

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Charakterisierung von Helios⁺ FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen
bei Patienten mit systemischen Lupus erythematodes**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lars Templin

aus Schwerin

Datum der Promotion: 09.09.2016

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	2
2. Abstract	4
3. Einleitung	8
3.1 <i>Das adaptive und angeborene Immunsystem</i>	9
3.2 <i>Lymphozyten und lymphatische Organe</i>	10
3.2.1 <i>T- und B-Lymphozyten</i>	10
3.2.2 <i>Entwicklung der Immuntoleranz</i>	11
3.3 <i>Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen</i>	12
3.3.1 <i>CD4⁺ T-Zell Differenzierung</i>	13
3.3.2 <i>Regulatorische T-Zellen (Tregs)</i>	13
3.3.3 <i>Phänotypische Charakterisierung humaner regulatorischer T-Zellen</i>	15
3.3.4 <i>Heterogenität menschlicher Tregs</i>	16
3.3.5 <i>Helios - ein potentieller Marker für Thymus-generierte Tregs</i>	18
3.4 <i>Systemischer Lupus erythematoses (SLE)</i>	19
3.4.1 <i>Klinisches Bild und Immunpathogenese</i>	19
3.4.2 <i>Therapie und Prognose</i>	20
3.4.3 <i>SLE und Tregs</i>	20
4. Eigene Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	22
5. Material und Methoden	23
5.1 <i>Materialien</i>	23
5.1.1 <i>Glas- und Plastikmaterial</i>	23
5.1.2 <i>Chemikalien und Puffer</i>	23
5.1.3 <i>Antikörper</i>	23
5.1.4 <i>Geräte</i>	24
5.2 <i>Patientengruppe und Kontrollgruppe</i>	24
5.3 <i>Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut</i>	28
5.4 <i>Ermittlung absoluter Zellzahlen mit Hilfe von TrueCount™ Tubes</i>	28
5.5 <i>Oberflächen- und Intrazellulärfärbung peripherer mononukleärer Zellen</i>	28
5.6 <i>In vitro Stimulation von CD4⁺ Tregs mit PMA/Ionomycin und Analyse der intrazellulären Zytokinproduktion</i>	29
5.7 <i>Analyse der Phosphorylierung von STAT5a</i>	30

5.8 Durchflusszytometrische Analyse des Probenmaterials	30
5.9 Analyse des Methylierungsstatus der TSDR des FoxP3-Gens	31
5.10 Statistische Auswertung.....	32
6. Ergebnisse	33
6.1 Erhöhte Frequenzen von zirkulierenden FoxP3 ⁺ regulatorischen T-Zellen in SLE-Patienten.....	33
6.2 Erhöhte Helios-Expression in zirkulierenden FoxP3 ⁺ Tregs bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden	34
6.3 Erhöhte Ko-Expression von Helios ⁺ und FoxP3 ⁺ Tregs in SLE-Patienten sowie Korrelation der Frequenzen zur Krankheitsaktivität	35
6.4 Differenzierung der FoxP3 Subpopulation anhand der Expression von CD45RA und Foxp3.....	37
6.5 FoxP3 ⁺ Helios ⁺ in SLE-Patienten weisen vorwiegend einen FoxP3 ^{low} / CD45RA ⁻ Phänotyp auf.....	39
6.6 Erhöhte Expression von CD25 und verminderte Expression von CD127 auf FoxP3 ⁺ Helios ⁺ nTregs im Vergleich zu FoxP3 ⁺ Helios ⁻ iTregs	40
6.7 Helios-Expression in FoxP3 ⁺ T-Zellen korreliert nicht mit der CD31-Expression als Marker für die Thymusaktivität.....	41
6.8 Erhöhte Ko-Expression von Ki-67 in FoxP3 ⁺ Helios ⁺ regulatorischen T-Zellen bei aktiven SLE-Patienten.....	43
6.9 FoxP3 ⁺ Helios ⁺ T-Zellen in SLE-Patienten sezernieren keine Effektorzytokine	44
6.10 FoxP3 ⁺ Helios ⁺ T-Zellen in SLE-Patienten besitzen eine demethylierte TSDR	46
6.11 Erhöhte basale Expression von pSTAT5a in aktiven SLE-Patienten	48
7. Diskussion	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8. Literaturverzeichnis.....	56
9. Abkürzungsverzeichnis.....	63
10. Eidesstattliche Erklärung.....	65
11. Lebenslauf.....	67
12. Publikationsliste	68
13. Danksagung.....	69

2. Abstract

Charakterisierung von Helios⁺ FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit systemischen Lupus erythematoses

von Lars Templin

Einleitung:

Mit dem Marker Helios, der im Jahr 2009 durch die Arbeitsgruppe um Ethan Shevach etabliert wurde, schien es erstmals möglich Thymus-generierte „natürliche“ Tregs (nTregs) von peripher induzierten Tregs (iTregs) abzugrenzen. Im Rahmen der Dissertation wurde erstmalig die Expression von Helios in FoxP3⁺ Tregs bei SLE-Patienten untersucht. Weiterhin erfolgte eine Charakterisierung Helios⁺ Tregs anhand phänotypischer und funktioneller Eigenschaften.

Methodik:

Mit Hilfe der Multicolor-Durchflusszytometrie wurde die Expression von FoxP3 und Helios in CD4⁺ T-Zellen des peripheren Blutes von SLE-Patienten mit einer gesunden Kontrollgruppe, thymektomierten sowie stammzelltransplantierten Patienten mit Autoimmunerkrankungen verglichen und mit Hilfe phänotypischer Treg-Marker analysiert. Die Analyse der Zytokinproduktion nach polyklonaler Stimulation sowie die Messung der basalen Phosphorylierung von STAT5a erfolgte durchflusszytometrisch, die Analyse des Methylierungsstatus der Tregs-spezifischen Region (TSDR) des FoxP3-Gens mit Hilfe der Real-Time-PCR.

Ergebnisse:

Im Vergleich zu gesunden Probanden war bei SLE-Patienten die Expression von Helios in zirkulierenden FoxP3⁺ Tregs und die Frequenz von FoxP3⁺ Tregs signifikant erhöht (Median: 82.5 % vs. 69.8 %, p<0.001). Durch eine erhöhte Frequenz FoxP3⁺ Tregs bei SLE-Patienten resultierte eine signifikant erhöhte Frequenz Helios⁺ FoxP3⁺ nTregs bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden, wohingegen Helios⁻ Tregs nicht signifikant vermehrt waren. Dabei korrelierte die Frequenz der FoxP3⁺ Helios⁺ natürlichen nTregs mit der zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme vorliegenden Krankheitsaktivität der SLE-Patienten (r=0.904). FoxP3⁺ Helios⁺

Tregs wiesen in SLE-Patienten im Vergleich zu Gesunden eine geringe Koexpression von CD31, eine erhöhte Ki-67 Expression sowie eine erhöhte basale Expression von pSTAT5a auf. Dabei produzierten sie im Gegensatz zu Helios⁻ FoxP3⁺ T-Zellen ähnlich wie bei gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation kaum Effektor-Zytokine und besaßen eine komplett demethylierte TSDR des FoxP3-Gens.

Schlussfolgerung:

Zirkulierende Helios⁺ FoxP3⁺ Tregs mit funktionell supprimierenden Eigenschaften sind bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht, hervorgerufen durch eine gesteigerte periphere Zellproliferation und bedingt durch Signalübermittlung von „common-gamma chain“-Zytokinen. Obwohl Helios als Marker für Thymus-generierte Tregs etabliert wurde, weisen unsere Daten darauf hin, dass die Helios-Expression in FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen von der Thymusaktivität unabhängig ist und CD31 besser mit der Thymusaktivität korreliert. Obwohl Helios-exprimierende Tregs bei SLE-Patienten expandiert sind, scheinen sie nicht in der Lage zu sein, die chronischen Autoimmunprozesse bei SLE-Patienten ausreichend einzudämmen. Basierend auf unseren Daten könnte eine Anreicherung der Helios⁺ Tregs die Grundlage für neue zelluläre Therapieansätze bei SLE-Patienten darstellen.

Characterisation of Helios⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus

by Lars Templin

Introduction:

The Helios marker, which was established in 2009 by the research group working with Ethan Shevach, seemed to make it possible to differentiate between thymus-derived “natural” Tregs (nTregs) and peripherally induced Tregs (iTregs). This dissertation studied the expression of Helios in FoxP3⁺ Tregs in SLE patients for the first time. Also, Helios⁺ Tregs were characterised using phenotypical and functional characteristics.

Methodology:

Multicolor flow cytometry was used to compare the expression of FoxP3 and Helios in CD4⁺ T cells in the peripheral blood of SLE patients with a healthy control group and with thymectomized and stem cell-transplanted patients with auto-immune diseases, and was analysed with the aid of phenotypical Treg markers. Cytokine production following polyclonal stimulation and the measurement of basal phosphorylation of STAT5a was analysed using flow cytometry, and the methylation status of the Tregs-specific region (TSDR) of the FoxP3 gene was analysed using real-time PCR.

Results:

In comparison to healthy test persons, the expression of Helios in circulating FoxP3⁺ Tregs and the frequency of FoxP3⁺ Tregs was significantly higher in SLE patients (median: 82.5 % vs. 69.8 %, $p < 0.001$). An increased frequency of FoxP3⁺ Tregs in SLE patients resulted in a significantly higher Helios⁺ FoxP3⁺ nTregs frequency in SLE patients compared with healthy test persons, without a significant increase in Helios⁻ Tregs. At the same time, there was a correlation between the frequency of the FoxP3⁺ Helios⁺ natural nTregs and the disease activity of the SLE patients at the time the blood sample was taken ($r = 0.904$). In comparison to healthy people, FoxP3⁺ Helios⁺ Tregs in SLE patients registered low CD31 coexpression, increased Ki-67 expression and increased basal pSTAT5a expression. In contrast to Helios⁻ FoxP3⁺ T cells, and like healthy

test persons, they produced hardly any effector cytokines following polyclonal stimulation and had an entirely demethylated TSDR of the FoxP3 gene.

Conclusions:

Circulating Helios⁺ FoxP3⁺ Tregs with functionally suppressive characteristics are significantly increased in SLE patients in comparison with healthy test persons, caused by increased peripheral cell proliferation and affected by the transmission of common gamma chain cytokines. Even though Helios has been established as a marker for thymus-derived Tregs, our data indicate that the Helios expression in FoxP3⁺ regulatory T cells is independent of thymic activity and that CD31 correlates better with thymic activity. Despite the fact that Helios-expressing Tregs in SLE patients are expanded, they appear unable to adequately restrict the chronic auto-immune processes in SLE patients. Based on our data, an enrichment of Helios⁺ Tregs could form a basis for new cell therapies for SLE patients.

3. Einleitung

Der Begriff Immunität kann als Qualität des Immunsystems in der Abwehr von Krankheitserregern betrachtet werden. Der Vorgang der zur Immunität führt, wird Immunisierung genannt. Die Immunisierung ist im betreffenden Organismus an die Tätigkeit eines besonderen Organs gebunden, das Immunsystem. Mit einer Masse von 2-3 kg gehört das Immunsystem zu den großen Organen und stellt die evolutionäre Antwort auf die potenzielle Bedrohung durch infektiöse Agenzien dar. Das Immunsystem besteht aus frei beweglichen Entzündungszellen, löslichen Serumbestandteilen und den lymphatischen Organen, die ein immunologisches Netzwerk im Organismus bilden. Für ein rasches Aufspüren und Eliminieren von Pathogenen sowie entarteten Zellen erfolgt eine kontinuierliche Zirkulation, Proliferation und Migration von Leukozyten und anderen Zellen des Immunsystems durch den Körper.

Die Bedeutung des Immunsystems besteht aber nicht nur darin, unseren Organismus vor Krankheitserregern zu schützen, sondern auch eine Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen und Substanzen zu gewährleisten. Der von Paul Ehrlich postulierte Begriff des "Horror autotoxicus" besagt, dass der Organismus über entscheidende immunsuppressive Mechanismen verfügen muss, um ihn vor überschießenden Immunreaktionen zu schützen. Mit dem Begriff des "Horror autotoxicus" wurde erstmals die Gefahr der "Selbsterstörung" durch das körpereigene Immunsystem beschrieben. Unter dem Begriff der Autoimmunität wird die Fehlregulation der Eigenerkennung und die Aktivierung autoreaktiver Immunzellen verstanden. Pathogene Immunreaktionen basieren demnach grundsätzlich auf Mechanismen, die ansonsten physiologische Immunfunktionen ausmachen. Um den Organismus vor einer Selbsterstörung und den verheerenden Auswirkungen der Autoimmunität zu schützen, besitzt der Organismus verschiedene Kontrollmechanismen. Hierzu gehören neben zentralen Kontrollmechanismen, die vorwiegend im Thymus stattfinden, auch Mechanismen in der Peripherie des Organismus. Ein aktiver peripherer Toleranzmechanismus erfolgt über regulatorische T-Zellen. Die Balance der Aktivität von regulatorischen T-Zellen und autoreaktiven Immunzellen ist entscheidend für den Ausgang einer Immunreaktion, sodass man sich von einem besserem Verständnis dieser Interaktion therapeutische Einflussmöglichkeiten auf Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses erhofft (1).

3.1 Das adaptive und angeborene Immunsystem

Das menschliche Immunsystem stützt sich auf zwei Säulen: Die unspezifische (angeborene) Immunität, die unmittelbaren Schutz vor eindringenden Krankheitserregern bietet und zur Erkennung von Strukturen dient, die vielen Krankheitserregern gemeinsam sind und die spezifische (erworbene) Immunität, welche zu einer selektiven Erkennung von Krankheitserregern beiträgt. Das angeborene Immunsystem repräsentiert das Immungedächtnis der Spezies, das adaptive das des Individuums.

Die Antwort des adaptiven Immunsystems folgt der angeborenen Immunität mit einer Latenz von bis zu 14 Tagen. Die Effektorzellen der erworbenen Immunität sind die B- und T-Lymphozyten. B-Zellen vermitteln über Antikörper die humorale Immunität, zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen die zellgebundene Immunität. Antikörper sind hochspezifisch wirkende Immunglobuline, die bestimmte Zielsubstanzen (Antigene) erkennen und binden können. Die Antwort des erworbenen Immunsystems wird von antigen-präsentierenden-Zellen des angeborenen Immunsystems ausgelöst, die das spezifische Antigen den T-Lymphozyten in regionären Lymphknoten präsentieren. Im Falle einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems kommt es zu einer klonalen Expansion, die zu einer Differenzierung der Lymphozyten zu Effektorzellen wie z.B. zu T-Helferzellen, und Gedächtniszellen führt. Von herausragender Bedeutung ist hier ebenfalls der Aufbau eines "immunologischen Gedächtnisses", welches bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen eine viel effizientere Effektorantwort generiert und somit die Latenzzeit der adaptiven Reaktion verkürzt. Im Verlauf der Immunantwort differenzieren sich antigenspezifische B-Lymphozyten zu B-Gedächtniszellen oder direkt zu Plasmazellen. Sie sind darauf spezialisiert, Antikörper zu sezernieren, die verschiedene Antigene mit hoher Spezifität erkennen und immunologische Effektormechanismen gegen das erkannte Antigen auslösen. Die Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität sind eng miteinander verknüpft. Phagozytierende Zellen der angeborenen Immunität wie die Makrophagen sind entscheidend für die Aktivierung der Effektorzellen des erworbenen Immunsystems. Umgekehrt können Antigene viel leichter von "Fresszellen" phagozytiert werden, wenn sie an Antikörper gebunden sind. Die Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems verstärken die Antwort des angeborenen Immunsystems. Viele Infektionen können von dem adaptiven Immunsystem abgewehrt werden und verursachen keine Krankheit. Andere Infektionen die nicht abgewehrt werden können, aktivieren das adaptive Immunsystem und können nun erfolgreich überstanden werden, gefolgt von einem teilweise lebenslangen "immunologischen Gedächtnis"(1;2).

