

**Aus dem Centrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie
Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin
Direktor: Prof. Dr. Andreas Radbruch**

Habilitationsschrift

**Untersuchungen zur Induktion suppressorischer T-Zellen und zur Regulation ihrer
Effektorfunktion**

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Immunologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. rer. nat. Alexander Scheffold

geboren am 15.5.1966 in Schwäbisch Gmünd

eingereicht: April 2007

Öffentlicher Vortrag: 16. Juli 2008

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Hünic

2. Gutachter: Prof. Dr. Edgar Schmitt

1. EINLEITUNG	3
1.1 SUPPRESSORISCHE ZELLEN ALS TEIL DER PERIPHEREN TOLERANZMECHANISMEN	3
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ regulatorische T-Zellen	4
Mechanismen der Treg-vermittelten Immunsuppression.....	5
Weitere suppressive T-Zellpopulationen	7
Spezialisierte Treg-Subpopulationen.....	7
1.2 DIE ROLLE DES NOTCH-SIGNALWEGES FÜR DIE GENERIERUNG SUPPRESSORISCHER T-ZELLEN	8
1.3 INDUKTION SUPPRESSORISCHER T-ZELLEN IN DER PERIPHERIE	11
Die Rolle der Darmmukosa-assoziierten Lymphknoten für die orale Toleranzinduktion	12
Organe und APC-Populationen, die an der oralen Toleranzinduktion beteiligt sind	14
2. EIGENE ARBEITEN	16
2.1 IL-2 INDUZIERT IL-10 IN CD4 ⁺ CD25 ⁺ TREG UND AKTIVIERT DIE SUPPRESSIVE AKTIVITÄT.....	17
2.2 CHARAKTERISIERUNG FUNKTIONELL DEFINIERTER TREG-SUBPOPULATIONEN	27
2.3 DIE REGULATION DER AKTIVITÄT CD4 ⁺ CD25 ⁺ REGULATORISCHER T-ZELLEN.....	45
2.4 IDENTIFIZIERUNG VON MEMBRAN-GEBUNDENEM IFN- γ UND IL-10	52
2.5 BEEINFLUSSUNG DER T-ZELLAKTIVIERUNG DURCH NOTCH-LIGANDEN	57
2.6 SENSITIVE VISUALISIERUNG DER PEPTID-PRÄSENTATION <i>EX VIVO</i> UND <i>IN VITRO</i>	67
2.7 PRÄSENTATION ORAL APPLIZIERTER ANTIGENE UND DIE ROLLE DER PEYERSCHEN PLAQUES FÜR DIE ANTIGENAUFNAHME	76
3. DISKUSSION	87
3.1 REGULATION DER EFFEKTORFUNKTION SUPPRESSORISCHER T-ZELLPOPULATIONEN	87
Die therapeutische Bedeutung suppressorischer T-Zellpopulationen	87
IL-2 reguliert die Homöostase der CD25 ⁺ Treg.....	87
Suppression in vitro: Konkurrenz um IL-2 oder alternative Mechanismen?	89
Suppression durch Zell-Zell-Kontakt oder lokale Zytokineffekte	90
Bedeutung der in vivo Konkurrenz um IL-2 für die Treg-Funktion?	92
Zytokininduktion und Zytokinedächtnis in Treg versus konventionellen T-Zellen.....	93
Zweistufenmodell der Regulation der Treg-Aktivierung durch IL-2.....	94
Implikationen für die Immuntherapie mit IL-2.....	95
Treg-Subpopulationen mit definierten funktionellen Charakteristika.....	96
Identifizierung Zellmembran-gebundener Zytokine	96
Membran-gebundene Zytokine als spezifische Marker funktioneller Subpopulationen.....	97
Identifizierung von Treg-Subpopulationen mit definiertem Phänotyp	98

Das Migrationspotential als ein kritischer Parameter der Suppression <i>in vivo</i>	99
Zusätzliche Parameter, die die <i>in vivo</i> Suppression durch $\alpha_E\beta_7^+$ Treg beeinflussen könnten.....	99
Die Regulation der Treg-Aktivität erfolgt auf verschiedenen Ebenen.....	100
3.2 INDUKTION SUPPRESSORISCHER T-ZELLEN IN DER PERIPHERIE	101
Die Modulation der T-Zellaktivierung durch Notch/Notch-Ligand-Interaktion.....	101
Die Rolle von Notch für T-Zellaktivierung/Differenzierung.....	102
Differenzielle Beeinflussung der T-Zellaktivierung durch verschiedene Notch-Liganden.....	104
Alternative Notch-Signalwege.....	105
Von der Modulation des T-Zellrezeptorsignals zur Regulation der T-Zelldifferenzierung	106
3.3 ANTIGEN-PRÄSENTIERENDE ZELLEN BEI DER INDUKTION SUPPRESSIVER T-ZELLEN <i>IN VIVO</i>	107
Antigen-präsentierende Zellen bei der Induktion oraler Toleranz.....	107
Spezifische Eigenschaften der DC der mLK	109
4. ZUSAMMENFASSUNG	111
5. LITERATUR.....	113

1. Einleitung

Das Immunsystem höherer Vertebraten zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, gegen Pathogene spezifische Abwehrreaktionen zu entwickeln, die durch hohe Antigenselektivität sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gekennzeichnet sind. Die zelluläre Basis dieser so genannten „adaptiven Immunität“, sind die B- und T-Lymphozyten. Jeder einzelne T- und B-Lymphozyt trägt Antigenrezeptoren einer einzigen Spezifität. Eine große Bandbreite verschiedener Spezifitäten wird dadurch erzeugt, dass die Gene der Antigenrezeptoren während der Lymphozytenentwicklung durch zufällige Zusammenlagerung verschiedener Gensegmente mittels somatischer Rekombination gebildet werden. Aufgrund der zufälligen Zusammensetzung der Rezeptorgene bilden sich häufig Rezeptoren, die körpereigene Strukturen, d.h. Autoantigene, erkennen und damit eine potentielle Gefährdung darstellen. Um Reaktionen gegen „Selbst“ zu verhindern, existieren aktive und passive Mechanismen, die autoreaktive Zellen eliminieren oder unter Kontrolle halten. Auch Immunreaktionen gegen harmlose Fremdartigene, wie Nahrungsmittel oder andere Substanzen, mit denen wir tagtäglich in Kontakt kommen, werden so verhindert. Ein Versagen dieser Toleranzmechanismen kann Ursache schwerer Autoimmunkrankheiten, wie Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose oder Diabetes beziehungsweise von Hypersensibilitäten, wie Allergien gegen Nahrungsmittel oder Pflanzenpollen, sein.

Aktive Toleranzmechanismen, die unerwünschte oder überschießende Immunreaktionen unterdrücken oder begrenzen können, sind von hohem therapeutischem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie und wo suppressorische Zellen *in vivo* induziert werden, welche Mechanismen für die Suppression bestimmter Immunreaktionen wichtig sind und wie die suppressive Funktion aktiviert werden kann.

1.1 Suppressorische Zellen als Teil der peripheren Toleranzmechanismen

Es können zwei Formen der Toleranzinduktion unterschieden werden. Die zentrale Toleranz wird durch Eliminierung autoreaktiver Lymphozyten während ihrer Ontogenese in den primären lymphoiden Organen – Knochenmark (B-Zellen) und Thymus (T-Zellen) – erreicht. Autoreaktive Zellen, die der zentralen Toleranzinduktion entkommen sind, und Zellen, die harmlose Fremdartigene erkennen, können auch in der Peripherie ausgeschaltet werden. Bei dieser „peripheren“ Toleranzinduktion werden Lymphozyten, die mit ihrem Antigen in Kontakt kommen, eliminiert oder funktionell inaktiviert (anergisiert). Oder es wird ihre Differenzierung in so genannte regulatorische oder suppressorische Zellen induziert. Suppressorische Zellen sind in der Lage, Immunreaktionen aktiv zu unterdrücken und stellen

damit eine zusätzliche Ebene der Protektion gegen autoreaktive Zellen in der Peripherie dar. Periphere Toleranzmechanismen sind nicht auf Autoantigene beschränkt, sondern können prinzipiell bei allen Antigenen wirksam werden. Sie verhindern so unerwünschte Immunreaktionen gegen harmlose Antigene aus unserer Umwelt.

Die Entscheidung darüber, ob bei Antigenkontakt in der Peripherie eine aktive Immunreaktion ausgelöst wird oder ob einer der verschiedenen Toleranzmechanismen aktiv wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Hierzu gehören die Art und der Aktivierungszustand der Antigen-präsentierenden Zelle und der ko-stimulatorischen Signale sowie Zeitdauer und Stärke des Antigenkontakts. Die genauen Bedingungen, unter denen periphere Toleranz und insbesondere die Generierung suppressorischer Zellen erreicht wird, sind nicht eindeutig geklärt, obwohl dies bedeutendes therapeutisches Potential für verschiedenste Immunerkrankungen besitzt - etwa bei Autoimmunität, Allergien oder chronische Entzündungen.

Es konnte vor Kurzem auch gezeigt werden, dass zusätzlich zu der Induktion in der Peripherie bereits im Thymus T-Zellen mit suppressorischer Aktivität als Teil der physiologischen CD4⁺ T-Helferzellpopulation entstehen. Diese so genannten regulatorischen T-Zellen (Treg) sind durch konstitutive Expression des IL-2-Rezeptors (CD25, IL-2-Rezeptor α -Kette) sowie des Transkriptionsfaktors Foxp3 gekennzeichnet. Treg spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz sowie bei der Kontrolle verschiedener Immunreaktionen. Ob und wie sie auch außerhalb des Thymus in der Peripherie gebildet werden, ist nicht vollständig geklärt.

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen

CD25⁺ Treg [Übersicht in (Sakaguchi, 2004)] bilden ca. 10% der physiologischen CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie. Die Bedeutung der CD25⁺ Treg für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz wurde durch adoptiven Transfer von CD4⁺ T-Zellen in lymphopenische Mäuse gezeigt. Werden die CD25⁺ Zellen vor Transfer der CD4⁺ T-Zellen depletiert, kommt es zur Ausbildung verschiedenster Autoimmunkrankheiten, was durch Kotransfer von CD25⁺ Treg verhindert werden kann (Sakaguchi, 2004). Mittlerweile wurde die Rolle der CD25⁺ Treg sowohl für die Aufrechterhaltung der Toleranz als auch für die Kontrolle normaler Immunantworten, z.B. gegen Infektionen oder Tumore, in vielen verschiedenen Modellsystemen belegt. Mit Foxp3 konnte ein Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der die Bedingungen für einen Linien-spezifischen Differenzierungs-Kontrollfaktor erfüllt [Übersicht in (Kim and Rudensky, 2006)]. Ektopische Expression von Foxp3 in naiven T-

Zellen induziert T-Zellen mit regulatorischem Phänotyp und Funktion (Fontenot et al., 2003; Fontenot et al., 2005; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003). Mäuse, bei denen der Transkriptionsfaktor Foxp3 in allen Körperzellen oder selektiv in CD4⁺ T-Zellen durch eine genetische Mutation inaktiviert ist, besitzen keine Treg und entwickeln verschiedene Autoimmunkrankheiten (Brunkow et al., 2001; Fontenot et al., 2003; Fontenot et al., 2005; Hori et al., 2003). Patienten mit IPEX-Syndrom, das durch die Entwicklung verschiedener Autoimmunkrankheiten gekennzeichnet ist, weisen ebenfalls eine Mutation im Foxp3-Gen auf (Bennett et al., 2001; Wildin et al., 2001).

Unter welchen Bedingungen die Expression von Foxp3 im Thymus und eventuell auch in der Peripherie induziert werden kann, ist nicht genau definiert. Die Spezifität des T-Zellrezeptors scheint eine Rolle zu spielen, da es Hinweise darauf gibt, dass im Thymus generierte Foxp3⁺ Treg hohe Affinität für Autoantigene besitzen (Hsieh et al., 2004; Hsieh et al., 2006; Jordan et al., 2001). Derzeit ist unklar, ob dies die Folge einer T-Zellrezeptor-vermittelten Foxp3-Induktion oder der Selektion von Foxp3⁺ Zellen ist (Hsieh et al., 2006; van Santen et al., 2004). Hochaffine, autoreaktive CD25⁺ Treg könnten als eine Art Puffer dienen, die die Aktivierung von konventionellen autoreaktiven T-Zellen kontrollieren, die geringere Affinität für Selbstantigene besitzen. Es gibt Hinweise darauf, dass Treg auch gegen exogene Antigene reagieren (Suffia et al., 2006) und in der Peripherie auch aus naiven Foxp3-negativen T-Zellen generiert werden können (Apostolou et al., 2002; Apostolou and von Boehmer, 2004; Knoechel et al., 2005; Kretschmer et al., 2005). Welche Rolle die Spezifität der Treg bei der Kontrolle pathologischer, aber auch protektiver Immunantworten spielt, ist noch nicht eindeutig geklärt.

Mechanismen der Treg-vermittelten Immunsuppression

CD25⁺ Treg besitzen große Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Toleranz sowie der Kontrolle verschiedener Immunreaktionen. Dennoch sind weder die Mechanismen noch die eigentlichen Zielzellen der Suppression bekannt [Übersicht in (von Boehmer, 2005)]. Die Suppression erfordert die Aktivierung der Treg über den T-Zellrezeptor (Thornton and Shevach, 1998; Thornton and Shevach, 2000). Zusätzlich kann die suppressive Aktivität durch Ko-Stimulation, beispielsweise über IL-2, stark erhöht werden (de la Rosa et al., 2004; Takahashi et al., 1998; Thornton et al., 2004). Derzeit besteht erhebliche Divergenz bei den postulierten Suppressionsmechanismen, da in verschiedenen Modellsystemen jeweils unterschiedliche Faktoren relevant werden. Prinzipiell können drei verschiedene Mechanismen unterschieden werden: Die Vermittlung eines negativen Signals an die Zielzelle

kann über einen löslichen Faktor oder in einem Zellkontakt-abhängigen Schritt über einen Membran-gebundenen Liganden erfolgen. Ein dritte Möglichkeit ist die Konkurrenz um Wachstums- oder Aktivierungssignale.

In vitro Untersuchungen zeigen, dass Treg die Proliferation von CD25⁻ Zielzellen inhibieren können (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Die Unterdrückung der Proliferation ist dabei wahrscheinlich das indirekte Resultat der Suppression der IL-2-Produktion (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Bisher konnte kein suppressives Molekül definiert werden, das alle Treg-vermittelten Effekte erklären könnte. Kandidatenzytokine wie IL-10 oder TGF- β scheinen *in vitro* keine Rolle zu spielen [Übersicht in (Shevach, 2002)]. Durch räumliche Trennung von Treg und Zielzellen, wobei nur der Austausch löslicher Mediatoren ermöglicht wird, wird die Suppression aufgehoben. Dies zeigt, dass die *in vitro* Suppression durch lokale Zytokinwirkung oder möglicherweise auch über direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt wird.

Wir haben die Möglichkeit einer Konkurrenz um den *in vitro* essentiellen T-Zellwachstumsfaktor IL-2 untersucht [(de la Rosa et al., 2004; Scheffold et al., 2005) und Busse *et al.* Manuskript eingereicht]. Da Treg den hochaffinen IL-2-Rezeptor konstitutiv exprimieren, verfügen sie über einen kompetitiven Vorteil gegenüber den IL-2-Rezeptor-negativen Zielzellen. Als zweite wichtige Voraussetzung für Konkurrenz produzieren Treg selbst kein IL-2. Beides wahrscheinlich aufgrund einer inversen transkriptionellen Regulation der IL-2 bzw. CD25 Expression durch den gleichen NFAT/Foxp3-Komplex (Wu et al., 2006). Unsere Arbeiten zeigen, dass Konkurrenz um IL-2 tatsächlich stattfindet und *in vitro* einen effektiven Suppressionsmechanismus darstellt (de la Rosa et al., 2004; Scheffold et al., 2005).

Inwieweit die *in vitro* Ergebnisse einer direkten Suppression der IL-2-Produktion und Proliferation der CD25⁻ T-Zellen auf die Situation *in vivo* übertragbar sind, ist derzeit unklar.

In verschiedenen *in vivo* Modellen sind die immunsuppressiven Zytokine TGF- β und IL-10 für den suppressiven Effekt erforderlich [Übersicht in (Suri-Payer and Fritzsche, 2006)]. Dabei ist nicht klar, ob die Suppression der T-Zellreaktion *in vivo* direkt oder indirekt erfolgt, z. B. über die Beeinflussung der Antigen-präsentierenden Zellen.

Diese Diskrepanz ist wohl unter anderem durch die unterschiedliche Rolle von IL-2 für die T-Zellproliferation *in vitro* und *in vivo* begründet [Übersicht in (Malek, 2003)]. IL-2 scheint *in vivo* kein essentieller Wachstumsfaktor für T-Zellen zu sein. Damit ist auszuschließen, dass die Abschaltung der IL-2-Produktion in den Zielzellen ein entscheidender Suppressionsparameter ist und dass Suppression durch Konkurrenz um IL-2 stattfindet. *In*

in vivo scheint IL-2 hauptsächlich für das Überleben von Treg notwendig zu sein. Mäuse, bei denen IL-2, einzelne Ketten des IL-2-Rezeptors oder Teile der IL-2-Rezeptorsignaltransduktionskette (STAT5) genetisch inaktiviert wurden, haben keine Treg, oder ihre Frequenz ist reduziert (Almeida et al., 2002; Antov et al., 2003; Malek et al., 2002; Papiernik et al., 1998; Snow et al., 2003). Diese Mäuse weisen verschiedene Zeichen von Autoimmunität und Immunüberaktivierung auf (Sadlack et al., 1995; Sadlack et al., 1993; Suzuki et al., 1995; Willerford et al., 1995). Unsere Arbeiten zeigen, dass IL-2 nicht nur für die Treg-Homöostase verantwortlich ist, sondern auch die suppressorische Aktivität reguliert (de la Rosa et al., 2004; Scheffold et al., 2005).

Weitere suppressive T-Zellpopulationen

In verschiedenen Systemen wurden eine ganze Reihe von T-Zellen oder B-Zellen mit suppressiven Eigenschaften beschrieben, die zum Beispiel durch tolerogene Antigenapplikationsformen induziert wurden. Die prominentesten sind Tr1-Zellen, die durch Produktion von IL-10 und zum Teil TGF- β [Übersicht in (Roncarolo et al., 2006)] charakterisiert sind, sowie die TGF- β -produzierenden Th3-Zellen, die beispielsweise durch orale Antigenapplikation induziert werden [Übersicht in (Weiner, 1997), Details siehe unten]. Im Gegensatz zu den im Thymus generierten Foxp3⁺CD25⁺ Treg konnte bei diesen Zellen bislang kein distinkter linienspezifischer Transkriptionsfaktor oder ein anderer spezifischer Marker identifiziert werden. Daher sind die Definitionen unscharf, und es ist unklar, ob es sich um jeweils getrennte Linien und stabile Differenzierungszustände oder überlappende Populationen mit möglicherweise wechselnden Aktivierungsstufen handelt. Die Identifizierung erfolgt weitgehend über die Produktion suppressiver Faktoren wie IL-10 oder TGF- β . Oder über die funktionelle Charakterisierung *in vitro* oder *in vivo*. Aufgrund der unklaren Definition der Zellen sind auch die induktiven Signale sowie die Stabilität des Phänotyps unbekannt. Beides sind aber unabdingbare Voraussetzungen für gezielte therapeutische Anwendungen. Daher ist es notwendig, definierte Subpopulationen direkt anhand der relevanten Effektormoleküle zu isolieren und deren Funktion und Differenzierungszustand zu überprüfen.

Spezialisierte Treg-Subpopulationen

Da Foxp3⁺ Treg aber auch andere T-Zellen mit suppressivem Potential an die Kontrolle verschiedenster Immunreaktionen beteiligt sind, stellt sich die Frage, ob Subpopulationen mit

spezialisierten Eigenschaften definiert werden können. So besteht die Möglichkeit, dass Treg ähnlich wie konventionelle T-Zellen nach Verlassen des Thymus bei Antigenkontakt in der Peripherie weitere Differenzierungsschritte durchlaufen und dabei die Fähigkeit erwerben, zusätzliche Effektorfunktionen auszuüben. Solche Subpopulationen ließen sich am besten über die relevanten Effektormoleküle identifizieren, die für eine bestimmte Funktion erforderlich sind. Wir konnten zeigen, dass IL-2 in einem Teil der Treg die Produktion von IL-10 induziert (de la Rosa et al., 2004). Ob diese Subpopulation spezielles suppressives Potential hat, ist Gegenstand künftiger Untersuchungen. Treg lassen sich außerdem aufgrund weiterer phänotypischer Parameter in mehrere Subpopulationen untergliedern. Bei den meisten untersuchten Subpopulationen ergaben sich jedoch *in vitro* keine Unterschiede im suppressorischen Potential. Ob Treg, die bestimmte Zytokine produzieren, *in vivo* ein erhöhtes Suppressionspotential besitzen, ist nicht bekannt. Wir konnten in Kooperation mit den Arbeitsgruppen Hamann und Hühn, HU-Charité Berlin, neue Treg-Subpopulationen beschreiben, die durch die Expression des Integrins $\alpha_E\beta_7$ charakterisiert sind. Diese Populationen weisen sowohl phänotypische als auch funktionelle Unterschiede *in vitro* und *in vivo* auf (Huehn et al., 2004; Lehmann et al., 2002).

