestimmten Oberflächenmarkern wie zum Beispiel CD62L beobachtet wurde, konnte keine Segregation mit bestimmten Eigenschaften oder einem speziellem Phänotyp unterschieden werden (zur Übersicht siehe (19, 24)). Manche Arbeiten konnten jedoch unter besonderen Bedingungen bzw. in verschiedenen *in vivo* Modellen eine funktionelle Segregation unter Treg Subpopulationen beobachten. Dieses gilt für die CD62L+ Population, welche möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Kontrolle von Diabetes übernimmt (69), als auch für die CD103+ Population, welcher eine bessere Kontrolle im Arthritis- oder Kolitis-Modell in der Maus zugeschrieben werden konnte (50, 70, 156). Weiterhin konnte eine Korrelation von ICOS+ Treg Zellen im Diabetes Modell beobachtet werden (155). Eine klare Beziehung zwischen den bisher beschriebenen Subpopulationen wurde aber bisher nicht manifestiert.

Das Gros der Treg Forschung betrachtet jedoch weiterhin nur die Gesamtpopulation von CD25+ Zellen. Diese Tatsache mag daher möglicherweise auch für z.T. gegensätzliche Forschungsergebnisse in unterschiedlichen *in vitro* oder *in vivo* Modellen verantwortlich sein (zur Übersicht siehe (19)). Die Ergebnisse aus 3.2 und 3.3 zeigen aber deutlich, dass der Schlüssel zum Verständnis von CD25+ Treg darin liegt, dass auch diese Zellpopulation eine ähnlich heterogene Population wie zum Beispiel CD4+ Effektor T-Zellen darstellen. Ein Beispiel der Heterogenität von Treg lässt sich anhand der CCR6 Expression präsentieren.

Tabelle 9: Vergleich von Treg Subpopulationen

	CCR6- Treg	CCR6+ T _{REM}
Eigenschaften		
Suppression (ZK)	+++	+++
IL-10 Produktion*	-	+++
IDO Induktion*	-	++
Gewebeinfiltration	+	+++
Proliferation	+	+++
Phänotyp		
CD5	+	+++
CD11a	+	+++
CD25	+++	+++
CD44	+	+++
CD45RB	-	-
CD54	+	+++
CD62L	+-	-+
CD69	-+	+-
CD103	-+	+-
CD122	++	++
OX-40	-+	+-
ICOS	-	+-
Ki67	-	+-
TCR	+-	+-
CTLA-4	+	++
GITR	+	++
Neuropilin-1*	++	++
Foxp3	+++	+++
CCR2*	-	++
CCR5	-	-
CCR6	-	++
CCR7	-+	-+
CXCR3*	+	++

Tabelle 9: Zusammenfassung der Unterschiede zwischen murinen CCR6- Treg und CCR6+ T_{REM}. Gezeigt sind die funktionellen Eigenschaften und der Phänotyp von CCR6- Treg (linke Spalte) und CCR6+ T_{REM} (rechte Spalte), basierend auf den Beobachtungen aus Abschnitt 3.2. + oder – bezeichnen jeweils relativ den Grad der Expression bzw. die Stärke der Eigenschaft (- < -+ < +- < ++ < +++), ZK= Zellkontaktabhängig. * = Nachweis auf mRNA Ebene.

Die Ergebnisse aus 3.2 und 3.3 zeigen, dass die CCR6 exprimierenden Zellen eine Subpopulation mit einem bestimmten Phänotyp und spezialisierten Eigenschaften im

Gegensatz zu CCR6 negativen Treg darstellen. In Tabelle 9 sind die im Laufe der Arbeit beobachteten Unterschiede von murinen CCR6+ und CCR6- Treg Zellen aufgelistet. CCR6+ T_{REM} sind mit weiteren Chemokinrezeptoren ausgestattet (CXCR3 und CCR2), um auf inflammatorische Stimuli reagieren zu können (siehe 3.2.6). Während CXCR3 in erhöhten Maßen nur auf Treg zu finden ist, scheint die CCR2 Expression mit CCR6 zu segregieren. Interessanterweise konnte tatsächlich auf CCR2+ Treg eine ähnlicher Phänotyp wie auf CCR6+ Treg festgestellt werden (154). CCR6+ Treg haben die Expression von CCR7 und L-Selektin weitestgehend herunterreguliert (siehe 3.2.3), welches permissiv für das Verlassen der Lymphe ist. Ferner tragen sie einen typischen, aktivierten Phänotyp mit einer erhöhten Ausprägung von Integrinen und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, CD11a, CD44, CD103), der für das Eindringen in den Entzündungsherd von Nöten ist (siehe 3.2.2 und 3.2.3). Der charakteristische Treg Phänotyp (Foxp3+, Neuropilin-1+, CD45RB^{low}, CD25+, CD122+) ist jedoch unverändert zwischen beiden Populationen, welches möglicherweise die gleich bleibende *in vitro* Suppression erklärt. CCR6+ T_{REM} zeigen lediglich eine verstärkte Expression von GITR und CTLA-4, welches in Übereinstimmung zum erhöhten Aktivierungsstatus steht (3.2.2).

Neben dem Phänotyp, der schon auf besondere Eigenschaften, bezüglich Effektorfunktion und Migrationsverhalten, der T_{REM} Zellen schließen lässt, konnten tatsächlich auch funktionelle Unterschiede beobachtet werden. CCR6+ CD25+ T_{REM} haben im Gegensatz zu CCR6- Zellen die Fähigkeit, nach Restimulation erhöhte Mengen von dem immunsuppressiven Zytokin IL-10 zu produzieren (siehe 3.2.7). Eine Eigenschaft, die von Treg Zellen nur situationsbedingt beobachtet werden konnte und somit umstritten ist (siehe 1.2.2). Die Tatsache, dass IL-10 jedoch nur von einem Teil der Treg Zellen produziert werden kann, könnte möglicherweise die konträren Ergebnisse erklären. Nach diesem Modell würde somit nur eine Subpopulation der T_{REM} von Treg innerhalb des peripheren Entzündungsherd IL-10 produzieren, eine IL-10 Expression von CCR6- Treg könnte nicht nachgewiesen werden. Dieses steht im guten Einklang zu unabhängig gemachten Beobachtungen bezüglich der IL-10 Produktion von Treg. Banz et al. konnten eine Segregation der IL-10 Expression auf CD103+ Treg beobachten (156), welche zu großen Teilen CCR6 ausprägen (siehe 3.2.2). Eine weitere Gruppe konnte zudem eine hohe IL-10 Produktion auf ICOS+ Treg nur in den prä-diabetischen Läsionen im Pankreas nachweisen (155). Wie die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.2 zeigen, segregiert auch die ICOS Expression auf Treg mit einer CCR6 Ausprägung. Auch eine kürzlich veröffentlichte Studie zur Rolle von Treg während der EAE in Mäusen konnte eine erhöhte IL-10 Expression auf CD25+ Treg mit einem T_{REM} ähnlichen Phänotyp

im ZNS-Infiltrat nachweisen (90). Somit scheint die Fähigkeit IL-10 auszuprägen, nur auf eine Subpopulation von Treg unter bestimmten Bedingungen, vornehmlich innerhalb von peripheren Entzündungsherden, beschränkt zu sein. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nur die CCR6+ T_{REM}, welche schon zuvor einen Antigenkontakt hatten, diese Fähigkeit besitzen. Weiterhin konnte eine erhöhte Proliferationsrate der Zellen beobachtet werden (siehe 3.2.4), eine Eigenschaft, die ebenfalls mit dem aktivierten Phänotyp im Einklang steht und als Charakteristikum von Effektor-Gedächtniszellen gilt (148). Während eine hohe CD44 Expression indikativ für eine T-Zell Aktivierung ist, scheint aufgrund der Experimente mit BrdU Markierungen, CCR6 erst später von proliferierenden Zellen exprimiert zu werden (3.2.4 und (149)). Die Beobachtung, dass T_{REM} Zellen im Vergleich zu CCR6- Treg eineIDO Expression von dendritischen Zellen induzieren können (siehe 3.2.7), steht im Einklang zur Fähigkeit IL-10 zu produzieren und der erhöhten Expression von CTLA-4 (siehe 3.2.2). Kürzlich veröffentlichte Studien konnten zeigen, dass eineIDO Induktion auf dendritischen Zellen CTLA-4 und IL-10 abhängig ist (23) und tatsächlich Treg in der Lage sind, dieIDO Expression in DC zu induzieren (61). Da auch aufIDO+ DC eine CCR6 Expression nachgewiesen werden konnte (22), scheint es möglich, dass die CCL20 vermittelte gleichzeitige Anwesenheit von T_{REM} undIDO+ DC am Entzündungsort das tolerogene Milieu verstärken kann und ein zusätzlicher Wirkmechanismus von T_{REM} dieIDO Induktion in DC ist.

Die fundamentalen Unterschiede von T_{REM} und CCR6- Treg scheinen aufgrund dieser Beobachtungen daher im unterschiedlichen „Einsatzort“ und in einer unterschiedlichen *in vivo* Suppression zu liegen. CCR6+ CD25+ T_{REM} sind aufgrund ihrer Ausstattung mit bestimmten Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen darauf spezialisiert, Immunreaktionen in peripheren Geweben zu kontrollieren. Offensichtlich scheinen aber in dieser Situation, parallel zur Zellkontakt vermittelten Suppression, noch alternative tolerogene Mechanismen, wie zum Beispiel eine IL-10 Sekretion und ein überIDO+ DC vermittelter Eingriff in den Tryptophan Katabolismus, eine Rolle zu spielen.