3.2 Lymphozyten und lymphatische Organe

3.2.1 T- und B-Lymphozyten

Lymphozyten sind die zellulären Träger der spezifischen Immunantwort. Sie sind in der Lage, Antigene spezifisch zu erkennen und zu eliminieren. Man unterscheidet B-Zellen und T-Zellen. Aktivierte B-Lymphozyten differenzieren zu Plasmazellen, die Immunglobuline synthetisieren und in löslicher Form sezernieren. T-Lymphozyten werden in zwei Hauptpopulationen unterschieden: zytotoxische $CD8^+$ (cluster determinant) T-Zellen, welche virusinfizierte Zellen abtöten und $CD4^+$ T-Helferzellen, die andere Zellen, wie B-Zellen und Makrophagen, aktivieren können. Lymphozyten besitzen zur Erkennung von Antigenen bestimmte Antigenrezeptoren. In jedem Individuum entsteht unabhängig vom Antigenkontakt durch Rekombination von einzelnen Gensegmenten eine große Vielfalt verschiedener Rezeptoren. Jede B-Zelle bzw. T-Zelle exprimiert nur einen Typ molekular identischer Rezeptoren. Bei Antigenkontakt teilen und differenzieren sich nur jene B-Zellen bzw. T-Zellen, deren Rezeptoren eine hohe Affinität zu diesem Antigen besitzen. Es entstehen Zellklone, in denen alle Zellen den identischen Antigenrezeptor tragen. Dieser Vorgang wird auch als klonale Selektion bezeichnet. Die klonal verteilten Antigenrezeptoren bilden die molekulare Grundlage einer außerordentlichen Unterscheidungsfähigkeit des adaptiven Immunsystems. In den primären lymphatischen Organen findet die Bildung bzw. Reifung von B- und T-Zellen statt. Beide Arten von Lymphozyten gehen im Knochenmark aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle oder Stammzelle hervor. B-Lymphozyten erhielten ihren Namen von der **B**ursa fabricius, ein sackförmiges lymphatisches Organ am Dach der Kloake bei Vögeln, welches erstmalig für die Beschreibung der Differenzierung der B-Lymphozyten diente. Während B-Zell-Vorläufer im Knochenmark (**b**one marrow) zu reifen B-Zellen differenzieren, wandern T-Zell-Vorläufer aus dem Knochenmark aus und gelangen über das Blut in den **T**hymus. Der Thymus, der sich nach Abschluss der Pubertät bis auf kleine Reste zurückbildet (Involution) und weitgehend durch Fettgewebe ersetzt wird (Thymusrestkörper), ist der Ort der T-Zellreifung und Differenzierung. Die Rekombination von einzelnen wenigen Gensegmenten ermöglicht die Bildung von vielfältigen Antigenpezifitäten der Lymphozyten (1;3;4).

3.2.2 Entwicklung der Immuntoleranz

Die aus dem Knochenmark in den Thymus eingewanderten T-Zellen besitzen noch keinen T-Zell-Rezeptor. Dieser wird nun im Thymus rekombiniert und exprimiert, sodass Milliarden von Thymozyten mit verschiedenen Antigenspezifitäten entstehen. Allerdings werden nur ca. 1-2% dieser Zellen der lymphatischen Organe als reife Lymphozyten in die Peripherie entlassen, alle anderen sterben im Rahmen stringenter Selektionsprozesse, die dazu führt, dass reife Lymphozyten mit defekten Rezeptoren, die ubiquitär vorhandenen Selbstantigene erkennen, den programmierten Zelltod sterben (Apoptose) oder eine erneute Rekombination des Rezeptors durchlaufen. Hierfür werden die Bindungseigenschaften des neu kombinierten T-Zellrezeptors an den im Thymus exprimierten Antigenen getestet. Bleibt die Reaktion unterhalb einer bestimmten Schwelle, sterben die Thymozyten den Zelltod durch Vernachlässigung. Durch diese positive Selektion wird eine minimale Affinität des T-Zellrezeptors garantiert. Ist die Bindungseigenschaft jedoch zu stark, sodass bei reifen T-Zellen eine Aktivierung erfolgen würde, sterben diese durch eine aktivierungsinduzierte Apoptose ab. Dieser Prozess heißt negative Selektion. Starke Signale, die gerade noch keine Apoptose im Sinne der negativen Selektion induzieren, führen zur Entwicklung von regulatorischen natürlichen T-Zellen aus den Thymozyten. Dies fördert die Trennschärfe des Systems zwischen der negativen und positiven Selektion. Nur Thymozyten mit einer mittleren Affinität für die im Thymus präsentierten Antigene überleben und verlassen als reife (naive) Lymphozyten den Thymus in den Blutkreislauf und haben damit die zentralen Kontrollmechanismen passiert. Dort kann es nun zum Erstkontakt mit einem Antigen kommen. Nach antigenspezifischer Aktivierung, Vermehrung und Differenzierung zu Effektorzellen treten sie über drainierende Lymphbahnen wieder in den Blutkreislauf ein. Als aktivierte Zellen sind sie in der Lage, praktisch jedes Organ zu erreichen, wo sie durch die Gefäßwand in das Gewebe vordringen und ihre Effektorfunktionen wahrnehmen.

Die peripheren Toleranzmechanismen bewirken eine Regulation der Autoreaktivität, sodass es in der Regel nicht zu deskriptiven Immunantworten kommt. Zu diesen Mechanismen gehört die Ignoranz, welche beschreibt, dass eine Aktivierung der T-Zellen durch z.B. eine zu geringe Expression der Antigene nicht ausreichend ist. Reife T-Zellen können auch auf einen sehr starken antigenen Reiz mit einer Apoptose reagieren. Dieser Mechanismus wird als Deletion bezeichnet. Mit dem Begriff der Anergie bezeichnet man eine paralyisierte anergische T-Zelle, welche zuvor bereits eine unvollständige Aktivierung erfahren hat. Ein entscheidender peripherer

Toleranzmechanismus erfolgt über die Suppression. Über regulatorische T-Zellen werden potentiell reaktive T-Zellen beeinflusst und deren Aktivierung unterdrückt (1;3;4).

3.3 Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen

T-Lymphozyten erkennen ihr spezifisches Antigen nicht in dessen Ursprungszustand, das Antigen wird vielmehr von körpereigenen antigenpräsentierenden Zellen aufbereitet (prozessiert). Diese antigenen Peptidbruchstücke werden nun auf der Oberfläche von Wirtszellen zusammen mit körpereigenen Strukturen, die vom Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) kodiert werden, präsentiert. Ein T-Zell-Rezeptor (TCR) kann nur einen spezifischen Peptid-MHC-Komplex auf präsentierenden Zellen binden, man spricht deshalb von der MHC-Restriktion bei der Antigenerkennung durch T-Zellen. T-Lymphozyten werden aufgrund ihrer verschiedenen Effektorfunktion in zwei unterschiedliche Klassen eingeteilt. Diese zwei Klassen können anhand ihrer Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 abgegrenzt werden. Die Oberflächenmoleküle werden abhängig von ihrem Differenzierungs- und Aktivierungszustandes exprimiert und erlauben somit eine diagnostische Differenzierung mittels spezifischer monoklonaler Antikörper. CD4⁺ T-Zellen übernehmen regulatorische Funktionen und interagieren sehr intensiv mit den Makrophagen und B-Lymphozyten. CD8⁺ T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Lymphozyten, die infizierte körpereigene Zellen erkennen und lysieren können. Diese zwei Zellarten unterscheiden sich ebenfalls in der Art, welchen MHC-Komplex sie erkennen. CD4⁺ T-Zellen binden an MHC-Klasse-II-Moleküle, die nur auf immunologisch relevanten Zellen exprimiert werden. CD8⁺ T-Zellen binden an MHC-Klasse-I-Moleküle, die sich auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des Körpers befinden. CD4 und CD8 Moleküle sind auf der T-Zell-Oberfläche eng mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert und verstärken die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHC/Peptid-Komplex, indem sie an konservierte Bereiche auf MHC-I bzw. MHC-II binden können. Sie werden deshalb auch als Ko-Rezeptoren bezeichnet. Naive T-Zellen benötigen mindestens zwei Signale für ihre vollständige Aktivierung. Neben der Bindung des T-Zell-Rezeptors an den spezifischen MHC/Peptid-Komplex spielen weitere membrangebundene oder lösliche Faktoren aus dem umgebenen Milieu eine kostimulatorische Rolle. T-Lymphozyten treten nach ihrer Aktivierung in ein starkes Proliferationsstadium ein. In dieser Phase der klonalen Selektion ist das Zytokin IL-2 als Wachstumsfaktor von entscheidender Bedeutung. T-Lymphozyten produzieren und nutzen dieses Interleukin in autokriner Weise. Anschließend differenzieren die expandierten Zellen unter dem Einfluss von Zytokinen zu Effektorzellen (1;5).

3.3.1 CD4⁺ T-Zell Differenzierung

CD4⁺ T-Zellen werden anhand ihrer sezernierten Zytokine in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Diese Zytokine sind verantwortlich für T-Zell-Effektorfunktionen und erlauben die Einleitung anderer Immunantworten oder haben direkten Einfluss auf das Gewebe. Das für lange Zeit gültige Modell für die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung ist das T-Helferzellen-1 (TH-1) und T-Helferzellen-2 (TH-2) Modell. T-Helferzellen-1 produzieren große Mengen an IFN- γ (Interferon), wohingegen TH-2 Zellen Interleukin-4 (IL-4) exprimieren und andere Interleukine, einschließlich IL-10, IL-5 und IL-13. TH-1 Zellen sind verantwortlich für Immunantworten auf intrazelluläre Antigene, wie ein Virus oder intrazelluläre Bakterien, und sind entscheidend für die Tumorabwehr. TH-2 Zellen hingegen sind verantwortlich für die Abwehr von Parasiten und Würmern und für die Einleitung der Antikörperproduktion. In den letzten Jahren ist offensichtlich geworden, dass einige Zellen nicht in TH-1 oder TH-2 Zellen eingeteilt werden können. Diese Zellen wurden zuerst charakterisiert anhand ihrer hohen Expression von IL-17A (6). Dies führte auch zu der Bezeichnung als TH-17 Zellen. Diese Zellen sezernieren eine Vielzahl an Zytokinen, einschließlich IL-22, IL-21, IL-17F und den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) (7;8). TH-17 Zellen ermöglichen die Neutrophilen-Infiltration und sind wichtig für die Kontrolle extrazellulärer pathogener Bakterien (9;10). Das Verständnis für die TH-1, TH-2 und TH-17 Differenzierung und ihrer Rollen während einer Infektion würden ohne die Erwähnung einer weiteren Klasse der CD4⁺ T-Zellen, der regulatorischen T-Zellen (Treg), nicht vollständig sein. Diese T-Zellen haben regulatorische Eigenschaften, welche es ihnen ermöglicht, eine TH-Zellantwort zu kontrollieren und verantwortlich für die Aufrechterhaltung einer normalen Immunhomöostase sind (11).

3.3.2 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Regulatorische T-Lymphozyten (Tregs), die den Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-P3 (FoxP3) exprimieren, sind natürlich vorkommenden Zellen in unserem Immunsystem. Neben den FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen sind noch zwei weitere regulatorische T-Zellen bekannt: die T-Helferzellen-3, die Transforming growth factor beta (TGF- β) sezernieren und die regulatorische T-Zelle Typ-1 (TR-1), die Interleukin-10 sezerniert. Sie sind unerlässlich für die Aufrechterhaltung der Autoimmuntoleranz und Immunhomöostase. Eine Störung innerhalb dieser Zellgruppe (z.B. durch eine Genmutation im FoxP3-Gen) führt zu einer schweren systemischen Autoimmunerkrankung, Immunpathologien und Allergien (12). FoxP3⁺ Tregs können die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktionen einer Reihe von Immunzellen,

einschließlich von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, natürlichen Killerzellen, B-Zellen und antigen-präsentierenden Zellen supprimieren (13). Diese einzigartige Tatsache, die Immunantwort zu kontrollieren, lässt FoxP3⁺ Tregs eine zentrale Rolle in der Vorbeugung von Autoimmunerkrankungen und Allergien einnehmen, ebenso in der Transplantationsmedizin und Mutter-Kind-Toleranz während einer Schwangerschaft. Allerdings können FoxP3⁺ Tregs auch Anti-Tumor Immunantworten supprimieren und eine weitere Tumorentwicklung begünstigen (14).

Im Jahr 1970 machten Gershon und Kondo die grundlegende Entdeckung, dass T-Zellen die Immunantwort nicht nur hochregulieren, sondern auch begrenzen können. Diese Eindämmung wurde von einer anderen T-Zellpopulation vermittelt, die sich von den T-Helferzellen unterschied (15). Diese T-Zellpopulation, welche von nun an Suppressor-T-Zelle genannt wurde, war intensiver Gegenstand folgender immunologischer Studien. Durch die Verwendung von Oberflächenmarkern wie CD4 und CD25 war es im Verlauf möglich, eine kleine spezifische T-Zellsubpopulation mit Suppressoraktivität abzugrenzen, die im folgenden als regulatorische T-Zellen bezeichnet wurden (16).

Menschliche Tregs wurden erstmals 2001 als CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen beschrieben, basierend auf den Ergebnissen von 1995, dass Tregs in Mäusen hauptsächlich CD25 exprimieren (17). Im Jahr 2003 wurde FoxP3 als Master-Transkriptionsfaktor für die Entwicklung und Funktion von Tregs in Mäusen beschrieben. Anschließende Studien hatten FoxP3 als spezifischen Marker für menschliche Tregs definiert (18;19). Jüngste Studien haben gezeigt, dass menschliche CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen nicht einheitlich in der Genexpression, im Phänotyp und in ihrer supprimierenden Funktion sind. Diese Studien verdeutlichen, dass eine neue zuverlässige Abgrenzung der menschlichen Tregs notwendig ist (20). Eine stabile FoxP3-Expression ist unverzichtbar für die Aufrechterhaltung der Suppressoraktivität der Tregs. Die FoxP3-Expression in Tregs wird über eine epigenetische Modifikation der DNA (Desoxyribonukleinsäure) an hoch konservierten methylierten/demethylierten CpG-Inseln (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) der DNA im FoxP3-Gen gesteuert. Eine hohe Expression von Foxp3 in Tregs geht mit einer Demethylierung der Treg-spezifischen Region (TSDR) einher. Der Demethylierungsstatus der TSDR, welcher die FoxP3 Expression stabilisiert, kann daher zu einer Abgrenzung zu anderen Zelltypen beitragen (21).