Wie oben besprochen, existieren neben den CD25⁺ Treg andere T-Zellpopulationen, die suppressorische Eigenschaften aufweisen und die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aus naiven T-Zellen induziert werden können. Diese Zellen können derzeit nicht durch phänotypische Marker charakterisiert werden, sondern werden über die suppressorischen Effektormoleküle wie IL-10 oder TGF- β definiert. In Vorarbeiten haben wir mittels einer von uns entwickelten sensitiven Immunfluoreszenztechnik den Nachweis erbracht, dass IL-10-produzierende Zellen auch eine Oberflächen-gebundene Form dieses Zytokins exprimieren (Scheffold et al., 2000). Derzeit ist unklar, welche Funktion diese Oberflächenform hat. Mit der Membran-ständigen Form von IL-10 steht aber erstmals ein natürlicher Parameter für die Sortierung und funktionelle Analyse der IL-10-produzierenden Zellen zur Verfügung.

1.2 Die Rolle des Notch-Signalweges für die Generierung suppressorischer T-Zellen

Die unmittelbaren Signale, die zur Induktion suppressorischer T-Zellen in der Peripherie führen, sind noch nicht bekannt. Man geht derzeit davon aus, dass die Abwesenheit starker inflammatorischer und ko-stimulatorischer Signale eine Voraussetzung ist. So beruhen *in vivo* Toleranzprotokolle in der Regel auf Antigenapplikation ohne zusätzliche immunstimulierende Signale wie bakterielle Polysaccharide, DNA oder Lipopeptide. Diese induzieren neben einer Verstärkung der Antigenpräsentation und Ko-Stimulation die Expression von Zytokinen wie

IL-12 oder TGF- β /IL-6/IL-23. Diese induzieren Th1- (Hsieh et al., 1993; Manetti et al., 1993) beziehungsweise Th17- (Bettelli et al., 2006) Differenzierung, unter anderem durch Induktion der Transkriptionsfaktoren T-bet (Szabo et al., 2000) bzw. ROR γ t (Ivanov et al., 2006). In Abwesenheit von starken Th1- oder Th17-induzierenden Signalen können Th2- oder suppressorische T-Zellen induziert werden [Übersicht in (Weaver et al., 2006)]. Allerdings ist noch unklar, welche positiven Signale neben der Abwesenheit inflammatorischer Signale hierfür verantwortlich sind. Th2-Differenzierung benötigt zumindest *in vitro* IL-4, das wichtigste Th2-Zytokin, das unter anderem den Th2-spezifischen Transkriptionsfaktor Gata-3 induziert (Zheng and Flavell, 1997). Für suppressorische T-Zellen gibt es verschiedene Berichte der Induktion durch die suppressorischen Zytokine IL-10 [Übersicht in (Roncarolo et al., 2006)] oder TGF- β (Chen et al., 2003). Vor allem für die Generierung von Tr1- bzw. Th3-Zellen sind weder die spezifischen Transkriptionsfaktoren noch die molekularen Differenzierungssignale bekannt. Es ist hier auch unklar, ob IL-10 bzw. TGF- β direkt auf die T-Zellen einwirken oder indirekt durch die Modulation der APC.

Neuere Studien zeigen, dass Notch-vermittelte Signale an der Differenzierung peripherer T-Zellen beteiligt sind und möglicherweise eine Rolle bei der direkten Induktion suppressorischer T-Zellen spielen [Übersicht in (Dallman et al., 2005; Maillard et al., 2003)]. Der Notch-Signalweg ist zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert und ist generell Teil unterschiedlichster Zelldifferenzierungsschritte [Übersicht in (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Dallman et al., 2005; Maillard et al., 2005)]. In Säugern sind vier Isoformen des Membran-gebundenen Notchrezeptors (Notch1-4) bekannt. Sie interagieren mit den insgesamt fünf Mitgliedern der beiden ebenfalls konservierten Ligandengruppen Jagged (Jagged1, 2), sowie Delta-like (Dll1, Dll3 und Dll4) (Weinmaster, 1997). Der klassische Notch-Signalweg wird nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor ausgelöst und beinhaltet zwei proteolytische Spaltungsschritte des Rezeptors. Zunächst wird die extrazelluläre Domäne des Rezeptors durch ein Mitglied der Familie der ADAM-Metalloproteasen entfernt. Eine damit einhergehende Konformationsänderung setzt eine γ -Sekretase-Schnittstelle frei, was nach erfolgter Spaltung zur Freisetzung der Notch-intrazellulären-Domäne (NICD) führt. NICD verfügt über Kernlokalisierungssequenzen und wandert in den Zellkern ein. Dort bindet NICD, im Komplex mit anderen Faktoren, an den Transkriptioninhibitor CSL (CBF1 - Suppressor of Hairless - Lag1; in Mäusen: RBP-J), wodurch ein Transkription-aktivierender Komplex entsteht. In der Folge kommt es zur Induktion verschiedener, bisher nicht vollständig charakterisierter Notch-Zielgene. Die am besten charakterisierten Zielgene gehören zu zwei verwandten Gruppen von

Transkriptionsfaktoren HES (Hairy and Enhancer of Split) und HEY (HES mit YRPW Motiv). Es wurden vereinzelt alternative Notch-Signalwege beschrieben, deren molekulare Komponenten aber schlecht charakterisiert sind.

Vielfältige Differenzierungsschritte während der Embryonalentwicklung, aber auch der Hämatopoese werden durch Notch-vermittelte Signale reguliert (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Maillard et al., 2003; Milner and Bigas, 1999). Vor allem die Entwicklung von T-Zellen im Thymus wird auf verschiedenen Ebenen durch Notch kontrolliert (Maillard et al., 2003; Maillard et al., 2005; Radtke et al., 2004; Robey and Bluestone, 2004). Hingegen ist über die Rolle der Notch-Signale für die T-Zelldifferenzierung in der Peripherie weit weniger bekannt [Übersicht in (Dallman et al., 2005; Maillard et al., 2003; Osborne and Minter, 2007)].

In einer ersten Studie konnten Hoyne *et al.* zeigen, dass Antigen-beladene dendritische Zellen, die den Notch-Liganden Jagged1 überexprimieren, *in vivo* Antigen-spezifische Suppression hervorrufen, die durch CD4⁺ T-Zellen transferiert werden kann (Hoyne et al., 2000). Es ist unklar, ob diese Induktion suppressorischer CD4⁺ T-Zellen durch direkte Jagged1/T-Zellinteraktion induziert wurde oder beispielsweise durch Modifikation der dendritischen Zellen. Die Induktion von suppressorischen T-Zellen oder dem suppressorischen Zytokin IL-10 konnte in weiteren *in vitro* Systemen prinzipiell bestätigt werden (Anastasi et al., 2003; Benson et al., 2005; Hoyne et al., 2000; Vigouroux et al., 2003; Wong et al., 2003; Yvon et al., 2003). Weiterhin wurde berichtet, dass der Notch-Ligand Dll1 durch Interaktion mit Notch3 eine Th1-Differenzierung über die direkte Induktion von T-bet bewirkt (Amsen et al., 2004; Maekawa et al., 2003). Amsen *et al.* konnten schließlich zeigen, dass Antigen-präsentierende Zellen generell den Notch-Signalweg nutzen, um Th1- oder Th2-Differenzierung zu induzieren, wobei die verschiedenen Ligandenfamilien Delta-like und Jagged unterschiedliche Programme auslösen. Delta-like induzieren Th1-, während Jagged Th2-Differenzierung auslöst (Amsen et al., 2004). Die differentielle Expression der verschiedenen Liganden auf den APC wird wiederum durch Signale der natürlichen Immunität reguliert. Inflammatorische Komponenten wie LPS induzieren Delta-like-Liganden, während das Th2-induzierende Adjuvanz Cholera-Toxin B *Jagged1* induziert (Amsen et al., 2004; Napolitani et al., 2005).

Weiterhin wurde berichtet, dass Notch die T-Zellaktivierung moduliert. Allerdings ist die hierzu vorhandene Datenlage ebenfalls inkonsistent. Es werden sowohl inhibitorische (Benson et al., 2005; Eagar et al., 2004; Izon et al., 2001; Maekawa et al., 2003) als auch

aktivierende Effekte beschrieben (Adler et al., 2003; Palaga et al., 2003; Tanigaki et al., 2004).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch verschiedene experimentelle Systeme sowie durch unterschiedliche Wirkung der verschiedenen Notch-Rezeptoren/Ligand-Interaktionen hervorgerufen werden. Sowohl APC als auch T-Zellen exprimieren verschiedene Notch-Rezeptoren und Liganden (Adler et al., 2003; Amsen et al., 2004; Hoyne et al., 2000; Kuroda et al., 2003; Palaga et al., 2003; Yamaguchi et al., 2002). Prinzipiell können auch alle Liganden mit allen Notch-Rezeptoren interagieren. Es gibt zudem Hinweise, dass auch die Differenzierung und Aktivierung von APC durch den Notch-Signalweg moduliert wird (Cheng et al., 2003; Masuya et al., 2002; Ohishi et al., 2001; Weijzen et al., 2002).

Um die Rolle der verschiedenen Notch-Liganden für die T-Zelldifferenzierung besser zu verstehen und möglicherweise direkte Effekte auf die Differenzierung suppressorischer T-Zellen zu definieren, haben wir den Einfluss rekombinanter Notch-Liganden auf die T-Zelldifferenzierung in einem APC-freien *in vitro* System untersucht (Rutz et al., 2005). Wir konnten zeigen, dass verschiedene Liganden die T-Zellaktivierung unterschiedlich modifizieren. Während Jagged1 und Dll1 eine deutliche Inhibition unmittelbarer T-Zellrezeptorsignale bewirken, verstärkt Dll4 die Aktivierung. Diese Effekte sind unabhängig von γ -Sekretase-Aktivität und werden daher vermutlich nicht über den klassischen Notch-Signalweg übermittelt. Wir haben damit einen neuen Weg der Beeinflussung der T-Zellaktivierung durch verschiedene Notch-Liganden beschrieben. Da die Stärke des T-Zellrezeptorsignals auch nachfolgende Differenzierungsschritte beeinflusst, könnte damit eine zusätzliche Ebene der Regulation der peripheren T-Zelldifferenzierung gefunden sein. Unter welchen Bedingungen die Modulation des T-Zellrezeptorsignals gegenüber der Notch-vermittelten Regulation der Transkription dominant ist, wird Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

1.3 Induktion suppressorischer T-Zellen in der Peripherie

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, spielen APC-vermittelte Signale eine wesentliche Rolle bei der peripheren Induktion suppressiver T-Zellen. Daher haben wir auch versucht, APC zu identifizieren, die *in vivo* an diesem Prozess beteiligt sind, um die zugrunde liegenden molekularen Interaktionen besser charakterisieren zu können. So kann die Bedeutung bekannter Interaktionspartner wie Notch/Notch-Liganden überprüft werden, und es können neue molekulare Schalter gefunden werden.

Als Modell hierfür dient die als „orale Toleranz“ beschriebene Induktion suppressiver T-Zellen. Es ist seit langem bekannt, dass lösliche Proteine, die nach oraler Gabe über die Darmmukosa aufgenommen werden, zur Induktion von Antigen-spezifischen suppressorischen T-Zellen führen [Übersicht in (Garside and Mowat, 2001; Mowat, 2003; Strobel and Mowat, 1998)]. Diese Form der Toleranzinduktion ist wahrscheinlich ein wichtiger Teil der natürlichen Funktion der Darm-assoziierten lymphoiden Gewebe (GALT, gut-associated lymphoid tissues), denn hier findet eine kontinuierliche Konfrontation des Immunsystems mit einer großen Zahl harmloser Fremdanigene statt, z.B. mit Nahrungsmittelbestandteilen oder den Antigenen der natürlichen Darmflora. Welche Art suppressorischer T-Zellen generiert werden ist nicht eindeutig geklärt. Ursprünglich wurden T-Zellen beschrieben, die TGF- β und IL-10 produzieren (Chen et al., 1994). Vor kurzem wurde gezeigt, dass auch CD25⁺ Foxp3⁺ T-Zellen induziert werden, wobei unklar ist, ob diese Zellen äquivalent zu Thymus-induzierten Treg sind (Hauet-Broere et al., 2003; Hultkrantz et al., 2005; Siewert et al., 2007; Sun et al., 2006; Thorstenson and Khoruts, 2001). Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten, die verschiedenen Subpopulationen zu identifizieren beziehungsweise zu definieren, sind die molekularen Details der Induktion oder der Wirkungsweise der suppressorischen Zellen noch unklar. Es ist auch unbekannt, inwieweit es zwischen den Populationen Überschneidungen gibt, da beispielsweise Foxp3⁺ Treg ebenfalls IL-10 produzieren können. Zumindest *in vitro* generierte Tr1-Zellen lassen sich aber von Foxp3⁺ Treg abgrenzen, da sie negativ für diesen Transkriptionsfaktor sind (Vieira et al., 2004).

Die Rolle der Darmmukosa-assoziierten Lymphknoten für die orale Toleranzinduktion

Eine wichtige Voraussetzung für die gezielte Generierung suppressorischer T-Zellen ist die Kenntnis der zugrundeliegenden molekularen und zellulären Prozesse. Welche Zellen nehmen oral applizierte Antigene auf, wo werden die Antigene den T-Zellen präsentiert und welche ko-stimulatorischen Signale sind involviert. Lange Zeit war eine direkte Identifizierung der beteiligten Zellen jedoch nicht möglich. Es gibt aber Hinweise darauf, dass die regionalen lymphoiden Organe [Peyersche Plaques (PP) und mesenteriale Lymphknoten (mLK)] bzw. die dort an der Präsentation intestinaler Antigene beteiligten APC für die Induktion oraler Toleranz oder Immunität notwendig sind. In Mäusen, die keine PP und mLK besitzen, ist die Induktion der oralen Toleranz inhibiert, während das selektive Fehlen der PP keine Auswirkungen hat (Spahn et al., 2001; Yamamoto et al., 2000). Zudem konnte durch selektive Rekonstitution von mLK in Lymphotoxin- α -k.o.-Mäusen, die keine PP, mLK und pLK

besitzen, die orale Toleranzinduktion wiederhergestellt werden (Spahn et al., 2002). In einer weiteren Studie wurde jedoch ein Fehlen der oralen Toleranz gegen Proteine in Abwesenheit von PP gefunden (Fujihashi et al., 2001). Die PP wurden außerdem als ein Ort der Antigenaufnahme aus dem Darmlumen angesehen, da das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) der PP verstärkt Antigen-transportierende M-Zellen aufweist [Übersicht in (Neutra et al., 1996)].

Die Induktion Antigen-spezifischer suppressorischer T-Zellen erfordert die Präsentation des Antigens. Daher fällt den APC der regionalen lymphoiden Organe vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der oralen Toleranz zu. Von den professionellen APC werden DC als entscheidend sowohl für die Induktion einer Immunantwort als auch für die Toleranzinduktion angesehen [Übersicht in (Guermontprez et al., 2002)]. Eine Erhöhung der DC-Frequenz in lymphoiden Organen durch Flt-3Ligand-Gabe *in vivo* erhöht die Effizienz der oralen Toleranzinduktion (Viney et al., 1998). Es gibt Hinweise, dass DC der mukosalen Lymphorgane, wie PP, mLK oder bronchialen LK, funktionelle Unterschiede gegenüber DC der Milz oder der peripheren LK aufweisen. Nach Stimulation durch CD40-Ligand produzieren DC der Peyerschen Plaques das immunsuppressive Zytokin IL-10 und induzieren verstärkt die Th2-Differenzierung *in vitro*, während DC der Milz IL-12 sezernieren und Th1-Zellen induzieren (Iwasaki and Kelsall, 1999). IL-10-produzierende DC, die *in vitro* regulatorische bzw. Th2-Zellen induzieren, wurden auch nach intranasaler Antigengabe aus bronchialen Lymphknoten isoliert (Akbari et al., 2002; Stumbles et al., 1998). DC aus mLK induzierten in T- und B-Zellen außerdem das für das *Homing* in intestinale Gewebe notwendige Integrin $\alpha_4\beta_7$ (Mora et al., 2003; Mora et al., 2006; Stagg et al., 2002). Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass die DC der Lamina Propria oral applizierte Antigene *in vivo* aufnehmen und nach Transfer in naive Mäuse Toleranz induzieren können (Chirido et al., 2005). Die DC der verschiedenen lymphoiden Organe lassen sich außerdem in phänotypisch und funktionell unterschiedliche Subpopulationen unterteilen [Übersicht in (Shortman and Liu, 2002)]. Es konnte gezeigt werden, dass selektiv CD11b⁺ DC der PP nach Stimulation mit mikrobiellen Stimuli (und auch CD40-Ligand) IL-10 produzieren, während andere DC-Subpopulationen auf die Stimulation mit mikrobiellen Stimuli IL-12 produzieren (Iwasaki and Kelsall, 2001). Vor kurzem wurde in Mäusen auch erstmals eine B220⁺ DC Subpopulation entdeckt, die die Charakteristika der plasmazytoiden DC (pDC) aufweist und über deren Anwesenheit und Funktion im GALT derzeit fast nichts bekannt ist (Nakano et al., 2001; Nikolic et al., 2002). Das zeigt, dass sowohl zwischen den verschiedenen lymphoiden Organen als auch innerhalb der Einzelorgane funktionell distinkte DC-Subpopulationen

vorliegen, die für die Induktion verschiedener Immunreaktionen verantwortlich sein können und deren Rolle *in vivo* weitgehend unverstanden ist. Es ist nicht eindeutig geklärt, ob es sich um unterschiedliche DC-Linien oder unterschiedliche Aktivierungszustände von DC handelt. Es ist außerdem unklar, welche APC-Populationen *in vivo* intestinale Antigene tatsächlich präsentieren. Es wird auch die Beteiligung anderer MHC II-exprimierender Zellen an der Induktion oraler Toleranz diskutiert, z.B. mukosale Epithelzellen [Übersicht in (Shao et al., 2001)] oder sinusoidale Leberendothelzellen [Übersicht in (Knolle and Limmer, 2001)]. Es gibt allerdings auch Hinweise, dass aus dem Knochenmark stammende APC für die Induktion einer T-Zellreaktion nach oraler Antigengabe notwendig sind (Blanas et al., 2000), was die Rolle der nicht-klassischen APC in Frage stellt. Diese Problematik wird kontrovers diskutiert.

Organe und APC-Populationen, die an der oralen Toleranzinduktion beteiligt sind

Eine Möglichkeit, jene APC zu identifizieren und zu charakterisieren, die an der Induktion suppressorischer T-Zellen nach oraler Antigengabe beteiligt sind, ist der direkte Nachweis der entsprechenden antigenen MHC/Peptid-Komplexe auf der APC-Oberfläche mittels Immunfluoreszenztechniken. Um eine T-Zelle zu aktivieren, reichen allerdings bereits weniger als hundert spezifische MHC/Peptidkomplexe aus (Demotz et al., 1990; Harding and Unanue, 1990), während die Nachweisgrenze konventioneller Immunfluoreszenz bei einigen tausend Molekülen pro Zelle liegt (Scheffold et al., 2000). Aufgrund der großen Zahl von MHC-Molekülen (bis zu 10^5 /Zelle), die mit vielen verschiedenen Peptiden beladen sind, weisen MHC/Peptid-spezifische Antikörper häufig Kreuzreaktivitäten auf, die den Nachweis weniger, spezifischer MHC/Peptid-Komplexe erschwert. Daher erfolgte der Nachweis der Antigenpräsentation bisher meist über funktionelle Analysen, d.h. *in vitro* Aktivierung spezifischer T-Zellen durch *in vivo* beladene APC (Kelsall and Strober, 1996; Liu and MacPherson, 1993; Richman et al., 1981) oder *in vivo*, nach Transfer spezifischer T-Zellen. In vereinzelt Studien konnte gezeigt werden, dass DC aus PP oder LP bzw. DC, die aus der den Darm drainierenden Lymphe gewonnen wurden, oral applizierte Antigene präsentieren (Chirido et al., 2005; Liu and MacPherson, 1993). Die Untersuchung der *in vivo* T-Zellaktivierung ergab, dass nach oraler Antigengabe innerhalb weniger Stunden eine Aktivierung und Proliferation der spezifischen T-Zellen vor allem in den PP und mLK stattfand, bei höheren Antigendosen zum Teil auch in der Milz [(Blanas et al., 2000; Gutgemann et al., 1998) und Übersicht in (Mintern et al., 1999)]. Durch Untersuchung der *in vivo* Aktivierung spezifischer T-Zellen konnte auch gezeigt werden, dass aus Knochenmark-Vorläuferzellen entstandene APC vermutlich für die Induktion einer T-Zellreaktion nach

oralen Antigengabe verantwortlich sind (Blanas et al., 2000). Mit diesen Verfahren konnten allerdings keine Aussagen über die tatsächliche Frequenz, den Phänotyp, die Art der vorhandenen Ko-Stimulatoren oder die Antigenbeladung einzelner APC in den verschiedenen Geweben gemacht werden.

Wir haben einen sensitiven Nachweis der Präsentation von MHC-Klasse-II-restringierten Peptiden mittels magnetofluoreszenter Liposomen entwickelt. Dessen Detektionslimit liegt im Bereich des T-Zellaktivierungslimits (<100 MHC/Peptid-Komplexe/Zelle) liegt. Diese Methode erlaubte die phänotypische Charakterisierung der APC, die oral applizierte Antigene in physiologisch relevanten Mengen präsentieren. So konnten wir untersuchen, welche Organe und welche APC präferentiell für die Präsentation oral applizierter Antigene verantwortlich sind.