In Abbildung 49 sind die beiden peripheren Treg Populationen und ihre Beziehung zueinander dargestellt. Die Expression von Foxp3 spezifiziert CD25+ Treg Vorläuferzellen wahrscheinlich schon im Thymus (zur Übersicht siehe (42)). In der Peripherie können dann CCR6+ T_{REM} induziert werden. Die Entstehung bedarf einer antigenspezifischen Aktivierung, welche wahrscheinlich im Beisein weiterer Faktoren wie zum Beispiel Zytokinen im LN erfolgt. CCR6+ T_{REM} können dann aufgrund ihres Phänotyps in peripheren Geweben agieren und setzen möglicherweise neben der Zellkontakt vermittelten Inhibition noch weitere

Mechanismen, wie zum Beispiel IL-10 Sekretion oder eine IL-10 und CTLA-4 vermittelte IDO Induktion in DC, zur Suppression ein. Die in der Maus gefundene Unterteilung von Treg scheint auch für den Menschen zu gelten. Auch hier kann eine Subgruppierung der regulatorischen CD25^{high} T-Zellen anhand einer CCR6 Expression vorgenommen werden. So findet sich eine ähnlicher Effektor-Gedächtniszell Phänotyp auf CCR6+ Treg Zellen im Menschen. Dies manifestiert sich in der Expression von CD45RO und CD45RA, aber auch in der geringen CCR7 und CD62L Ausprägung (siehe 3.3.1) (126).

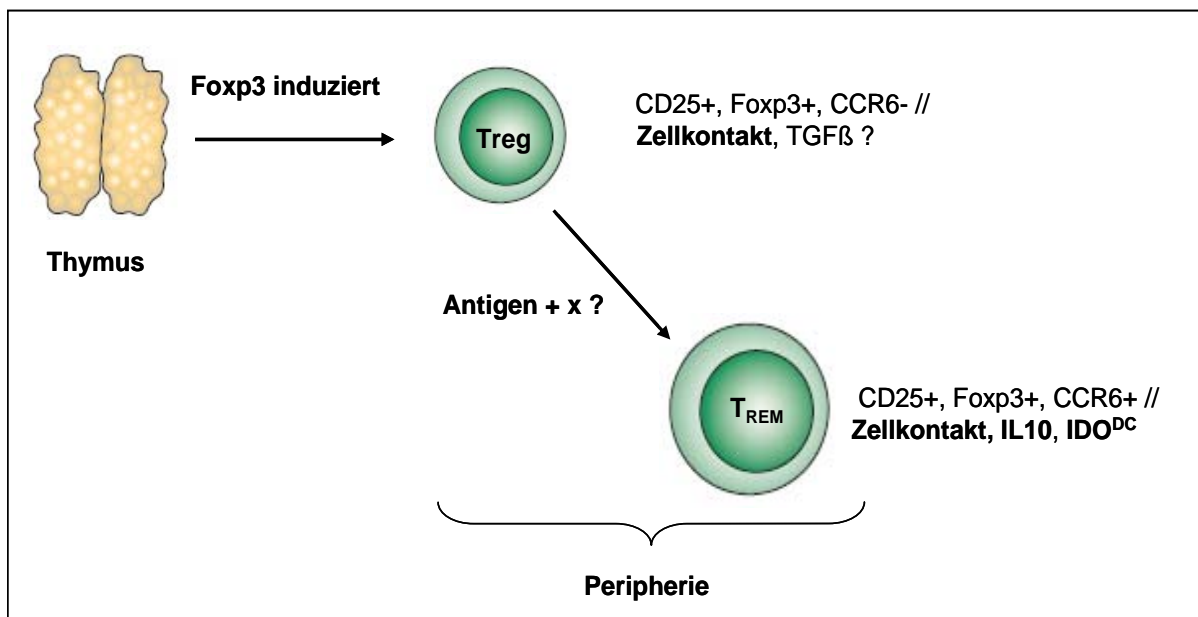


Abbildung 49: Natürliche regulatorische T-Zellen: Das Diagramm zeigt schematisch die Subpopulationen von natürlichen CD25+ regulatorischen T-Zellen und ihren Ursprung. Treg= CD25+ CD4+ CCR6- natürliche regulatorische T-Zelle, T_{REM}: CCR6+ Effektor-Gedächtniszell ähnliche regulatorische T-Zelle. Im rechten Absatz sind der Phänotyp und die Wirkungsweise angezeigt. Fettgedruckt ist die jeweils vorherrschende Art der Suppression. IDO^{DC}= IDO Induktion in dendritischen Zellen.

Im Menschen können allerdings wesentlich mehr CCR6+ Treg gefunden werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache, dass auch eine viel höhere Zahl an „konventionellen“ CCR6+ CD25^{low} Effektor-Gedächtniszellen im humanen PBMC detektiert werden kann (siehe 3.3.1), wobei die höhere Anzahl an CD45RO+ Gedächtniszellen in humanen PBMC wahrscheinlich auf die unvermeidlichen, zahlreichen Infektionen im Laufe eines Menschenlebens zurückzuführen sind (siehe 3.3.1)(73).

4.2.2 Die Entstehung von T_{REM} verläuft parallel zur T_{EM} Induktion

CCR6 scheint sowohl im Menschen (3.3) als auch in der Maus (3.2) nur auf Gedächtniszell ähnlichen CD4+ T-Zellen exprimiert zu sein (126). Die CCR6 Expression kann nicht über eine „konventionelle“ Aktivierung *in vitro* in der Maus (siehe 3.2.5) oder im Menschen erzwungen werden (115, 126). Es scheint, als ob die Induktion von CCR6 auf CD4+ T-Zellen weitere Faktoren benötigt, die entweder nur *in vivo* vorliegen (siehe 3.2.5) oder durch die, mehr der physiologischen Situation *in vivo* ähnelnden, gemischten Lymphozytenkultur *in vitro* simuliert werden können (115). Weiterhin bleibt festzuhalten, dass offensichtlich nicht alle CD4+ T-Zellen CCR6 nach Antigenkontakt *in vivo* Hochregulieren, welches ein zusätzliches Indiz für den spezifischen Charakter einer CCR6 Expression darstellt (siehe 3.2.5). Die Faktoren, die neben dem Antigenkontakt eine Gedächtniszell-Entwicklung einleiten, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Zytokine, die in einem spezifischen Milieu die Gedächtniszell-Induktion begünstigen (zur Übersicht siehe (143, 181)). Für die CD8+ Gedächtniszell-Induktion konnten hier tatsächlich schon Faktoren identifiziert werden, wobei diese bisher für CD4+ Gedächtniszellen noch nicht eindeutig bestimmt werden konnten (181). Die Beobachtungen in den adoptiven Transferexperimenten deuten daher tatsächlich darauf hin, dass die CCR6 Expression faktisch die Induktion von Gedächtniszellen markiert. So konnte nur eine verzögerte CCR6 Induktion, nicht direkt nach der Aktivierung, sondern erst nach der dritten Teilung sowohl auf CD25+ als auch auf CD25- T-Zellen beobachtet werden (siehe 3.2.5). Weiterhin erfolgte die CCR6 Induktion nur auf einer Subpopulation, der über Antigen aktivierten und proliferierenden Zellen, welches im Einklang mit den *in vivo* BrdU Markierungen steht (siehe 3.2.4). Aufgrund der gemachten Beobachtungen scheint die CCR6 Induktion auf CD25+ Treg jedoch effizienter zu sein (siehe 3.2.5). Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Phänomen mit einer unterschiedlichen Kinetik im Verlassen des Lymphknotens unter Teff und Treg zusammenhängt. Dieses würde im Einklang mit der Beobachtung stehen, dass die CD62L Expression auf *in vivo* aktivierten Treg Zellen erst mit einer Verzögerung herunterreguliert wird (149) und somit die Treg Zellen nach Aktivierung länger im Lymphknoten verweilen. Die verzögerte und unvollständige Induktion von CCR6 auf regulatorischen und Effektor T-Zellen deutet daher darauf hin, dass die CCR6 Expression tatsächlich Effektor-Gedächtniszellen im Einklang mit dem observierten Phänotyp und den funktionellen Eigenschaften (siehe 4.2.1) markiert. Aufgrund dieser Beobachtungen kann in Übereinstimmung mit früheren Publikationen (115, 126) ebenfalls ausgeschlossen werden, dass die CCR6 Expression lediglich aktivierte T-Zellen charakterisiert. Während *in*

in vivo nur Teile von CD4+ T-Zellen CCR6 Hochregulieren, werden andere Aktivierungsmarker (zum Beispiel: CD54 und CD5) auf allen Zellen induziert (siehe 3.2.5).

Der zentrale Punkt dieser Beobachtungen ist folglich, dass auch CD25+ Treg fundamentalen immunologischen Prinzipien zu gehorchen scheinen. Die Induktion von wahrscheinlich relativ kurzlebigen Effektor-Gedächtniszellen (Daten nicht gezeigt (143, 148)) von Effektor und regulatorischen T-Zellen scheint weitestgehend parallel bzw. analog zu verlaufen. In Abbildung 50 ist ein Modell zur Entstehung von T_{EM} und T_{REM} dargestellt: Die Aktivierung von Treg als auch Teff erfolgt über Antigenkontakt im Lymphknoten, wodurch eine Proliferation der Zellen eingeleitet wird. Wahrscheinlich wird dann innerhalb eines bestimmten Zytokin-Milieus die Induktion von Effektor-Gedächtniszellen, erkennbar an der CCR6 Expression, nur auf wenigen Zellen eingeleitet.