3.3.3 Phänotypische Charakterisierung humaner regulatorischer T-Zellen

Die Schlüsselrolle von FoxP3 für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz wurde erstmals bei Patienten mit einer schweren systemischen Autoimmunerkrankung beobachtet. Durch eine Mutation im FoxP3-Gen entwickelte sich das IPEX-Syndrom (Immune dysregulation Polyendocrinopathie Enteropathy X-linked Syndrom), das zu schweren Organvergrößerungen, Diabetes, Ekzemen, Nahrungsmittelallergien und zu Infektionen führen kann (22). Die Expression von FoxP3 in naiven Maus-CD4⁺ T-Zellen führt zu einer Suppressoraktivität und induziert die Expression von Treg-Zell-charakteristischen Molekülen, wie CD25, zytotoxischen T-Lymphozyten-Antigen 4 (CTLA-4) und dem glukokortikoid-induzierten TNF-Rezeptor bezogenen Protein (GITR) (18;23;24). Über die Expression dieser Rezeptoren, insbesondere über den inhibitorischen Korezeptor CTLA-4, sind Tregs in der Lage, die Aktivierung von B- und T-Helferzellen zu regulieren und damit die humorale Immunantwort einzudämmen (25). Eine stabile und hohe Expression von FoxP3 ist für eine adäquate Suppressorfunktion in menschlichen CD4⁺ T-Zellen notwendig. Ein Verlust der FoxP3-Expression über einen bestimmten Zeitraum verringert die Suppressorfähigkeit ehemals potenter Tregs. Eine geringe Expression von FoxP3 induziert einen limitierten Treg-Phänotyp ohne Suppressorfunktion (26;27).

Es können zwei Arten von CD4⁺ Tregs unterschieden werden: "natürliche", im Thymus generierte (thymic-derived-nTregs) und "induzierte", d.h. in der Peripherie aus CD4⁺ CD25⁻ konventionellen T-Zellen generierte Tregs (induzierte-iTregs)(28). nTregs entwickeln sich während der stringenten Selektion im Thymus und besitzen durch ihre hohe FoxP3-Expression eine natürliche Suppressorfunktion. Im Gegensatz dazu entwickeln sich iTregs aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie (22). Diese induzierten oder adaptiven Tregs exprimieren eine große Anzahl der phänotypischen Marker, die mit regulatorischen Funktionen verknüpft sind, wie FoxP3, CD25 und CTLA-4. FoxP3⁺ T-Zellen, die *in vitro* durch TCR-Stimulation und TGF-β aus naiven CD4⁺ T-Zellen induziert wurden, zeigen hingegen eine geringere *in vitro* Suppressorfunktion sowie eine instabilere FoxP3-Expression, als natürliche Tregs. Dies deutet darauf hin, dass konventionelle CD4⁺ T-Zellen weitere Faktoren, zusätzlich zu den durch die FoxP3 Expression ausgelösten phänotypischen und funktionellen Veränderungen, für eine vollständige Suppressoraktivität im Menschen benötigen (29).

Basierend auf diesen Daten ist FoxP3 als intrazellulärer Marker nur bedingt geeignet Tregs anhand ihrer Funktionen zu klassifizieren. Hierfür sind andere Zelloberflächenmarker für eine Identifizierung von "echten" Tregs wichtig. In Mäusen können naive CD4⁺ FoxP3⁺ Tregs anhand

ihrer CD25-Expression identifiziert werden (17). Diese Tatsache kann aber nicht auf den Menschen übertragen werden, da im peripheren Blut bis zu 30% CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen vorhanden sind. Nur Zellen mit den höchsten CD25-Expressionen zeigen eine funktionelle Suppressoraktivität und können als echte Tregs in Betracht gezogen werden (30). Es ist anzunehmen, dass die Expressionslevel von FoxP3 und CD25 proportional zueinander sind. Dies würde aber bei der Isolation von T-Zellen, die CD25 am höchsten exprimieren (CD25^{high}), T-Zellen ausschließen, die FoxP3 und CD25 geringer (FoxP3^{low}, CD25^{mid}) exprimieren. Für das praktische Vorgehen besteht kein gesichertes Kriterium, CD25^{high} und CD25^{mid} Zellen klar voneinander abzugrenzen. Diese Tatsache verhindert eine Reproduzierbarkeit von experimentellen Daten und macht einen Vergleich schwierig (20). Kürzlich wurde die geringe Expression des Oberflächenmoleküls CD127 (auch bekannt als IL-7 Rezeptor α -Kette) als Marker für Tregs beschrieben. Die FoxP3-Expression und Suppressorfähigkeit ist in CD4⁺ T-Zellen erhöht, die geringe CD127-Level auf ihrer Oberfläche exprimieren. Durch die Tatsache, dass auch konventionelle CD4⁺ T-Zellen nach ihrer Aktivierung CD127 herunterregulieren, kann der Marker CD127 nicht für die genaue Unterscheidung zwischen Tregs und aktivierten T-Zellen herangezogen werden (31;32). Die kombinierte Anwendung von CD127 und CD25 für die Isolierung von echten Tregs ist beeinträchtigt durch die Existenz von nicht-regulatorischen FoxP3 exprimierenden CD4⁺ T-Zellpopulationen im peripheren Blut des Menschen. Diese Population, die geringe FoxP3- und wenig bis mittlere CD127-Level exprimiert, supprimiert keine Effektorzellen *in vitro* und produziert pro-inflammatorische Zytokine, einschließlich IL-2, Interferon- γ und IL-17. Diese nicht-regulatorischen T-Zellen könnten aktivierte CD4⁺ Effektorzellen repräsentieren, in denen *in vitro* eine Hochregulation von FoxP3 gezeigt wurde, ohne eine stabile Suppressorfunktion zu erlangen (12). Die Unterschiede zwischen nicht-regulatorischen T-Zellen und "echten" Tregs könnten mit dem Methylierungsstatus des FoxP3-Gens zusammenhängen. In nicht naiven FoxP3^{low} nicht-regulatorischen T-Zellen ist das FoxP3-Gen inkomplett demethyliert, in FoxP3⁺ Tregs dagegen komplett demethyliert (20).

3.3.4 Heterogenität menschlicher Tregs

Anhand der Expression von CD45RA ist eine Einteilung in naive (CD45RA⁺) und Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA⁻) möglich. Mithilfe von funktionellen Untersuchungen konnte weiterhin eine Aufgliederung von FoxP3⁺ T-Zellen in drei Subpopulationen erfolgen: (1) CD45RA⁺ FoxP3^{low} naive Tregs (nTreg); (2) CD45RA⁻ FoxP3^{high} Effektor Tregs (eTreg), und (3) nicht-supprimierende, CD45RA⁻ FoxP3^{low} T-Zellen (20).

CD45RA⁺ FoxP3^{low} naive Tregs weisen eine hohe Oberflächen-Expression von CD31 (auch bekannt als PECAM1, Platelet endothelial cell adhesion molecule) auf, ein Zelloberflächenmarker für kürzlich im Thymus generierte T-Zellen (33;34). Die geringe intrazelluläre Expression von Ki-67 (ein nukleärer Proliferationsmarker) weist darauf hin, dass sich diese naiven Tregs in einem Ruhestadium befinden (12). Naive Tregs proliferieren nach TCR-Stimulation *in vitro* und sind resistent gegenüber Apoptose, im Gegensatz zu CD45RA⁻ FoxP3^{high} Effektor Tregs. Untersuchungen haben gezeigt, dass naive, nach ihrer Aktivierung proliferierende Tregs FoxP3 hochregulieren und sich zu CD45RO⁺ FoxP3^{high} Tregs differenzieren können (20). CD45RA⁻ FoxP3^{high} Effektor T-Zellen weisen eine potente Suppressoraktivität *in vitro* auf (20). Durch ihre hohe Expression von CD25, GITR, CTLA-4 und Ki-67 Expression haben diese Zellen Eigenschaften von kürzlich aktivierten T-Zellen, die hoch proliferativ sind. Im Gegensatz zu naiven Tregs, die z.B. vermehrt im Nabelschnurblut zu finden sind, sind Effektor Tregs hauptsächlich in Erwachsenen und älteren Menschen nachweisbar (20).

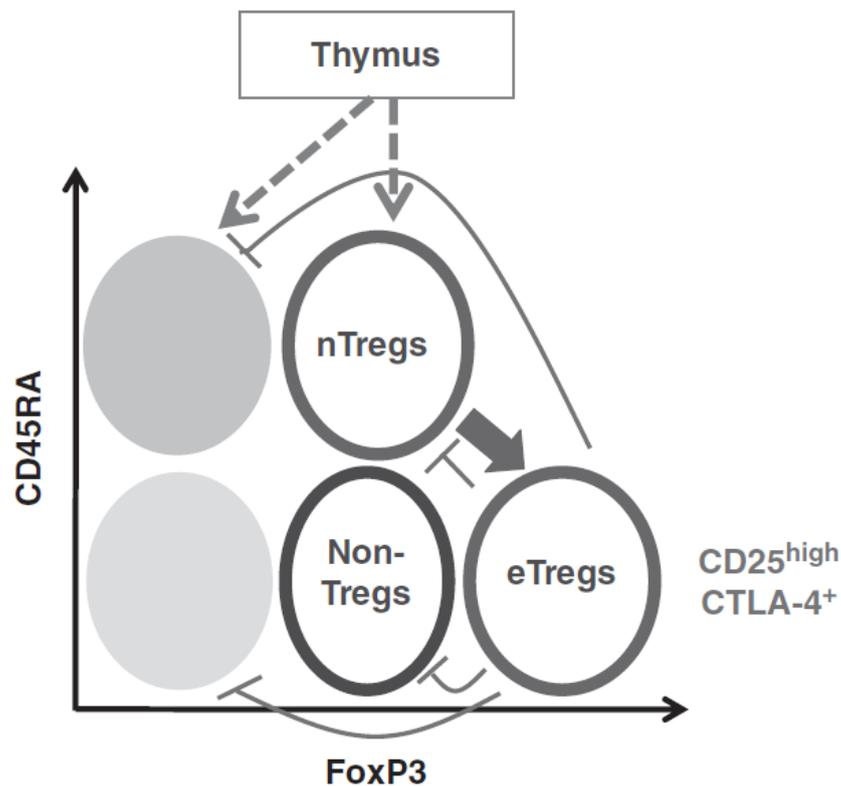


Abbildung 1: Differenzierung und Interaktion der FoxP3 Subpopulationen.

Der Thymus produziert CD45RA⁺ FoxP3^{low} natürliche Tregs (nTregs) als auch naive CD45RA⁺ nicht-regulatorische T-Zellen. Nach Antigen-Stimulation differenzieren sich nTregs zu CD45RA⁻ FoxP3^{high} Effektor-Tregs (eTregs), welche supprimierende Eigenschaften besitzen und die Proliferation von anderen Tregs, als auch der nTregs unterdrücken können.

Modifiziert nach Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their knowns and unknowns (35).

3.3.5 Helios - ein potentieller Marker für Thymus-generierte Tregs

Durch das Fehlen eines spezifischen Markers war die Unterscheidung zwischen nTregs und iTregs bislang erschwert (36). Kürzlich wurde Helios als potentieller Marker für Thymus-generierte Tregs identifiziert (37). Die Ikaros Transkriptions-Faktor-Familie besteht aus fünf DNA-bindenden Proteinen, die durch sechs hoch-konservierte C2H2 (zwei Cystein- und zwei Histidinreste) Zinkfinger charakterisiert sind. Zwei DNA-bindende Proteine, Eos und Pegasus, sind in zahlreichen Geweben exprimiert, wohingegen Ikaros, Helios und Aiolos hauptsächlich im hämatopoetischen System vorzufinden sind. Ikaros und Aiolos sind in vielen hämatopoetischen Zellen exprimiert, Helios scheint sich dagegen auf die T-Lymphozytenlinie zu beschränken (38;39). Helios wurde erstmals in Tumoren der Schilddrüse von Mäusen geklont und von einer undefinierten Subpopulation von T-Zellen exprimiert. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Helios überwiegend von FoxP3⁺ Tregs exprimiert wird (40).

Drei unabhängige Beobachtungen durch Thornton et. al führten zu der Schlussfolgerung, dass Helios ein potentieller Marker für Thymus-generierte Tregs ist (37). Erstens wurde gezeigt, dass fast alle der FoxP3⁺ T-Zellen im Thymus und peripheren Blut von jungen Mäusen Helios exprimieren. Zweitens, FoxP3⁺ Tregs, die durch *in vitro* Stimulation mit anti-CD3/CD28, IL-2 und TGF- β induziert wurden, exprimierten kein Helios. Und drittens, exprimieren durch orale Antigenaufnahme induzierte FoxP3⁺ Tregs *in vivo* ebenfalls kein Helios. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Helios-Expression zwei verschiedene Subpopulation von FoxP3⁺ T-Zellen definiert. Zum einen die Thymus-generierten Tregs, welche Helios positiv sind und die in der Peripherie aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen induzierten Tregs, die Helios nicht exprimieren (37).

Erst kürzlich wurde allerdings in einigen Studien beschrieben, dass die Helios-Expression in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unter bestimmten Bedingungen induziert werden kann und damit mit der T-Zell-Aktivierung und Proliferation assoziiert ist (41-43). Die funktionelle Bedeutung von Helios in Tregs bleibt weiterhin unklar.

3.4 Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

3.4.1 Klinisches Bild und Immunpathogenese

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine chronische Autoimmunerkrankung mit bislang nicht vollständig verstandener Ätiologie, in dessen Verlauf es zu einer Beteiligung multipler Organsysteme des Körpers kommen kann. Frauen sind im Vergleich zu Männern ca. 9 mal häufiger von dieser Erkrankung betroffen. Charakteristisch für die Erkrankung ist die Entwicklung von Autoantikörpern, die gegen verschiedene nukleäre, zytoplasmatische und Zellmembranantigene gerichtet sind (44;45). Diese Autoantikörper führen entweder direkt oder in Form von Immunkomplexen zu einer Entzündung und damit zu einer Schädigung von Zielorganen (46). Typischerweise sind beim SLE Antikörper nachweisbar, die gegen doppelsträngige DNA (dsDNA) gerichtet sind. Die Titer dieser Autoantikörper korrelieren dabei mit der Krankheitsaktivität und können deshalb in der Verlaufskontrolle zur Aktivitätsbeurteilung herangezogen werden (47;48). Das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung ist sehr heterogen. Häufige Manifestationen sind Fieber, Abgeschlagenheit, Haut- und Gelenkmanifestationen. Neben Haarausfall, aphtösen Läsionen und Serositis kommt es in mehr als 70% der SLE-Erkrankungen zu einer Lupusnephritis. Weiterhin kann es zu einem Befall des zentralen Nervensystems mit psychischen Veränderungen und Kopfschmerzen sowie zu einer SLE-Vaskulitis mit den typischen Spätfolgen von Polyneuropathien und Parästhesien kommen (3).

Der genaue Mechanismus, der zur Entstehung von Autoantikörpern führt, ist bis heute nicht ausreichend geklärt. Es wird angenommen, dass auf dem Boden einer genetischen Prädisposition Umwelteinflüsse zu einer Autoantikörperantwort führen, die nicht durch regulatorische Mechanismen eingedämmt werden kann. Folge ist eine B-Zell-Hyperaktivität, die zu einer Bildung einer Vielzahl von unterschiedlichen Autoantikörpern führt, die nicht nur gegen nukleäre Antigene gerichtet sind. Diese Autoantikörper sind für die verschiedensten Organbeteiligungen verantwortlich, da sie weitere Immunreaktionen über die Rekrutierung von Entzündungszellen und die Zytokinproduktion über die Beteiligung von Effektor-T-Zellen verstärken. Letztendlich kann über langlebige Plasmazellen ein autoreaktives immunologisches Gedächtnis gebildet werden, welches entscheidend zur Chronifizierung und zu therapierefraktären Verläufen beiträgt (49;50). Ein genetischer Einfluss konnte in Zwillingsstudien und genomweiten Assoziationsstudien belegt werden (51).