2. Eigene Arbeiten

Im Folgenden sind die wichtigsten Arbeiten eingebunden, die dieser Habilitationsschrift zugrunde liegen. Jedem Artikel ist eine Zusammenfassung vorangestellt.

- 2.1 IL-2 induziert IL-10 in CD4⁺CD25⁺ Treg und aktiviert die suppressive Aktivität.
- 2.2 Charakterisierung funktionell definierter Treg-Subpopulationen.
- 2.3 Die Regulation der Aktivität CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen.
- 2.4 Identifizierung von Membran-gebundenem IFN- γ und IL-10
- 2.5 Beeinflussung der T-Zellaktivierung durch Notch-Liganden
- 2.6 Sensitive Visualisierung der Peptid-Präsentation *ex vivo* und *in vitro*.
- 2.7 Präsentation oral applizierter Antigene und die Rolle der Peyerschen Plaques für die Antigenaufnahme.

2.1 IL-2 induziert IL-10 in CD4⁺CD25⁺ Treg und aktiviert die suppressive Aktivität

Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Treg sind durch die konstitutive Expression von CD25, der α -Kette des IL-2-Rezeptors, gekennzeichnet. Die funktionelle Bedeutung des IL-2-Rezeptors für Treg war jedoch lange Zeit unklar, da CD25 auch von aktivierten Foxp3⁻ T-Zellen exprimiert wird. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass IL-2 für die Homöostase von Treg essentiell ist, wohingegen die Rolle von CD25/IL-2 für ihre suppressive Effektorfunktion weniger gut untersucht war. Da außerdem bekannt ist, dass Treg selbst kein IL-2 produzieren, scheinen sie von der Aufnahme von exogenem IL-2 abhängig zu sein. Wir haben die Rolle der IL-2-Aufnahme durch Treg *in vitro* näher charakterisiert, wobei sich Hinweise auf einen neuen Mechanismus der Suppression sowie der Regulation ihrer Aktivierung ergaben.

Wir konnten zeigen, dass Treg IL-2 binden und bei Ko-Kultivierung mit den CD4⁺CD25⁻ Zielzellen um IL-2 konkurrieren. Durch die spezifische Blockade der IL-2-Aufnahme durch Treg konnte die Suppression vollständig aufgehoben werden. Da IL-2 *in vitro* ein essentieller Wachstumsfaktor ist, deuten diese Ergebnisse auf IL-2-Kompetition als suppressiven Mechanismus hin. In Übereinstimmung damit hebt IL-2-Zugabe zur Ko-Kultur die Suppression auf. Gleichzeitig können Treg durch IL-2-neutralisierende Antikörper ersetzt werden. Wir konnten aber auch zeigen, dass IL-2 in den Treg IL-10 induziert, das in einigen *in vivo* Systemen für die Suppression notwendig ist. Insgesamt zeigt unsere Arbeit, dass die IL-2-Aufnahme für die Regulation der suppressiven Aktivität von Treg wichtig ist. Die Tatsache, dass IL-2 im Allgemeinen von aktivierten T-Zellen oder auch dendritischen Zellen produziert wird, könnte auf einen IL-2-vermittelten Regulationsmechanismus hinweisen, der für eine ausreichende Gegenregulation bei Immunaktivierung sorgt.

Publikation:

De la Rosa, M., Rutz, S. Dorninger H. and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34(9):2480-8.

2.2 Charakterisierung funktionell definierter Treg-Subpopulationen

Es stellte sich die Frage, ob innerhalb der Population der CD25⁺ Treg Subgruppen mit definierten funktionellen Eigenschaften existieren. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Alf Hamann, Charité, konnten wir eine Unterteilung anhand der Expression des Integrins $\alpha_E\beta_7$ vornehmen und zeigen, dass $\alpha_E\beta_7^+$ Treg sowohl *in vitro* als auch *in vivo* höhere suppressorische Kapazität besitzen als $\alpha_E\beta_7^-$ Treg. In einer weiteren gemeinsamen Studie konnten wir zeigen, dass $\alpha_E\beta_7^+$ Treg einen Gedächtnis-/Effektorzell-Phänotyp aufweisen, charakterisiert durch starke Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (u.a. E/P-Selektin-Liganden), die sie beispielsweise zur Einwanderung in entzündete Gewebe befähigen. Im Gegensatz dazu exprimieren $\alpha_E\beta_7^-$ Treg verstärkt die Moleküle CCR7 sowie CD62L-Selektin, die für die Einwanderung in die Lymphknoten notwendig sind. In Übereinstimmung damit konnten wir zeigen, dass $\alpha_E\beta_7^+$ Treg eine verstärkte Migration in entzündete Gewebe aufwiesen. Die verbesserte Migration war gleichzeitig verbunden mit der verstärkten Suppression einer modellhaften *in vivo* Entzündungsreaktion, der Antigen-induzierten Arthritis. $\alpha_E\beta_7^+$ Treg weisen außerdem eine geringere Menge an *T cell receptor excision circles* (TRECs) auf, was auf erhöhte Proliferation nach Verlassen des Thymus hindeutet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Gedächtnis/Effektorzell-Phänotyp das Resultat einer peripheren Differenzierung ist, z.B nach Antigenkontakt.

Damit ist es erstmals gelungen, zwei funktionelle Subpopulationen innerhalb der CD25⁺ Treg zu identifizieren, die vermutlich *in vivo* unterschiedliche Rollen ausüben. Weiterhin konnte so gezeigt werden, dass die Lokalisierung der Treg ein wichtiger Regulationsparameter für die *in vivo* suppressorische Wirkung ist. Weitere Untersuchungen sollen zeigen, inwieweit über suppressorische Effektorfunktionen wie die IL-10-Produktion ebenfalls funktionell definierte Populationen abgegrenzt werden können und wie diese Faktoren mit der $\alpha_E\beta_7^+$ Expression korrelieren.

Publikationen:

1. Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyra, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13031-13036.
2. Huehn, J., K. Siegmund, J.C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G.F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G.K. Przybylski, U. Niesner, M. De La Rosa, C.A. Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental Stage, Phenotype, and Migration Distinguish Naive- and Effector/Memory-like CD4+ Regulatory T Cells. *J Exp Med* 199:303-313

2.3 Die Regulation der Aktivität CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen

Trotz des großen Interesses an der Biologie der CD25⁺ Treg sind bis heute die molekularen Details ihrer suppressorischen Aktivität unklar. Dies betrifft sowohl die Identität der suppressiven Mechanismen als auch die Regulation ihrer Aktivierung. Insbesondere bei der Frage der suppressiven Effektorfunktionen gibt es erhebliche Diskrepanzen zwischen *in vivo* und *in vitro* erzielten Ergebnissen. Neuere Arbeiten, unter anderem auch die unserer Arbeitsgruppe, weisen auf eine wichtige Rolle der IL-2-Aufnahme für die suppressorische Treg-Aktivität hin und können möglicherweise zur Klärung einiger dieser Widersprüche beitragen. In dem hier vorliegenden Artikel haben wir die unterschiedlichen Auswirkungen der IL-2-Aufnahme durch Treg *in vitro* und *in vivo* diskutiert. Es werden auch Ergebnisse eines neuen mathematischen Modells vorgestellt, das zelluläre Kommunikation mittels IL-2 simuliert. Die Modellierung zeigt unter anderem, dass die Effektivität der Konkurrenz um IL-2 stark vom Abstand zwischen Treg und IL-2-produzierender Zielzelle abhängt. Dies führt zu einer Neubewertung von Daten, die mittels gängiger *in vitro* Treg-Testsysteme gewonnen wurden und bisher als Hinweis auf einen kontakt-abhängigen Suppressionsmechanismus interpretiert wurden.

Der Nachweis des Treg-aktivierenden Effektes von IL-2 hat auch zur Entwicklung eines neuen Modells der Regulation der Treg-Funktion *in vivo* geführt: Erst durch das im Verlauf der Immunantwort generierte IL-2 können Treg in einen aktiven suppressiven Zustand versetzt werden, der möglicherweise wichtig für die Begrenzung der Immunreaktion ist. Wir stellen außerdem Ergebnisse vor, die darauf hinweisen, dass dieser aktivierte Zustand nur transient und daher zeitlich auf die Dauer der Immunreaktion begrenzt ist. Dieses Modell führt zusätzlich zur Regulation der Treg-Aktivierung über Antigen-spezifität und Lokalisierung eine weitere Kontrollebene ein, die eine genaue Anpassung an die physiologischen Erfordernisse ermöglicht. Zusätzlich bietet die gezielte Aktivierung von Treg durch IL-2 möglicherweise die Chance für gezieltere therapeutische Anwendungen.

Publikation:

Scheffold A., Hühn, J., Höfer T.(2005) Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur J Immunol* 35(5):1336-41.

2.4 Identifizierung von Membran-gebundenem IFN- γ und IL-10

Viele T-Zelleffekte werden über die Sekretion von Zytokinen vermittelt. Daher ist die Fähigkeit, ganz bestimmte Zytokine zu produzieren, ein wesentliches Definitionskriterium für T-Zellpopulationen mit spezialisierten Funktionen. So stellt IL-10 eines der wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokine dar und kann daher zur Identifizierung suppressiver T-Zellen verwendet werden. IFN- γ , das prototypische Th1-Zytokin, weist hingegen hauptsächlich proinflammatorische Wirkungen auf. Allerdings kann die Zytokinproduktion einer bestimmten T-Zelle nicht durch konventionelle Oberflächenparameter bestimmt werden, sondern muss durch intrazelluläre Färbung des Zytokins nachgewiesen werden. Hierfür müssen die Zellen jedoch fixiert werden und stehen daher nicht für weitere funktionelle Analysen zur Verfügung.

Wir haben mittels einer von uns entwickelten Immunfluoreszenztechnik, den so genannten magnetofluoreszenten Liposomen, die den Nachweis extrem geringer Mengen von Oberflächen-gebundenen Antigenen ermöglichen, eine neue Membran-gebundene Form der Zytokine IFN- γ und IL-10 entdeckt. Die Oberflächenexpression ist spezifisch für Zytokinproduzierende Zellen. Sie ist unabhängig von der Expression der entsprechenden Zytokinrezeptoren, und nicht durch passive Adsorption der Zytokine aus dem Medium zu erklären. Mittels dieser Oberflächenzytokine war es möglich, Zytokin-sezernierende Zellen aus einem heterogenen Gemisch von T-Zellen zu isolieren. Damit stand erstmals ein spezifischer Oberflächenmarker zur Verfügung, mit dem potentiell suppressive IL-10-produzierende T-Zellen isoliert und funktionell analysiert werden können. Welche Funktion diese Oberflächen-gebundenen Zytokine besitzen, ist derzeit noch unklar. Sie könnten gegebenenfalls in Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Situationen eine Bedeutung besitzen, ähnlich dem als spezifisch für Treg beschriebenen Oberflächen-gebundenen TGF- β .

Publikation:

Scheffold, A., M. Assenmacher, L. Reiners-Schramm, R. Lauster, and A. Radbruch. 2000. High-sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells. *Nat Med* 6:107-110.

2.5 Beeinflussung der T-Zellaktivierung durch Notch-Liganden

Der Notch-Signalweg stellt eine Möglichkeit dar, die Differenzierung von naiven T-Zellen in suppressorische aber auch Th1- oder Th2-Zellen zu induzieren. Allerdings sind die publizierten Ergebnisse zum Teil widersprüchlich, was unter anderem daran liegen kann, dass die molekularen Grundlagen dieser Notch-vermittelten Differenzierungsschritte sowie die Rolle der verschiedenen Notch-Liganden und Notch-Rezeptoren noch unklar ist. Wir haben daher den Einfluß der Notch-Liganden *dll1*, *dll4* und *jagged1* auf die T-Zellaktivierung untersucht. Die uns zur Verfügung stehenden rekombinanten Proteine erlaubten die Analyse ihrer spezifischen Effekte in einem APC-freien System. Wir konnten so erstmals zeigen, dass die verschiedenen Liganden direkt die T-Zellaktivierung modulieren, wobei *jagged1* und *dll1* inhibierend und *dll4* aktivierend wirkte. Alle Effekte waren unabhängig vom klassischen, γ -Sekretase-abhängigen Notch-Signalweg. Die blockierende Wirkung beruht vermutlich auf einer unmittelbaren Inhibition proximaler T-Zellrezeptorsignale und führt zu einer verminderten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP1 und NF-AT.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Notch außer über die Regulation der Transkription bestimmter Zielgene auch über eine direkte Modulation der T-Zellrezeptorsignale die T-Zelldifferenzierung beeinflussen kann. Unter welchen Bedingungen die verschiedenen Modulationsmechanismen aktiv oder dominant sind und welche Mechanismen entscheidend für die Induktion suppressorischer T-Zellen sind, ist noch unklar. Ein weiterer wichtiger Punkt hierfür ist die Analyse der Ligandenexpression auf APC und die daraus resultierende Modulation der T-Zelldifferenzierung.

Publikation:

Rutz S, Mordmüller B, Sakano S, and Scheffold A. 2005. Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *Eur J Immunol* 35(8):2443-2451.

2.6 Sensitive Visualisierung der Peptid-Präsentation *ex vivo* und *in vitro*

Antigen-präsentierenden Zellen kommt eine zentrale Bedeutung für die Steuerung der Differenzierung von T-Zellen in der Peripherie zu. Sie induzieren nicht nur die T-Zellaktivierung über die Präsentation spezifischer MHC/Peptidkomplexe, sondern vermitteln auch die für die Differenzierung zusätzlich notwendigen ko-stimulatorischen Signale. Die Qualität und Quantität dieser Ko-Stimulatoren wird durch die physiologische Umgebung und immunstimulierende Signale von Pathogenen reguliert. Um besser verstehen zu können, warum es in bestimmten Situationen *in vivo* zur Induktion suppressiver T-Zellen kommt und welche Signale dabei entscheidend sind, ist es notwendig, jene APC näher zu charakterisieren, die T-Zellaktivierung und Differenzierung *in vivo* steuern. Voraussetzung dafür ist der Nachweis derjenigen APC, die zum Beispiel nach tolerogener Antigenapplikation ein bestimmtes Peptid präsentieren. T-Zellen können bereits durch weniger als hundert spezifische MHC/Peptidkomplexe pro APC aktiviert werden. Konventionelle Immunfluoreszenztechniken erlauben den Nachweis einer positiven Zelle erst ab mehreren tausend Antigenen pro Zelle. Wir haben daher Hapten-markierte Peptide eingesetzt, die durch Färbung mit magnetofluoreszenten Liposomen mit hoher Sensitivität und Spezifität detektiert werden können. Nach *in vitro* und *in vivo* Applikation konnten die Peptide auf der Oberfläche von MHC-Klasse-II⁺ Zellen nachgewiesen werden und gestatteten die eindeutige Identifizierung Peptid-präsentierender APC. Parallele Peptid-Färbung und Stimulation Peptid-spezifischer T-Zellen mit den Peptid-beladenen APC ergab eine vergleichbare Sensitivität beider Nachweismethoden. Damit steht eine Nachweismethode zur Verfügung, mit der sich jene APC identifizieren, und näher charakterisieren lassen, die physiologisch relevante Mengen an Peptiden *in vivo* präsentieren.

Publikation:

Kunkel, D., D. Kirchhoff, R. Volkmer-Engert, A. Radbruch, and A. Scheffold. 2003.

Sensitive visualization of peptide presentation in vitro and ex vivo. *Cytometry* 54A:19-26.

2.7 Präsentation oral applizierter Antigene und die Rolle der Peyerschen Plaques für die Antigenaufnahme

Orale Antigenapplikation löslicher Proteine führt zur Induktion Antigen-spezifischer suppressorischer T-Zellen. Um die hierfür verantwortlichen APC zu identifizieren, haben wir die Peptid-präsentierenden Zellen nach oraler Applikation mittels der oben beschriebenen Technologie näher charakterisiert. Wir haben außerdem Mäuse verwendet, bei denen während der Embryogenese selektiv die Ausbildung der Peyerschen Plaques inhibiert wurde, um deren spezifischen Beitrag zu Antigenaufnahme und -präsentation zu bestimmen.

Wenige Stunden nach Applikation konnten Peptid-präsentierende Zellen in den regionalen lymphoiden Organen (PP, mLK), bei steigender Dosis auch in peripheren Organen (Milz) nachgewiesen werden. Die Antigenpräsentation war dabei immer am stärksten auf den DC der PP (bis zu 65%), gefolgt von denen der mLK. Interessanterweise erfolgte die Aktivierung naiver Peptid-spezifischer T-Zellen bei limitierenden Antigenmengen ausschließlich in den mLK. Die Abwesenheit der PP hatte weder auf die Antigenpräsentation in den restlichen lymphoiden Organen noch auf die T-Zellaktivierung einen Einfluss.

Diese Daten weisen darauf hin, dass nicht die PP für die orale Toleranzinduktion verantwortlich sind, sondern dass vor allem den mLK und den dort residenten oder dorthin eingewanderten DC eine besondere Rolle zukommt. Weitere Analysen sollen zeigen, welche DC-Populationen die Antigenpräsentation übernehmen, wo die Antigenbeladung stattfindet und welche Moleküle eventuell für die Induktion suppressorischer T-Zellen durch mLK-DC verantwortlich sind.

Publikation:

Kunkel, D., D. Kirchhoff, S. Nishikawa, A. Radbruch, and A. Scheffold. 2003. Visualization of peptide presentation following oral application of antigen in normal and Peyer's patches-deficient mice. *Eur J Immunol* 33:1292-1301.

3. Diskussion

3.1 Regulation der Effektorfunktion suppressorischer T-Zellpopulationen

Die therapeutische Bedeutung suppressorischer T-Zellpopulationen

Viele Immunpathologien werden durch überschießende Immunreaktionen verursacht, bei denen die körpereigenen Kontrollmechanismen zur Verhinderung oder Begrenzung einer Immunantwort versagen. Dies kann zu einer Reaktion gegen Autoantigene oder harmlose Fremdantigene führen oder zu chronischen Entzündungsreaktionen gegen Pathogene. Im Gegensatz zu herkömmlichen Therapien, die durch die Blockierung bestimmter Effektorfunktionen des Immunsystems eine mehr oder weniger generelle Immunsuppression mit entsprechenden Nebenwirkungen bewirken, stellen suppressorische T-Zellen einen physiologischen Kontrollmechanismus dar. Die Vorteile dieser physiologischen Immunsuppression sind die Antigen-spezifität, die lokale Begrenzung sowie die gezielte Aktivierung der suppressiven Effektorfunktionen. Aufgrund dieser Eigenschaften können pathologische Prozesse unter Aufrechterhaltung des Immunschutzes kontrolliert werden.

Ein Defekt der natürlichen suppressorischen Zellen kann ursächlich für die Entstehung von Immunpathologien sein. Alternativ kann die physiologische suppressorische Aktivität in bestimmten Situationen nicht ausreichend sein. In beiden Fällen ergeben sich therapeutische Ansatzpunkte durch die gezielte Stärkung des suppressorischen Arms des Immunsystems. Dies kann durch adoptiven Transfer geeigneter Zellen oder durch ihre gezielte Aktivierung oder Expansion *in vivo* erreicht werden.

Wir haben untersucht, welche Eigenschaften für die Immunsuppression durch CD25⁺ Treg relevant sind, wie Subpopulationen mit speziellen Funktionen definiert und gegebenenfalls aufgereinigt werden können und wie die suppressiven Effektormechanismen aktiviert werden. Weiterhin ist wichtig, durch welche Signale suppressorische Zellen gegen bestimmte Antigene *in vivo* oder *in vitro* induziert werden können. Diese Arbeiten sollen dazu beitragen, den gezielten Einsatz suppressorischer T-Zellen für therapeutische Zwecke zu ermöglichen.

IL-2 reguliert die Homöostase der CD25⁺ Treg

Über die konstitutive Expression von CD25, der α -Kette des IL-2-Rezeptors, konnte die bisher am besten charakterisierte Population natürlicher suppressorischer T-Zellen, die Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Treg, identifiziert werden. Die Rolle von CD25 und IL-2 für CD25⁺

Treg war lange Zeit umstritten, da auch aktivierte T-Zellen CD25 exprimieren. *In vitro* hebt Zugabe eines IL-2-Überschusses die suppressorische Wirkung auf (Thornton and Shevach, 1998). *In vivo* hingegen konnte gezeigt werden, dass IL-2 für die Homöostase der Treg Population in der Peripherie essentiell ist [Übersicht in (Malek, 2003)]. *In vivo* Blockade von IL-2 durch spezifische Antikörper reduziert die Treg-Frequenz und die Expressionsstärke von CD25 [(Murakami et al., 2002; Setoguchi et al., 2005) und eigene nicht veröffentlichte Ergebnisse]. Mäuse, die genetisch defizient für Teile des IL-2-Rezeptors oder der IL-2-Signaltransduktionskette sind, haben ebenfalls verringerte Treg-Frequenzen (Almeida et al., 2002; Antov et al., 2003; Malek et al., 2002; Papiernik et al., 1998; Snow et al., 2003). Gleichzeitig weisen diese Mäuse einen letalen Phänotyp auf, der durch Hyperproliferation und -aktivierung autoreaktiver T-Zellen gekennzeichnet ist (Sadlack et al., 1995; Sadlack et al., 1993; Suzuki et al., 1995; Willerford et al., 1995). Diese Immunpathologie ist vermutlich auf das Fehlen von Treg zurückzuführen, da neonataler Transfer von Treg in IL-2-Rezeptor-defiziente Mäuse die Krankheitsentwicklung unterbindet (Almeida et al., 2002; Antov et al., 2003; Malek et al., 2002; Wolf et al., 2001). Treg scheinen auch in Abwesenheit von IL-2 im Thymus generiert zu werden, benötigen aber IL-2 für die Expansion und/oder Aktivierung in der Peripherie. Dies konnte erstmals durch den Transfer von CD4⁺ T-Zellen in Mäuse mit experimenteller Autoimmun-Enzephalomyelitis gezeigt werden (Furtado et al., 2002). CD4⁺ T-Zellen aus IL-2-defizienten Mäusen waren in diesem System protektiv, während CD4⁺ T-Zellen aus CD25-defizienten Mäusen keinen Einfluss ausüben. Fontenot *et al.* und D'Cruz *et al.* konnten zeigen, dass CD25-defiziente Mäuse im Thymus normale Frequenzen an Treg aufwiesen, während die Treg-Frequenz in der Peripherie reduziert war (D'Cruz and Klein, 2005; Fontenot et al., 2005).