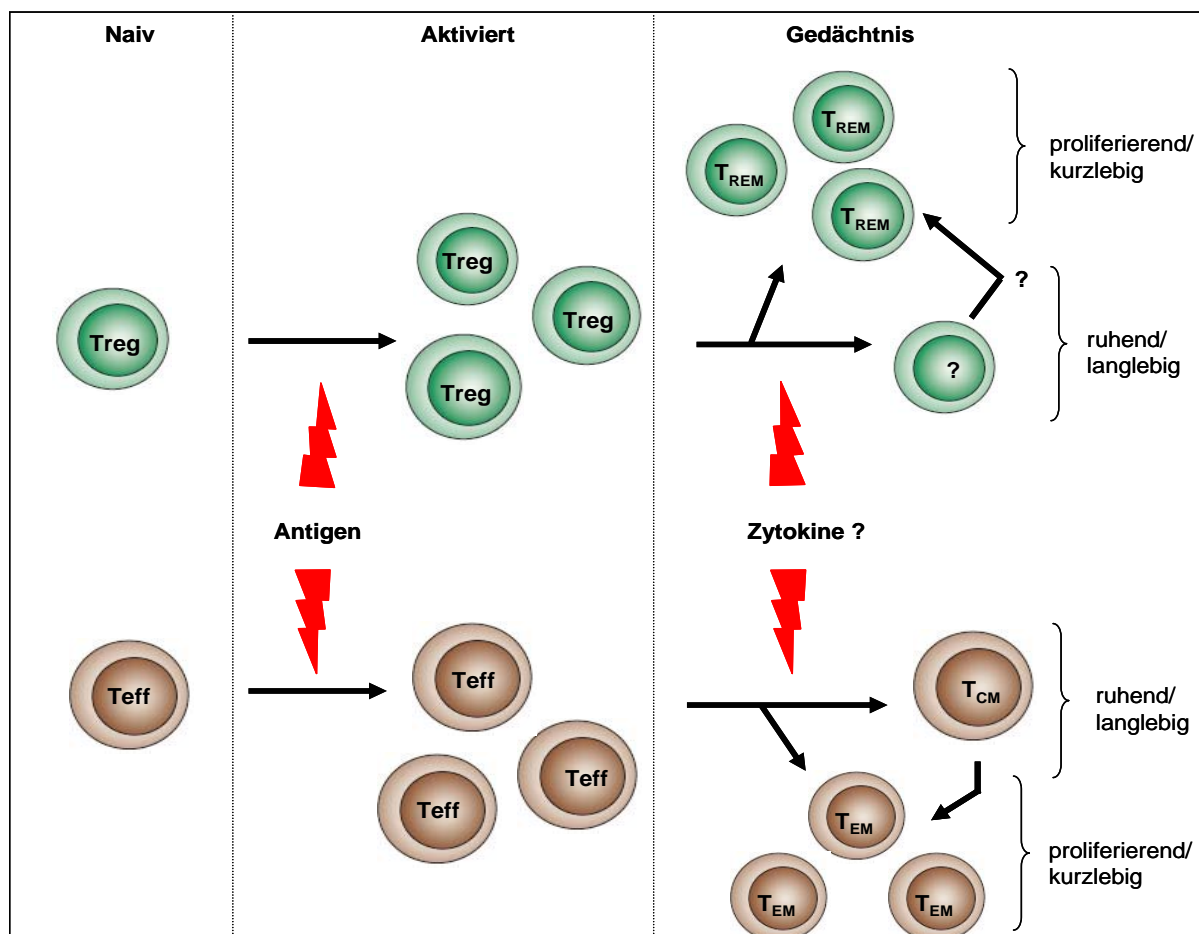


Abbildung 50: Modell für die analoge Entstehung von CCR6+ T_{EM} oder T_{REM} im Kontext zu weiteren CD4+ T-Zellpopulationen. Die Abbildung zeigt schematisch die vermutliche Entstehung von CCR6 exprimierenden Effektor-Gedächtniszellen ähnlichen CD4+ T-Zellen. Obere Zeile: CD25+ regulatorische T-Zellen (Treg, grün), untere Reihe CD25- Effektor T-Zellen (Teff, braun). T_{EM}: CCR6+ Effektor-Gedächtniszellen, T_{REM}: CCR6+ Effektor-Gedächtniszellen ähnliche regulatorische T-Zellen, T_{CM}: Zentrale Gedächtniszellen. Erklärung siehe Text (4.2.2).

Im Laufe eines späteren, wiederholten Antigen Kontaktes können dann wiederum Effektor-Gedächtniszellen aus Zentralen-Gedächtniszellen (T_{CM}) induziert werden (zur Übersicht siehe (143, 181)). Ausgehend von diesem Modell stellt sich die Frage, ob auch ruhende, langlebige Zentrale-Gedächtniszellen auf Seiten der Treg („ T_{RCM} , *regulatory central-memory like*“) analog zu T_{CM} existieren. Diese Frage kann allerdings nur über weitere Experimente geklärt werden. Es existieren jedoch tatsächlich Hinweise darauf, dass eine „langlebige“ Treg Vakzinierung über die Induktion bestimmter Treg erreicht werden kann (57, 182, 183).

Obwohl die humanen Treg Populationen nicht so ausführlich wie im Mausmodell analysiert wurden (siehe 3.2), scheint auch hier die Expression von CCR6 erst nach Antigenkontakt und somit analog zum Mausmodell zu erfolgen. So konnte nur eine sehr geringe CCR6 Expression auf Treg aus humanen Nabelschnurblut detektiert werden (Daten nicht gezeigt), welches im Einklang mit dem vorwiegend naiven Phänotyp von Nabelschnurblut Treg steht. Zahlreiche Arbeiten konnten hier neben einer überwiegenden CD45RA Expression weitere „naive“ Marker wie zum Beispiel eine hohe CCR7 und CD62L Ausprägung feststellen (184-187). Ein geeignetes Modell zur Studie von Gedächtniszell ähnlichen Treg Populationen könnte somit die CCR6 EGFP-KI Maus darstellen. Die CCR6 EGFP-KI Maus könnte dazu dienen, die T_{REM} Entstehung genauer zu untersuchen und könnte möglicherweise dabei hilfreich sein, weitere Gedächtniszell ähnliche Treg Populationen zu identifizieren.

4.2.3 Die Balance von antagonistisch wirkenden CCR6+ T_{REM} und T_{EM} kontrolliert die Immunreaktion im entzündeten Gewebe

Der Phänotyp und die unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften deuten an, dass CCR6+ T_{REM} im Gegensatz zu CCR6- Treg eine Rolle bei der Kontrolle von peripheren Entzündungen spielen (siehe 4.2.1). Demzufolge erscheint es plausibel, dass CCR6+ und CCR6- Treg an unterschiedlichen Orten im Organismus wirken. Diese Vermutung konnte in der Tat bestätigt werden. Sowohl im Entzündungsmodell für das ZNS (EAE), als auch für zwei unabhängige Tumormodelle konnte gezeigt werden, dass CCR6+ Treg direkt im entzündeten Gewebe akkumulieren, wobei die Akkumulation mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer CCL20–CCR6 vermittelten Migration der Zellen ausgeht. Beide Populationen, regulatorische CCR6+ T_{REM} oder Effektor CCR6+ T_{EM} Zellen werden daher über den Liganden CCL20 zum Entzündungsherd gelockt und scheinen folglich antagonistisch zu wirken. Die Verschiebung des Gleichgewichtes auf eine Seite kann dann möglicherweise die Richtung der Immunreaktion beeinflussen.

Die erhaltenen Ergebnisse aus den *in vivo* Entzündungsmodellen deuten tatsächlich auf ein ähnliches Szenario hin. Im Falle der EAE kann während der akuten Phase ein Übergewicht auf Seiten der CCR6+ T_{EM} beobachtet werden, während in der Remissionsphase eine deutliche Reduktion von T_{EM} und somit ein Übergewicht an T_{REM} zu beobachten ist (siehe 3.2.8). Auch in den zwei Tumormodellen kann eine Anreicherung von beiden Zellpopulationen im Tumor-Infiltrat beobachtet werden, welches auf ein ähnliches Szenario schließen lässt (siehe 3.2.8). Besonders im Falle des J558L Plasmazytoms kann eine deutliche Akkumulation von CCR6+ Zellen sowohl auf Treg als auch Effektor T-Zell Seite beobachtet werden (siehe 3.2.8). Obwohl im B16 Tumormodell ein geringerer Anteil an CCR6+ T-Zellen im Infiltrat nachgewiesen werden konnte, ist tendenziell auch in diesem Modell der gleiche Trend einer Anreicherung von CCR6+ Effektor-Gedächtniszellen im Tumor-Infiltrat zu erkennen. Dass im B16 Tumormodell in homozygoten CCR6 EGFP-KI Tieren keine GFP+ T-Zell Infiltration im Tumor beobachtet werden konnte, belegt sogar eindeutig, dass die Effektor-Gedächtniszell Migration in diesem Fall tatsächlich über eine CCL20–CCR6 Interaktion vermittelt ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Akkumulation von GFP+ Zellen im LN von diesen Tieren (siehe 3.2.8).

Die These, dass die Immunreaktion an peripheren Entzündungsherden über ein Gleichgewicht von korrespondierenden regulatorischen und Effektor T-Zellen gesteuert ist, wird durch Beobachtungen aus anderen Arbeitsgruppen indirekt unterstützt. So konnte in verschiedenen Entzündungsmodellen in CCR6 gendefizienten Tieren gezeigt werden, dass je nach Situation eine Verstärkung oder Schwächung der Immunreaktion induziert werden konnte. Dieses wurde sowohl für zwei Allergie Typen als auch für zwei unterschiedliche Kolitis-Modelle gezeigt (136, 137). In einem weiteren Modell konnte durch eine im Tumor induzierte ektopische CCL20 Expression eine verzögerte Tumorabstoßung und somit eine Tumor Akzeptanz induziert werden (188), welches interessanterweise in diesem Fall indirekt auf einen Vorteil für CCR6+ T_{REM} gegenüber den konventionellen CCR6+ T_{EM} weist.

Die Beobachtungen aus den verschiedenen Tiermodellen deuten daher an, dass möglicherweise neben der Chemokinrezeptor-Expression von T_{REM} und T_{EM} noch weitere Regelwerke bestehen müssen, welche die Steuerung einer Immunreaktion und die Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Toleranz oder Entzündung beeinflussen. Eine reine Lenkung der Treg Migration allein über eine Chemokin–Chemokinrezeptor Interaktion scheint aus zwei Gründen unwahrscheinlich: i) Es konnte bisher sowohl im Menschen als auch in der Maus keine selektive Chemokinrezeptor-Expression von Treg beobachtet werden.