3.4.2 Therapie und Prognose

Die Therapie des SLE richtet sich nach den individuellen klinischen Manifestationen, insgesamt orientieren sich die Therapieansätze in der Behandlung des SLE alle auf eine mehr oder weniger spezifische Suppression des Immunsystems. Bei leichter Krankheitsaktivität werden häufig nichtsteroidale Antirheumatika in Kombination mit Hydroxychloroquin als Dauertherapie eingesetzt. Studien haben gezeigt, dass eine konsequente Therapie mit Hydroxychloroquin das Risiko verringert, einen schweren Schub zu erleiden, und das Langzeitüberleben verbessert (52). Akute Schübe werden durch den vorübergehenden Einsatz von Kortikosteroiden abgefangen. Bei progressivem Verlauf des SLE eignen sich zur Steroideinsparung besonders Azathioprin, bei vorwiegendem Gelenkbefall Methotrexat (48). Bei schweren lebensbedrohlichen Verlaufsformen mit Beteiligung von Nieren, Zentralnervensystem, Herz oder Gefäßen wird bevorzugt Cyclophosphamid eingesetzt (53-55). Klassische Indikationen sind die Lupusnephritis sowie schwere neurologische oder psychiatrische Manifestationen (56). Bei der Lupusnephritis hat sich in den letzten Jahren auch die Gabe von Mycophenolatmofetil bewährt (57).

Bei schweren Verlaufsformen der Erkrankung konnte als Ultima ratio mit Hilfe einer immunoablativen Therapie in Kombination mit einer autologen Stammzelltransplantation Langzeitremissionen erzielt werden (58). Neue Therapieansätze stellen eine B-Zell-Depletion oder eine Plasmazelldepletion dar. Hier könnte mit dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib eine neue Therapieoption bei therapierefraktären SLE-Verläufen zur Verfügung stehen (59).

Entscheidend für die Prognose des SLE sind das Ausmaß der Beteiligung und Funktionsstörung von Niere, Zentralnervensystem und Herz sowie die Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie. Durch moderne Therapieverfahren kann bei konsequenter Verlaufskontrolle ein nahezu normales Alter erreicht werden. Unbehandelt führt der SLE nach wenigen Jahren zum Tod (46).

3.4.3 SLE und Tregs

Aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Immunregulation/Immuntoleranz standen Tregs im Fokus verschiedener Voruntersuchungen. Hierbei wurden insgesamt widersprüchliche Ergebnisse generiert. In ersten Studien wurde eine verringerte Prozentzahl von $CD4^+CD25^{\text{high}}$ Zellen in Patienten mit SLE gefunden. Diese verringerten Prozentzahlen der $CD4^+CD25^{\text{high}}$ Zellen korrelierten in vielen Studien reziprok mit der Krankheitsaktivität (60-64). Im Gegensatz dazu wurden in späteren Untersuchungen erhöhte Treg-Frequenzen im peripheren Blut bei SLE-Patienten beschrieben (65-67). Die Funktion von Tregs in SLE wurde bereits verschiedentlich in

der Literatur beschrieben. Einige Studien haben dabei keine Defekte in der Treg-Funktion gefunden (64). Wohingegen in anderen Studien ein Defekt in der Suppressoraktivität, hauptsächlich durch Messungen der Effektor-T-Zellproliferation oder IFN- γ Produktion dieser Zellen, beobachtet wurde (68-70).

In einem spezifischen Mausmodell von SLE konnte nachgewiesen werden, dass Effektor-T-Zellen resistent gegenüber der Suppression von Tregs sein können (71). Andere Studien konnten diese Beobachtung nicht bestätigen (70;72;73), allerdings zeigen jüngste Studien, dass Effektor-T-Zellen die Suppression in SLE umgehen können. Venigalla et. al beobachteten Resistenzen gegenüber der Suppression in einer Reihe von Patienten mit aktivem SLE, wohingegen Vargas-Rojas et. al keine Abhängigkeit der Effektor-T-Zellresistenz gegenüber der Krankheitsaktivität nachweisen konnte (68;74). Die Beobachtung vieler möglicher Defekte der Immunzellen reflektiert den systemischen Charakter und die Schlüsselrolle der regulatorischen T-Zellen in SLE, vergleichbar mit ihrer Rolle in anderen Autoimmunerkrankungen.

4. Eigene Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Mit dem Marker Helios, der im Jahr 2009 durch die Arbeitsgruppe um Ethan Shevach etabliert wurde, schien es erstmals möglich Thymus-generierte Tregs (nTregs) von peripher induzierten Tregs (iTregs) abzugrenzen. Gegenstand dieser Arbeit war es, den Pool der zirkulierenden FoxP3⁺ Tregs auf die Koexpression von Helios zu untersuchen, um die Relation zwischen nTregs und iTregs bei SLE zu erfassen. Hierfür sollte zunächst die Frequenz zirkulierender Helios⁺ und Helios⁻ FoxP3⁺ Tregs bei Patienten mit SLE im Vergleich zu gleichaltrigen Gesunden untersucht werden und mit der Krankheitsaktivität und dem klinischen Erkrankungsbild korreliert werden. Weiterhin waren unter Verwendung Treg-relevanter Marker eine Phänotypisierung der FoxP3⁺ Treg Subpopulationen sowie eine Koexpressionsanalyse von CD31 als etablierter Surrogat-Parameter für Thymus-generierte Tregs vorgesehen. Als Kontrollkohorte standen hier Patienten nach Thymektomie und Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation zur Verfügung, die unterschiedliche Thymusaktivitätszustände repräsentierten. Zur Evaluation der Treg-Homöostase sollten zusätzlich die Proliferationsraten von Helios⁺ FoxP3⁺ Tregs mit Hilfe eines Marker für die zelluläre Proliferation (Ki-67) bestimmt werden. Um zu erfassen, inwieweit Zytokine für die Treg-Proliferation verantwortlich sind, sollte der Phosphorylierungsstatus von STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) untersucht werden. Für eine Unterscheidung, ob FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen in SLE-Patienten eine aktivierte konventionelle T-Zell-Subpopulation oder eher eine Subpopulation mit regulatorischen Potential darstellen, wurde die Fähigkeit der Tregs zur Effektorzytokin-Produktion untersucht. Suppressionsanalysen von Helios⁺ Tregs sind aufgrund des intrazellulären Nachweises und der damit verbundenen Zellfixierung nicht möglich. Zur Erfassung der Funktionalität der Tregs sollte daher die Analyse des Demethylierungsstatus im FoxP3-Gen erfolgen, welcher eng mit einer stabilen FoxP3-Expression und einer konstanten Suppressorzelllinie korreliert.

5. Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Glas- und Plastikmaterial

- | | |
|----------------------------------|---------------|
| • Plastik-Tubes (15 ml/ 50 ml) | Falcon BD |
| • Pipetten (10/200/1000 mikrol.) | Gilson |
| • Pipettenspitzen | np nerbe plus |
| • Flow-Cytometrie Tubes | Sarstedt |
| • Filter CellTrics 30 mikrom. | Partec |
| • Truecount™ Tubes | BD Bioscience |

5.1.2 Chemikalien und Puffer

- | | |
|---|--------------------------|
| • PAH Lymphocyte separation medium LSM 1077 | The cell culture company |
| • Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) | Sigma-Aldrich/ Roth |
| • PBS mit Bovinem Serum-Albumin (PBS/BSA) | Biomol |
| • Phorbo 12-myristate 13-acetate (PMA) | Sigma |
| • Ionomycin | Sigma |
| • Brefeldin A | Sigma |
| • FACS Lysing Solution | Becton & Dickinson |
| • RPMI 1640 + GlutaMax | Invitrogen |
| • 10% humanes AB Serum | Lonza |
| • FoxP3 FixPerm Konzentrat + Diluent | eBioscience |
| • FoxP3 Perm-Buffer 10x Konzentrat | eBioscience |
| • Methanol Rotipuran 99,9% | Roth |

5.1.3 Antikörper

Oberflächenfärbung

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Firma	Verdünnung
CD45RA	Alexa fluor 700	HI 100	Biologend	1:100
CD4	APC Cy7	RPA-T4	BD	1:100
CD31	APC	AC128	Milteny-Biotec	1:20
CD25	PE-Cy7	2A3	BD	1:50
CD4	Pacific Blue	RPA-T4	BD	1:100
CD3	PerCP	UCHT-1	Biologend	1:50
CD127	A647	RDR5	eBioscience	1:10
Beriglobin				1:50

Intrazellulärfärbung

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Firma	Verdünnung
Ki-67	FITC	MIB-1	Dako	1:50
FoxP3	Alexa 488	PCH 101	eBioscience	1:10
IFN- γ	PE-Cy7	4S.B3	eBioscience	1:100
IL-2	PerCP Cy5.5	MQ1-7H12	eBioscience	1:20
Helios	PE	22F6	Biolegend	1:10
Beriglobin				1:50
Stat5a	PE	pY694	BD	1:20
Helios	Alexa-647	22F6	Biolegend	1:50

5.1.4 Geräte

- Zentrifuge Rotanta 460 R (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
- Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf, hamburg, Deutschland)
- Kühlschrank + 4°C (Bosch, Gerlingen, Deutschland)
- Gefrierschrank -20°C (Bosch, Gerlingen, Deutschland)
- AutoMACS Pro (Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland)
- Casy Zellzählsystem (Schärfe Sytem GmbH, Reutlingen, Deutschland)
- Durchflußzytometer FACS LSR Fortessa/Aria (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, USA)
- FACS Auswertesoftware Diva (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, USA)
- Brutschrank Typ BB6220 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
- SPSS 12.0 für Windows (SPSS Inc., Armonk, USA)
- Prism 5.0b (GraphPad Software, La Jolla, USA)

5.2 Patientengruppe und Kontrollgruppe

Es wurde das Blut von 20 SLE-Patienten untersucht, die aus der rheumatologischen Fachambulanz oder der Bettenstation der Medizinischen Klinik m.S. Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin rekrutiert wurden. Alle Patienten erfüllten die ACR-Klassifikationskriterien für SLE (75) und willigten nach Aufklärung schriftlich in die Blutentnahme ein. Die Untersuchung erfolgte im Rahmen einer wissenschaftlichen Studie, die durch die Ethik-Kommission der Charité – Universitätsmedizin genehmigt wurde (Immunregulation EA1/124/09). Die Krankheitsaktivität wurde ermittelt anhand des Systemischen Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SELENA-SLEDAI) (76) und der British Isles Lupus Activity Group (BILAG) (77). Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 35,6 Jahre (range 24-63 Jahre). Eine Patientin war asiatischer Abstammung, alle übrigen SLE-Patienten und gesunden Blutspender waren kaukasischer Abstammung. Detaillierte demographische und klinische Angaben der SLE-Patienten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Um den Einfluss des Thymus auf die Bildung von nTregs darzustellen, wurden 11 thymektomierte Patienten aus der neurologischen Abteilung der Charite sowie 7 Autoimmunpatienten (4 SLE, 1 Granulomatosis mit Polyangiitis, 1 systemische Sklerodermie, 1 autoimmunvermittelte Polyneuropathie) nach autologer Stammzelltransplantation untersucht. Alle thymektomierte Patienten litten an Myasthenia gravis; der mittlere Abstand nach Thymektomie lag bei 12 Jahren. Die Patienten nach autologer Stammzelltransplantation waren in klinischer Remission; der mittlere Abstand nach Transplantation lag bei 55 Monaten.

Als Kontrollgruppe wurden 20 alters- und geschlechtsgepaarte gesunde Mitarbeiter des Deutschen-Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ, ein Leibnitz-Institut) oder der Medizinischen Klinik m.S. Rheumatologie und Klinische Immunologie rekrutiert. Um den Einfluss des Alters auf die nTregs darzustellen, erfolgte die Rekrutierung einer Kohorte von 50 bis 96-jährigen Patienten aus der orthopädischen Klinik der Charité, die sich für eine Gelenkendoprothetik vorstellten. Die Blutentnahmen zur Evaluierung altersspezifischer Veränderungen innerhalb der Tregs wurden im Rahmen der Studie „Alter und Immunität“ [EA1/178/07] gewonnen. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt und in Übereinstimmung mit den Ethikbestimmungen der World Medical Association (Deklaration von Helsinki) GCP konform durchgeführt. Alle Teilnehmer wurden ärztlich aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Die Analyse der basalen Phosphorylierung von STAT5a erfolgte in einer separaten Patientenkohorte von 10 SLE-Patienten, die aus der rheumatologischen Fachambulanz oder Bettenstation der Medizinischen Klinik m.S. Rheumatologie und klinischen Immunologie rekrutiert wurden. Detaillierte demographische und klinische Angaben dieser SLE-Patienten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

SLE Patient Nr.	Alter	Geschlecht	SLEDAI	Behandlung				Organmanifestation (BILAG Score)						
				Pred (mg/d)	HQL (mg/d)	AZA (mg/d)	MMF (mg/d)	Constitutional	Mucocutaneous	Neuropsychiatric	Musculoskeletal	Cardiorespiratory	Renal	Hematology
1	63	W	4	5	200	0	1000	D	D	E	D	E	E	D
2	44	W	2	7	0	100	0	D	D	E	D	E	D	D
3	34	W	7	10	0	0	0	B	C	E	B	C	D	D
4	29	M	3	0	0	0	0	C	D	E	B	E	E	B
5	55	M	9	2.5	200	0	0	C	D	E	D	E	E	D
6	29	W	9	5	200	0	1080	C	B	E	C	A	D	B
7	24	W	10	5	200	0	1000	C	B	E	C	D	E	D
8	44	W	2	5	300	0	1000	D	D	D	D	E	D	D
9	28	W	6	7.5	200	75	0	C	B	E	D	E	D	D
10	29	W	2	0	200	0	0	C	A	E	D	E	D	D
11	43	W	8	7.5	0	0	0	C	D	E	B	C	E	E
12	30	W	6	20	400	0	0	B	B	E	B	A	E	E
13	26	W	10	15	0	125	0	C	C	E	A	E	B	E
14	34	W	14	30	400	100	0	B	A	E	B	E	A	C
15	26	M	2	5	200	0	1000	D	C	E	D	E	D	D
16	37	W	2	7.5	400	100	0	C	C	E	D	D	D	E
17	24	W	4	5	0	0	1000	D	C	E	D	E	C	E
18	41	W	18	0	200	0	0	C	A	E	A	E	E	E
19	25	W	2	2	300	0	1440	D	D	E	D	E	D	D
20	47	W	2	5	0	150	0	D	B	D	D	E	E	D

Tabelle 1: Klinische Charakterisierung und Therapieregime der analysierten SLE Patienten

W = weiblich, M = männlich, SLEDAI = Systemic Lupus erythematosus Disease Activity Score, BILAG = British Isles Lupus Assessment, Pred = Prednisolon, HQL = Hydroxychloroquine, AZA = Azathioprine, MMF = Mycophenolate Mofetil

SLE Patient Nr.	Alter	Geschlecht	SLEDAI	Behandlung				Organmanifestation
				Pred (mg/d)	HQL (mg/d)	AZA (mg/d)	MMF (mg/d)	
1	39	W	6	0	0	0	0	orale Ulzeration, Alopezie
2	24	W	13	15	0	0	0	Fieber, orale Ulzeration, Arthritis, Alopezie
3	25	W	10	0	0	0	0	Fieber, orale Ulzeration, Alopezie, Leukopenie
4	30	W	4	12,5	400	0	0	Pleuritis
5	39	W	7	10	400	0	0	Fieber, Alopezie, Pleuritis
6	21	M	6	40	0	0	0	Hautausschlag
7	26	M	11	10	200	0	0	orale Ulzeration, Leukopenie, Myositis
8	20	W	16	50	200	0	0	Niere, Gelenke, Hautausschlag, orale Ulzeration
9	36	W	8	5	0	0	0	Alopezie, Hautausschlag, orale Ulzeration
10	38	W	7	5	300	0	0	Pleuritis, Leukopenie

Tabelle 2: klinische Charakterisierung und Therapieregime der analysierten SLE-Patienten zur Analyse der basalen Phosphorylierung von STAT5a

W = weiblich, M = männlich, SLEDAI = Systemic Lupus erythematosus Disease Activity Score, Pred = Prednisolon, HQL = Hydroxychloroquine, AZA = Azathioprine, MMF = Mycophenolate Mofetil

5.3 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) wurden mit Hilfe von Ficoll-Paque bei Raumtemperatur durch eine Dichtegradientenzentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden (78). Hierzu wurden die Blutproben zunächst im Verhältnis 1:1 mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS/BSA) gemischt. Anschließend wurden 40 ml verdünntes Blut auf 15 ml Ficoll überschichtet. Zur Ausbildung eines Gradienten wurden die Proben 20 Minuten bei 2000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Anschließend wurde die sogenannte Interphase abgesaugt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Zellpellet resuspendiert, erneut auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und für 15 min bei 900 rpm zentrifugiert, das Zellpellet anschließend in 10 ml PBS resuspendiert. Mit Hilfe des Casy Zellzählsystems wurde anschließend die Zellzahl bestimmt.