Das Überleben der CD25⁺ Treg in der Peripherie scheint also von IL-2 abhängig zu sein, obwohl diese Zellen selbst kein IL-2 produzieren. Vermutlich ist Foxp3 über einen gemeinsam mit NFAT gebildeten negativen Transkriptions-Regulationskomplexes selbst für die Suppression der IL-2-Produktion in Treg verantwortlich (Wu et al., 2006). Treg müssen also IL-2 effizient aus der Umgebung aufnehmen können. Durch Verwendung eines IL-2-IgG-Fusionsproteins, das nach Bindung an den Rezeptor auf der Zelloberfläche mittels Immunfluoreszenzfärbung nachweisbar ist, konnten wir zeigen, dass Treg tatsächlich konstitutiv die Fähigkeit besitzen, IL-2 zu binden (de la Rosa et al., 2004). Sie tragen vermutlich also nicht nur CD25, sondern den vollständigen hochaffinen IL-2-Rezeptor, bestehend aus α , β und γ -Kette. Die konstitutive Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors

könnte einen kompetitiven Vorteil und damit ein wichtiges Überlebenskriterium *in vivo* darstellen.

Suppression in vitro: Konkurrenz um IL-2 oder alternative Mechanismen?

Unter Bedingungen, bei denen IL-2 ein kritischer Überlebens-, Proliferations- oder Aktivierungsfaktor ist, könnte die effiziente Aufnahme von IL-2 aus der Umgebung gleichzeitig einen suppressiven Mechanismus darstellen. Wir konnten zeigen, dass Treg *in vitro* tatsächlich erfolgreich mit CD4⁺ T-Zellen um IL-2 konkurrieren (de la Rosa et al., 2004). Durch selektive Blockade der IL-2-Aufnahme durch Treg konnten wir außerdem zeigen, dass die Suppression der T-Zellaktivierung *in vitro* von der IL-2-Aufnahme durch Treg abhängt. Alle suppressiven Treg-Effekte (Inhibition von IL-2-Produktion, Proliferation, CD25-Expression) werden durch Zugabe eines Überschusses von IL-2 aufgehoben. Umgekehrt können durch Neutralisierung von IL-2 mittels Antikörpern in der *in vitro* Kultur die gleichen Suppressionseffekte erreicht werden wie durch Treg. Diese Ergebnisse zeigen, dass Konkurrenz um IL-2 prinzipiell als Suppressionsmechanismus *in vitro* ausreichend wäre. Auch die Gruppe von Ethan Shevach konnte zeigen, dass die suppressorische Aktivität der Treg von der Aktivierung durch IL-2 abhängt (Thornton et al., 2004; Thornton et al., 2004). Interessanterweise konnte die Treg-vermittelte Suppression der IL-2-mRNA-Expression durch Zugabe von IL-2 nicht aufgehoben werden, obwohl unter diesen Bedingungen die Proliferation wieder voll hergestellt war [(Thornton et al., 2004) und eigene unveröffentlichte Ergebnisse]. Unsere Ergebnisse zeigen aber, dass die Suppression der IL-2-Proteinproduktion durch exogenes IL-2 vollkommen aufgehoben wird (de la Rosa et al., 2004). In einer neueren Arbeit wurde hingegen beschrieben, dass die Suppression der IL-2-Proteinproduktion durch IL-2 ebenfalls nicht aufgehoben wird (Sojka et al., 2005), was im Gegensatz zu unseren eigenen Daten steht. Welche experimentellen Details diesen Unterschied hervorrufen, ist noch nicht klar. Die unterschiedliche Regulation von IL-2-mRNA und -Protein könnte hingegen durch zwei unabhängig voneinander agierende Regulationsebenen erklärt werden: Die IL-2-Translation/Proteinproduktion in den Zielzellen erfordert IL-2-Signale (autokriner *Feedback-loop*) und wäre daher durch einfache Konkurrenz um IL-2 inhibierbar. Die IL-2-Transkription scheint dagegen unabhängig von direkten IL-2-Rezeptorsignalen zu sein, daher ist sie also nicht durch IL-2-Konkurrenz inhibierbar. Die Suppression würde in diesem Fall durch einen zweiten Mechanismus erfolgen, der in Treg durch IL-2 oder alternative Signale angeschaltet werden muss. Derzeit

liegen allerdings noch keine weiteren experimentellen Daten zu dieser differentiellen Regulation vor.

Ein Hinweis auf alternative, von IL-2-Kompetition unabhängige Suppressionsmechanismen folgt aus der Beobachtung, dass Treg aus CD25-defizienten Mäusen *in vitro* ebenfalls suppressiv sind (D'Cruz and Klein, 2005; Fontenot et al., 2005), möglicherweise aber mit reduzierter Effizienz (D'Cruz and Klein, 2005). Der Unterschied zu Treg aus Wildtypmäusen könnte darin bestehen, dass CD25-defiziente Mäuse chronische Entzündungsreaktionen und T-Zellhyperproliferation aufweisen, was bereits zu einer *in vivo* Aktivierung der Treg führen könnte (Fontenot et al., 2005). Diese Ergebnisse zeigen aber, dass die IL-2-Aufnahme durch Treg nicht essentiell ist und dass zusätzlich zur IL-2-Kompetition alternative Mechanismen existieren müssen. Unterschiedliche suppressorische Mechanismen, die je nach Situation dominant sind, könnten eventuell auch die widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich des suppressiven Mechanismus *in vitro* und *in vivo* erklären. Konkurrenz um IL-2 scheint *in vitro* relevant zu sein, aber nicht *in vivo*. Umgekehrt scheinen die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β *in vitro* keine Rolle zu spielen, aber durchaus in verschiedenen *in vivo* Modellen [Übersicht in (Izcue et al., 2006; von Boehmer, 2005)]. Aussagekräftige *in vitro* Tests müssen also unter Bedingungen durchgeführt werden, die der *in vivo* Situation entsprechen, wo also z.B. IL-2-Kompetition keine Rolle spielt. Dies trifft vor allem für Untersuchungen menschlicher Treg zu, da hier entsprechende *in vivo* Systeme für Funktionstests fehlen. Die Suppression der IL-2-Transkription als experimenteller Parameter in Anwesenheit eines IL-2-Überschusses könnte hierfür ein erster Ansatzpunkt sein.

Suppression durch Zell-Zell-Kontakt oder lokale Zytokineffekte

Aus verschiedenen *in vitro* Analysen der suppressiven Funktion von Treg wurde der Schluss gezogen, dass der Austausch löslicher Mediatoren keine Rolle spielt [Übersicht in (Shevach, 2002; von Boehmer, 2005)]. Zum einen waren suppressorische Kandidatenzytokine wie TGF- β oder IL-10 für die *in vitro* Suppression nicht notwendig (Piccirillo et al., 2002; Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Zum anderen wird der suppressive Effekt aufgehoben, wenn Treg und Zielzellen durch eine Membran getrennt wurden, die zwar den Austausch löslicher Mediatoren, nicht aber direkten Zell-Zell-Kontakt gestattet („Transwell-Assay“) (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). Es wird daher in der Literatur häufig von einem Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Suppressionsmechanismus gesprochen – ein Widerspruch zur IL-2-Kompetitionshypothese?

Bei sorgfältiger Betrachtung wird klar, dass die Konkurrenz um lösliche Mediatoren zwar nicht Zell-Zell-Kontakt-, wohl aber Distanz-abhängig ist. Wir konnten zeigen, dass durch IL-2, das die Zielzellen nach Aktivierung produzieren, ein dynamischer autokriner Rückkopplungs-Mechanismus in Gang gesetzt wird, der IL-2-Produktion sowie IL-2-Rezeptorexpression im Laufe der ersten 24 Stunden nach Aktivierung verstärkt (de la Rosa et al., 2004). Die Unterdrückung der IL-2-Produktion durch Treg oder anti-IL-2-Antikörper erfordert, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkt diese Rückkopplung blockiert wird. Hierzu müssen Treg in räumlicher Nähe zur Zielzelle sein, um IL-2 „abzufangen“, bevor es von den Zielzellen selbst aufgenommen werden kann. Da viele lokale Immunprozesse durch Zytokine reguliert werden, war es interessant, eine quantitative Beschreibung der Zytokinwirkung unter Einbeziehung topologischer (Zell-Zell-Abstand) und biophysikalischer Parameter (Sekretionsrate, Rezeptorexpression und -umsatzgeschwindigkeit sowie autokrine Rückkopplungsschleifen) zu versuchen. Dies wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Thomas Höfer, Institut für Biologie, Theoretische Biophysik, HU-Berlin, durchgeführt [Busse D, Diplomarbeit HU-Berlin 2006, (Scheffold et al., 2005) und Busse *et al.* Manuskript in Vorbereitung].

Diese Analyse zeigte, dass über einen weiten Bereich verschiedener IL-2-Sekretionsraten Konkurrenz durch Treg sehr effektiv ist, vorausgesetzt der Zell-Zell-Abstand liegt im Bereich von maximal 1-2 Zelldurchmessern. Im Transwell-Assay liegt der Abstand hingegen im Bereich von ca. 100 Zelldurchmessern, was effektive Konkurrenz unmöglich macht. Interessanterweise ist die T-Zellaktivierung in diesem Modell kein kontinuierlicher Prozess. Unterschreitet die T-Zellrezeptorstimulation und damit die IL-2-Sekretion einen kritischen Wert, bleibt die Aktivierung vollständig aus, d.h. die autokrine Rückkopplungsschleife wird nicht in Gang gesetzt. Wird der kritische Wert überschritten, kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der Aktivierung durch Anschalten der Rückkopplungsschleife. Die Einführung von Treg in das System verschiebt den kritischen Wert zu höheren IL-2-Sekretionsraten. Die Effektivität der Treg hängt außer vom Zell-Zell-Abstand vornehmlich vom initialen Unterschied in der IL-2-Rezeptorexpression ab. Dieses mathematische Modell unterstützt also die ursprüngliche Annahme, dass die konstitutive IL-2-Rezeptorexpression einen wichtigen physiologischen Parameter für das Überleben und die Aktivierung von Treg darstellt, über den eine ausreichende IL-2 Versorgung gewährleistet wird. Die sprunghafte Aktivierung wurde auch im experimentellen System beobachtet. Derzeit werden weitere Details der mathematischen Vorhersage experimentell überprüft.

Bedeutung der in vivo Konkurrenz um IL-2 für die Treg-Funktion?

Bei *in vitro* Tests der suppressiven Aktivität, z.B. Suppression der IL-2-Produktion oder der Proliferation von mit anti-CD3 aktivierten T-Zellen, ist IL-2 limitiert und die IL-2-Konkurrenz daher ein dominanter Faktor. Klein *et al.* konnten zeigen, dass Konkurrenz um IL-2 auch *in vivo* stattfindet (Klein *et al.*, 2003). *In vivo* ist IL-2 für T-Zellen aber kein essentieller Proliferationsfaktor, und Treg sind in der Lage, IL-2-unabhängige Immunprozesse zu regulieren (Malek *et al.*, 2002), was Konkurrenz als alleinigen Mechanismus ausschließt.

Allerdings wurde die aktivierende Rolle von IL-2 für die T-Zellreaktion *in vivo* aufgrund des drastischen hyperproliferativen Phänotyps der IL-2/IL-2R-defizienten Mäuse nicht im Detail analysiert. Erst in jüngster Zeit wird versucht, in verfeinerten experimentellen Systemen wie Knochenmarks-Chimären oder durch adoptiven Transfer kleiner T-Zellpopulationen mit IL-2/IL-2R-Defizienz die tatsächliche Funktion von IL-2 in einer spezifischen Immunreaktion genauer zu bestimmen. Erste Ergebnisse zeigen beispielsweise, dass IL-2 für die unmittelbare Expansion in der Primärantwort nicht unbedingt erforderlich ist. Jedoch scheint die Anwesenheit von IL-2 während der Primärantwort einen Expansionsvorteil für die sekundäre Stimulation zu bewirken, so dass IL-2 möglicherweise die Gedächtnisantwort positiv reguliert (Dooms *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2006). Außerdem scheint IL-2 auch für die Generierung von Treg aus konventionellen T-Zellen in der Peripherie notwendig zu sein (Knoechel *et al.*, 2005). Inwieweit Treg bei diesen Prozessen durch IL-2-Konkurrenz interferieren, ist noch unbeantwortet.

Ebenfalls unklar ist, inwieweit IL-2 im normalen Immunsystem neben der Treg-Homöostase auch deren Aktivierung steuert und welche zusätzlichen Signale daran beteiligt sind. Es gibt jedoch vermehrt Hinweise darauf, dass IL-2-Gabe *in vivo* Treg aktiviert. Durch Injektion eines IL-2-IgG2b-Fusionsproteins wurden nicht nur zelluläre und humorale Immunantworten unterdrückt, sondern in zwei experimentellen Krankheitssystemen, Kolitis und Organtransplantation, auch die pathologische Immunreaktion verhindert (Kunzendorf *et al.*, 1996; Ruckert *et al.*, 2002; Ruckert *et al.*, 1998; Stallmach *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1998). Diese suppressive Wirkung beruhte nicht auf der Depletion aktivierter Zellen, sondern es war vielmehr eine Zunahme der CD25⁺ T-Zellen zu beobachten. Im Falle der experimentellen Kolitis war auch eine erhöhte IL-10-Produktion feststellbar, und der suppressive Effekt konnte durch IL-10-Blockade aufgehoben werden (Stallmach *et al.*, 1999). Wir und andere konnten zeigen, dass IL-2 in Treg die Fähigkeit zur IL-10-Produktion induziert (Barthlott *et al.*, 2005; de la Rosa *et al.*, 2004). Damit konnte ein erster von IL-2 induzierter immunsuppressiver Faktor identifiziert werden. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die *in*

in vivo Applikation von IL-2-IgG2b zur Expansion von Foxp3⁺ Treg und zur verstärkten IL-10-Produktion führt. Wir haben ebenso Hinweise darauf, dass DNA-Vakzinierung mit IL-2-Plasmiden eine Treg-abhängige Suppression von Antigen-spezifischer T-Zellproliferation sowie von *delayed-type hypersensitivity*-Reaktionen hervorruft (Brandenburg *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

Wie erwähnt, scheint IL-2 aber nicht der einzige aktivierende Faktor zu sein, da Treg aus CD25-defizienten Mäusen *in vitro* suppressorische Aktivität (D'Cruz and Klein, 2005; Fontenot et al., 2005) besitzen und IL-2/IL-2-Rezeptor-defiziente Mäuse im Vergleich zu Foxp3-defizienten Mäusen, die keine Treg besitzen, einen schwächeren pathologischen Phänotyp aufweisen (Fontenot et al., 2005). So lange jedoch nicht geklärt ist, welche suppressorischen Effektormoleküle für eine bestimmte suppressorische Funktion erforderlich sind, lassen sich auch die entsprechenden Aktivierungssignale nicht eindeutig definieren.

Zytokininduktion und Zytokinedächtnis in Treg versus konventionellen T-Zellen

Der Vergleich mit konventionellen T-Zellen zeigte, dass die IL-10-Induktion in Treg anders reguliert wird. In naiven T-Zellen ist IL-4 hinreichend, um auch in Abwesenheit von IL-2 eine Th2-Differenzierung und damit IL-10 zu induzieren [Übersicht in (Ansel et al., 2006)]. Treg hingegen benötigen IL-2, wobei IL-4 einen starken synergistischen Effekt ausübt [(Barthlott et al., 2005; de la Rosa et al., 2004)]. Dieser Unterschied könnte möglicherweise ein Hinweis auf eine unterschiedliche Ebene der Regulation der Zytokinexpression sein. In Th2-Zellen ist die IL-10-Produktion wie die Produktion der meisten anderen Zytokine transkriptionell reguliert. Die IL-10-mRNA-Menge korreliert mit der IL-10-Proteinproduktion, was unter anderem auch durch die mRNA-Analyse sortierter IL-10-Produzenten aus Th2-Kulturen gezeigt wurde (A. Radbruch, H.-D. Chang, unveröffentlichte Ergebnisse). Es ist bekannt, dass Treg, insbesondere $\alpha_E\beta_7^+$ Treg (Jochen Hühn persönliche Mitteilung), bereits *ex vivo* ohne weitere Stimulation eine erhöhte IL-10-mRNA-Menge aufweisen (Fontenot et al., 2005; McHugh et al., 2002). Trotzdem ist auch nach Kurzzeitstimulation mit PMA/Ionomycin keine oder nur eine sehr geringe IL-10-Proteinproduktion nachweisbar. Dies könnte auf eine posttranskriptionelle Regulation der IL-10-Sekretion in Treg hinweisen, die durch IL-2 gesteuert wird. Die IL-10-Induktion durch IL-2 scheint außerdem *in vitro* transient zu sein (S. Brandenburg, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch $\alpha_E\beta_7^+$ Treg, die ansonsten einen „Gedächtniszell“-Phänotyp aufweisen, benötigen IL-2 für die Induktion von IL-10.

Insgesamt hätte dies eine interessante Konsequenz für die Abrufung des Zytokinedächtnisses. Während in konventionellen Gedächtniszellen ein T-Zellrezeptorsignal

ausreicht, um die Produktion der bereits vorprogrammierten Zytokine zu induzieren, benötigen Treg auch nach wiederholter Antigenstimulation weiterhin Ko-Stimulation über IL-2, die sie im Verlauf einer Immunantwort zum Beispiel von aktivierten DC oder T-Zellen erhalten. Dies könnte tatsächlich einen wichtigen zusätzlichen Kontrollmechanismus darstellen, da Treg hohe Affinität für Selbstantigene aufweisen (Hsieh et al., 2004; Hsieh et al., 2006; Jordan et al., 2001; Kawahata et al., 2002; Stephens and Ignatowicz, 2003) und *in vivo* daher einem kontinuierlichen T-Zellrezeptor-Signal ausgesetzt sind (Fisson et al., 2003). Wäre die suppressive Aktivität alleine durch T-Zellrezeptorsignale gesteuert, würde eine dauernde Immunsuppression resultieren. Die IL-2-abhängige Induktion von suppressiven Effektorfunktionen könnte eine zeitliche und lokale Kopplung der suppressiven Aktivität an eine aktive Immunreaktion bewirken.

Zweistufenmodell der Regulation der Treg-Aktivierung durch IL-2

IL-2 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen produziert, vereinzelt gibt es auch Berichte, dass aktivierte DC IL-2 sezernieren (Granucci et al., 2001; Granucci et al., 2003). Beide Zelltypen stellen mögliche Zielzellen der Treg-vermittelten Suppression dar. Daraus haben wir ein neues Modell der Regulation der Treg-Aktivität durch die Zielzellen entwickelt.

Im nicht-aktivierten Immunsystem werden konstant geringe Mengen an IL-2 produziert. Dieses IL-2 stammt vermutlich von einer Population von CD25^{intermediär} CD4⁺ T-Zellen, die unter diesen Bedingungen die höchsten IL-2-mRNA-Level aufweist (Setoguchi et al., 2005) – eventuell induziert durch kontinuierliche, niedrigaffine T-Zellrezeptorstimulation, wie sie für die T-Zellhomöostase notwendig ist (Polic et al., 2001). Es gibt auch experimentelle Hinweise darauf, dass die Zahl der Treg durch die Zahl der IL-2⁺CD4⁺ T-Zellen reguliert wird (Almeida et al., 2006). Diese IL-2-Menge scheint jedoch nicht auszureichen, um IL-10-Produktion zu ermöglichen, da *ex vivo* Treg nach T-Zellrezeptorstimulation kein IL-10 sezernieren. Ob das „Wegfangen“ des im Grundzustand produzierten IL-2 durch Treg bereits dazu beiträgt, die Aktivierung von autoreaktiven Zellen zu verhindern, ist nicht bekannt.