Die Chemokinrezeptor-Expression kann in allen Fällen auch auf den korrespondierenden Effektor T-Zellen beobachtet werden, wobei die Expression von zahlreichen Chemokinrezeptoren unter „naiven“ Bedingungen jedoch meistens relativ gering auf Effektor T-Zellen zu sein scheint. Dieses gilt für CCR6, konnte aber auch für CCR2 und CCR5 beobachtet werden (siehe 3.2 und 3.3). Ebenfalls konnte für die CCR4 Expression im Menschen gezeigt werden, dass obwohl ein Großteil der CD25^{high} Treg den Rezeptor ausprägt, eine signifikante CCR4 Expression auch auf CD25^{int} Effektor- oder Gedächtniszellen gefunden werden kann (siehe 3.3.1). ii) Eine selektive Chemokinrezeptor-Expression von Treg würde ein hohes Risiko für den Organismus beinhalten. Obwohl im Prinzip eine gesteuerte Treg Migration über diesen Mechanismus erreicht werden könnte, böte dieses wahrscheinlich zuviel Angriffsfläche für zahlreiche Pathogene. Eine Steuerung der Treg Migration allein über Chemokine könnte so von Pathogenen ausgenutzt werden, indem sie diese Faktoren imitieren, um ein tolerogenes Umfeld zu erreichen. Gerade der Vorteil einer viel schnelleren Anpassung seitens des Pathogens gegenüber dem Wirt würde solch eine Lösung evolutionär zum Scheitern verurteilen. So konnten tatsächlich schon ähnliche „Escape“ Mechanismen von Pathogenen beobachtet werden. Zahlreiche Viren beinhalten Chemokin ähnliche Gene in ihrem Genom, welche die Funktion von endogenen Chemokinen kopieren können (zur Übersicht siehe (189, 190)). Eine kürzlich veröffentlichte Studie vermochte zum Beispiel zu zeigen, dass ein humaner Herpesvirus ein Chemokin homolog kodiert (viral MIP-II) welches über die Attraktion von Eosinophilen und Th2 Zellen die Immunreaktion des Wirts beeinflussen kann (191, 192).

Ein weiterer möglicher Kontrollpunkt für eine selektive Steuerung der Zellmigration liegt auf der Ebene von Adhäsionsmolekülen. Nur durch eine geeignete Adhäsionsmolekül Expression kann eine Zelle an den tatsächlichen Ort der Entzündung über das Endothel einwandern und den Entzündungsherd direkt erreichen (zur Übersicht siehe (124, 169)). Eine zusätzliche Kontrolle der Migration über Adhäsionsmoleküle böte entscheidende Vorteile. So könnten Effektor und regulatorische T-Zellen immer noch auf das gleiche Chemokinsignal reagieren, während der Eintritt zum entzündeten Gewebe von der populationspezifischen Expression von Adhäsionsmolekül-Liganden des Endothels kontrolliert werden kann. Dieser Mechanismus böte den Vorteil, dass je nach Situation eine schnelle Reaktion des Immunsystems eingeleitet werden könnte. Weiterhin würde dieses Modell weniger Angriffsfläche für die Ausnutzung der Treg Migration von Pathogenen liefern, da Pathogene mindestens zwei völlig unterschiedliche Strategien entwickeln müssten, um die vorteilhaften tolerogenen Bedingungen zu induzieren.

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit deuten faktisch darauf hin, dass möglicherweise ein ähnliches Szenario die selektive Migration von antagonistisch wirkenden T_{EM} und T_{REM} im Menschen kontrollieren kann. Bei der Analyse von humanen PBMC konnte tatsächlich ein Unterschied in der Integrin Ausprägung zwischen T_{EM} und T_{REM} Zellen, die den gleichen Chemokinrezeptor exprimieren, beobachtet werden. Humane $CCR6^+$ T_{EM} zeigen eine hohe VLA-4 jedoch keine CLA Expression, während die korrespondierenden $CCR6^+$ T_{REM} vorwiegend CLA positiv, aber VLA-4 negativ sind (siehe 3.3.3).

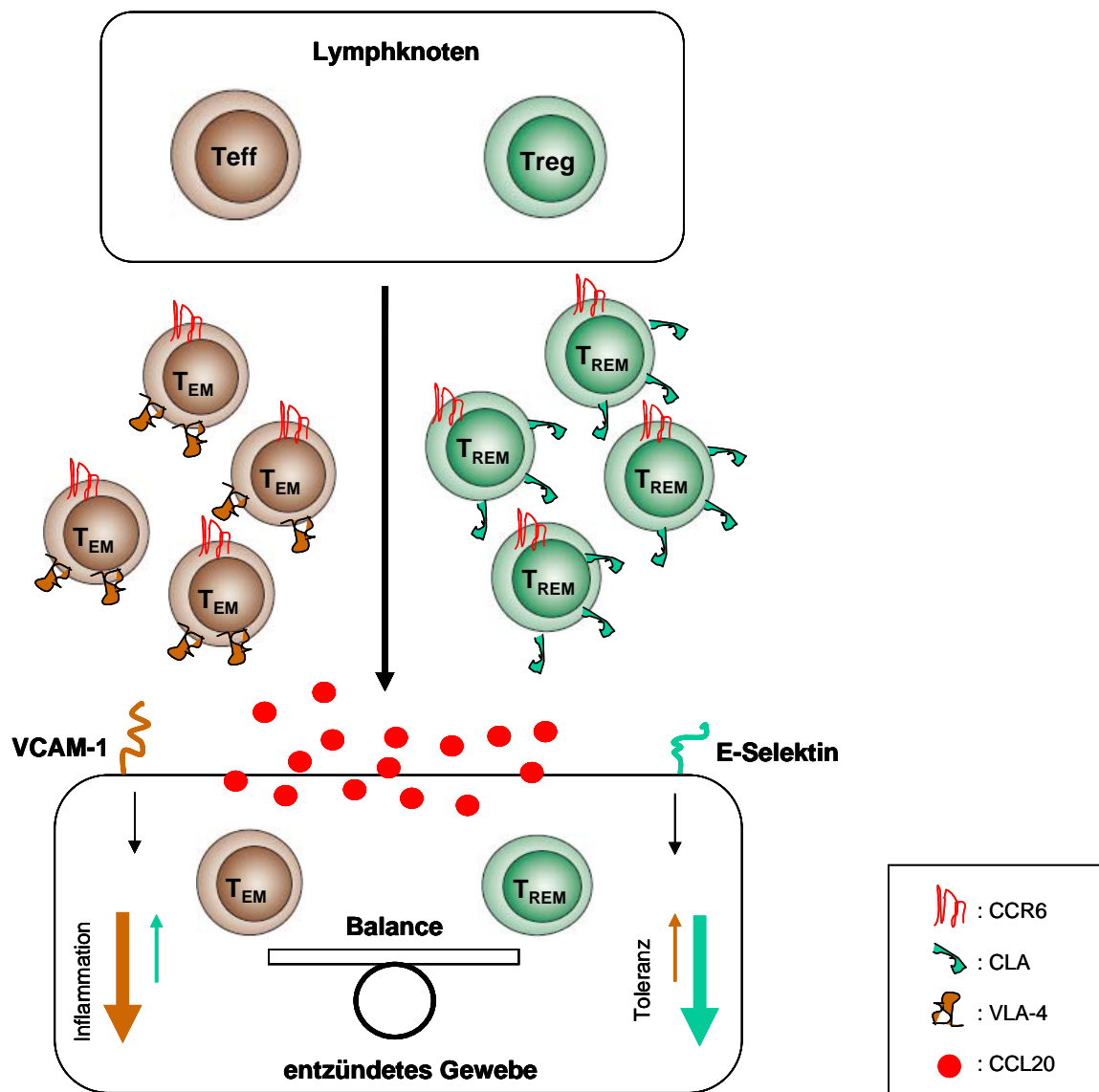


Abbildung 51: Modell für die Steuerung einer Immunreaktion an peripheren Entzündungsherden über die Balance von $CCR6^+$ T_{EM} zu T_{REM} . Das Modell zeigt schematisch die vermutliche Steuerung der Balance von $CCR6$ exprimierenden antagonistisch wirkenden T_{EM} (braun) und T_{REM} (grün). Beide Populationen entstehen durch Antigenkontakt im Lymphknoten und reagieren gleichermaßen auf eine induzierte $CCL20$ Ausschüttung (rot) im entzündeten Gewebe. Durch eine Expression von $VCAM-1$ (Ligand für $VLA-4$) oder E -Selektin (Ligand für CLA) kann die Infiltration von $VLA-4$ exprimierenden T_{EM} oder CLA ausprägenden T_{REM} selektiv gesteuert werden. Die Steuerung der Balance von T_{EM} zu T_{REM} kann so die Immunreaktion in eine bestimmte Richtung lenken.

Bei der Analyse der Adhäsion von beiden Populationen, konnte ausgehend von dieser Beobachtung, erwartungsgemäß tatsächlich eine unterschiedliche Adhäsion *in vitro* an die jeweiligen Liganden beobachtet werden (siehe 3.3.3). Die Ergebnisse suggerieren, dass im Menschen eine Verschiebung des Gleichgewichts von Effektor zu regulatorischen Zellen tatsächlich zusätzlich über eine VCAM-1 oder E-Selektin Expression am Ort der Entzündung gesteuert werden kann. Somit würde im Zusammenspiel mit einer CCL20 Ausschüttung die Expression des Integrin-Liganden über das Gleichgewicht zu Gunsten von eher inflammatorischen bzw. tolerogenen Bedingungen entscheiden (siehe Abbildung 51). Erste Ergebnisse bei der Analyse der T-Zell Infiltration von humanem Tumorgewebe aus Patientinnen mit Brustkrebs unterstützen indirekt diese These (in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schlag, MDC-Berlin/Helios-Klinikum Berlin-Buch/Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Fall konnte in Übereinstimmung mit früheren Analysen eine Anreicherung von CD25^{high} Treg im Tumorgewebe beobachtet werden (101, 103, 193). Die phänotypische Analyse ergab tatsächlich eine Anreicherung von Foxp3⁺ CCR6⁺ CD49⁻ T_{REM} im Tumorgewebe, während die Foxp3⁻ Effektorzellen neben CCR6 eine hohe Ausprägung von CD49d zeigten (Daten nicht gezeigt). Zu diesem Zeitpunkt kann allerdings aufgrund der geringen Stichprobenzahl noch keine klare Aussage getroffen werden. Die Tatsache, dass aber auch im humanen Tumorgewebe eine Anreicherung von Effektor-Gedächtniszellen, ähnlich wie im Mausmodell (siehe 3.2.8) gefunden werden kann, deutet auf verwandte Mechanismen im Menschen hin.