5.4 Ermittlung absoluter Zellzahlen mit Hilfe von TrueCount™ Tubes

Die absoluten Zellzahlen für CD4⁺ FoxP3⁺ Tregs wurden durchflusszytometrisch unter Verwendung von TrueCOUNT™ Tubes ermittelt. Diese vorgefertigten FACS-Röhrchen enthalten eine bekannte Anzahl von sog. fluoreszierenden „Beads“ die parallel zu den Zellen durch das Zytometer aufgenommen werden. Bei der Auswertung der zytometrischen Daten kann die Zahl der aufgenommenen „Beads“ durch Setzen eines geeigneten Gates ermittelt werden. Da man das Volumen der in das Tube eingesetzten Zellsuspension kennt, kann man das während der Messung aufgenommene Volumen und damit auch die absolute Zahl an Zellen in der Zielpopulation errechnen.

5.5 Oberflächen- und Intrazellulärfärbung peripherer mononukleärer Zellen

Für die phänotypische Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgte eine Oberflächenfärbung von 1×10^6 PBMCs für 20 min bei 37°C in PBS-bovinem Serumalbumin (PBS/BSA) unter Verwendung folgender Antikörper: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD31, anti-CD25, anti-CD127 und CD45RA. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 2ml PBS und Zentrifugation bei 1300 rpm bei 4°C. Für die nachfolgende intrazelluläre Färbung wurden folgende Antikörper verwendet: anti-FoxP3, anti-Helios, anti-Ki-67. Die hierfür erforderliche Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Human-FoxP3-FixPerm-

Perm-Buffer Konzentrates (eBioscience). Hierfür wurde das Zellpellet zunächst mit 1 ml Fix-Perm resuspendiert und anschließend für 30 min bei 4°C inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 2 ml PBS und 1500 rpm für 10 min bei 4°C. Danach erfolgte die Permeabilisierung mit 2 ml Perm-buffer und Zentrifugation bei 1500 rpm bei 4°C für 10 min. Die intrazelluläre Färbung wurde anschließend im Perm-buffer mit den entsprechenden Antikörperverdünnungen für 20 min bei 4°C und 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit 2 ml Perm-buffer wurden nun ungebundene Antikörper durch Zentrifugation bei 1500 rpm bei 4°C für 10 min herausgelöst. Als letzter Schritt erfolgte eine Resuspension in 350 µl PBS-BSA-Acid.

5.6 In vitro Stimulation von CD4⁺Tregs mit PMA/Ionomycin und Analyse der intrazellulären Zytokinproduktion

Mithilfe einer *in vitro* Stimulation von CD4⁺ T-Zellen ist es möglich, die Zytokin-Sekretion in bestimmten Zellen durchflusszytometrisch zu ermitteln. Hierfür wurden zunächst CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe des magnetischen Zelltrennungssystem MACS® (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) angereichert. Bei diesem System werden sehr kleine, supermagnetische Partikel (ca. 50nm) eingesetzt, die nicht viel größer als Antikörper sind. Die Antikörper können ähnlich wie Fluorochrome auf verschiedene Weise mittels monoklonaler Antikörper spezifisch an bestimmte Zellen gebunden werden. Die Bindung kann direkt über Antikörper-Magnetpartikel-Konjugate erfolgen oder indirekt über Anti-Antikörper-Magnetpartikel-Konjugate. Die Trennung spezifisch markierter Zellen von unmarkierten Zellen erfolgt in einem hochgradienten-Magnetfeld, das durch Insertion einer aus ferromagnetischen Stahlpartikeln bestehenden Säulenmatrix in das Magnetfeld eines Hochleistungspermanentmagneten erzeugt wird. Wird die Zellsuspension über die Säule gegeben, bleiben die magnetisch markierten Zellen an den Stahlkugeln hängen, während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen und als negative Fraktion aufgefangen werden. Die markierten Zellen lassen sich durch Ausspülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewinnen (Elution). Für die Anreicherung von CD4⁺ T Zellen wurde nach Zellzählung am Casy Zellzählsystem der Überstand abgekippt, mit 350 µl PBS-BSA und mit 50 µl CD4 beads der Firma Miltenyi Biotec resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min. Nach anschließender Resuspension konnte eine Isolierung mithilfe des magnetischen Zelltrennungssystems erfolgen. Anschließend wurde ein CD4⁺ MACS Check vorgenommen, wobei 5000-10000 CD4⁺ Zellen entnommen wurden und mit CD4 Cy5 Antikörpern angefärbt wurden. Nach 10 min Lagerung

auf Eis schloss sich ein Waschschrift mit PBS-BSA bei 1300 rpm für 10 min an. Nach Resuspension in 100 µl PBS BSA erfolgte eine durchflusszytometrische Kontrolle der Reinheit der CD4⁺ Isolierung (>95%).

Angereicherte und isolierte CD4⁺ T Zellen wurden in Vorbereitung auf die Zytokinmessung in 500µl RPMI-1640 + GlutaMax (Invitrogen) resuspendiert, mit 10% humanem AB Serum (Lonza) aufgefüllt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Eine adäquate Messung der Zytokinproduktion setzt eine suffiziente Aktivierung der CD4⁺ T Zellen voraus. Diese T-Zellaktivierung erfolgte mit Hilfe von Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Ionomycin und Brefeldin A. Nach Inkubation der CD4⁺ T Zellen über Nacht wurden sie nun anschließend mit PMA (25 ng/ml, Sigma-Aldrich) und Ionomycin (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) für 5 Stunden stimuliert und bei 37°C inkubiert. Nach 1 Stunde wurden 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich) für 4 Stunden bei 37°C hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend nach oben genannten Fixierungs- und Permeabilisierungsablauf intrazellulär mit Anti-FoxP3, Anti-Helios, Anti-IL-2, Anti-Interferon-γ gefärbt.

5.7 Analyse der Phosphorylierung von STAT5a

Für die Analyse der Phosphorylierung von STAT5a wurden periphere mononukleäre Zellen mittels Dichtezentrifugation isoliert. Um eine hohe Genauigkeit der Analyse zu gewährleisten, war ein Zeitfenster von 30 min zwischen Blutentnahme und Bearbeitung der Probe von entscheidender Bedeutung. Nach einer Oberflächenfärbung mit anti-CD4 und anti-CD45RA nach beschriebenen Ablauf erfolgte eine besondere Vorbereitung für eine intrazelluläre Färbung. Für die Fixierung und Permeabilisation wurde erneut das anti-Human-FoxP3-FixPerm-Perm-Buffer Konzentrat (eBioscience) verwendet. Nach anschließendem Waschschrift bei 1500 rpm für 10 min erfolgte für eine weitere Permeabilisation eine vorsichtige Zugabe von 1 ml Methanol (Rotipuran 99,9%) für 10 Minuten bei -20°C (79). Die intrazelluläre Färbung erfolgte mit anti-STAT5a (PE), anti-FoxP3 (Alexa488) und anti-Helios (Alexa647) nach einem Waschvorgang mit FoxP3-Permeabilisierungspuffer.

5.8 Durchflusszytometrische Analyse des Probenmaterials

Die mithilfe von Antikörpern markierten PBMCs wurden nun auf ihre fluoreszierenden und lichtstreuenden Eigenschaften mithilfe der Technik der Durchflusszytometrie untersucht. Die Messungen erfolgten an einem FACS-Durchflusszytometer (Fluoreszenz Activated Cell Analysis) mit Argon-Laser BD LSRFortessaTM (Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg).

Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse und Charakterisierung einzelner Zellen aufgrund ihrer fluoreszierenden und lichtstreuenden Eigenschaften. Dazu werden Zellen in Suspension durch spezielle Vorrichtungen des Durchflusszytometers in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl wie Perlen einer Perlenkette aneinandergereiht (hydrodynamische Fokussierung) und passieren so einzeln einen Laserstrahl. Physikalische Zelleigenschaften wie Größe und Granularität bestimmen die charakteristische Streuung des Laserlichtes. Die Streuung entlang des Laserlichtstrahls in Vorwärtsrichtung gibt Auskunft über die Größe der Zelle, d. h. je größer die Zelle, desto größer ist die Streuung in Vorwärtsrichtung. Der Parameter für die Vorwärtsstreuung wird als FSC (forward scatter) bezeichnet. Desweiteren erfolgt eine von der Granularität abhängige Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Licht. Diese Seitwärtsstreuung wird auch SSC (sideward scatter) genannt und ist umso höher, je größer die Granularität der Zelle ist. Die Zellen können auch mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden vom Laserlicht angeregt, d.h. ihre Elektronen werden auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfallen der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau emittieren sie Lichtenergie, die als Fluoreszenz sichtbar wird. Durch den Energieverlust während des Strahlungsüberganges besitzt das energieärmere emittierte Licht stets eine größere Wellenlänge als das energiereichere absorbierte Licht. Die Absorption des Lichts ist abhängig vom Laser, der Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, und vom Fluorochrom, dessen Absorptionsspektrum im selben Wellenlängenbereich liegen muss. Bei Markierung von Zellen mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen muss beachtet werden, dass sich die Absorptions- und Emissionsspektren voneinander unterscheiden. Die gewonnenen Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften werden von speziellen Detektoren erfasst und verstärkt (sogenannter Photomultiplier, PMT). Über spezielle Computer-Software werden die verschiedenen Parameter der Zelle gespeichert und analysiert. Die Vorteile der Durchflusszytometrie liegen in der Möglichkeit mehrere verschiedene Parameter einer Zelle simultan zu erfassen. Zusätzlich können innerhalb von Sekunden mehrere Tausend Zellen erfasst werden, wodurch eine aussagekräftige Statistik ermöglicht wird.

5.9 Analyse des Methylierungsstatus der TSDR des FoxP3-Gens

Die Analyse des Methylierungsstatus der Treg-spezifischen Region (TSDR) des FoxP3-Gens erfolgte in enger Kooperation mit dem Institut für Medizinische Immunologie der Charité. Hierfür wurden frisch isolierte PBMCs nach Färbung mit CD3, CD4, FoxP3 und Helios mit Hilfe einer FACS-Sortierung am FACS ARIATM isoliert und in 3 Populationen separiert: FoxP3⁺

Helios⁺, FoxP3⁺ Helios⁻ und FoxP3⁻ Helios⁻. Die Reinheit der Zellen betrug durchschnittlich 94%. Anschließend wurden die Zellen bei -18°C eingefroren und im Institut für Immunologie der Charité weiter verarbeitet. Es erfolgte eine DNA-Extraktion mit dem QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Um den Methylierungsstatus der TSDR des FoxP3-Gens mithilfe einer Real-Time-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zu untersuchen, wurde eine Mindestmenge von 60 ng bisulfit-behandelter DNA eingesetzt. Die Real-Time-PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt, welche nach dem FastStart-Universal-Probe-Master-Protokoll von Roche erfolgte (Roche Diagnostik, Mannheim, Deutschland). Das Reaktionsvolumen umfasste weiterhin 50 ng/ml Lambda-DNA (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland), 5 pmol/ml methylierter oder nicht-methylierter DNA, 30 pmol/ml methylierter oder nicht-methylierter spezifischer Primer und 60 ng bisulfit-behandelter DNA. Anschließend erfolgte die Messung am ABI 7500 Real-Time-PCR-System (Applied Biosystems 7500 Real-Time-PCR, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) (80).

5.10 Statistische Auswertung

Die Datenanalyse wurde mit GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad, CA, USA) durchgeführt. In unserem Test-Design mit gepaarten Stichproben (matched samples) wird jeder Untersuchungsteilnehmer der einen Stichprobe einem Teilnehmer der anderen Stichprobe anhand eines Merkmals zugeordnet. Aus dem Prozess des Matching resultiert immer ein Paar von Versuchspersonen, die hinsichtlich eines spezifischen Merkmals äquivalent sind und daher als abhängige Stichproben bezeichnet werden können (81). Das Matching erfolgte mittels Alters- und Geschlechtszuteilung. Der Kolmogorov-Smirnov Test wurde für die Verteilungsanalyse der einzelnen Parameter herangezogen. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs war nicht von einer gesicherten Normalverteilung auszugehen, sodass auch für normalverteilte Daten und homogener Streuung ein nicht-parametrischer Wilcoxon Paarvergleichstest angewandt wurde. Korrelationen wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Spearman Rangkorrelationskoeffizienten erhoben.

6. Ergebnisse

6.1 Erhöhte Frequenzen von zirkulierenden FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen in SLE-Patienten

Zunächst wurde die Frequenz zirkulierender FoxP3⁺ Tregs bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden untersucht. Hierzu wurde die Expression von FoxP3⁺ und CD25 in CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Ein repräsentatives Beispiel ist in einem Dot Plot dargestellt (Abb. 2). Dabei zeigte sich, dass im peripheren Blut von SLE-Patienten die Frequenzen von FoxP3⁺ Tregs gegenüber einer dem Alter und Geschlecht entsprechenden gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht waren (Median: 12,7% vs. 7,2%, $p < 0.001$). Aufgrund einer insgesamt erniedrigten Anzahl CD4⁺ T-Zellen bei SLE-Patienten waren die absoluten Zahlen der FoxP3⁺ Tregs in SLE-Patienten signifikant reduziert (Median: 34,9 / μ l vs. 82,9 / μ l, $p < 0.031$, Abb 3).