Im Zuge einer Immunreaktion gegen Pathogene werden T-Zellen oder DC aktiviert, die lokal große Mengen IL-2 ausschütten. Unter diesen Bedingungen spielt Konkurrenz vermutlich keine Rolle, aber den Treg steht genug IL-2 zur Verfügung, um die Fähigkeit zur IL-10-Produktion anzuschalten. Die IL-10-Induktion erfordert neben IL-2 auch eine Aktivierung der Treg über den T-Zellrezeptor, die, wie oben besprochen, durch die erhöhte Autoreaktivität der Treg gewährleistet wird. In Übereinstimmung mit diesem Modell, sind Treg, die aus Geweben isoliert werden, in denen eine aktive Immunreaktion stattfindet, nach Kurzzeitstimulation in

der Lage, IL-10 zu produzieren (Belkaid et al., 2002; Hesse et al., 2004; Klein et al., 2003). Wie bereits erwähnt, bewirkt die transiente Fähigkeit zur IL-10-Produktion eine enge zeitliche und räumliche Kopplung der Treg-Aktivität an die Immunreaktion. Es ist derzeit nicht bekannt, welche weiteren suppressiven Mechanismen aktiviert werden bzw. welche weiteren Signale hierfür erforderlich sind. Es ist klar, dass IL-10 nicht als alleiniger suppressiver Faktor ausreicht. Im Vergleich zu Treg-defizienten Mäusen weisen IL-10-defiziente Mäuse nur eine begrenzte Immunpathologie auf (Kuhn et al., 1993). Möglicherweise verfügen Treg auch über die Fähigkeit, auf verschiedene Stimuli aus der Umgebung verschiedene Effektorfunktionen zu aktivieren und auf diese Weise eine an die jeweiligen Bedingungen adaptierte Kontrolle auszuüben.

Implikationen für die Immuntherapie mit IL-2

IL-2 wird in verschiedenen Bereichen (Tumorimmunologie, HIV-Infektionen, Vakzinierung, therapeutisch eingesetzt) in der Regel um eine Aktivierung des Immunsystems zu erreichen [Übersicht in (Antony and Restifo, 2005; Atkins, 2002; Gaffen and Liu, 2004)]. Die Erfolge sind jedoch schwankend, und es ergeben sich starke Nebenwirkungen aufgrund der pleiotropen Wirkung von IL-2. Wie oben diskutiert, wird IL-2 nach neuesten Erkenntnissen weniger als Aktivator der T-Zellreaktion gesehen, die Hauptfunktion scheint vielmehr die Regulation der Treg-Homöostase und die Aktivierung ihrer suppressorischen Funktion zu sein (Malek, 2003). In mit IL-2 behandelten Patienten lassen sich auch expandierte Treg-Populationen nachweisen (Ahmadzadeh and Rosenberg, 2006; Cesana et al., 2006; Sereti et al., 2005; Sereti et al., 2002; Zhang et al., 2005). Zorn *et al.* zeigen, dass Foxp3 durch IL-2 in Abhängigkeit von STAT3 und STAT5 hochreguliert wird und die Expansion von Treg in IL-2-behandelten Patienten induziert (Zorn et al., 2006). Zukünftige Strategien sollten also darauf abzielen, die Stärkung des suppressiven Arms des Immunsystems durch IL-2 zu unterbinden, z.B. durch Treg-Depletion, die Verwendung von alternativen Zytokinen wie IL-15 oder die gezielte Aktivierung von Effektorzellen beispielsweise durch lokale Applikation und entsprechende Dosierung.

Im Gegenzug bietet die gezielte Aktivierung von Treg durch IL-2 die Möglichkeit, die Immunsuppression zu stärken, z.B. in chronischen Entzündungsreaktionen oder Autoimmunität. Allerdings muss hier umgekehrt eine generelle Immunaktivierung durch IL-2 verhindert werden. Dies könnte eventuell durch entsprechend niedrige Dosierung erreicht werden, da nur Treg konstitutiv den hochaffinen IL-2-Rezeptor exprimieren. Alternativ könnten gentechnisch modifizierte Treg eingesetzt werden, deren IL-2-Signalweg konstitutiv

aktiv ist. Zuletzt bleibt zu klären, ob weitere Signale definiert werden können, die zu einer selektiven Aktivierung der Treg-Funktion führen.

Treg-Subpopulationen mit definierten funktionellen Charakteristika

Für gezielte therapeutische Anwendungen stellt sich außerdem die Frage, ob die Population der CD4⁺CD25⁺ Treg in Subpopulationen unterteilt werden kann, die über spezialisierte Fähigkeiten verfügen. Dies ist vor allem für die therapeutische Nutzung interessant, um optimierte Treg oder Treg-Aktivierungsprotokolle einsetzen zu können. Über die Expression des Integrins $\alpha_E\beta_7$ konnten wir in Kooperation mit den AGs Hamann und Hühn, beide Charité, Berlin, erstmals funktionell distinkte Treg-Subpopulationen klassifizieren, die den Phänotyp naiver T-Zellen bzw. den von Gedächtniszellen widerspiegeln und zudem über ein spezifisches Migrationsverhalten *in vivo* verfügen (Huehn et al., 2004; Lehmann et al., 2002; Siegmund et al., 2005).

Aber auch hinsichtlich der Zytokinproduktion sind Treg heterogen. Beispielsweise ist auch nach IL-2/IL-4-Stimulation nur ein Teil der Treg in der Lage, IL-10 zu produzieren. Allerdings konnten bisher Zytokin-produzierende Zellen nicht anhand spezifischer Oberflächenmarker aufgetrennt werden. Wir haben mit der Charakterisierung der Oberflächenexpression der Zytokine IL-10 und IFN- γ auf Zytokin-produzierenden Zellen zwei natürliche Identifikationsmarker beschrieben (Assenmacher et al., 1996; Scheffold et al., 2000). Damit können Zytokin-produzierende T-Zellpopulationen direkt anhand eines physiologischen Markers aufgereinigt und funktionell analysiert werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass diese Oberflächen-gebundenen Zytokine funktionelle Relevanz aufweisen, zum Beispiel bei Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Prozessen.

Identifizierung Zellmembran-gebundener Zytokine

Die Entwicklung der hochsensitiven Immunfluoreszenz machte es durch Einsatz magnetofluoreszenter Liposomen möglich, Moleküle, die in weniger als hundert Kopien pro Zelle vorliegen, sicher zu detektieren und positive Zellen zu sortieren (Scheffold et al., 2000; Scheffold et al., 1995). Konventionelle Fluorochrom-markierte Antikörper haben dagegen ein Detektionslimit von mehreren Tausend Molekülen pro Zelle. Mit unserer Technologie konnten wir zeigen, dass die Zytokine IL-10 und IFN- γ auf der Zelloberfläche der Zellen exprimiert sind, die die Zytokine produzieren (Assenmacher et al., 1996; Scheffold et al., 2000). Die Art der Verankerung in oder an der Membran ist derzeit unklar. Die Bindung an

den Zytokinrezeptor oder passive Adsorption konnten als Mechanismus ausgeschlossen werden. Außerdem wurde die Oberflächenexpression auch in verschiedensten transfizierten Zelllinien unterschiedlicher Spezies detektiert, was die Existenz eines unbekanntes Rezeptors unwahrscheinlich macht. Die Oberflächenverankerung scheint eine spezifische Eigenschaft von IFN- γ und IL-10 zu sein, da zum Beispiel die Zytokine IL-2 und IL-4 nicht nachgewiesen werden konnten. Es gibt weitere Berichte über die Oberflächenexpression von Proteinen, die wie IL-10 und IFN- γ keine klassische Membrandomäne oder eine andere spezifische Verankerungsstelle besitzen (Kaplan et al., 1983; Kaul and Loos, 1995; Thorner et al., 1982). Wir haben vor kurzem in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Frank Buttgerit, Charité Berlin, ebenfalls mittels der hochsensitiven Immunfluoreszenz auch eine Membran-gebundene Form des Glukokortikoid-Rezeptors nachgewiesen (Bartholome et al., 2004; Buttgerit and Scheffold, 2002; Spies et al., 2006; Tryc et al., 2006). In allen Fällen ist die Verankerungsweise in der Membran ungeklärt, und es gibt auch keine schlüssigen Hinweise auf Gemeinsamkeiten. In den meisten Fällen wird eine sehr geringe Menge an Membran-gebundenen Molekülen exprimiert, während die intrazelluläre oder sezernierte Variante in sehr viel größerer Zahl pro Zelle vorliegt. Daher ist nicht auszuschließen, dass die nachgewiesenen Membran-gebundenen Moleküle ein Resultat der natürlichen Fehlerquote der zellulären Biosynthese sind. Beispielsweise könnte ein nicht abgetrenntes Signalpeptid bei sezernierten Proteinen für eine Verankerung in der Membran verantwortlich sein.

Membran-gebundene Zytokine als spezifische Marker funktioneller Subpopulationen

Unabhängig von der funktionellen Bedeutung sind die beschriebenen Membran-gebundenen Zytokine wichtige technische Hilfsmittel. Die direkte Korrelation der Oberflächenexpression mit der Zytokinsekretion machte es möglich, Zytokin-produzierende Zellen zu sortieren und getrennt funktionell zu analysieren (Assenmacher et al., 1998; Assenmacher et al., 1998; Austrup et al., 1997; Klugewitz et al., 2000; Scheffold et al., 1998). Innerhalb der meisten T-Zellpopulationen, wie oben für Treg beschrieben, besteht eine deutliche Heterogenität hinsichtlich der Zytokinproduktion einzelner Zellen. Die Sortierung von IL-10-produzierenden Treg ist daher eine Möglichkeit, um die Stabilität des Zytokingedächtnisses zu analysieren und gegebenenfalls spezifische Transkriptionsfaktoren oder andere Regulationsmechanismen der IL-10-Produktion zu identifizieren. Außerdem soll untersucht werden, ob IL-10-produzierende Treg möglicherweise über ein erhöhtes suppressives Potential in bestimmten Krankheitssituationen verfügen.

Bisher ebenfalls ungeklärt ist die Funktion Membran-gebundener Zytokine. Theoretisch sollten die Rezeptorbindungsstellen frei verfügbar sein, da die Bindung, wie beschrieben, nicht über den Rezeptor erfolgt. Ein weiterer Hinweis darauf ist, dass auch die verschiedenen zur Detektion verwendeten Antikörper innerhalb der Rezeptorbindungsstelle binden, diese also bei den Membranzytokinen frei zugänglich ist. Es gibt vereinzelte Hinweise, dass Membran-gebundenes IFN- γ funktionell ist (Chizzolini et al., 1997; Chizzolini et al., 1998; Rezzonico et al., 1998). Über die Wirkung von Membran-IL-10 auf T-Zellen ist derzeit nichts bekannt. Trotz der geringen Expression im Vergleich zur sezernierten Form, könnte die Membran-gebundene Variante aufgrund ihrer längeren Halbwertszeit (Scheffold et al., 1998) und bei Zellkontakt-vermittelten Prozessen eine Rolle spielen. Es gibt Hinweise darauf, dass Treg selektiv eine Oberflächenform des immunsuppressiven Zytokins TGF- β exprimieren, die möglicherweise in die suppressive Aktivität involviert ist (Nakamura et al., 2001). Eine vergleichende Analyse der TGF- β - und IL-10-Expression und eine mögliche Rolle für die Membran-gebundenen Zytokinvarianten wird ebenfalls Teil weiterer funktioneller Untersuchungen IL-10-sezernierender Treg sein.

Identifizierung von Treg-Subpopulationen mit definiertem Phänotyp

Ein weiterer Schritt zur Definition der Parameter, die für die Suppression relevant sind, war die Unterscheidung von Treg-Subpopulationen anhand der Expression des Integrins $\alpha_E\beta_7$ (Huehn et al., 2004; Lehmann et al., 2002; Siegmund et al., 2005). Diese Untersuchungen wurden möglich durch die Kooperation mit den AGs Hamann und Hühn, die auf die Analyse der Migrationseigenschaften von Immunzellen spezialisiert sind. Neben den $\alpha_E\beta_7^{+/-}$ CD25⁺ Treg wurde auch eine CD25⁻ $\alpha_E\beta_7^{+}$ Population identifiziert. Alle drei Populationen exprimieren Foxp3. Eine Expressionsanalyse ergab deutliche Unterschiede zwischen den Subpopulationen, insbesondere im Bereich der Aktivierungsmarker sowie Migrations- und Adhäsions-relevanter Moleküle. $\alpha_E\beta_7^{-}$ Treg weisen erhöhte Expression der für die Migration in die Lymphknoten notwendigen CCR7 und CD62L auf, die typisch für naive T-Zellen sind. Beide $\alpha_E\beta_7^{+}$ Treg hingegen exprimieren verstärkt Aktivierungsmarker (CD69, Ki67), kostimulatorische und Adhäsionsmoleküle [ICOS, CD54, β_1 -Integrin, LFA-1 (β_2 -Integrin), E- und P-Selektin-Ligand] bzw. Chemokinrezeptoren (CXCR3, CXCR4), die unter anderem für die Migration in entzündete Gewebe notwendig und typisch für T-Zellen mit Gedächtnis- oder Effektorotyp sind (Huehn et al., 2004; Lehmann et al., 2002).

Das Migrationspotential als ein kritischer Parameter der Suppression in vivo

Wir konnten nicht nur phänotypische, sondern auch funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Treg-Subpopulationen nachweisen. $\alpha_E\beta_7^+$ Treg zeigten erhöhte Migration in Reaktion auf die inflammatorischen Chemokine CXCL9 (Mig, CXCR3-Ligand), CCL17 (TARC, CCR4-Ligand) und CCL20 (LARC, CCR6-Ligand), während $\alpha_E\beta_7^-$ Treg verstärkte Migration auf den CCR7-Liganden CCL19 (ELC) aufwiesen, der für die Migration in die lymphoiden Gewebe notwendig ist (Huehn et al., 2004). Auch *in vivo* wurde ein entsprechendes Migrationsverhalten nachgewiesen: $\alpha_E\beta_7^+$ Treg wandern vornehmlich in entzündete Gewebe ein, während $\alpha_E\beta_7^-$ Treg durch die Lymphknoten rezirkulieren. In einem Arthritismodell konnten wir außerdem zeigen, dass die verstärkte Migration in entzündete Gewebe tatsächlich auch mit erhöhtem suppressorischen Potential assoziiert ist. In weiteren Untersuchungen der AG Huhn mit Fucosyltransferase VII^{-/-} Treg, die keinen funktionellen E- und P-Selektinliganden exprimieren, wurde gezeigt, dass die Migration in entzündete Gewebe tatsächlich die Voraussetzung für die Suppression in einem Hautentzündungsmodell ist (Siegmund et al., 2005).

Umgekehrt wurde nachgewiesen, dass Immunreaktionen, die im Lymphknoten stattfinden, durch CD62L⁺ Treg verstärkt unterdrückt werden, die besser in die Lymphknoten einwandern können (Ermann et al., 2005; Siegmund et al., 2005; Szanya et al., 2002). Diese Daten weisen darauf hin, dass nicht die suppressive Aktivität an sich auf $\alpha_E\beta_7^+$ Treg beschränkt ist, sondern tatsächlich die Lokalisierung der Treg am jeweiligen Ort der Immunreaktion der bestimmende Faktor ist.

Zusätzliche Parameter, die die in vivo Suppression durch $\alpha_E\beta_7^+$ Treg beeinflussen könnten

Neben der Migration ist wahrscheinlich die Fähigkeit, bestimmte suppressorische Effektormoleküle zu generieren, sowie die Antigenspezifität für die Wirksamkeit der Treg *in vivo* relevant. Wie beschrieben, weisen $\alpha_E\beta_7^+$ Treg nach IL-2 Stimulation eine höhere Frequenz IL-10-produzierender Zellen auf. Da IL-10 nicht das einzige suppressorische Effektormolekül ist und die jeweils relevanten Moleküle derzeit noch nicht bekannt sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass $\alpha_E\beta_7^+$ und $\alpha_E\beta_7^-$ Treg diesbezüglich weitere Unterschiede aufweisen. Da verschiedene Subpopulationen, die über ihr Migrationspotential definiert wurden, unterschiedliche Immunreaktionen regulieren, besteht die Möglichkeit, dass auch jeweils verschiedene suppressive Effektorfunktionen von $\alpha_E\beta_7^+$ bzw. $\alpha_E\beta_7^-$ Treg genutzt

werden. Für eine bestimmte Situation könnte also die Regulation aus einer optimierten Kombination von Lokalisierung und geeigneter suppressiver Effektorfunktion resultieren. Ein weiterer wichtiger Parameter könnte die Antigen-spezifität der $\alpha_E\beta_7^+$ und $\alpha_E\beta_7^-$ Treg sein. Durch die Verwendung T-Zellrezeptor-transgener Treg ist bekannt, dass Antigen-spezifische Treg prinzipiell höhere suppressive Aktivität besitzen als nicht-transgene Kontroll Treg [(Siegmond et al., 2005; Tang et al., 2004; Tarbell et al., 2004) und eigene nicht-veröffentlichte Ergebnisse]. Da Treg hohe Affinität für Autoantigene besitzen (Hsieh et al., 2004; Hsieh et al., 2006; Jordan et al., 2001; Kawahata et al., 2002; Stephens and Ignatowicz, 2003) und daher in der Peripherie ständig aktiviert werden (Fisson et al., 2003), könnte die Differenzierung in Gedächtnis-/Effektor-Treg darüber erfolgen. Dafür spricht, dass $\alpha_E\beta_7^+$ Treg den frühen Aktivierungsmarker CD69 und den Proliferationsmarker Ki67 verstärkt exprimieren und außerdem eine geringe Zahl an so genannten *TRECs* aufweisen (Huehn et al., 2004; Lehmann et al., 2002). Letzteres ist ein Indiz auf häufige Zellteilungen nach Verlassen des Thymus. Diese Antigen-abhängige Entstehung der $\alpha_E\beta_7^+$ Treg muss nicht auf Autoantigene beschränkt sein, sondern könnte zusätzlich auch durch externe Antigene induziert werden. Auf diese Weise wäre das Erreichen des $\alpha_E\beta_7^+$ Treg-Pools mit einer Antigenselektion verbunden, z.B. für Antigene, die besonders stark in der Peripherie präsentiert werden. Die daraus resultierenden Unterschiede in der Antigen-spezifität zwischen $\alpha_E\beta_7^+$ und $\alpha_E\beta_7^-$ Treg könnten ein weiterer Grund für das unterschiedliche suppressorische Potential *in vivo* sein. Inwieweit diese Selektion stattfindet, unter welchen Bedingungen $\alpha_E\beta_7^+$ Treg entstehen und ob die Antigen-spezifität für die *in vivo* beobachteten Unterschiede relevant ist, wird derzeit untersucht.

Die Regulation der Treg-Aktivität erfolgt auf verschiedenen Ebenen

Aus den hier beschriebenen Untersuchungen lassen sich zwei Ebenen der Regulation der Treg-Aktivität ableiten. Eine Ebene ist die räumliche Verteilung innerhalb der verschiedenen Gewebe. Die spezifischen Migrationseigenschaften und eventuell weitere funktionelle Unterschiede, die mit dem Gedächtnis/Effektorzell-Phänotyp assoziiert sind, scheinen ein stabiler Differenzierungszustand zu sein, der möglicherweise durch wiederholten Antigenkontakt induziert wird. Die zweite Ebene hingegen ist transient und besteht in der Aktivierung der Suppressorfunktion durch Ko-Stimulation über IL-2, das lokal von aktivierten T-Zellen oder DC zur Verfügung gestellt wird. Von dieser Stimulation sind sowohl $\alpha_E\beta_7^+$ Treg als auch $\alpha_E\beta_7^-$ Treg betroffen (nicht veröffentlichte Ergebnisse), das heißt beide Regulationsebenen sind unabhängig voneinander. Allerdings ist die Frequenz an IL-10-

Produzenten nach IL-2-Stimulation höher innerhalb der $\alpha_E\beta_7^+$ Treg. Wie diese Art von „Gedächtnis“ für IL-10 molekular geprägt wird, ist unbekannt. Weitere Analysen müssen daher zeigen, ob zur *in vivo* Effizienz der $\alpha_E\beta_7^+$ Treg zusätzlich zum Migrationspotential auch die Fähigkeit beiträgt, verstärkt suppressive Moleküle oder distinkte Molekülgruppen zu exprimieren. In diesem Zusammenhang muss, wie oben besprochen, auch die Rolle der Antigenpezifität der verschiedenen Subpopulationen untersucht werden.

Diese Untersuchungen haben das Ziel, diejenigen Effektorfunktionen zu identifizieren, die für eine Suppression einer bestimmten Pathologie erforderlich sind und ihre Induktionswege zu verstehen. So soll es möglich werden, funktionell speziell zugeschnittene Treg-Populationen für therapeutische Zwecke zu induzieren oder gezielt zu selektionieren. Mit der Identifizierung von spezifischem Migrationspotential und IL-2-vermittelter Aktivierung der suppressiven Effektorfunktion sind zwei wichtige Parameter identifiziert, die die Separation funktionell definierter Subpopulationen ermöglichen.

3.2 Induktion suppressorischer T-Zellen in der Peripherie

Neben der Charakterisierung von Treg-Aktivierungssignalen und Treg-Subpopulationen mit spezifischen Suppressionsfähigkeiten, wie in den vorigen Abschnitten beschrieben, haben wir auch versucht, die Signale zu charakterisieren, die möglicherweise die Differenzierung von suppressorischen T-Zellen *in vivo* steuern. Zum einen haben wir den Einfluss des Notch-Signalwegs auf die periphere T-Zellaktivierung und -differenzierung untersucht, da es Hinweise gibt, dass Notch-Signale für die Entstehung suppressorischer T-Zellen von Bedeutung sein können (Anastasi et al., 2003; Hoyne et al., 2000; Vigouroux et al., 2003; Wong et al., 2003; Yvon et al., 2003). Die hierfür verantwortlichen Signale werden wahrscheinlich durch bestimmte Antigen-präsentierende Zellen vermittelt, die *in vivo* die Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen steuern. Daher war es ein weiterer Ansatzpunkt unserer Arbeit, diejenigen APC zu identifizieren, die nach tolerogenen Antigenapplikationsformen, z.B. oraler Antigengabe, die antigenen Peptide *in vivo* präsentieren.