Ein weiteres Beispiel der differentiellen Adhäsionsmolekül-Ausprägung von T_{EM} und T_{REM} und deren Bedeutung für die Kontrolle von peripheren Entzündungen kann möglicherweise der starke therapeutische Effekt von anti-VLA-4 Antikörpern bei der Behandlung von Multiple Sclerosis Patienten sein (zur Übersicht siehe (194)). Klinische Tests der Phase III mit dem anti-VLA4 Antikörper Natalizumab (Antegren, Tysabri) konnten zeigen, dass diese Behandlung zu einer dramatischen Reduktion der Krankheit führen kann (89, 195). Die Wirkung der Antikörper-Behandlung wurde in der Blockade der VCAM-1–VLA-4 vermittelten Migration von encephalitogenen Effektor T-Zellen in das ZNS vermutet (196-198). Neuere Studien konnten aber zeigen, dass der von anti-VLA4 Antikörpern vermittelte Effekt möglicherweise komplexer ist (199, 200). Die Tatsache, dass humane Treg Zellen nur wenig VLA-4 exprimieren, suggeriert, dass eventuell auch regulatorische Mechanismen eine Rolle spielen. Aufgrund der Beobachtungen im murinen EAE Modell scheint die Balance von T_{REM} und T_{EM} mit dem Krankheitsverlauf zu korrelieren (siehe 3.2.8). So könnte bei der Behandlung mit Natalizumab möglicherweise noch ein zweiter Aspekt neben der Blockierung

der ZNS-Infiltration von CD4+ Effektor T-Zellen eine Rolle spielen. CCR6+ CD49- T_{REM} im Menschen sollten durch eine CD49d Depletion nicht betroffen sein und könnten so aktiv über eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zu einem eher tolerogenen Milieu das Abklingen der Symptome beschleunigen. Dieses steht im Einklang mit seltenen Ausbrüchen von progressiver multifocaler Leukoencephalopathy (PML) im Laufe der Behandlung mit Natalizumab. Diese häufig fatal verlaufende Infektion von Oligodendrozyten, ausgelöst durch einen Polyomavirus, tritt normalerweise nur in Immun-inkompetenten Individuen, welche an Krebs oder AIDS leiden, auf (201, 202). Weiterhin könnte dies eine Erklärung für die relativ gute Wirkung der Antikörper trotz fortgeschrittenem Krankheitsverlaufs bieten, da Effektorzellen, die bereits im ZNS akkumuliert sind, auch hier im Prinzip die Möglichkeit zur Proliferation besitzen und die Krankheit weiter vorantreiben könnten (203).

Während die grundsätzlichen Erkenntnisse bezüglich der CCR6 Expression auf T_{REM} und T_{EM} von der Maus auf den Menschen übertragbar scheinen, konnte im murinen Modell jedoch keine klare Korrelation der VLA-4 oder CLA Expression unter den Subpopulationen festgestellt werden (siehe 3.3.4). Vielmehr scheint in der Maus die Expression vom Integrin α E (CD103) eine entscheidende Rolle zu spielen. Die CD103 Expression scheint in der Maus selektiv auf Treg, vornehmlich auf T_{REM} exprimiert zu sein (siehe 3.2.2) (70). So könnte im Mausmodell eine Adhäsionsmolekül vermittelte Kontrolle der Treg Migration über die differentielle Expression von CD103, analog zur differentiellen CD49d und CLA Expression im Menschen gesteuert werden. Tatsächlich konnte in Mäusen ein ähnliches Szenario schon beobachtet werden. In einem *Leishmania* Infektions-Modell wurde gezeigt, dass nur Effektor-Gedächtniszell ähnliche CD103 exprimierende Treg in der Lage sind, eine Infektion zu favorisieren. Insbesondere scheint das α E-Integrin hier eine bedeutende Rolle zu spielen, da es für den Eintritt und den Verbleib der Treg Zellen am Entzündungsort essentiell erscheint (204).

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit dem o.g. Modell (siehe Abbildung 51) und weiteren Beobachtungen bezüglich der CD103 Expression auf murinen Treg Zellen (70, 205). Da von humanen Treg Zellen jedoch praktisch kein CD103 exprimiert wird (3.3.3 und (166, 206)), scheint hier eine selektive Treg Migration wahrscheinlich über die differentielle VLA-4 und CLA Expression kontrolliert zu werden.

Ein interessanter Nebenaspekt ist, dass die humanen CCR6+ CD49- T_{REM} Zellen offensichtlich auch die höchste Menge an Foxp3 Protein ausprägen (siehe 3.3.3). Das Ergebnis suggeriert, dass diese Population am effektivsten bei der Suppression von

Immunantworten ist. Erste Versuche *in vitro* deuten tatsächlich darauf hin (siehe 3.3.3). Auch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit konnte eine erhöhte Effektivität von peripheren Treg, isoliert aus dem Synovialfluid von Arthritis Patienten, beobachten (207). Diese Beobachtungen deuten indirekt darauf hin, dass aktivierte, peripher agierende T_{REM} am Entzündungsort tatsächlich ein höheres Potential an suppressiver Wirkung entfalten können, welches im Einklang mit den o.g. Beobachtungen (siehe 4.2.1) und weiteren Studien mit T_{REM} ähnlichen murinen Zellen aus dem ZNS steht (90).

Zur detaillierten Erklärung dieser Phänomene bedarf es allerdings definitiv weiterführender Studien. Diese könnten sich allerdings als kompliziert erweisen, da aufgrund der gravierenden Unterschiede bezüglich der Adhäsionsmolekül-Expression zwischen Maus und Mensch hier offensichtlich das Mausmodell nur bedingt zur Aufklärung beitragen kann. Eine Umgehung dieses Problems könnte daher möglicherweise die Etablierung eines Entzündungsmodells in der *human adaptive immune system Rag2(-/-)gamma(c)(-/-)* Maus (huAIS-RG) darstellen (208, 209). Diese Maus kann aufgrund des frühen Transfers von humanen CD34+ Stammzellen offensichtlich ein funktionsfähiges adaptives humanes Immunsystem bilden. So könnte zum Beispiel ein Tumormodell in der huAIS-RG Maus unter Zuhilfenahme von Adhäsionsmolekül-Transfektanten eine Möglichkeit bieten, die o.g. Theorie experimentell im „humanen Immunsystem“ zu überprüfen. Weitere Studien werden zeigen, ob dieser theoretische Ansatz in der Praxis durchführbar ist.

Festzuhalten bleibt jedoch, dass neben der Chemokinrezeptor-Expression in beiden Spezies ähnliche Mechanismen zu existieren scheinen, welche im Prinzip eine selektive Treg oder Teff Migration über eine differentielle Adhäsionsmolekül-Ausprägung ermöglichen können.

Zusammengefasst definiert somit die CCR6 Expression von peripheren Treg, Effektor-Gedächtniszell ähnliche regulatorische T-Zellen (T_{REM}). Dieses Phänomen ist offensichtlich unabhängig von der untersuchten Spezies, so dass eine CCR6 Expression analoge Subpopulationen von Treg in der Maus und im Menschen zu definieren scheint. Neben dem Phänotyp unterscheidet sich die CCR6+ Treg Subpopulation auch funktionell von CCR6- Treg. CCR6+ T_{REM} können vermutlich zusätzlich zur Zellkontakt vermittelten Suppression weitere tolerogene Mechanismen, wie die Sekretion von IL-10 oder einen Eingriff in den Tryptophan-Katabolismus von Effektor T-Zellen, über eine Induktion vonIDO auf dendritischen Zellen nutzen, welches sie möglicherweise am Entzündungsort effektiver werden lässt. T_{REM} Zellen mögen daher eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von peripheren

Entzündungen spielen, indem sie die wahrscheinlich analog entstehenden „regulären“ Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) kontrollieren. Die Balance von T_{REM} zu T_{EM} am Entzündungsort kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit den Ausgang einer Immunreaktion, zu inflammatorischen oder tolerogenen Bedingungen hin, kontrollieren.

4.3 Die Entwicklung von CD25+ Treg Vorläuferzellen im Thymus

Die Entstehung von natürlichen CD25+ Treg im Thymus steht außer Frage. Allerdings konnte mittlerweile gezeigt werden, dass auch eine *de novo* Induktion von Foxp3+ CD25+ regulatorischen T-Zellen in der Peripherie über verschiedene Protokolle möglich ist, wobei hier vermutlich das Zytokin TGF- β eine Hauptrolle spielt (siehe 1.2.2). Diese Zellen scheinen phänotypisch und funktionell mit natürlichen, im Thymus gereiften Treg identisch zu sein (zur Übersicht siehe (42, 141, 210)). Frühere Analysen konnten zeigen, dass die Entwicklung von Treg Zellen im Thymus durch die Expression von Foxp3 spezifiziert wird. Die Beobachtung, dass Foxp3 schon im Thymus von Treg Vorläuferzellen ausgeprägt wird, legt die Vermutung nahe, dass die Expression von Foxp3 somit tatsächlich eine spezifische Treg Zelllinie definiert (zur Übersicht (42, 44)). Trotz zahlreicher Studien über natürliche CD25+ regulatorische T-Zellen ist jedoch im speziellen von der Thymus gesteuerten Entwicklung von Treg noch wenig bekannt. Die Beobachtung, dass eine konstitutive CCL20 Expression auch im Thymus zu finden ist (132, 211), deutet darauf hin, dass auch hier eine CCR6 Expression auf Treg Zellen von Bedeutung sein könnte. Bei der Analyse von CD25+ Thymozyten konnte tatsächlich eine hohe CCR6 Expression nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CCR6 exprimierende Thymozyten funktionelle Treg Vorläuferzellen mit einem speziellem Reifungsgrad darstellen.