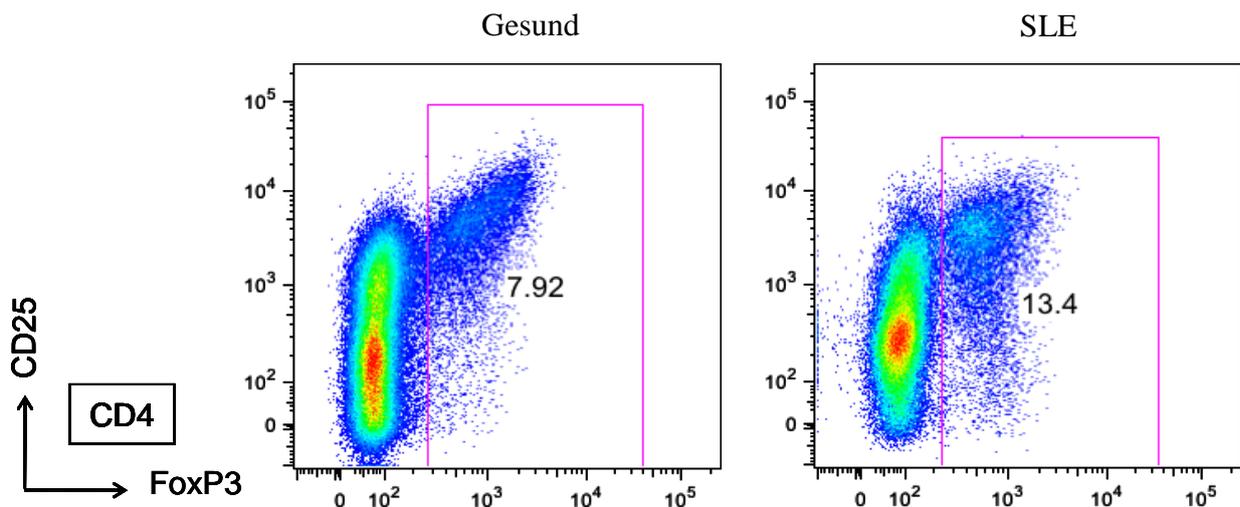


Abbildung 2: Expressionsanalyse von CD25 und FoxP3 in CD4⁺ T-Zellen

Durchflusszytometrische Analyse der CD25 Expression und intrazellulärem FoxP3 Expression, repräsentative Dot plots eines SLE Patienten und einer gesunden Kontrollperson zeigen den Oberflächenmarker CD25 und den intrazellulären Marker FoxP3.

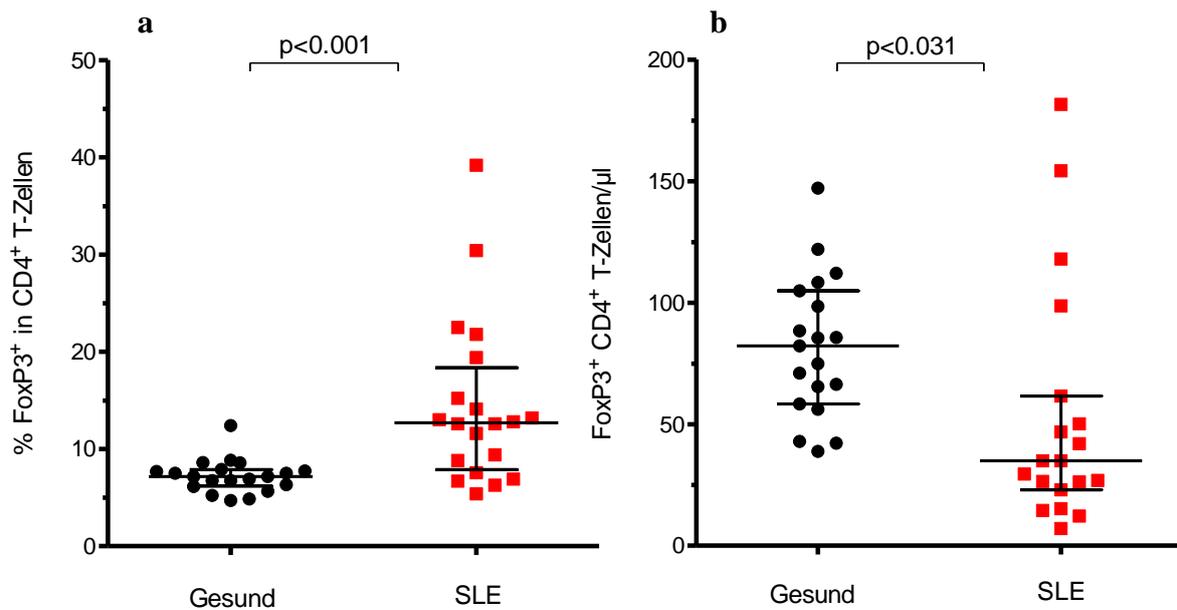


Abbildung 3: Frequenzen und absolute Anzahl FoxP3⁺ Tregs in CD4⁺ Tregs

relative Frequenz von FoxP3⁺ Tregs innerhalb des CD4⁺ T-Zell-Kompartments in einer repräsentativen Kontrollgruppe (n=20) und in SLE-Patienten (Abb. 3a, n=20) basierend auf durchflusszytometrischen Analysen in Abb. 2 (Median, Interquartilsabstand), absolute Zahlen der FoxP3⁺ Tregs in CD4⁺ T-Zellen in Zellen/µl in einer gesunden Kontrollgruppe (n=20) und SLE-Patienten (Abb. 3b, n=20), gezeigt sind Median und Interquartilsabstand.

6.2 Erhöhte Helios-Expression in zirkulierenden FoxP3⁺ Tregs bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden

Anschließend erfolgte eine Analyse der intrazellulären Helios-Expression in FoxP3⁺ Tregs bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden, wozu bislang keine systematischen Untersuchungen bei SLE-Patienten vorlagen. Übereinstimmend mit Vordaten exprimierten durchschnittlich 69,8 % der zirkulierenden FoxP3⁺ Tregs bei gesunden Probanden Helios (37). Dagegen wiesen FoxP3⁺ Tregs bei SLE-Patienten eine signifikant erhöhte Helios-Expression auf (Median: 82,5 % vs. 69,8 %, $p < 0.001$, Abb. 4).

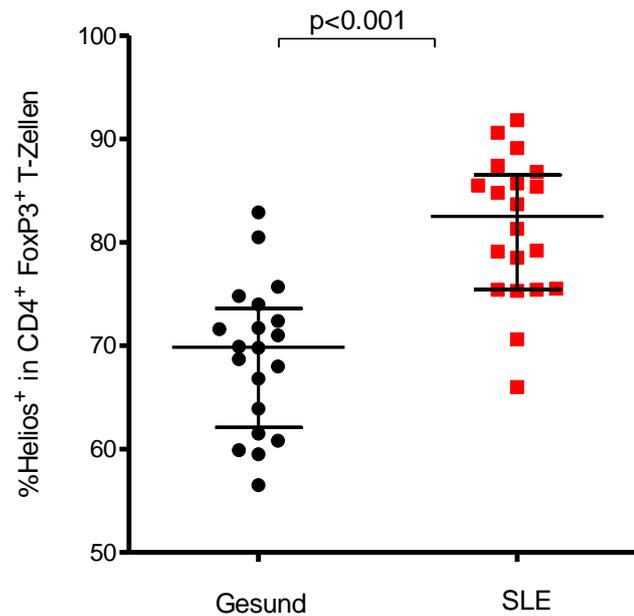


Abbildung 4: Helios Expression in CD4⁺ FoxP3⁺ Tregs

Helios-Expression in CD4⁺ FoxP3⁺ Tregs in SLE-Patienten (n=20) und einer gesunden Kontrollgruppe (n=20), gezeigt sind Median und Interquartilsabstand.

6.3 Erhöhte Ko-Expression von Helios⁺ und FoxP3⁺ Tregs in SLE-Patienten sowie Korrelation der Frequenzen zur Krankheitsaktivität

Die Koexpressionsanalyse von FoxP3 und Helios auf CD4⁺ T-Zellen ermöglichte die Einteilung in vier T-Zell-Subpopulationen (FoxP3⁺ Helios⁺; FoxP3⁺ Helios⁻, FoxP3⁻ Helios⁺, FoxP3⁻ Helios⁻) (Abb. 5). Hierbei zeigte sich bei SLE-Patienten im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Frequenz von FoxP3⁺ Helios⁺ natürlichen, also Thymus-generierten Tregs (Median: 5.0% vs. 11.0%, $p < 0.001$) (Abb. 6a). Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz FoxP3⁺ Helios⁻ induzierter Tregs und FoxP3⁻ Helios⁺ T-Zellen bei SLE-Patienten und in einer gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 6 b-c). Eine Korrelationsanalyse zwischen Frequenzen der FoxP3⁺ Helios⁺ nTregs und der zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme vorliegenden Krankheitsaktivitäten, ermittelt durch den SLEDAI, ergab eine relevante Korrelation ($r=0.904$, $p < 0.001$, Abb. 7). Keine Korrelation ergab sich bezüglich Patientenalter, Krankheitsdauer, Medikation oder zu bestimmten Organmanifestationen (Daten nicht gezeigt).

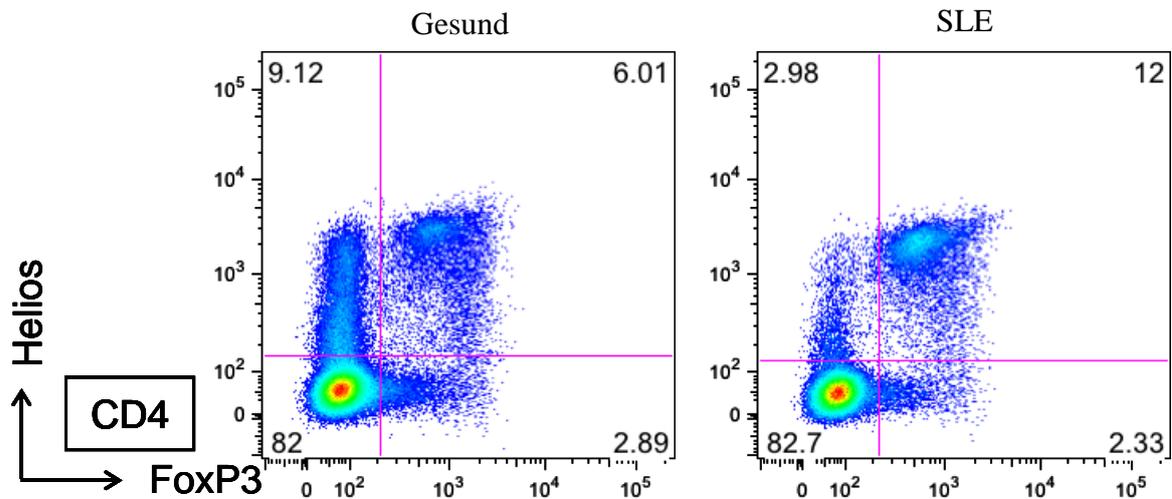


Abbildung 5: Helios und FoxP3 Expression in CD4⁺ T-Zellen

Dot Plots zeigen die Expression von Helios und FoxP3 in CD4⁺ T-Zellen einer gesunden Kontrollperson und eines repräsentativen SLE-Patienten.

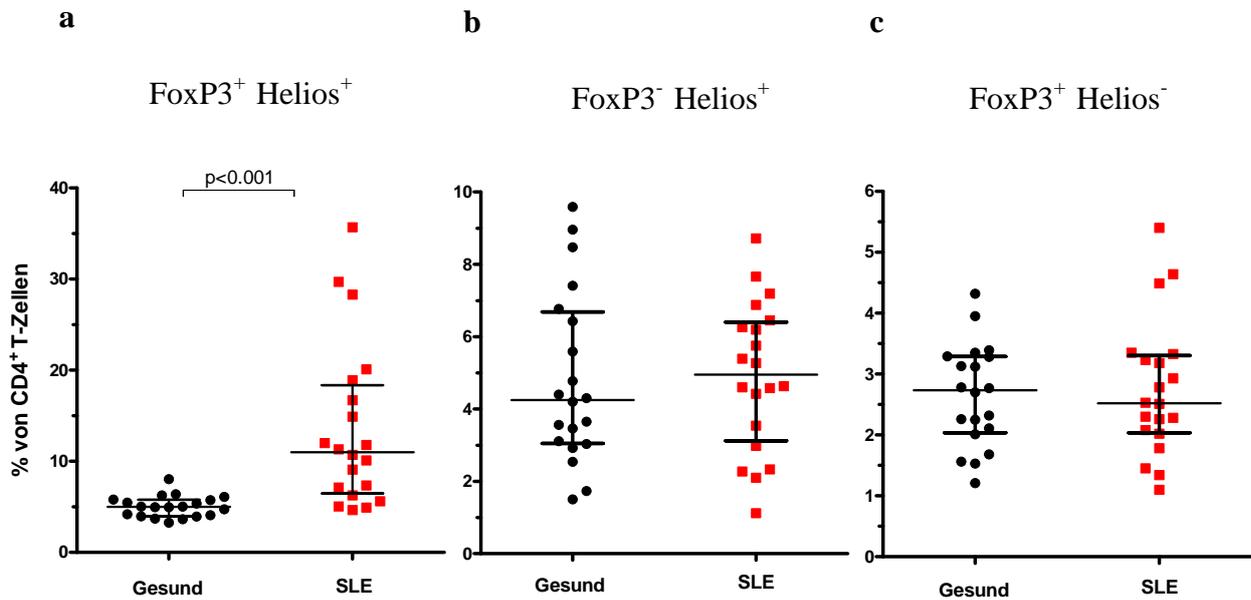


Abbildung 6: Koexpressionsanalyse von FoxP3 und Helios in CD4⁺ T-Zellen.

Relative Frequenzen von FoxP3⁺ Helios⁺ (natürlichen) Tregs (Abb. 6a), FoxP3⁻ Helios⁺ Tregs (Abb. 6b) und FoxP3⁺ Helios⁻ (induzierten) (Abb. 6c) in CD4⁺ T-Zellen in einer repräsentativen Kontrollgruppe und SLE-Patienten (n=20), gezeigt sind Median und Interquartilsabstand.

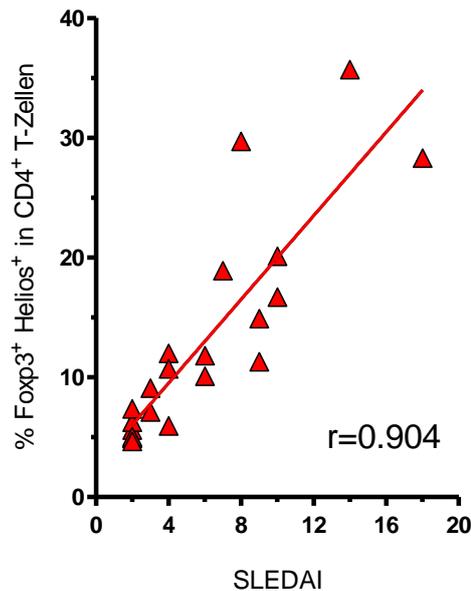


Abbildung 7: Korrelationsanalyse

Spearman-Korrelation zwischen der Frequenz zirkulierender FoxP3 und Helios koexprimierender Tregs bei SLE-Patienten und deren Krankheitsaktivität basierend auf dem SELENA-SLEDAI-score, Regressionsanalyse.

6.4 Differenzierung der FoxP3 Subpopulation anhand der Expression von CD45RA und Foxp3

Die von Miyara et al. beschriebene Einteilung des peripheren Pools der FoxP3⁺ Tregs durch die kombinierte Anwendung von CD45RA und FoxP3 ermöglicht die Einteilung der Tregs in drei funktionell verschiedene FoxP3-Subpopulationen (20). Die Helios-Expression sollte mit dieser Einteilung korreliert werden. Hierfür erfolgte zunächst eine Verteilungsanalyse der 3 Subpopulationen bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Anschließend erfolgte die Analyse der Helios-Expression in den 3 Subpopulationen.