Die Modulation der T-Zellaktivierung durch Notch/Notch-Ligand-Interaktion

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen waren Berichte über eine Notch-vermittelte Differenzierung peripherer T-Zellen in T-Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften

(Anastasi et al., 2003; Hoyne et al., 2000; Vigouroux et al., 2003; Wong et al., 2003; Yvon et al., 2003). In diesen experimentellen Systemen war nicht geklärt, ob die beobachtete Differenzierung durch ein direkt auf die T-Zellen wirkendes Notch-Signal, vermittelt durch einen bestimmten Liganden, induziert wurde, oder ob indirekte Effekte verantwortlich sind, z.B. die Notch-vermittelte Modulation der APC selbst. Daher haben wir in einem APC-freien System die Effekte der Notch-Liganden Jagged1, Dll1, Dll4 auf die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung/-aktivierung analysiert. Wir konnten zeigen, dass die Notch-Liganden unterschiedliche Bindungsaffinität an T-Zellen aufweisen, wobei die Bindungsstärke mit der Aktivierung des klassischen Notch-Signalweges korrelierte (Dll4 > Dll1 > Jagged1). Das eigentlich überraschende Ergebnis aber war, dass Notch-Liganden direkt frühe T-Zellaktivierungsereignisse modulieren. Jagged1 und etwas weniger ausgeprägt Dll1 inhibieren die T-Zellaktivierung, während Dll4 ko-stimulierende Wirkung zeigte. Diese Notch-Ligand-vermittelten Effekte waren unabhängig vom klassischen, über γ -Sekretase vermittelten Notch-Signalweg. Dementsprechend spielt die transkriptionelle Regulation, beispielsweise eines T-Zellrezeptorinhibitors, durch NICD vermutlich keine Rolle. Vielmehr beruht der Effekt vermutlich auf einer direkten Inhibition des frühen T-Zellrezeptorsignals. Dies wird nahe gelegt durch die schnelle Wirkung - erste Effekte waren bereits nach 30-45 Minuten detektierbar - sowie die Inhibition der wichtigsten, über den T-Zellrezeptor aktivierten Transkriptionsfaktoren, NF- κ B, AP-1 und NF-AT. Für eine Membran-proximale Wirkung auf die T-Zellrezeptorsignalkette spricht außerdem, dass PMA-Stimulation, die unterhalb des T-Zellrezeptors auf der Ebene der Proteinkinase C (θ) wirkt, nicht inhibiert wird. Die Notch-Aktivierung muss zudem durch kreuzvernetzende Liganden und räumlich wie zeitlich gekoppelt an den T-Zellrezeptorstimulus erfolgen. In einer physiologischen T-Zell-APC-Interaktion würde dies einer Rekrutierung von Notch in die immunologische Synapse entsprechen, was kürzlich für Notch-1 und den Notch-Inhibitor Numb gezeigt wurde (Anderson et al., 2005; Benson et al., 2005).

Unsere Ergebnisse zeigen also erstmals, dass verschiedene Notch-Liganden die T-Zellrezeptoraktivierung in unterschiedliche Richtung beeinflussen können, wobei dies in beiden Fällen unabhängig vom klassischen Notch-Signalweg stattfindet.

Die Rolle von Notch für T-Zellaktivierung/Differenzierung

Aus bisher veröffentlichten Daten ergibt sich für die Rolle von Notch bei der T-Zellaktivierung und -differenzierung kein klares Bild [Übersicht in (Dallman et al., 2005)]. Es wurden sowohl T-Zell aktivierende (Adler et al., 2003; Palaga et al., 2003) als auch

deaktivierende Effekte beschrieben (Eagar et al., 2004). Weiterhin wurde die durch Notch induzierte Differenzierung von naiven T-Zellen in wahlweise Th1- (Amsen et al., 2004; Maekawa et al., 2003; Minter et al., 2005), Th2- (Amsen et al., 2004; Tanaka et al., 2006; Tanigaki et al., 2004; Tu et al., 2005) oder suppressorische Zellen beschrieben (Hoyne et al., 2000; Vigouroux et al., 2003; Yvon et al., 2003). Ein wesentlicher Grund für diese zum Teil widersprüchlichen Resultate dürften die verschiedenen verwendeten experimentellen Systeme sein. Neben rekombinanten Liganden oder Liganden-überexprimierenden Zellen werden vielfach γ -Sekretase-Inhibitoren eingesetzt, die generell den klassischen Notch-Signalweg inhibieren, zum Teil aber auch andere γ -Sekretase-abhängige Prozesse mit entsprechenden Nebenwirkungen. Beispielweise bewirkt die durch γ -Sekretase-Inhibitoren induzierte Blockade der enzymatischen Spaltung des *Amyloid Precursor Proteins* (APP) eine Inhibition der T-Zellproliferation unabhängig von Notch (Benson et al., 2005). Gleichzeitig ist die Wirkung der Inhibitoren auch noch vom verwendeten Stimulationssystem abhängig, z.B. in An- oder Abwesenheit von APC (Eagar et al., 2004). Alternativ werden konstitutiv aktive Notch-Rezeptoren verwendet, die unabhängig von der Bindung eines Liganden sind, vermutlich aber ein unphysiologisch starkes, beziehungsweise lang andauerndes Signal vermitteln. Die Tatsache, dass diese Systeme jeweils unterschiedliche Signalstärke, -dauer und -qualität erzeugen, kann also die Ursache der zum Teil widersprüchlichen Resultate sein. Aufgrund der vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten, hervorgerufen durch die Expression auf verschiedensten Zelltypen und die wechselseitigen Interaktionsmöglichkeiten der verschiedenen Liganden und Notch-Rezeptoren, lässt sich derzeit nur schwer bestimmen, welche Effekte bei physiologischen Interaktionen relevant sind. Zur eindeutigen Klärung der Rolle von Notch ist es daher erforderlich, die molekulare Grundlagen der induzierten Differenzierungszustände aufzuklären.

Bezüglich des auch von uns untersuchten Einflusses von Notch auf die T-Zellaktivierung ergibt sich beim Vergleich der verschiedenen publizierten Ergebnisse eine gewisse Abhängigkeit vom experimentellen System. Untersuchungen mit konstitutiv aktiven Notch-Molekülen, oder Notch-Inhibition durch γ -Sekretase-Inhibitoren (Adler et al., 2003; Palaga et al., 2003) bzw. durch genetische Inaktivierung (Tanigaki et al., 2004) weisen eher auf eine aktivierende Rolle von Notch hin. Studien, bei denen die Liganden-induzierte Notch-Kreuzvernetzung eingesetzt wurden, fanden dagegen eher einen inhibitorischen Effekt (Eagar et al., 2004; Maekawa et al., 2003), den wir zumindest für die Liganden Jagged1 und Dll1 bestätigen konnten (Rutz et al., 2005). Dies ist jedoch kein generelles Schema, da es auch von konstitutiv aktivem Notch-1 Berichte gibt, dass T-Zellsignale (Izon et al., 2001)

beziehungsweise die Proliferation nach T-Zellaktivierung inhibiert sind (Benson et al., 2005). Allerdings weisen Resultate aus Mäusen, bei denen Notch-1 selektiv in CD4⁺ T-Zellen ausgeschaltet wurde, darauf hin, dass Notch-1 zumindest keine essentielle Rolle bei der Kontrolle der T-Zellaktivierung sowie der Th1- und Th2-Differenzierung *in vivo* spielt (Tacchini-Cottier et al., 2004). Allerdings werden zumindest in aktivierten T-Zellen alle 4 Notch-Rezeptoren exprimiert, was den Verlust eines einzelnen Rezeptors kompensieren könnte (Adler et al., 2003; Palaga et al., 2003).

Differentielle Beeinflussung der T-Zellaktivierung durch verschiedene Notch-Liganden

Unsere Ergebnisse weisen erstmals darauf hin, dass verschiedene Liganden unterschiedlichen Einfluss auf die T-Zellaktivierung ausüben. Solche funktionellen Unterschiede verschiedener Notch-Liganden bei der Leukozytendifferenzierung wurden bereits in anderen Systemen gefunden (Amsen et al., 2004; Aranguren et al., 2006; Jaleco et al., 2001; Lehar et al., 2004). Das könnte zum einen auf eine Aktivierung unterschiedlicher Notch-Rezeptoren durch die verschiedenen Liganden hinweisen, wofür es derzeit allerdings keine direkte experimentelle Evidenz gibt. Bekannt ist lediglich, dass zum Beispiel durch posttranslationale Glykosylierung von Notch durch Fringe die Affinität der Liganden Jagged und Delta gegensätzlich beeinflusst werden kann [Übersicht in (Haines and Irvine, 2003)]. Interessanterweise konnten wir eine negative Korrelation zwischen der inhibitorischen Wirkung der Liganden auf die T-Zellaktivierung und der Stärke der Aktivierung des klassischen Notch-Signalweges zeigen. Gleichzeitig ist die inhibitorische Wirkung der Liganden unabhängig vom klassischen Notch-Signalweg. Berücksichtigt man die oben beschriebenen widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich T-Zellaktivierung bei Liganden-basierten Systemen (supprimierend) *versus* Systemen, die ausschließlich den klassischen Notch-Signalweg adressieren (stimulierend), dann besteht die Möglichkeit, dass hier zwei gegenläufige Effekte miteinander konkurrieren. Der klassische Signalweg, der besonders durch Dll4 angeschaltet wird, verstärkt die T-Zellaktivierung. Die Liganden Jagged-1 und Dll1 induzieren den klassischen Signalweg nur schwach, bewirken dafür aber über eine direkte Interaktion mit der T-Zellrezeptorsignalkette eine Abschwächung der T-Zellaktivierung. Die von Eagar *et al.* gefundenen inhibitorischen Effekte von Dll1 sind zwar γ -Sekretase abhängig, blockieren aber auch direkt frühe T-Zellrezeptorsignale (Eagar et al., 2004). Ob die von Maekawa *et al.* beschriebenen inhibitorischen Effekte von Dll1 über den klassischen Weg vermittelt sind, wurde hingegen nicht untersucht (Maekawa et al., 2003).

Es kann spekuliert werden, dass für die differentielle Aktivierung des alternativen Weges die jeweilige Fähigkeit zur Aktivierung des klassischen Weges ursächlich sein könnte. Voraussetzung für die Inhibition früher T-Zellrezeptorsignale ist die räumliche Nähe von Notch zum T-Zellrezeptor. Wie oben beschrieben geschieht dies vermutlich durch die Rekrutierung von Notch in die immunologische Synapse (Anderson et al., 2005; Benson et al., 2005). Die Aktivierung des klassischen Signalweges induziert sequentiell eine Spaltung der extrazellulären und intrazellulären Notch-Domänen, so dass die Verweildauer von Notch in der Nähe zum T-Zellrezeptor nur kurz ist. Ein schwach bindender Ligand hingegen könnte Notch in die Synapse rekrutieren, ohne die Notch-Spaltung zu induzieren, woraus eine längere Verweildauer von Notch resultieren würde. Für die Rekrutierung eines Rezeptor/Ligand-Paares in die immunologische Synapse sind schwache Affinitäten durchaus ausreichend, was das Beispiel der T-Zellrezeptor-MHC-Interaktion belegt. Allerdings sind bisher weder die Verweildauer oder die Rekrutierung unterschiedlicher Notch-Rezeptoren noch die Effekte unterschiedlicher Liganden hierauf näher charakterisiert worden.

Alternative Notch-Signalwege

Alternative, d.h. γ -Sekretase bzw. CSL-unabhängige, Notch-Signalwege wurden bisher hauptsächlich in *Drosophila* beschrieben [Übersicht in (Martinez et al., 2002)]. Über die molekularen Mechanismen ist allerdings wenig bekannt. Es wurde eine γ -Sekretase-unabhängige Inhibition der „Jun N-terminal kinase“ (JNK) beschrieben (Ordentlich et al., 1998; Zecchini et al., 1999). Deltex spielt möglicherweise eine Rolle als Mediator der CSL-unabhängigen Notch-Signalvermittlung (Ramain et al., 2001). In Vertebraten gibt es über die molekularen Mechanismen dieser γ -Sekretase-unabhängigen Signalwege nur indirekte Hinweise. Beispielweise fanden Amsen *et al.*, dass in T-Zellen die Dll1 induzierte Th1-Differenzierung unabhängig von γ -Sekretase ist, während die Jagged-1-induzierte Th2-Differenzierung auf klassischem Weg erfolgt (Amsen et al., 2004). Unsere Ergebnisse zeigen, dass zumindest die inhibitorischen Effekte der Liganden Jagged-1 und Dll1 ebenfalls über einen γ -Sekretase-unabhängigen Weg verlaufen müssen (Rutz et al., 2005). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurden bei der durch Dll1 oder durch Notch-1-Antikörper induzierten Inhibition der T-Zellaktivierung ebenfalls sehr frühe Phosphorylierungsereignisse gehemmt. Eine so schnelle Wirkung macht eine transkriptionelle Regulation unwahrscheinlich und spricht daher ebenfalls für einen alternativen Signalweg (Eagar et al., 2004). Aufgrund der wenigen verfügbaren Daten können derzeit über die

physiologische Relevanz und den molekularen Mechanismus der Notch-vermittelten T-Zellinhibition keine weitergehenden Aussagen getroffen werden.

Von der Modulation des T-Zellrezeptorsignals zur Regulation der T-Zelldifferenzierung

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen waren Berichte, dass Notch-vermittelte Signale *in vivo* und *in vitro* zur Induktion suppressorischer T-Zellen führen können. Dies wurde durch Expression der Liganden Jagged1 (Hoyne et al., 2000; Vigouroux et al., 2003; Yvon et al., 2003) oder Dll1 (Wong et al., 2003) auf APC oder durch Expression von konstitutiv aktivem Notch-3 (Anastasi et al., 2003) in T-Zellen gezeigt. Benson *et al.* finden, dass auch in differenzierten T-Zellen die Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10, aber nicht die Produktion anderer Zytokine, wie IL-2, IL-4 oder IFN- γ , von Notch abhängt (Benson et al., 2005).

Mittlerweile weisen weitere Untersuchungen jedoch darauf hin, dass Notch-Signale auch Th1- und Th2-Differenzierungsprozesse steuern können, wobei die Resultate auch hier zum Teil widersprüchlich sind. Maekawa *et al.* zeigen, dass Dll1 über die Aktivierung von Notch-3 direkt und unabhängig von IL-12 T-bet und damit Th1-Differenzierung induziert und für effiziente Th1-Induktion notwendig ist (Maekawa et al., 2003). Amsen *et al.* beschreiben ebenfalls Th1-Induktion durch Dll1 und zeigen weiterhin, dass Jagged-1 den Th2-Transkriptionsfaktor GATA-3 und damit Th2-Zellen induziert (Amsen et al., 2004). Dass Notch-Signale eine wichtige Rolle bei der Th2-Differenzierung spielen, wird außerdem durch genetische Inaktivierung von CSL oder Blockade von CSL-abhängigen Notch-Signalen in T-Zellen durch transgene Expression eines dominant negativen „Mastermind-like“ (MML-DN) in CD4⁺ T-Zellen belegt. In beiden Fällen ist die Th2- aber nicht die Th1-Induktion *in vivo* und *in vitro* inhibiert (Amsen et al., 2004; Tanaka et al., 2006; Tanigaki et al., 2004; Tu et al., 2005). Wir konnten im von uns verwendeten experimentellen System mit immobilisierten rekombinanten Notch-Liganden keinen Hinweis auf eine Modulation der T-Zelldifferenzierung finden. Möglicherweise wird in diesem System die nicht-klassische Wirkung der Liganden begünstigt, so dass andere Effekte nicht sichtbar werden.

Eine mögliche Erklärung für die Heterogenität der Befunde könnte sein, dass Notch die T-Zelldifferenzierungsprozesse in Abhängigkeit von zusätzlichen Faktoren steuert, die in den verschiedenen Systemen möglicherweise variabel sind. In neueren Experimenten konnten wir beispielsweise zeigen, dass die zuvor beschriebene Induktion von IL-10 durch Notch-Signale strikt von zusätzlichen IL-12/STAT4-Signalen abhängt. Hierdurch wird eine Konversion von pro-inflammatorischen Th1-Zellen zu suppressorischen T-Zellen induziert (Rutz *et al.*, in

prep). Eine weitere Ursache für Variabilität ist, dass in physiologischen Reaktionen die naive T-Zelldifferenzierung auf mehreren Ebenen reguliert wird. Hierbei werden sowohl Qualität und Quantität des T-Zellrezeptorsignals als auch ko-stimulatorische Signale durch Membran-gebundene oder lösliche Faktoren oder die Zugänglichkeit von relevanten DNA-Bereichen integriert [Übersicht in (Reinhardt et al., 2006)]. Vor allem auch die Stärke des T-Zellrezeptorsignals beeinflusst die Th1/Th2-Differenzierung (Constant et al., 1995; Hirano et al., 1998; Rogers et al., 1998; Tao et al., 1997). Notch-Signale könnten daher sowohl durch die Modulation der T-Zellrezeptor-Signalstärke als auch durch transkriptionelle Regulation Einfluss nehmen. Weitere ko-stimulatorische Signale können die jeweilige Notch-Wirkung dabei ebenfalls beeinflussen.

Durch die Komplexität des Notch-Systems und der verwendeten experimentellen Methoden bleiben in diesem Zusammenhang derzeit mehr Fragen als Antworten. Die Tatsache, dass die genetische Inaktivierung der einzelnen Notch-Liganden Dll1 oder Jagged-1 und der Rezeptoren Notch-1-3 embryonal letal verläuft, macht genauere Untersuchungen schwierig, weist aber gleichzeitig darauf hin, dass durchaus eine Spezialisierung der beteiligten Moleküle bei der Zelldifferenzierung vorhanden ist. Um die pleiotropen Effekte des Notch-Systems zu umgehen, müssen Systeme etabliert werden, die die Rolle der einzelnen Liganden und Rezeptoren in physiologischen APC/T-Zell-Interaktionen bestimmbar machen. Diesbezüglich ist ein wichtiger erster Schritt zu klären, welche Liganden auf APC, die *in vivo* an tolerogenen oder immunogenen Immunantworten beteiligt sind, überhaupt exprimiert werden.

3.3 Antigen-präsentierende Zellen bei der Induktion suppressiver T-Zellen *in vivo*

Antigen-präsentierende Zellen bei der Induktion oraler Toleranz

Als prototypische tolerogene Immunreaktion gilt die Toleranzentwicklung gegen oral aufgenommene Proteine in den Darm-assoziierten lymphoiden Geweben [Übersicht in (Mowat, 2003)]. Abhängig von der verabreichten Dosis kann diese zur Inaktivierung oder Deletion der spezifischen T-Zellen (hohe Dosis) führen oder die Induktion suppressorischer T-Zellen (niedrige Dosis) bewirken. Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Aufklärung der molekularen Prozesse, die zur Induktion von Toleranz *versus* Immunität *in vivo* führen, sind technische Probleme bei der Identifizierung der Zellen, die *in vivo* an diesen Immunreaktionen beteiligt sind. Vermutlich spielen APC-vermittelte Signale eine

entscheidende Rolle. Aber gerade die Identität und Lokalisation der APC, die ein bestimmtes Antigen den T-Zellen präsentieren, war weitgehend unbekannt. Wir haben daher eine durchflusszytometrische Analysemethode etabliert, die es gestattet, diejenigen APC, die bestimmte antigene Peptide *in vivo* präsentieren, direkt zu identifizieren (Kunkel et al., 2003; Kunkel et al., 2003). Damit sollten APC, die an der Induktion oraler Toleranz beteiligt sind, charakterisiert werden. Hierüber sollten Hinweise auf relevante molekulare Signale der Toleranzinduktion erhalten werden.

Da T-Zellen von nur wenigen 10-100 MHC/Peptid-Komplexen aktiviert werden können (Demotz et al., 1990; Harding and Unanue, 1990), war es wichtig, dass das von uns verwendete Nachweissystem entsprechende Sensitivität besitzt, um möglichst alle physiologisch relevanten APC entdecken zu können (Kunkel et al., 2003). *In vivo* Versuche mit oral applizierten Antigenen zeigten, dass es nur durch diese hohe Sensitivität überhaupt möglich war, positive APC nachzuweisen. Wir konnten zeigen, dass DC besonders effizient oral applizierte Peptide präsentieren. Als Hauptorte wurden die PP und mLK identifiziert (Kunkel et al., 2003). Antigenpräsentation in der Peripherie war nur bei extrem hohen Antigendosen detektierbar. Damit wird die Vermutung unterstützt, dass den APC in den regionalen lymphoiden Geweben eine entscheidende Rolle zufällt.