4.3.1 CCR6 Expression von Thymozyten

Abhängig vom Alter der Mäuse prägen CD25+ Thymozyten zu ca. 10-50% CCR6 an der Zelloberfläche aus. Interessant erweist sich, dass sich im Gegensatz zur Peripherie die CCR6 Expression praktisch auf die CD25+ CD4SP Population beschränkt. Eine nahezu exklusive Ausprägung von einem Chemokinrezeptor auf Treg Vorläuferzellen konnte zuvor nur für CCR8 im Menschen beschrieben werden (212). Allerdings sind auch hier nicht alle humanen Thymozyten CCR8 positiv, sondern nur eine Subpopulation. Zwei weitere Beobachtungen

bezüglich der CCR6 Expression auf CD25+ Thymozyten sind besonders auffällig. Einerseits unterscheiden sich die CCR6 exprimierenden Treg von CCR6- CD25+ Treg im Thymus durch eine erhöhte CD8 Expression, welches sie im CD4 gegen CD8 FACS-Profil als eine klar abgegrenzte Population darstellt (siehe 3.4.1). Andererseits scheint die CCR6+ Population mit dem Alter der Mäuse anzuwachsen und erst in adulten Tieren voll ausgeprägt zu sein (siehe 3.4.1). Diese beiden Eigenschaften deuten auf eine entwicklungspezifische CCR6 Expression auf CD25+ Treg Vorläuferzellen hin. Dass die CCR6 Ausprägung fast ausschließlich auf CD25+ Thymozyten gefunden wird, unterstützt diese Vermutung. Aufgrund der vorwiegend intermediären CD8 Ausprägung von CCR6+ Thymozyten stellen diese Zellen daher möglicherweise ein Übergangsstadium zu voll ausgereiften CD25+ CD4SP Thymozyten dar, da dieses Kompartiment als transitionelle Population während der Thymus Reifung angesehen wird (150, 213). Die CCR6 Expression auf CD25+ Treg Vorläuferzellen ist daher möglicherweise nur transient und markiert einen bestimmten Abschnitt der Selektion von Treg Vorläuferzellen.

4.3.2 CCR6 identifiziert Thymozyten mit der höchsten Foxp3 Expression

Die Analyse der funktionellen Eigenschaften von CD25+ Treg Vorläuferzellen aus dem Thymus zeigt, dass die CCR6+ Fraktion besser supprimiert als die CCR6- Fraktion (siehe 3.4.2). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der erhöhten Foxp3 Expression, die über Realtime RT-PCR in der CCR6+ Population gemessen werden konnte (siehe 3.4.2). Die Analyse von Foxp3+ Zellen im Thymus zeigt, dass sich die Foxp3+ Population zu über 80% aus CD25+ Thymozyten zusammensetzt, wobei hiervon ca. 50% der Zellen den Chemokinrezeptor CCR6 ausprägen (siehe 3.4.2). Bei der detaillierte Analyse der Foxp3 Expression in Abhängigkeit von CD25 und CCR6 kann man jedoch feststellen, dass sich innerhalb der CD25^{high} CCR6- Population ein signifikanter Anteil von Foxp3 negativen Thymozyten findet (siehe 3.4.2). Diese Beobachtung kann die erfasste schlechtere Suppression erklären und weist eindeutig darauf hin, dass sich innerhalb der CCR6- Population aktivierte CD25+ Thymozyten befinden, die keine Treg Vorläuferzellen darstellen. Dieses gilt besonders für die CD25^{int} aber auch für die CD25^{high} Population, während die CCR6+ Zellen in beiden Fraktionen eine signifikant höhere Foxp3 Expression zeigen. Vor diesem Hintergrund kann man vermuten, dass eine CCR6 Expression im Thymus linear mit der Foxp3 und CD25 Expression im Zusammenhang steht. Da CCR6 jedoch nicht direkt wie zum Beispiel CD25 über Foxp3 induziert wird (siehe 4.2, Daten nicht gezeigt (45)), müssen andere Signale für die scheinbar assoziierte Expression verantwortlich sein, wobei

diese möglicherweise mit dem Reifungsprozess von Treg und somit indirekt mit einer Foxp3 Induktion verknüpft sind.

4.3.3 Die CCR6 Expression im Thymus scheint eine Vorstufe von reifen CD25+ Thymozyten zu charakterisieren

Die Spezifizierung von Treg erfolgt wahrscheinlich im Thymus-Cortex während des DP Stadiums von Thymozyten. Es konnte gezeigt werden, dass MHC II exprimierende radioresistente cortikale Thymusepithelzellen für die Generierung von Treg essentiell sind (171). Offensichtlich besteht aber auch die Notwendigkeit zur vollständigen Reifung von Treg in der Präsenz von medullären, hematopoetischen dendritischen Zellen, wobei der Einfluss hier nicht eindeutig ist und diskutiert wird (171, 214-216). Ausgehend von früheren Beobachtungen, dass die Generierung von CD25+ Treg im Thymus jedoch eine CD28 und B7 Expression oder eine CD40 und CD40L Expression benötigt, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die medullären DC eine zentrale Rolle bei der Reifung von Treg einnehmen, da die Expression an Kostimulatoren im Thymus auf diesen Zellen am höchsten ist (zur Übersicht siehe (217, 218)). Eine kürzlich erschienene Publikation vermutet, dass im Anschluss an die positive Selektion im Thymus-Cortex, die CD25+ Treg Vorläuferzellen maßgeblich auf antigenpräsentierenden Zellen mit Knochenmark-Ursprung in der Thymus-Medulla negativ selektioniert werden (213). Im Einklang mit diesen Beobachtungen steht, dass eine Foxp3 Expression fast ausschließlich in der Thymus-Medulla oder der cortiko-medullären Grenze anzutreffen ist (141). Da nahezu alle CCR6+ CD25+ Thymozyten Foxp3 exprimieren (siehe 3.4.2), ist es daher möglich, dass die CCR6+ Thymozyten das Übergangsstadium von DP Thymozyten zu CD4SP Thymozyten an der cortiko-medullären Grenze definieren. Demzufolge stellen diese Zellen möglicherweise gerade selektionierte Treg Vorläuferzellen dar.

Diese Vermutung wird durch den Phänotyp der CCR6+ Treg Vorläuferzellen unterstützt (siehe 3.4.3). CCR6+ CD8^{int} Treg Vorläuferzellen präsentieren einen aktivierten Phänotyp. Sie zeigen im Vergleich zu CD25+ CCR6- CD8- Thymozyten eine geringere CD45RB und CD62L Expression und eine höhere CD69, CD54, CD11a, CD44 und CD5 Expression. Einhergehend mit der intermediären CD8 Korezeptor Expression werden jedoch nur geringe Mengen an CD3 und TCR Komplex ausgeprägt, welches ein weiteres Indiz für den „semi-unreifen“ Status dieser Zellen ist. Daher mögen CCR6 exprimierende Zellen eine Übergangspopulation zu ausgereiften CD25+ CCR6- Treg Vorläuferzellen darstellen.

Interessant ist jedoch, dass die Treg charakteristischen Marker, wie zum Beispiel CTLA-4 und GITR als auch CD122, schon vollständig auf diesen Zellen ausgeprägt sind und sie sich unter diesem Gesichtspunkt nicht von den CCR6- Treg Vorläuferzellen unterscheiden (3.4.2 und 3.4.3). Die Expression dieser Moleküle scheint daher recht schnell mit der eigentlichen Spezifizierung von Treg einherzugehen.

Als initialer Schritt der Treg Entwicklung muss wahrscheinlich die Induktion von Foxp3 angesehen werden. Die Beobachtung der Foxp3 Expression auf den unterschiedlichen Populationen von Treg Vorläuferzellen stützt die o.g. Theorie. Neben der höchsten CD25 und Foxp3 Expression auf CCR6+ Thymozyten kann die Expression von CD103 nur auf CCR6+ Thymozyten ausgemacht werden. Da beide Moleküle, CD25 und CD103, von einer starken Foxp3 Expression induziert werden (45), erscheint es schlüssig, dass beide Moleküle durch die besonders hohe Foxp3 Expression auf CCR6+ Thymozyten stark exprimiert werden (siehe 4.3.2).

Welche Funktion hat die CCR6 Expression auf Treg Vorläuferzellen im Thymus? Möglicherweise werden CCR6+ Zellen über den Liganden CCL20 in ein bestimmtes Kompartiment herangeführt. Die Identifikation von CCL20 ausprägenden Zellen würde daher hilfreich sein, die Rolle von CCR6 während der thymalen Entwicklung von Treg aufzuklären. Eine interessante Studie über die vom Zytokin Oncostatin M (OM) induzierte extrathymale Entwicklung von T-Zellen im LN von transgenen OM Mäusen konnte ebenfalls eine hohe CCL20 Expression in den ektopisch induzierten Thymus ähnlichen LN feststellen (211). Die Tatsache, dass sogar in ektopisch induzierten, „primären“ lymphoiden Geweben mit Thymus-Funktion eine CCL20 Expression beobachtet werden kann, deutet darauf hin dass die CCL20 Expression essentiell für eine spezielle Funktion im Thymus ist (211). Da die CCR6 Expression im Thymus zum Großteil auf CD25+ Treg Vorläuferzellen beschränkt ist, scheint es daher möglich, dass CCL20 eine konservierte Rolle bei der Treg Entwicklung spielt. Erste Untersuchungen in humanen Thymi unterstützen diese Vermutung. Auch hier konnte eine ähnliche CCR6 Expression auf Thymozyten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung von CCR6^{-/-} Tieren (111) konnte jedoch keine offensichtlichen Störungen während der Entwicklung von Treg nachweisen (siehe 3.4.4). So zeigte sich die relative Anzahl von Treg in CCR6^{-/-} Mäusen im Thymus und in der Peripherie unverändert. Bei einer detaillierteren Untersuchung konnte auch kein Unterschied in der Foxp3 Expression von Treg im Thymus oder in der Peripherie festgestellt werden. Die Analyse ergab weiterhin keine signifikanten Veränderungen in der thymalen Expression von CD103 in CCR6 gendefizienten Mäusen (Daten nicht gezeigt), welches offensichtlich mit einer CCR6 Expression im Thymus

assoziiert ist (siehe 3.4.2). Auch in der Studie von Louis et al. konnten keine direkten Auswirkungen der CCR6-Gendefizienz bei der Entwicklung von T-Zellen in wt Tieren oder transgenen OM Tieren festgestellt werden, wobei jedoch in diesem Fall nicht CD25+ Treg im Speziellen untersucht wurden (211). Dass die Treg Zell Entwicklung in CCR6^{-/-} Tieren nicht gravierend gestört ist, steht ebenfalls im Einklang mit dem beobachteten Phänotyp von drei unabhängig generierten CCR6^{-/-} Mäusen (111, 135, 136).