Bei den durchflusszytometrischen Analysen der Frequenzen in den jeweiligen Subpopulationen zeigte sich, dass bei den SLE-Patienten eine höhere Frequenz CD4⁺ T-Zellen in jeder FoxP3 Subpopulation vorhanden war (Abb. 9). Die höchste statistische Signifikanz war dabei in der CD45RA⁻ FoxP3^{low} Subpopulation nachweisbar (Median: 2,6% vs. 5,3%, p< 0.001). Diese FoxP3⁺ T-Zellen sind anhand von Voruntersuchungen im Gegensatz zu den anderen FoxP⁺ Subpopulationen in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu produzieren und haben die Fähigkeit zur Suppression anderer Zellen verloren (20). Die Frequenzen der ruhenden CD45RA⁺ FoxP3^{low} natürlichen, Thymus-generierten suppressiven Tregs in SLE-Patienten waren im

Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht (Median: 2,0% vs. 3,6%, $p < 0.010$). Die suppressiven $CD45RA^- FoxP3^{high}$ Effektor Tregs waren ebenfalls in SLE-Patienten erhöht (Median: 1,9% vs. 2,5%, $p < 0.008$).

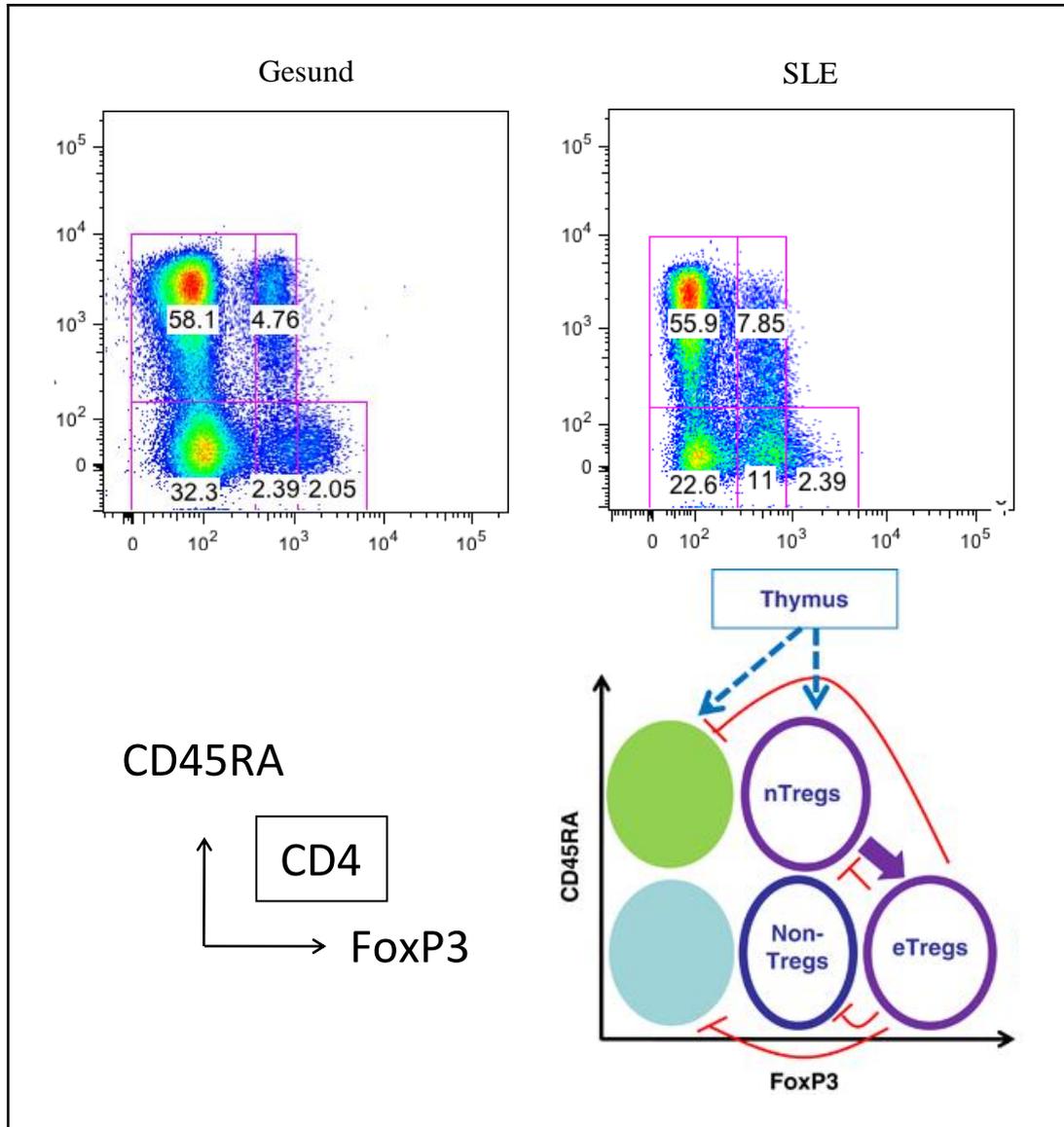


Abbildung 8: FoxP3 Frequenzen der Miyara-Subpopulationen

oben: Dot Plots zeigen Frequenzen von CD45RA und FoxP3 in $CD4^+$ T-Zellen in einem repräsentativen SLE-Patienten und einem gesunden Spender, rechts unten: Differenzierung und Interaktion der Treg Subpopulation (modifiziert nach Immunol Cell Biol. 2011 Mar; 89(3):346-51).

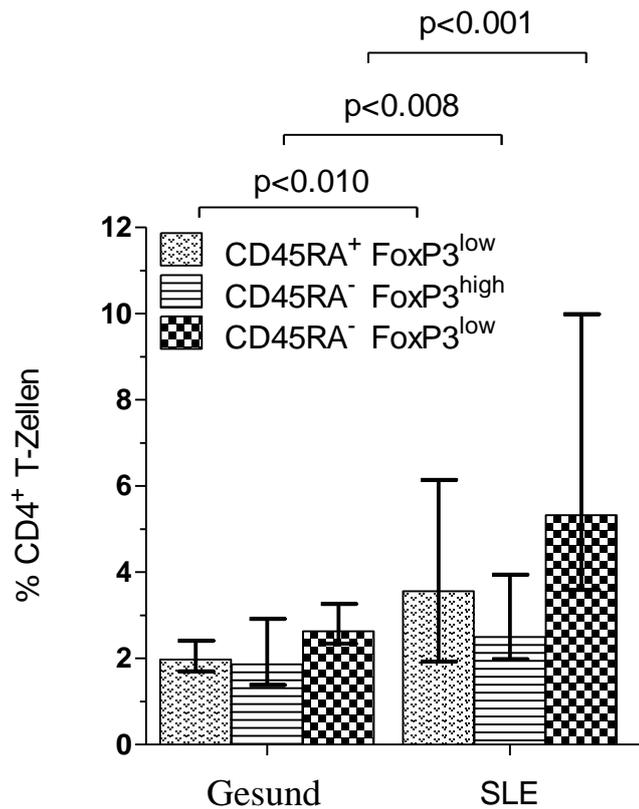


Abbildung 9: Differenzierung der FoxP3 Subpopulation anhand der Expression von CD45RA und FoxP3

Relative Frequenzen der FoxP3 Subpopulationen in CD4⁺ T-Zellen, n=20, gezeigt sind Median und Interquartilsabstand.

6.5 FoxP3⁺ Helios⁺ in SLE-Patienten weisen vorwiegend einen FoxP3^{low}/CD45RA⁻ Phänotyp auf

Anschließend erfolgte die Analyse der Helios-Expression in den 3 oben beschriebenen Treg-Subpopulationen. Die FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen von gesunden Spendern waren nahezu in allen drei Subpopulationen gleich verteilt (Abb. 10). Im Gegensatz dazu waren Helios-exprimierende FoxP3⁺ Tregs bei SLE-Patienten signifikant in der CD45RA⁻ FoxP3^{low} Subpopulation (p<0.001) vermehrt, hingegen in der CD45RA⁺ FoxP3^{low} Subpopulation erniedrigt (p=0.005). Dahingegen war die Mehrheit der FoxP3⁺ Helios⁻ T-Zellen sowohl bei gesunden Spendern als auch von SLE-Patienten in der CD45RA⁻ FoxP3^{low} Subpopulation anzufinden.

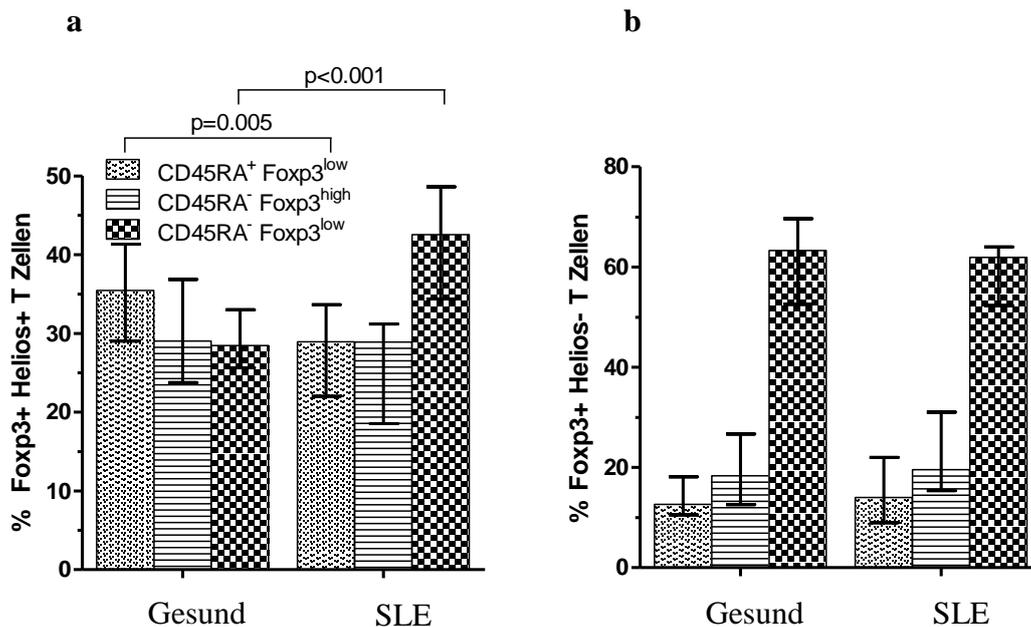


Abbildung 10: Expression von FoxP3 und Helios in FoxP3 Subpopulationen

Frequenzen der CD45RA⁺ FoxP3^{low}, CD45RA⁻ FoxP3^{high} und CD45RA⁻ FoxP3^{low} regulatorischen T-Zellen in FoxP3⁺ Helios⁺ (Abb. 10a) und FoxP3⁺ Helios⁻ T-Zellen (Abb. 10b) von gesunden Spendern (n=20) und SLE-Patienten (n=20), gezeigt sind Median und Interquartilsabstand.

6.6 Erhöhte Expression von CD25 und verminderte Expression von CD127 auf FoxP3⁺ Helios⁺ nTregs im Vergleich zu FoxP3⁺ Helios⁻ iTregs

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, den Phänotyp der FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen mithilfe von etablierten Oberflächenmarkern zu untersuchen. Hierfür untersuchten wir die Expression von Interleukin-2-Rezeptor-alpha (CD25), welcher grundlegend auf Tregs exprimiert wird (17), sowie die alpha Untereinheit des Interleukin-7-Rezeptors (CD127), welcher gegensätzlich mit der FoxP3-Expression und der supprimierenden Treg-Funktion korreliert (31). Wie in vorherigen Studien für gesunde Spender beschrieben (82), exprimieren die FoxP3⁺ Helios⁺ nTregs von SLE-Patienten ähnlich wie bei gesunden Spendern signifikant mehr CD25 und weniger CD127 auf ihrer Oberfläche, als FoxP⁺ Helios⁻ T-Zellen (Abb. 11). Allerdings war die CD25-Expression auf FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellen von SLE-Patienten, korrelierend zu Voruntersuchungen (83), signifikant niedriger als die von gesunden Spendern (p=0.01).

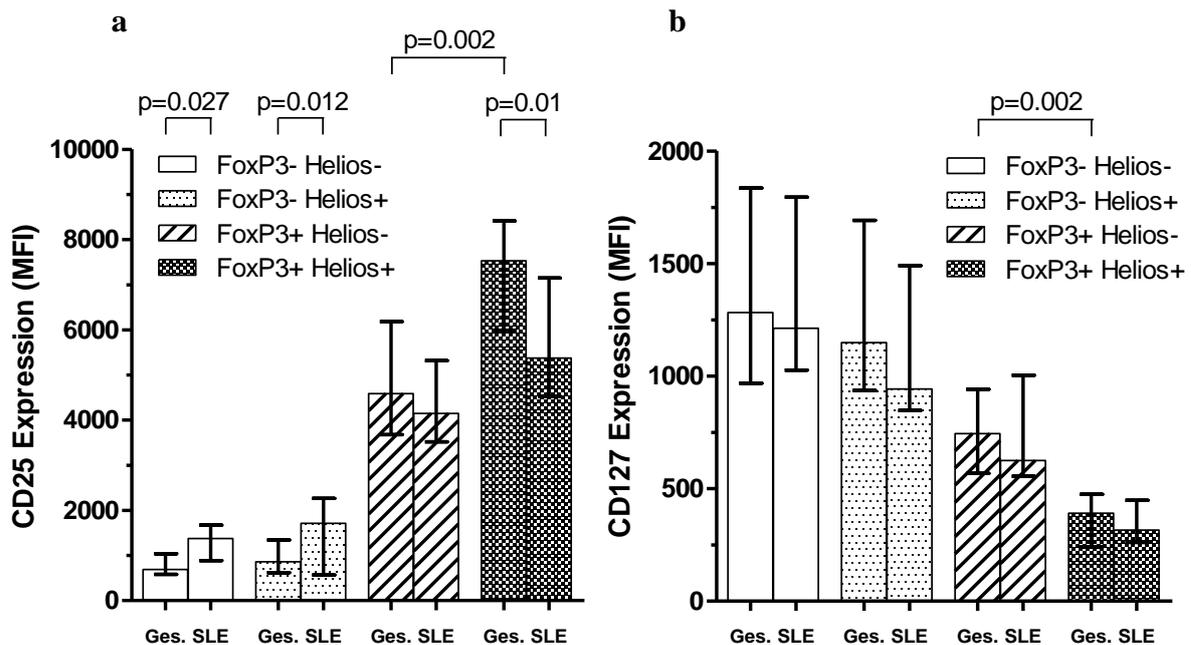


Abbildung 11: Expression von CD25 und CD127 in Treg Subpopulationen

Dargestellt sind CD25-Expression (Abb. 11a) und CD127-Expression (Abb. 11b), MFI (median fluorescence intensity) in FoxP3⁻ Helios⁻, FoxP3⁻ Helios⁺, FoxP3⁺ Helios⁻ und FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen von gesunden Spender (Ges.= Gesund, n=20) und SLE-Patienten (n=20), gezeigt sind Median und Interquartilsabstand.