Bisher wurden die PP als der Hauptort für den Eintritt von Antigenen aus dem Darm und die Induktion der gegen sie gerichteten Immunreaktion angesehen. Für Immunreaktionen gegen Pathogene scheint dies auch zuzutreffen [(Kwa et al., 2006) und eigene unveröffentlichte Ergebnisse]. Unsere Versuche mit PP-defizienten Mäusen zeigten jedoch, dass die Peptidaufnahme und wichtiger noch die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen gegen lösliche Antigene nicht beeinträchtigt ist. Andere Studien zeigen, dass die orale Toleranzinduktion ebenfalls unabhängig von den PP ist (Alpan et al., 2001; Hashimoto et al., 2001; Spahn et al., 2001; Spahn et al., 2002; Worbs et al., 2006). Interessanterweise fanden wir, dass auch in Wildtyp-Mäusen die mLK und nicht die PP der Hauptort für die Aktivierung naiver T-Zellen gegen Proteinantigene waren (Kunkel et al., 2003). Worbs *et al.* konnten schließlich demonstrieren, dass orale Toleranz vornehmlich in den mesenterialen Lymphknoten induziert wird. Zusammengefasst weisen diese Arbeiten darauf hin, dass DC aus den mLK für die Induktion von oraler Toleranz verantwortlich sind (Worbs et al., 2006). Neuere Arbeiten zeigen außerdem, dass die mLK DC für die Induktion der Darm-spezifischen Homing-Rezeptoren CCR9 und $\alpha_4\beta_7$ verantwortlich sind (Johansson-Lindbom et al., 2005; Stagg et al., 2002). Außerdem wurden die verantwortliche DC auf eine Subpopulation von mLK DC eingegrenzt, die durch den Marker $\alpha_E\beta_7$ charakterisiert sind

(Annacker et al., 2005; Jang et al., 2006; Johansson-Lindbom et al., 2005). Diese wandern vermutlich aus der Lamina Propria, wo sie das Antigen aufnehmen, in die mLK ein. Tatsächlich fanden wir nach oraler Antigengabe in der Lamina Propria Peptid-beladene DC in ähnlicher hoher Frequenz wie in den PP (Kirchhoff D, Diplom Arbeit, HU-Berlin 2001). Die Gruppe um Allan Mowat konnte kürzlich zeigen, dass LP-DC oral appliziertes Ovalbumin aufnehmen und nach Transfer Toleranz erzeugen (Chirido et al., 2005).

Damit ergibt sich für die lokale Immunreaktion im Darm folgendes Modell: Antigene, zumindest lösliche Proteinantigene, scheinen direkt über die Darmmukosa in die LP und die PP zu gelangen, wo sie von lokalen DC aufgenommen werden. Aus der LP wandern $\alpha_E\beta_7^+$ DC wahrscheinlich kontinuierlich in die mLK, wo sie die zuvor aufgenommenen Antigene naiven T-Zellen präsentieren. Inwieweit DC aus den PP in die mLK einwandern und an der Initiation der T-Zellreaktion teilnehmen, ist nicht klar. Für die orale Toleranzinduktion scheint der Beitrag jedoch vernachlässigbar. Die Gesamtzahl von DC in der LP übersteigt auch die der DC aus den PP, wodurch sich bereits ein quantitatives Übergewicht dieses Weges ergibt.

Die Aufnahme von Antigenen aus dem Darm und der Präsentation in den mLK scheint dabei ebenfalls räumlich begrenzt zu sein. Betrachtet man nämlich die Aktivierung von naiven T-Zellen in einzelnen mLK, zeigt sich, dass nur in wenigen mLK eine Reaktion stattfindet (eigene nicht veröffentlichte Ergebnisse). Bei kleineren Proteinfragmenten und bei leerem Darm findet die Aufnahme verstärkt im proximalen Ileum statt, während sie sich für große Proteine und in gefütterten Mäusen distal verschiebt. Das heißt, Antigene werden tatsächlich nur in einem relativ engen Abschnitt des Darms aufgenommen und dann ausschließlich in den diesen Bereich drainierenden mLK präsentiert. In welchem Darmabschnitt dies geschieht, hängt eventuell von der Größe oder dem Verdauungsgrad des Proteins ab. Dies zeigt, dass die Immunreaktion gegen lösliche Proteine auch innerhalb der Darm-assoziierten lymphoiden Gewebe weiter unterteilt und die Antigenaufnahme auch auf bestimmte Darmabschnitte begrenzt sein kann. Für die Analyse der Immunreaktion im Darm müssen diese regionalen Aspekte berücksichtigt werden. Beispielsweise müssen die Auswirkungen lokaler pathologischer Veränderungen, z.B. durch Infektionen oder Entzündungsreaktionen im Darm, gezielt in den betroffenen Abschnitten der Mukosa bzw. in den drainierenden mLK untersucht werden, da andere Bereiche vollkommen unbeeinflusst bleiben können.

Spezifische Eigenschaften der DC der mLK

Nachdem nun klar zu sein scheint, dass die DC aus den mLK die Initiation der Immunreaktion gegen lösliche Proteine aus dem Darm verantworten, wird es in Zukunft

darum gehen, spezifische Mediatoren zu identifizieren, die Immunität *versus* Toleranz und insbesondere die Induktion suppressorischer T-Zellen steuern.

Da, wie oben beschrieben, der Notch-Signalweg eine Rolle bei der Induktion von Toleranz spielen könnte, stellt sich die Frage, wo Notch-Liganden unter physiologischen Bedingungen exprimiert sind. Da nur wenige für die Immunfluoreszenz geeignete Antikörper erhältlich sind, ist über die Expression und Funktion von Notch-Liganden auf APC *in vivo* derzeit wenig bekannt. mRNA-Daten weisen darauf hin, dass DC verschiedene Notch-Liganden exprimieren. Die Expression der verschiedenen Notch-Liganden auf DC wird zum Beispiel auch über TLR Signale reguliert [(Amsen et al., 2004; Napolitani et al., 2005) und Vaddakadathu *et al.* in Vorbereitung]. Wir haben damit begonnen, die Expression von Notch-Liganden auf verschiedenen DC-Subpopulationen und in verschiedenen Immunorganen zu analysieren. Durch Verwendung einer sensitiven Immunfluoreszenzmethode konnten wir zeigen, dass der Notch-Ligand Jagged1 auf $\alpha_E\beta_7^+$ DC im mLK selektiv exprimiert wird (nicht veröffentlichte Ergebnisse). DC der Milz hingegen weisen keinerlei Expression von Jagged1 auf. Im Gegensatz hierzu wird durch TLR-Signale hauptsächlich der Ligand Dll4 *de novo* induziert (bis zu 1000fach).

Mit der Charakterisierung der $\alpha_E\beta_7^+$ DC konnte also ein wichtiger Schritt getan werden, die Verantwortung für die Toleranzinduktion auf eine kleine APC-Population einzugrenzen. Mit der Entdeckung der differentiellen Expression von Notch-Liganden auf dieser DC-Subpopulation und der Regulation der Ligandenexpression durch verschiedene TLR-Signale haben wir eine Gruppe von Kandidatenmolekülen identifiziert, die möglicherweise eine Verbindung zwischen der Toleranzinduktion durch Notch und der Antigenpräsentation im Darm herstellt. Welche Rolle Notch-Signale für die spezifische Immunreaktion im Darm spielen und wie die Expression der Liganden auf APC durch Entzündungen oder Infektionen im Darm verändert wird, ist Bestandteil aktueller Untersuchungen.

4. Zusammenfassung

Aktive Toleranzmechanismen, zum Beispiel durch suppressorische T-Zellen, die unerwünschte Immunreaktionen unterdrücken oder abschalten, besitzen großes Potential für die Prävention oder die Therapie verschiedenster Immunpathologien, von Autoimmunität bis Allergie oder Transplantatabstoßung. In der hier vorgelegten Arbeit wurden wesentliche Aspekte der Funktion und der Induktion suppressorischer T-Zellen untersucht.

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen, Treg, stellen die derzeit am besten charakterisierte Population suppressorischer T-Zellen dar, deren essentielle physiologische Rolle bei der Aufrechterhaltung der Toleranz vielfach belegt ist. Wir haben uns hier mit der Frage beschäftigt, welche Parameter die Funktion der Zellen modulieren. Wir konnten nachweisen, dass Treg aufgrund der dauerhaften Expression des IL-2-Rezeptors effizient um IL-2 mit ihrer Umgebung konkurrieren können. Wir konnten auch zeigen, dass IL-2 in Treg die IL-10-Produktion und damit einen suppressorischen Effektormechanismus anschaltet. Wir haben daraus ein Modell entwickelt, bei dem der Fähigkeit der Treg, IL-2 aus der Umgebung aufzunehmen, eine entscheidende Rolle zufällt. Über die IL-2-Aufnahme ist sowohl die Treg-Homöostase als auch ihre suppressorische Funktion an die Aktivität des Immunsystems gekoppelt. Wir untersuchen derzeit, welche Rolle IL-10-produzierende Treg *in vivo* beispielsweise in Entzündungssituationen spielen und welche zusätzlichen suppressorischen Mechanismen durch IL-2 reguliert werden. Mit der Entdeckung des Membran-gebundenen IL-10 haben wir einen Biomarker für IL-10-produzierende Zellen entdeckt, der für die Analyse von IL-10-Produzenten hilfreich sein wird. Ob die Membran-gebundene Form von IL-10 auch spezifische Funktionen besitzt, zum Beispiel verstärkte Wirksamkeit bei Zell-Zell-Kontakt, ist noch unklar.

In Kooperation mit den Arbeitsgruppen Hamann und Hühn konnten wir mit der Charakterisierung der $\alpha_E\beta_7^+$ „Gedächtnis-ähnlichen“ und $\alpha_E\beta_7^-$ „naiv-ähnlichen“ Treg erstmals zwei funktionell distinkte Treg-Populationen definieren. Hierdurch konnten wir das Migrationspotential als zweiten wichtigen Parameter zur Regulation der suppressiven Aktivität *in vivo* identifizieren.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung der APC und möglicher molekularer Schalter, die *in vivo* suppressorische T-Zellen induzieren. Wir haben eine Technologie entwickelt, die es ermöglicht, jene APC zu identifizieren, die in einer tolerogenen Immunantwort *in vivo* – hier orale Antigenapplikation – die entsprechenden Peptide präsentieren. Wir konnten zeigen, dass die T-Zellreaktion gegen oral applizierte

Proteine hauptsächlich im mesenterialen Lymphknoten und nicht in den Peyerschen Plaques stattfindet. Auch die Antigenaufnahme aus dem Darm erfolgt unabhängig von den Peyerschen Plaques. Die Präsentation der Antigene erfolgt vorzugsweise auf dendritischen Zellen, was auf ihre Rolle bei der Toleranzinduktion hinweist. Die Vermutung, dass dendritische Zellen der mesenterialen Lymphknoten für die Toleranzinduktion wichtig sind, wurde durch Arbeiten anderer Gruppen bestätigt. Insbesondere spielt eine Subpopulation von $\alpha_E\beta_7$ -positiven dendritischen Zellen, die aus der Lamina Propria stammen, eine entscheidende Rolle. Interessanterweise zeigen unsere noch unveröffentlichten Arbeiten, dass diese Subpopulation der dendritischen Zellen selektiv den Notch-Liganden Jagged1 exprimiert, der als molekularer Schalter für die Induktion von suppressorischen T-Zellen beschrieben wurden.

Wir haben außerdem gezeigt, dass Notch-Liganden unabhängig vom klassischen Notch-Signalweg direkt die T-Zellaktivierung und damit indirekt möglicherweise die Differenzierung modulieren. Jagged1 und etwas weniger ausgeprägt Dll1 waren supprimierend im Gegensatz zum aktivierenden Effekt von Dll4. Zusätzlich zeigen neueste Ergebnisse, dass Notch in Verbindung mit IL-12/STAT4 über den klassischen Signalweg Th1-Zellen in suppressorische T-Zellen konvertieren kann, die unter anderem das immunsuppressive Zytokin IL-10 produzieren. Welche Rolle Notch für die Toleranzinduktion *in vivo* spielt und welche Effekte der Notch-Liganden physiologisch relevant sind, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Unsere Arbeiten zur Regulation der Effektorfunktion und zur Induktion von suppressorischen T-Zellen sollen dazu beitragen, diese physiologischen Mechanismen der Immunkontrolle gezielt für therapeutische Zwecke einsetzen zu können.

5. Literatur

- Adler, S. H., Chiffoleau, E., Xu, L., Dalton, N. M., Burg, J. M., Wells, A. D., Wolfe, M. S., Turka, L. A., and Pear, W. S. (2003). Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *J Immunol* *171*, 2896-2903.
- Ahmadzadeh, M., and Rosenberg, S. A. (2006). IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* *107*, 2409-2414.
- Akbari, O., Freeman, G. J., Meyer, E. H., Greenfield, E. A., Chang, T. T., Sharpe, A. H., Berry, G., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2002). Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* *29*, 29.
- Almeida, A. R., Legrand, N., Papiernik, M., and Freitas, A. A. (2002). Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J Immunol* *169*, 4850-4860.
- Almeida, A. R., Zaragoza, B., and Freitas, A. A. (2006). Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J Immunol* *177*, 192-200.
- Alpan, O., Rudomen, G., and Matzinger, P. (2001). The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. *J Immunol* *166*, 4843-4852.
- Amsen, D., Blander, J. M., Lee, G. R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R. A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* *117*, 515-526.
- Anastasi, E., Campese, A. F., Bellavia, D., Bulotta, A., Balestri, A., Pascucci, M., Checquolo, S., Gradini, R., Lendahl, U., Frati, L., *et al.* (2003). Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J Immunol* *171*, 4504-4511.
- Anderson, A. C., Kitchens, E. A., Chan, S. W., St Hill, C., Jan, Y. N., Zhong, W., and Robey, E. A. (2005). The Notch Regulator Numb Links the Notch and TCR Signaling Pathways. *J Immunol* *174*, 890-897.
- Annacker, O., Coombes, J. L., Malmstrom, V., Uhlig, H. H., Bourne, T., Johansson-Lindbom, B., Agace, W. W., Parker, C. M., and Powrie, F. (2005). Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* *202*, 1051-1061.
- Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B., and Rao, A. (2006). Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* *24*, 607-656.
- Antony, P. A., and Restifo, N. P. (2005). CD4+CD25+ T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2. *J Immunother* *28*, 120-128.
- Antov, A., Yang, L., Vig, M., Baltimore, D., and Van Parijs, L. (2003). Essential role for STAT5 signaling in CD25+CD4+ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. *J Immunol* *171*, 3435-3441.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* *3*, 756-763.
- Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* *199*, 1401-1408.

- Aranguren, X. L., Luttun, A., Clavel, C., Moreno, C., Abizanda, G., Barajas, M. A., Pelacho, B., Uriz, M., Arana, M., Echavarri, A., *et al.* (2006). In vitro and in vivo arterial differentiation of human multipotent adult progenitor cells. *Blood*, DOI 10.1182/blood-2006-1106-030411.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Assenmacher, M., Lohning, M., Scheffold, A., Manz, R. A., Schmitz, J., and Radbruch, A. (1998). Sequential production of IL-2, IFN-gamma and IL-10 by individual staphylococcal enterotoxin B-activated T helper lymphocytes. *Eur J Immunol* 28, 1534-1543.
- Assenmacher, M., Lohning, M., Scheffold, A., Richter, A., Miltenyi, S., Schmitz, J., and Radbruch, A. (1998). Commitment of individual Th1-like lymphocytes to expression of IFN-gamma versus IL-4 and IL-10: selective induction of IL-10 by sequential stimulation of naive Th cells with IL-12 and IL-4. *J Immunol* 161, 2825-2832.
- Assenmacher, M., Scheffold, A., Schmitz, J., Segura Checa, J. A., Miltenyi, S., and Radbruch, A. (1996). Specific expression of surface interferon-gamma on interferon-gamma producing T cells from mouse and man. *Eur J Immunol* 26, 263-267.
- Atkins, M. B. (2002). Interleukin-2: clinical applications. *Semin Oncol* 29, 12-17.
- Austrup, F., Vestweber, D., Borges, E., Lohning, M., Brauer, R., Herz, U., Renz, H., Hallmann, R., Scheffold, A., Radbruch, A., and Hamann, A. (1997). P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385, 81-83.
- Barthlott, T., Moncrieffe, H., Veldhoen, M., Atkins, C. J., Christensen, J., O'Garra, A., and Stockinger, B. (2005). CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol* 17, 279-288.
- Bartholome, B., Spies, C. M., Gaber, T., Schuchmann, S., Berki, T., Kunkel, D., Bienert, M., Radbruch, A., Burmester, G. R., Lauster, R., *et al.* (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *Faseb J* 18, 70-80.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., and Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27, 20-21.
- Benson, R. A., Adamson, K., Corsin-Jimenez, M., Marley, J. V., Wahl, K. A., Lamb, J. R., and Howie, S. E. (2005). Notch1 co-localizes with CD4 on activated T cells and Notch signaling is required for IL-10 production. *Eur J Immunol* 35, 859-869.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., and Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Blanas, E., Davey, G. M., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2000). A bone marrow-derived APC in the gut-associated lymphoid tissue captures oral antigens and presents them to both CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 164, 2890-2896.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepfer, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new

forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68-73.

Buttgereit, F., and Scheffold, A. (2002). Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67, 529-534.

Cesana, G. C., DeRaffele, G., Cohen, S., Moroziewicz, D., Mitcham, J., Stoutenburg, J., Cheung, K., Hesdorffer, C., Kim-Schulze, S., and Kaufman, H. L. (2006). Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 1169-1177.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.

Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A., and Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237-1240.

Cheng, P., Nefedova, Y., Miele, L., Osborne, B. A., and Gabrilovich, D. (2003). Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells. *Blood* 102, 3980-3988.

Chirido, F. G., Millington, O. R., Beacock-Sharp, H., and Mowat, A. M. (2005). Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol* 35, 1831-1840.

Chizzolini, C., Chiccheportiche, R., Burger, D., and Dayer, J. M. (1997). Human Th1 cells preferentially induce interleukin (IL)-1beta while Th2 cells induce IL-1 receptor antagonist production upon cell/cell contact with monocytes. *Eur J Immunol* 27, 171-177.

Chizzolini, C., Rezzonico, R., Ribbens, C., Burger, D., Wollheim, F. A., and Dayer, J. M. (1998). Inhibition of type I collagen production by dermal fibroblasts upon contact with activated T cells: different sensitivity to inhibition between systemic sclerosis and control fibroblasts. *Arthritis Rheum* 41, 2039-2047.

Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T., and Bottomly, K. (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *JExpMed* 182, 1591-1596.

D'Cruz, L. M., and Klein, L. (2005). Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6, 1152-1159.

Dallman, M. J., Smith, E., Benson, R. A., and Lamb, J. R. (2005). Notch: control of lymphocyte differentiation in the periphery. *Curr Opin Immunol* 17, 259-266.

de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34, 2480-2488.

Demetz, S., Grey, H. M., and Sette, A. (1990). The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249, 1028-1030.

Dooms, H., Kahn, E., Knoechel, B., and Abbas, A. K. (2004). IL-2 induces a competitive survival advantage in T lymphocytes. *J Immunol* 172, 5973-5979.

Eagar, T. N., Tang, Q., Wolfe, M., He, Y., Pear, W. S., and Bluestone, J. A. (2004). Notch 1 signaling regulates peripheral T cell activation. *Immunity* 20, 407-415.

- Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F. G., Higgins, J. P., Negrin, R. S., Fathman, C. G., and Strober, S. (2005). Only the CD62L⁺ subpopulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 105, 2220-2226.
- Fisson, S., Darrasse-Jeze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R., and Salomon, B. L. (2003). Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198, 737-746.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6, 1142-1151.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G., and Rudensky, A. Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22, 329-341.
- Fujihashi, K., Dohi, T., Rennert, P. D., Yamamoto, M., Koga, T., Kiyono, H., and McGhee, J. R. (2001). Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3310-3315.
- Furtado, G. C., Curotto de Lafaille, M. A., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J. J. (2002). Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J ExpMed* 196, 851-857.
- Gaffen, S. L., and Liu, K. D. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* 28, 109-123.
- Garside, P., and Mowat, A. M. (2001). Oral tolerance. *Semin Immunol* 13, 177-185.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2, 882-888.
- Granucci, F., Zanoni, I., Feau, S., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2003). Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *Embo J* 22, 2546-2551.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.
- Gutgemann, I., Fahrner, A. M., Altman, J. D., Davis, M. M., and Chien, Y. H. (1998). Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity* 8, 667-673.
- Haines, N., and Irvine, K. D. (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 786-797.
- Harding, C. V., and Unanue, E. R. (1990). Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 346, 574-576.
- Hashimoto, A., Yamada, H., Matsuzaki, G., and Nomoto, K. (2001). Successful priming and tolerization of T cells to orally administered antigens in B-cell-deficient mice. *Cell Immunol* 207, 36-40.
- Hauet-Broere, F., Unger, W. W., Garssen, J., Hoijer, M. A., Kraal, G., and Samsom, J. N. (2003). Functional CD25⁻ and CD25⁺ mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application. *Eur J Immunol* 33, 2801-2810.