Diese Beobachtungen können auf das folgende Szenario hindeuten: Die CCR6 Expression auf CD25+ Treg Vorläuferzellen vermittelt eine spezifische Interaktion mit CCL20 ausprägenden DC oder Thymusepithelzellen (211). Diese Interaktion organisiert einen Prozess nach der positiven Selektion im Cortex, vermutlich während der negativen Selektion von Treg Vorläuferzellen, welcher wahrscheinlich in der Medulla oder cortiko-medullären Grenze stattfindet.

Die CCL20-CCR6 vermittelte Interaktion würde in diesem Fall möglicherweise über das Repertoire von Treg entscheiden. Ein Prozess, der somit nur unter ganz spezifischen Konditionen im CCR6^{-/-} Tieren auffallen würde, welches den „normalen“ Treg Phänotyp in CCR6 gendefizienten Tieren erklären könnte (siehe 3.4.4). Weiterhin könnte dieses Modell mit der Beobachtung, dass sich die Anzahl von CCR6+ Zellen mit zunehmendem Alter erhöht, in Einklang gebracht werden (siehe 3.4.1). In diesem Fall könnte ein stetiges Einwandern von peripheren DC, beladen mit peripheren Autoantigenen, mit zunehmendem Alter eine Erhöhung der CCR6 exprimierenden Treg Vorläuferzellen hervorrufen, welche über diese Zellen einen Abschnitt ihrer Selektion passieren. Ein ähnlicher Prozess konnte tatsächlich schon beobachtet werden und wird derzeit diskutiert (214). Auch die Beobachtungen von Romagnoli et al. könnten ein solches Szenario unterstützen (213). Diese Studie konnte anhand von Trogozytose (Transfer von APC Membran-Determinanten auf T-Zellen) von MHC-II Molekülen auf Thymozyten zeigen, dass Treg Vorläuferzellen vornehmlich auf im Knochenmark entstandenen APC in der Thymus-Medulla negativ selektioniert werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die CD4+ CD8^{int} CD25+ Treg Vorläuferzellen, welche auch in dieser Studie als „semi-reife“ Population bezeichnet wurde, die Population definiert in der hauptsächlich die negative Selektion von Treg Vorläuferzellen auf BM APC stattfindet. CD4+ CD8^{int} CD25+ Treg Vorläuferzellen zeigten die höchste MHC-II Trogozytose, welches ein Aktivierungs- und von der TCR Avidität abhängiger Prozess ist. Da CCR6+ Treg Vorläuferzellen vornehmlich intermediäre Mengen an CD8 ausprägen, wäre es daher denkbar, dass diese Zellen Thymozyten darstellen, welche auf BM

APC selektioniert werden und eine hohe Avidität für bestimmte Antigene zeigen. Als Folgerung dieser Vermutung sollte daher in $CCR6^{-/-}$ Mäusen ein breiteres Repertoire an autoreaktiven Treg vorherrschen, da möglicherweise die CCL20 vermittelte Interaktion der negativen Selektion an BM APC nicht stattfinden kann.

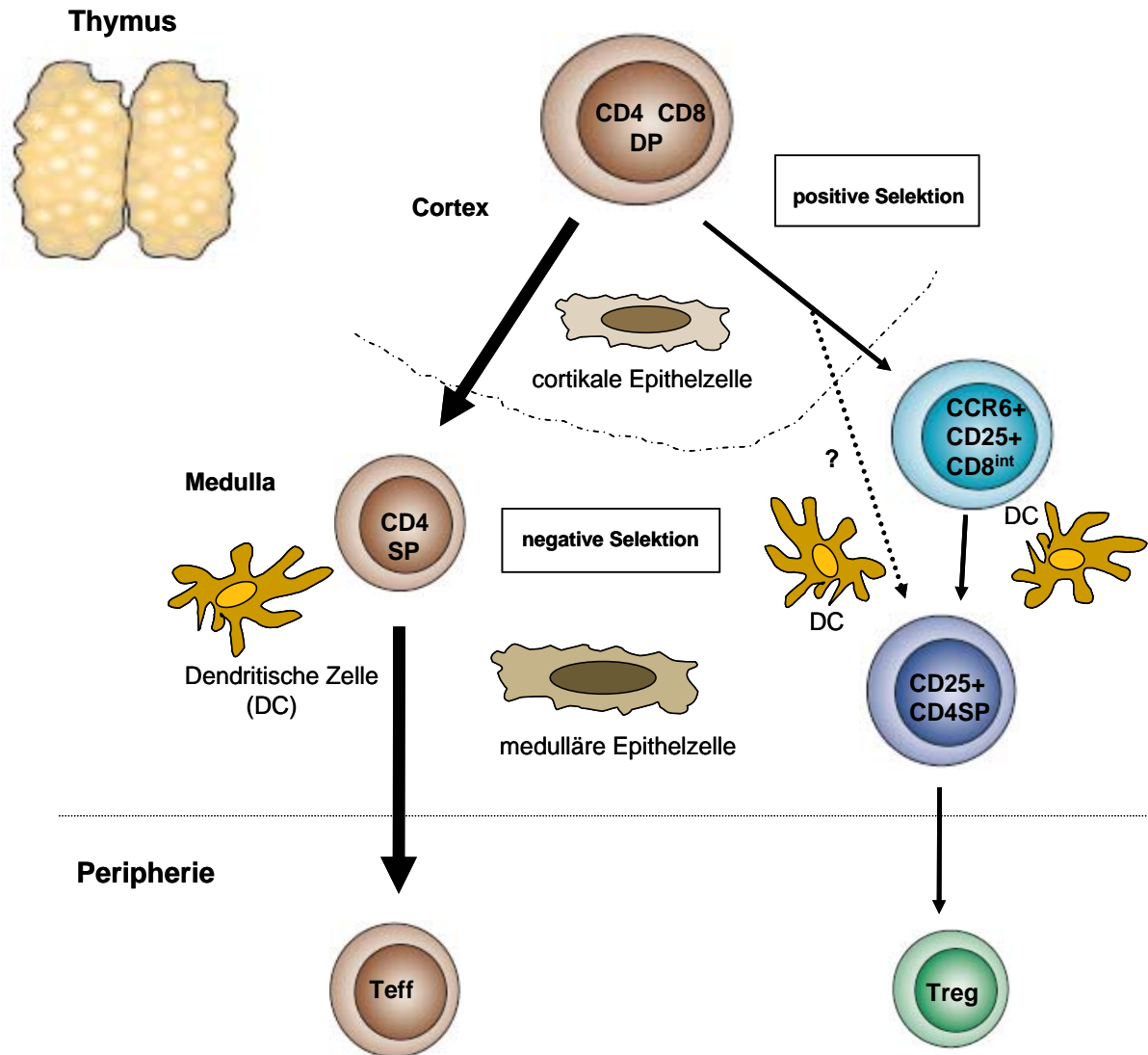


Abbildung 52: Schematische Darstellung der Treg Entwicklung im Thymus. Die Abbildung zeigt schematisch ein Modell für die Entwicklung von Treg und Teff Vorläuferzellen unter Einbeziehung der CCR6⁺ Treg Vorläuferzellen. DP: doppelpositiv, SP: einzelpositiv, int: intermediär. Die Pfeile deuten die möglichen Entwicklungsrouten der Thymozyten im Thymus an. Erklärung siehe Text (4.3.3).

Zur Klärung der Funktion der CCR6 Ausprägung auf CD25⁺ Thymozyten bedarf es daher eindeutig weiterer Experimente. So könnte zum Beispiel über BrdU Markierungen oder über eine Markierung von Thymozyten mittels intrathymaler Injektion von Fluoresceinisothiocyanat (Fitc) (zur Übersicht siehe (219)) oder anhand adoptiver

Zelltransfer-Modelle möglicherweise der Zusammenhang von CCR6+ und CCR6- Thymozyten genauer aufgeklärt werden. Weiterhin könnte über eine TCR Repertoireanalyse von CD25+ Treg Vorläuferzellen aus CCR6 gendefizienten Mäusen überprüft werden, ob die o.g. Theorie zutreffend ist.

Abbildung 52 stellt die vermutete Rolle der CCR6+ Thymozyten während der Entwicklung von Treg Zellen im Thymus dar. Das gezeigte Modell scheint anhand des Phänotyps, der Funktionalität von CCR6+ CD25+ Thymozyten und aufgrund von Beobachtungen bezüglich der CD25+ CD8^{int} Population in unabhängigen Studien (141, 150, 213, 215, 220) am wahrscheinlichsten zu sein (s.o.). Ob allerdings nur ein Teil oder alle der CD25+ Thymozyten dieses Stadium durchlaufen müssen, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Dass die CCR6+ CD25+ Thymozyten lediglich Immigranten von reifen T_{REM} aus der Peripherie darstellen oder im CD8^{int} Stadium den Thymus direkt verlassen können, kann aufgrund des unterschiedlichen Phänotyps zu peripher induzierten T_{REM} (siehe 4.2) mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine CCR6 Expression auf Thymozyten ein transients, vom Reifungsgrad abhängiger Prozess ist, welcher möglicherweise eine spezielle CCL20-CCR6 vermittelte Lokalisation im Laufe der Treg Reifung vermittelt.

4.4 Zusammenfassung der Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit charakterisieren eine neue Subpopulation von CD25+ natürlichen regulatorischen T-Zellen in der Maus und im Menschen. Eine komparative Genexpressionsanalyse zwischen CD25+ Treg und CD25- Effektor T-Zellen konnte neben zahlreichen anderen Genen den Chemokinrezeptor CCR6 als eines der am höchsten deregulierten Transkripte zwischen beiden Populationen identifizieren. Die Überexpression von CCR6 auf Treg konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Eine detaillierte Analyse ergab, dass die CCR6 Expression eine Subpopulation von Treg definiert, welche offensichtlich nach Antigenkontakt und im Beisein weiterer unbekannter Faktoren *in vivo* induziert werden kann. Die CCR6+ Treg Population zeigt alle typischen Treg Marker aber zusätzlich einen spezifischen Effektor-Gedächtniszell ähnlichen Phänotyp. Da diese Population neben dem Phänotyp weiterhin typische Eigenschaften wie zum Beispiel eine hohe Proliferationsrate und verstärkte Zytokin Sekretion nach wiederholtem Antigenkontakt, von

konventionellen Effektor-Gedächtniszellen besitzt, werden diese Zellen als Effektor-Gedächtniszell ähnliche regulatorische T-Zellen (T_{REM}) bezeichnet. Einhergehend mit dem Phänotyp unterscheiden sich T_{REM} von CCR6- Treg auch funktionell. CCR6+ T_{REM} akkumulieren vornehmlich im entzündeten Gewebe und können neben der Zellkontakt vermittelten Suppression zusätzlich das tolerogene Milieu wahrscheinlich über eine IL-10 Sekretion oder über eine Aktivierung von IDO in dendritischen Zellen verstärken. Somit scheinen CCR6+ T_{REM} eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Immunreaktionen direkt im entzündeten Gewebe zu übernehmen. Diese Rolle wird wahrscheinlich durch die Balance von T_{REM} zur antagonistischen T_{EM} Population gesteuert, welches wiederum zusätzlich über eine spezifische Adhäsionsmolekül Expression kodiert werden kann.

Eine zur Maus analoge T_{REM} Population konnte auch im Menschen identifiziert werden. Während in der Maus jedoch möglicherweise die spezifische Expression von CD103 eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der T_{REM} spezifischen Migration einnimmt, scheint im Menschen hier die differentielle Expression von VLA-4 und CLA zwischen CCR6+ T_{EM} und T_{REM} entscheidend zu sein. Die Identifizierung von T_{REM} erlaubt daher erstmals eine von der Spezies unabhängige Klassifizierung einer Treg Subpopulation anhand der peripheren Expression vom Chemokinrezeptor CCR6. Diese Erkenntnis scheint für das weitere Verständnis von Treg essentiell zu sein, da die Erfassung von CD25+ Treg nicht als eine homogene, sondern als heterogene Population möglicherweise viele zuvor gemachte konträre Ergebnisse, wie zum Beispiel eine IL-10 Abhängigkeit von Treg nur in bestimmten *in vivo* Modellen, erklären kann. Zudem eröffnet die Identifizierung von CCR6+ T_{REM} in der Maus und im Menschen auch ein enormes Potential für zukünftige klinische Anwendungen, die auf eine Manipulation von Treg während einer Immunreaktion abzielen, da insbesondere diese Population *in vivo* eine größere Leistungsfähigkeit im Vergleich zu konventionellen Treg zu haben scheint und die Identifizierung der differentiellen Adhäsionsmolekül-Expression erstmals eine gezielte Steuerung von Treg erlaubt.

Die Untersuchungen zur Thymus gesteuerten Entwicklung von CD25+ natürlichen regulatorischen T-Zellen zeigen, dass auch die Entwicklung von Treg Vorläuferzellen weitaus komplexer ist als bisher angenommen. Auch während der Thymus gesteuerten Entwicklung von Treg konnte eine Expression des Chemokinrezeptors CCR6 auf einer spezifischen Treg Population nachgewiesen werden, die offensichtlich ein bestimmtes Reifestadium von Treg Vorläuferzellen beschreibt und somit vermutlich nur transient ist. Obwohl die hier vorgestellten Daten bei weitem nicht ausreichen, um die Relevanz von CCR6+ CD8^{int} CD4+ Treg Vorläuferzellen für die Entwicklung von Treg vollständig aufzuklären, zeigen diese

Ergebnisse jedoch, dass die thymale Entwicklung von Treg auch in unterschiedlichen Stufen zu verlaufen scheint und u.a. auch durch zeitliche Faktoren, abhängig vom Alter der Tiere, geprägt wird. Die im Thymus identifizierten CCR6+ CD8^{int} Treg Zellen zeigen die höchste Foxp3 Expression und einen typischen aktivierten „semi-reifen“ Phänotyp, während sie funktionell schon voll ausgereift zu sein scheinen. Möglicherweise bezeichnet die CCR6 Expression auf Treg Vorläuferzellen ein Stadium, welches im Zusammenhang mit der negativen Selektion von Treg an dendritischen Zellen in der Medulla steht. Aufgrund dieser Erkenntnis kann das Heranziehen von CCR6 zusätzlich zur CD25 Expression für zukünftige Studien mit Treg Vorläuferzellen hilfreich sein, tatsächlich Foxp3+ Treg Vorläuferzellen zu isolieren, da die Beschränkung auf CD25 nur die Analyse einer Mischpopulation erlaubt. Zur genauen Klärung dieser Frage und der genauen Rolle der CCR6 Expression für die Entwicklung von Treg Vorläuferzellen im Thymus bedarf es aber definitiv weiterer Experimente.

4.5 Ausblick

Die „Wiederentdeckung“ von regulatorischen oder Suppressor T-Zellen hat seit dem Ende der 90er Jahre die immunologische Denkweise über periphere Toleranzmechanismen grundlegend beeinflusst. CD25+ natürliche regulatorische T-Zellen (Treg) sind die bisher am besten verstandenen CD4+ T-Zellen mit regulatorischen Potential, wobei die meisten Arbeiten hierzu erst in den letzten fünf Jahren erschienen sind. Treg scheinen besonders attraktiv, da die mögliche Kontrolle von diesen Zellen neue Ansätze zur Bekämpfung von Autoimmunkrankheiten oder Krebs eröffnen könnte.

Für das Studium und die Entwicklung von zukünftigen Therapien ist allerdings die Verfügbarkeit eines geeigneten Tiermodells essentiell. Es hat sich gezeigt, dass die Arbeiten in der Maus auch unter diesem Aspekt, zur Erforschung von peripherer Toleranz, durchaus zu großen Teilen auf das humane Immunsystem übertragbar sind. Allerdings kann unter anderem mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass trotzdem nicht alle Aspekte von CD25+ Treg aus Mäusen auf den Menschen übertragen werden können. So zeigt zum Beispiel die unterschiedliche Expression der Adhäsionsmoleküle oder von Neuropilin-1 auf murinen CD25+ Treg im Vergleich zu humanen CD25^{high} Treg, dass Erkenntnisse aus dem Mausmodell kritisch im humanen Modell validiert werden müssen. Allein die Tatsache, dass

auch die Foxp3 Expression zwischen beiden Spezies scheinbar unterschiedlich reguliert ist, unterstreicht diesen Aspekt (221).

Diese Studie hat versucht, die in der Maus gewonnen Erkenntnisse direkt im humanen Modell zu validieren. Ausgehend von diesem Ansatz, kann im Falle von der CCR6 Expression auf murinen Treg und auf humanen CD25^{high} Treg tatsächlich davon ausgegangen werden, dass die Expression des Chemokinrezeptors analoge Subpopulationen von Effektor-Gedächtniszell ähnlichen Treg in beiden Spezies definiert. Obwohl auch hier noch Unterschiede, zum Beispiel in der Integrin Expression evaluiert wurden, liefert diese Beobachtung jedoch wichtige Erkenntnisse, die möglicherweise für zukünftige Anwendungen, welche auf eine Manipulation des Migrationsverhaltens zur selektiven Steuerung von Treg abzielen, essentiell erscheinen. So kann aufgrund dieser Studie davon ausgegangen werden, dass die Steuerung von Treg durchaus komplizierter ist als von einigen früheren Studien vermutet. Offensichtlich scheint eine Interferenz mit der Chemokin–Chemokinrezeptor Achse nicht auszureichen, wie zum Beispiel für CCR4 in einer Studie mit humanen Ovarialkarzinomen suggeriert wird (103). Alle bisher untersuchten Chemokinrezeptoren werden offensichtlich auch häufig von Teilen der Effektorzellen ausgeprägt, so dass der Schlüssel zur selektiven Steuerung wahrscheinlich in einer zusätzlichen Manipulation der Adhäsionsmoleküle liegt.

Weiterhin belegt diese Studie im Schwerpunkt die Ansicht, neben wenigen anderen kürzlich erschienenen Publikationen (siehe 4.2.1), dass CD25+ Treg Zellen nur über einen Ansatz verstanden werden können, der CD25+ Treg nicht als einheitliche, sondern vielmehr als eine heterogene Population begreift.

So scheint auch für zukünftige Studien, welche auf eine Treg Vakzinierung abzielen, die Population von Effektor-Gedächtniszell ähnlichen Treg und deren effiziente Induktion besonders entscheidend zu sein. Aufbauend auf dieser Arbeit, können daher zukünftige Studien möglicherweise neue Erkenntnisse liefern, die ein besseres Verständnis von Treg im Mausmodell und im Menschen ermöglichen und somit den Grundstein für zukünftige klinische Anwendungen von Treg eröffnen.