- Hesse, M., Piccirillo, C. A., Belkaid, Y., Prufer, J., Mentink-Kane, M., Leusink, M., Cheever, A. W., Shevach, E. M., and Wynn, T. A. (2004). The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* *172*, 3157-3166.
- Hirano, F., Chung, M., Tanaka, H., Maruyama, N., Makino, I., Moore, D. D., and Scheidereit, C. (1998). Alternative splicing variants of IkappaB beta establish differential NF-kappaB signal responsiveness in human cells. *MolCell Biol* *18*, 2596-2607.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* *299*, 1057-1061.
- Hoyne, G. F., Le, R., I, Corsin-Jimenez, M., Tan, K., Dunne, J., Forsyth, L. M., Dallman, M. J., Owen, M. J., Ish-Horowicz, D., and Lamb, J. R. (2000). Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *IntImmunol* *12*, 177-185.
- Hsieh, C. S., Liang, Y., Tyznik, A. J., Self, S. G., Liggitt, D., and Rudensky, A. Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* *21*, 267-277.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* *260*, 547-549.
- Hsieh, C. S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J. D., and Rudensky, A. Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* *7*, 401-410.
- Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J. C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G. F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G. K., *et al.* (2004). Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* *199*, 303-313.
- Hultkrantz, S., Ostman, S., and Telemo, E. (2005). Induction of antigen-specific regulatory T cells in the liver-draining celiac lymph node following oral antigen administration. *Immunology* *116*, 362-372.
- Ivanov, II, McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., and Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* *126*, 1121-1133.
- Iwasaki, A., and Kelsall, B. L. (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* *190*, 229-239.
- Iwasaki, A., and Kelsall, B. L. (2001). Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* *166*, 4884-4890.
- Izcue, A., Coombes, J. L., and Powrie, F. (2006). Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev* *212*, 256-271.
- Izon, D. J., Punt, J. A., Xu, L., Karnell, F. G., Allman, D., Myung, P. S., Boerth, N. J., Pui, J. C., Koretzky, G. A., and Pear, W. S. (2001). Notch1 regulates maturation of CD4+ and CD8+ thymocytes by modulating TCR signal strength. *Immunity* *14*, 253-264.
- Jaleco, A. C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., Haury, M., Henrique, D., and Parreira, L. (2001). Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *JExpMed* *194*, 991-1002.

- Jang, M. H., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Ebisuno, Y., Yang, B. G., *et al.* (2006). CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol* 176, 803-810.
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Forster, R., and Agace, W. W. (2005). Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 202, 1063-1073.
- Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Naji, A., and Caton, A. J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2, 301-306.
- Kaplan, D. R., Colca, J. R., and McDaniel, M. L. (1983). Insulin as a surface marker on isolated cells from rat pancreatic islets. *J Cell Biol* 97, 433-437.
- Kaul, M., and Loos, M. (1995). Collagen-like complement component C1q is a membrane protein of human monocyte-derived macrophages that mediates endocytosis. *J Immunol* 155, 5795-5802.
- Kawahata, K., Misaki, Y., Yamauchi, M., Tsunekawa, S., Setoguchi, K., Miyazaki, J., and Yamamoto, K. (2002). Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol* 168, 4399-4405.
- Kelsall, B. L., and Strober, W. (1996). Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 183, 237-247.
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S. A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-342.
- Kim, J. M., and Rudensky, A. (2006). The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev* 212, 86-98.
- Klein, L., Khazaie, K., and von Boehmer, H. (2003). In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8886-8891.
- Klugewitz, K., Scheffold, A., Radbruch, A., and Hamann, A. (2000). Transfer of IFN γ -depleted CD4(+) T cells together with CD8(+) T cells leads to rejection of murine kidney sarcoma in mice. *Int J Cancer* 87, 673-679.
- Knoechel, B., Lohr, J., Kahn, E., Bluestone, J. A., and Abbas, A. K. (2005). Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med* 202, 1375-1386.
- Knolle, P. A., and Limmer, A. (2001). Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends Immunol* 22, 432-437.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6, 1219-1227.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.
- Kunkel, D., Kirchhoff, D., Nishikawa, S., Radbruch, A., and Scheffold, A. (2003). Visualization of peptide presentation following oral application of antigen in normal and Peyer's patches-deficient mice. *Eur J Immunol* 33, 1292-1301.

- Kunkel, D., Kirchhoff, D., Volkmer-Engert, R., Radbruch, A., and Scheffold, A. (2003). Sensitive visualization of peptide presentation in vitro and ex vivo. *Cytometry A* 54, 19-26.
- Kunzendorf, U., Pohl, T., Bulfone-Paus, S., Krause, H., Notter, M., Onu, A., Walz, G., and Diamantstein, T. (1996). Suppression of cell-mediated and humoral immune responses by an interleukin-2-immunoglobulin fusion protein in mice. *J ClinInvest* 97, 1204-1210.
- Kuroda, K., Han, H., Tani, S., Tanigaki, K., Tun, T., Furukawa, T., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Hamada, Y., Toyokuni, S., and Honjo, T. (2003). Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* 18, 301-312.
- Kwa, S. F., Beverley, P., and Smith, A. L. (2006). Peyer's patches are required for the induction of rapid Th1 responses in the gut and mesenteric lymph nodes during an enteric infection. *J Immunol* 176, 7533-7541.
- Lehar, S. M., Dooley, J., Farr, A. G., and Bevan, M. J. (2004). Notch ligands Delta1 and Jagged1 transmit distinct signals to T cell precursors. *Blood* 105, 1440-1447.
- Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyra, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., and Hamann, A. (2002). Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13031-13036.
- Liu, L. M., and MacPherson, G. G. (1993). Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. *J Exp Med* 177, 1299-1307.
- Maekawa, Y., Tsukumo, S., Chiba, S., Hirai, H., Hayashi, Y., Okada, H., Kishihara, K., and Yasutomo, K. (2003). Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. *Immunity* 19, 549-559.
- Maillard, I., Adler, S. H., and Pear, W. S. (2003). Notch and the immune system. *Immunity* 19, 781-791.
- Maillard, I., Fang, T., and Pear, W. S. (2005). REGULATION OF LYMPHOID DEVELOPMENT, DIFFERENTIATION, AND FUNCTION BY THE NOTCH PATHWAY. *AnnuRevImmunol* 23, 945-974.
- Malek, T. R. (2003). The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J LeukocBiol* 74, 961-965.
- Malek, T. R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., and Kong, L. (2002). CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17, 167-178.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177, 1199-1204.
- Martinez, A. A., Zecchini, V., and Brennan, K. (2002). CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *CurrOpinGenetDev* 12, 524-533.
- Masuya, M., Katayama, N., Hoshino, N., Nishikawa, H., Sakano, S., Araki, H., Mitani, H., Suzuki, H., Miyashita, H., Kobayashi, K., *et al.* (2002). The soluble Notch ligand, Jagged-1, inhibits proliferation of CD34+ macrophage progenitors. *IntJHematol* 75, 269-276.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., and Byrne, M. C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression

analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323.

Milner, L. A., and Bigas, A. (1999). Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* 93, 2431-2448.

Minter, L. M., Turley, D. M., Das, P., Shin, H. M., Joshi, I., Lawlor, R. G., Cho, O. H., Palaga, T., Gottipati, S., Telfer, J. C., *et al.* (2005). Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat Immunol* 6, 680-688.

Mintern, J., Li, M., Davey, G. M., Blanas, E., Kurts, C., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (1999). The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester to determine the site, duration and cell type responsible for antigen presentation in vivo. *Immunol Cell Biol* 77, 539-543.

Mora, J. R., Bono, M. R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L. L., Roseblatt, M., and Von Andrian, U. H. (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 424, 88-93.

Mora, J. R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S. Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K. L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., *et al.* (2006). Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 314, 1157-1160.

Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.

Murakami, M., Sakamoto, A., Bender, J., Kappler, J., and Marrack, P. (2002). CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8832-8837.

Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194, 629-644.

Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M. D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1171-1178.

Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 769-776.

Neutra, M. R., Pringault, E., and Kraehenbuhl, J. P. (1996). Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 14, 275-300.

Nikolic, T., Dingjan, G. M., Leenen, P. J., and Hendriks, R. W. (2002). A subfraction of B220(+) cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics. *Eur J Immunol* 32, 686-692.

Ohishi, K., Varnum-Finney, B., Serda, R. E., Anasetti, C., and Bernstein, I. D. (2001). The Notch ligand, Delta-1, inhibits the differentiation of monocytes into macrophages but permits their differentiation into dendritic cells. *Blood* 98, 1402-1407.

Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C. P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., and Kadesch, T. (1998). Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol* 18, 2230-2239.

- Osborne, B. A., and Minter, L. M. (2007). Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol* 7, 64-75.
- Palaga, T., Miele, L., Golde, T. E., and Osborne, B. A. (2003). TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-gamma production in peripheral T cells. *J Immunol* 171, 3019-3024.
- Papiernik, M., de Moraes, M. L., Pontoux, C., Vasseur, F., and Penit, C. (1998). Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 10, 371-378.
- Piccirillo, C. A., Letterio, J. J., Thornton, A. M., McHugh, R. S., Mamura, M., Mizuhara, H., and Shevach, E. M. (2002). CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196, 237-246.
- Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A., and Rajewsky, K. (2001). How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8744-8749.
- Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S. J., and MacDonald, H. R. (2004). Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5, 247-253.
- Ramain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C., and Heitzler, P. (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol* 11, 1729-1738.
- Reinhardt, R. L., Kang, S. J., Liang, H. E., and Locksley, R. M. (2006). T helper cell effector fates--who, how and where? *Curr Opin Immunol* 18, 271-277.
- Rezzonico, R., Burger, D., and Dayer, J. M. (1998). Direct contact between T lymphocytes and human dermal fibroblasts or synoviocytes down-regulates types I and III collagen production via cell-associated cytokines. *J Biol Chem* 273, 18720-18728.
- Richman, L. K., Graeff, A. S., and Strober, W. (1981). Antigen presentation by macrophage-enriched cells from the mouse Peyer's patch. *Cell Immunol* 62, 110-118.
- Robey, E. A., and Bluestone, J. A. (2004). Notch signaling in lymphocyte development and function. *Curr Opin Immunol* 16, 360-366.
- Rogers, P. R., Huston, G., and Swain, S. L. (1998). High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors secreting Th1 rather than Th0 cytokines. *J Immunol* 161, 3844-3852.
- Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M. K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212, 28-50.
- Ruckert, R., Brandt, K., Hofmann, U., Bulfone-Paus, S., and Paus, R. (2002). IL-2-IgG2b fusion protein suppresses murine contact hypersensitivity in vivo. *J Invest Dermatol* 119, 370-376.
- Ruckert, R., Herz, U., Paus, R., Ungureanu, D., Pohl, T., Renz, H., and Bulfone-Paus, S. (1998). IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a Th2 but not a Th1 immune response in vivo, while IL-2-IgG2b fusion protein inhibits both. *Eur J Immunol* 28, 3312-3320.
- Rutz, S., Mordmuller, B., Sakano, S., and Scheffold, A. (2005). Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *Eur J Immunol* 35, 2443-2451.

- Sadlack, B., Lohler, J., Schorle, H., Klebb, G., Haber, H., Sickel, E., Noelle, R. J., and Horak, I. (1995). Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 25, 3053-3059.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C., and Horak, I. (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75, 253-261.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *AnnuRevImmunol* 22, 531-562.
- Scheffold, A., Assenmacher, M., Reiners-Schramm, L., Lauster, R., and Radbruch, A. (2000). High-sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti- inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells. *Nat Med* 6, 107-110.
- Scheffold, A., Huhn, J., and Hofer, T. (2005). Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur J Immunol* 35, 1336-1341.
- Scheffold, A., Lohning, M., Richter, A., Assenmacher, M., Manz, R., Austrup, F., Hamann, A., and Radbruch, A. (1998). Analysis and sorting of T cells according to cytokine expression. *Eur Cytokine Netw* 9, 5-11.
- Scheffold, A., Miltenyi, S., and Radbruch, A. (1995). Magnetofluorescent liposomes for increased sensitivity of immunofluorescence. *Immunotechnology* 1, 127-137.
- Sereti, I., Imamichi, H., Natarajan, V., Imamichi, T., Ramchandani, M. S., Badralmaa, Y., Berg, S. C., Metcalf, J. A., Hahn, B. K., Shen, J. M., *et al.* (2005). In vivo expansion of CD4CD45RO-CD25 T cells expressing foxP3 in IL-2-treated HIV-infected patients. *J Clin Invest* 115, 1839-1847.
- Sereti, I., Martinez-Wilson, H., Metcalf, J. A., Baseler, M. W., Hallahan, C. W., Hahn, B., Hengel, R. L., Davey, R. T., Kovacs, J. A., and Lane, H. C. (2002). Long-term effects of intermittent interleukin 2 therapy in patients with HIV infection: characterization of a novel subset of CD4(+)/CD25(+) T cells. *Blood* 100, 2159-2167.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201, 723-735.
- Shao, L., Serrano, D., and Mayer, L. (2001). The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Semin Immunol* 13, 163-176.
- Shevach, E. M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat RevImmunol* 2, 389-400.
- Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-161.
- Siegmund, K., Feuerer, M., Siewert, C., Ghani, S., Haubold, U., Dankof, A., Krenn, V., Schon, M. P., Scheffold, A., Lowe, J. B., *et al.* (2005). Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* 106, 3097-3104.
- Siewert, C., Hamann, A., and Huehn, J. (2007). alphaEbeta7 identifies cycling natural Foxp3+ regulatory T cells of heterogeneous origin. (submitted).
- Snow, J. W., Abraham, N., Ma, M. C., Herndier, B. G., Pastuszak, A. W., and Goldsmith, M. A. (2003). Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice. *J Immunol* 171, 5042-5050.

- Sojka, D. K., Hughson, A., Sukiennicki, T. L., and Fowell, D. J. (2005). Early kinetic window of target T cell susceptibility to CD25+ regulatory T cell activity. *J Immunol* *175*, 7274-7280.
- Spahn, T. W., Fontana, A., Faria, A. M., Slavin, A. J., Eugster, H. P., Zhang, X., Koni, P. A., Ruddle, N. H., Flavell, R. A., Rennert, P. D., and Weiner, H. L. (2001). Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* *31*, 1278-1287.
- Spahn, T. W., Weiner, H. L., Rennert, P. D., Luger, N., Fontana, A., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2002). Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* *32*, 1109-1113.
- Spies, C. M., Schaumann, D. H., Berki, T., Mayer, K., Jakstadt, M., Huscher, D., Wunder, C., Burmester, G. R., Radbruch, A., Lauster, R., *et al.* (2006). Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. *Ann Rheum Dis* *65*, 1139-1146.
- Stagg, A. J., Kamm, M. A., and Knight, S. C. (2002). Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin. *Eur J Immunol* *32*, 1445-1454.
- Stallmach, A., Wittig, B., Giese, T., Pfister, K., Hoffmann, J. C., Bulfone-Paus, S., Kunzendorf, U., Meuer, S. C., and Zeitz, M. (1999). Protection of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by an interleukin 2-IgG2b fusion protein in mice. *Gastroenterology* *117*, 866-876.
- Stephens, G. L., and Ignatowicz, L. (2003). Decreasing the threshold for thymocyte activation biases CD4+ T cells toward a regulatory (CD4+CD25+) lineage. *Eur J Immunol* *33*, 1282-1291.
- Strobel, S., and Mowat, A. M. (1998). Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* *19*, 173-181.
- Stumbles, P. A., Thomas, J. A., Pimm, C. L., Lee, P. T., Venaille, T. J., Proksch, S., and Holt, P. G. (1998). Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med* *188*, 2019-2031.
- Suffia, I. J., Reckling, S. K., Piccirillo, C. A., Goldszmid, R. S., and Belkaid, Y. (2006). Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med* *203*, 777-788.
- Sun, J. B., Raghavan, S., Sjolting, A., Lundin, S., and Holmgren, J. (2006). Oral Tolerance Induction with Antigen Conjugated to Cholera Toxin B Subunit Generates Both Foxp3+CD25+ and Foxp3-CD25- CD4+ Regulatory T Cells. *J Immunol* *177*, 7634-7644.
- Suri-Payer, E., and Fritzsche, B. (2006). Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol* *28*, 3-16.
- Suzuki, H., Kundig, T. M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J. J., Ohashi, P. S., Griesser, H., and (1995). Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* *268*, 1472-1476.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* *100*, 655-669.
- Szanya, V., Ermann, J., Taylor, C., Holness, C., and Fathman, C. G. (2002). The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol* *169*, 2461-2465.

- Tacchini-Cottier, F., Allenbach, C., Otten, L. A., and Radtke, F. (2004). Notch1 expression on T cells is not required for CD4+ T helper differentiation. *Eur J Immunol* *34*, 1588-1596.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* *10*, 1969-1980.
- Tanaka, S., Tsukada, J., Suzuki, W., Hayashi, K., Tanigaki, K., Tsuji, M., Inoue, H., Honjo, T., and Kubo, M. (2006). The interleukin-4 enhancer CNS-2 is regulated by Notch signals and controls initial expression in NKT cells and memory-type CD4 T cells. *Immunity* *24*, 689-701.
- Tang, Q., Henriksen, K. J., Bi, M., Finger, E. B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E. L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J. A. (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* *199*, 1455-1465.
- Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M., and Honjo, T. (2004). Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* *20*, 611-622.
- Tao, X., Grant, C., Constant, S., and Bottomly, K. (1997). Induction of IL-4-producing CD4+ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. *J Immunol* *158*, 4237-4244.
- Tarbell, K. V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P., and Steinman, R. M. (2004). CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* *199*, 1467-1477.
- Thorner, M. O., Borges, J. L., Cronin, M. J., Keefer, D. A., Hellmann, P., Lewis, D., Dabney, L. G., and Quesenberry, P. J. (1982). Fluorescence activated cell sorting of functional anterior pituitary cells. *Endocrinology* *110*, 1831-1833.
- Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A., and Shevach, E. M. (2004). Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* *172*, 6519-6523.
- Thornton, A. M., Piccirillo, C. A., and Shevach, E. M. (2004). Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* *172*, 366-376.
- Thornton, A. M., Piccirillo, C. A., and Shevach, E. M. (2004). Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol* *34*, 366-376.
- Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* *188*, 287-296.
- Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* *164*, 183-190.
- Thorstenson, K. M., and Khoruts, A. (2001). Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* *167*, 188-195.
- Tryc, A. B., Spies, C. M., Schneider, U., Kunkel, D., Berki, T., Sieper, J., Burmester, G. R., Radbruch, A., Scheffold, A., and Buttgerit, F. (2006). Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* *33*, 2249-2253.
- Tu, L., Fang, T. C., Artis, D., Shestova, O., Pross, S. E., Maillard, I., and Pear, W. S. (2005). Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* *202*, 1037-1042.

- van Santen, H. M., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* 200, 1221-1230.
- Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D. C., and O'Garra, A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 172, 5986-5993.
- Vigouroux, S., Yvon, E., Wagner, H. J., Biagi, E., Dotti, G., Sili, U., Lira, C., Rooney, C. M., and Brenner, M. K. (2003). Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes. *J Virol* 77, 10872-10880.
- Viney, J. L., Mowat, A. M., O'Malley, J. M., Williamson, E., and Fanger, N. A. (1998). Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol* 160, 5815-5825.
- von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6, 338-344.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., and Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24, 677-688.
- Weijzen, S., Velders, M. P., Elmishad, A. G., Bacon, P. E., Panella, J. R., Nickoloff, B. J., Miele, L., and Kast, W. M. (2002). The Notch ligand Jagged-1 is able to induce maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol* 169, 4273-4278.
- Weiner, H. L. (1997). Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 18, 335-343.
- Weinmaster, G. (1997). The ins and outs of notch signaling. *MolCell Neurosci* 9, 91-102.
- Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J. L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., *et al.* (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27, 18-20.
- Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F. W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 3, 521-530.
- Williams, M. A., Tzgnik, A. J., and Bevan, M. J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* 441, 890-893.
- Wolf, M., Schimpl, A., and Hunig, T. (2001). Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁻⁾ and CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *EurJ Immunol* 31, 1637-1645.
- Wong, K. K., Carpenter, M. J., Young, L. L., Walker, S. J., McKenzie, G., Rust, A. J., Ward, G., Packwood, L., Wahl, K., Delriviere, L., *et al.* (2003). Notch ligation by Delta1 inhibits peripheral immune responses to transplantation antigens by a CD8⁺ cell-dependent mechanism. *J Clin Invest* 112, 1741-1750.
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M. W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 203, 519-527.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S. F., *et al.* (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126, 375-387.

- Yamaguchi, E., Chiba, S., Kumano, K., Kunisato, A., Takahashi, T., Takahashi, T., and Hirai, H. (2002). Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice. *ImmunolLett* *81*, 59-64.
- Yamamoto, M., Rennert, P., McGhee, J. R., Kweon, M. N., Yamamoto, S., Dohi, T., Otake, S., Bluethmann, H., Fujihashi, K., and Kiyono, H. (2000). Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J Immunol* *164*, 5184-5191.
- Yvon, E. S., Vigouroux, S., Rousseau, R. F., Biagi, E., Amrolia, P., Dotti, G., Wagner, H. J., and Brenner, M. K. (2003). Over expression of the Notch ligand, Jagged-1 induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood* *102*, 3815-3821.
- Zecchini, V., Brennan, K., and Martinez-Arias, A. (1999). An activity of Notch regulates JNK signalling and affects dorsal closure in *Drosophila*. *Curr Biol* *9*, 460-469.
- Zhang, E. P., Pohl, T., Bulfone-Paus, S., Wachtlin, J., Kunzendorf, U., and Hoffmann, F. (1998). Prolongation of corneal allograft survival by an interleukin-2-immunoglobulin fusion protein in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* *236*, 486-492.
- Zhang, H., Chua, K. S., Guimond, M., Kapoor, V., Brown, M. V., Fleisher, T. A., Long, L. M., Bernstein, D., Hill, B. J., Douek, D. C., *et al.* (2005). Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Med* *11*, 1238-1243.
- Zheng, W., and Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* *89*, 587-596.
- Zorn, E., Nelson, E. A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., Bellucci, R., Raderschall, E., Canning, C., Soiffer, R. J., *et al.* (2006). IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* *108*, 1571-1579.