6.7 Helios-Expression in FoxP3⁺ T-Zellen korreliert nicht mit der CD31-Expression als Marker für die Thymusaktivität

Helios wurde als potentieller Marker für Thymus-generierte nTregs identifiziert. Um zu prüfen, inwieweit die Helios-Expression mit der Thymusaktivität (37) korreliert, analysierten wir die Helios-Expression in FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit verschiedenen Thymusaktivitätszuständen anhand des Oberflächenmarkers CD31, der als Surrogat-Marker für erst kürzlich im Thymus-generierte T-Zellen etabliert ist (33;34;84). Hierzu wurde zunächst die Expression von Helios und CD31 in Tregs von gesunden Spendern in verschiedenen Alterstufen untersucht (Nabelschnurblut, n=3 und einer Kohorte von gesunden Spendern im Alter von 0 bis 96 Jahren). Mit zunehmenden Alter der Probanden zeigte sich eine stabile Helios-Expression der Tregs bei ca. 70% ($r=-0.282$, $p<0.03$). Im Gegensatz dazu nahm die Ko-Expression von CD45RA und CD31 auf den FoxP3⁺ T-Zellen signifikant von initial 66,4% im Nabelschnurblut zu 3,8% im Alter von 96 Jahren ab ($r=-0.868$, $p<0.001$, Abb. 12).

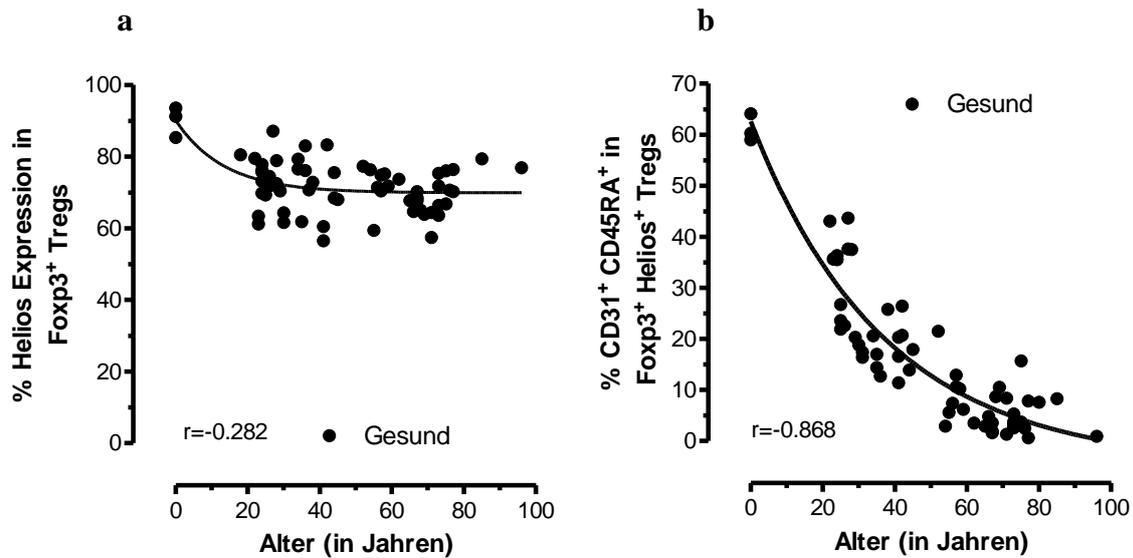


Abbildung 12: Helios-Expression und Ko-Expression von CD45RA und CD31 in einer Alterstudie mit gesunden Probanden.

Für die Analyse der Helios-Expression in FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen (Abb. 12a) und die Ko-Expression von CD45RA und CD31 in FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellen (Abb. 12b) wurde Nabelschnurblut sowie das Blut von Spendern in einem Alter zwischen 18 und 96 Jahren verwendet, Spearman-Korrelation.

Anschließend untersuchten wir die Helios-Expression in FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen in Patienten mit einer durch eine Thymektomie eingeschränkten Thymusaktivität sowie in Patienten, die nach einer autologen Stammzelltransplantation eine erhöhte Thymusaktivität aufwiesen (85;86). Überraschenderweise war trotz der unterschiedlichen Thymusaktivität der untersuchten Probanden die Helios-Expression in FoxP3⁺ T-Zellen in beiden Patientengruppen, als auch zu altersangepassten gesunden Spendern bei ca. 70% stabil (Abb. 13). Dahingegen war die Ko-Expression von CD45RA und CD31 in FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellen in Patienten nach Thymektomie signifikant erniedrigt (Median 7,1% vs. 20,7%, $p=0.009$) und in Patienten nach einer autologen Stammzelltransplantation verglichen zu altersangepassten gesunden Spendern signifikant erhöht (Median 26,4% vs. 20,7%, $p=0.016$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Helios-Expression in FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen von der Thymusaktivität unabhängig ist und CD31 besser mit der Thymusaktivität korreliert.

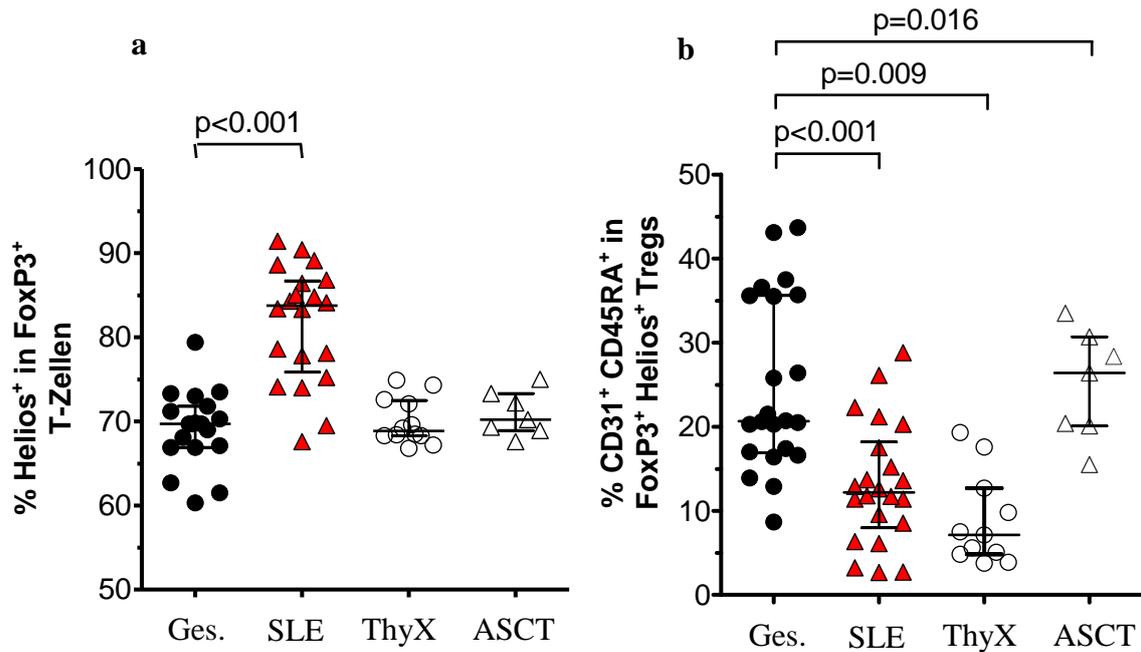


Abbildung 13: Helios-Expression und Ko-Expression von CD45RA und CD31 bei Patienten mit SLE, nach Thymektomie und nach autologer Stammzelltransplantation für Autoimmunerkrankungen

Dargestellt ist die Helios-Expression in FoxP3⁺ T-Zellen (Abb. 13a) und die Ko-Expression von CD45RA und CD31 in FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellen (Abb. 13b) von gesunden Spendern (Ges., n=20) im Vergleich zu altersangepassten Patienten mit SLE (n=20), Patienten nach einer Thymektomie (ThyX, n=11) und Patienten nach einer autologen Stammzelltransplantation (ASCT, n=7), gezeigt sind Median und Interquartilsabstand.

6.8 Erhöhte Ko-Expression von Ki-67 in FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellen bei aktiven SLE-Patienten

Basierend auf Voruntersuchungen, in denen die Helios-Expression in Tregs mit der zellulären Aktivierung und Proliferation assoziiert ist (42), untersuchten wir Proben von SLE-Patienten und gesunden Spendern auf ihre Ko-Expression von Helios und einem Marker für die zelluläre Proliferation, Ki-67. In gesunden Spendern war der Anteil der proliferierenden Zellen in Helios exprimierenden T-Zellen verglichen zu Helios⁻ T-Zellen sowohl in FoxP3⁻ und FoxP3⁺ T-Zellen höher. Wie bereits vorbeschrieben (20), war die zelluläre Proliferation in SLE-Patienten verglichen mit gesunden Spendern in allen FoxP3⁻ und FoxP3⁺ T Zellsubpopulationen signifikant höher (Abb. 14). Die höchsten Proliferationsraten beobachteten wir in der FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellsubpopulation. Dabei war die zelluläre Proliferation eng mit der Krankheitsaktivität der SLE-Patienten verbunden (Abb. 14b).

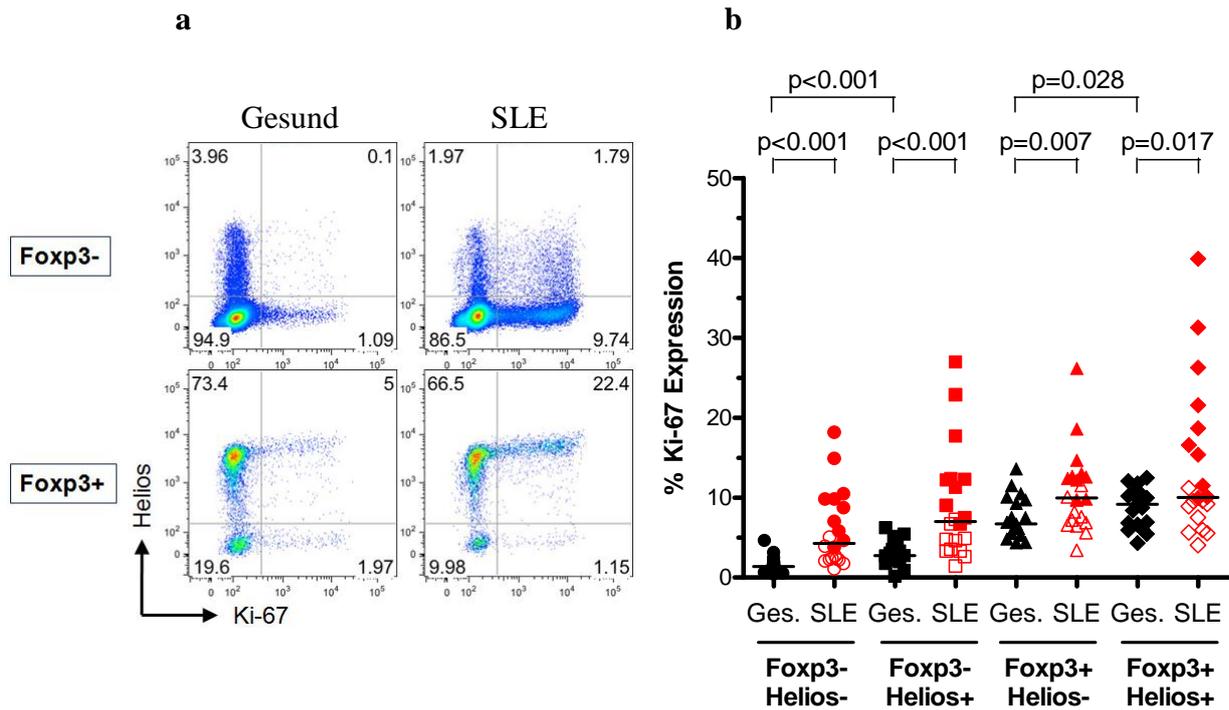


Abbildung 14: Ko-Expressionsanalyse von Ki-67 in Helios exprimierenden FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen in aktiven SLE-Patienten und gesunden Spendern

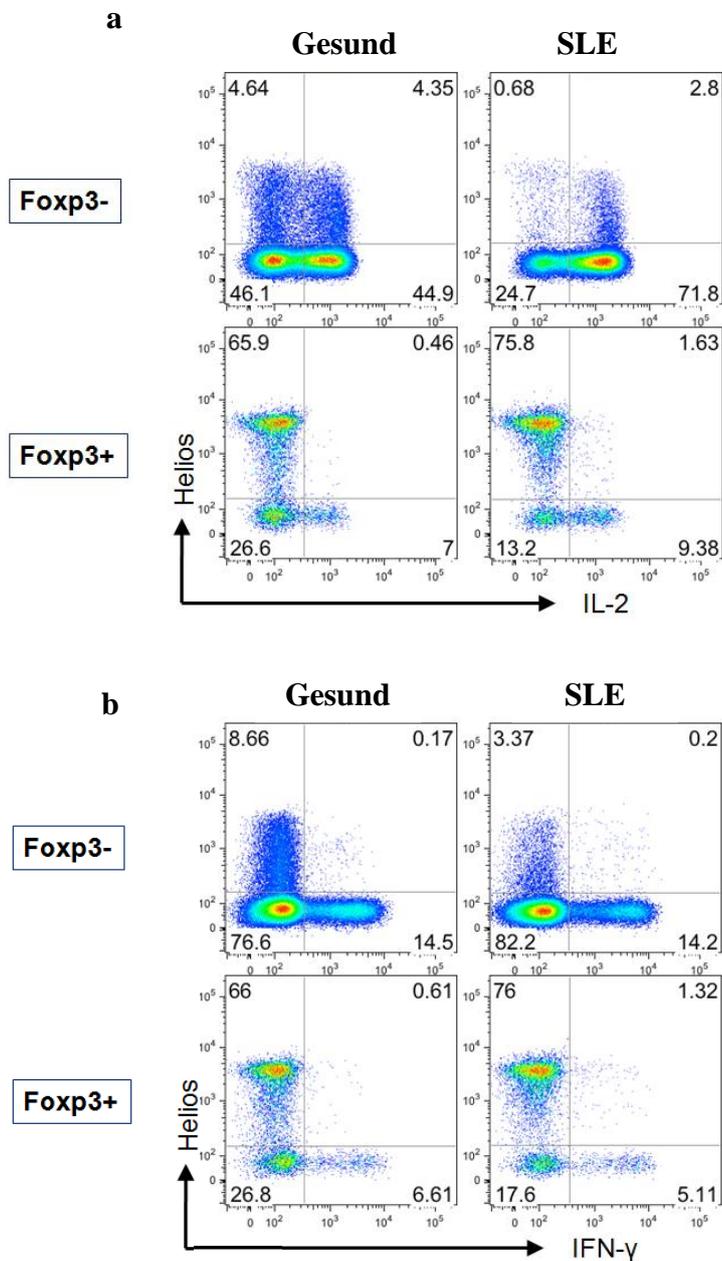
Helios-exprimierende FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen von aktiven SLE-Patienten zeigen im Vergleich zu gesunden Spendern eine erhöhte basale Expression von Ki-67. Ko-Expressionsanalysen von Helios und Ki-67 in FoxP3⁻ und FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellsubpopulationen in Blutproben von gesunden Spendern (Ges., n=20) und SLE-Patienten (n=20). SLE-Patienten mit einem inaktiven Krankheitszustand (SLEDAI < 6) sind mit offenen Symbolen und Patienten mit einem aktiven Krankheitszustand (SLEDAI ≥ 6) mit geschlossenen Symbolen dargestellt (Abb. 14b), Median. Abb. 14a) zeigt repräsentative Dot plots eines gesunden Spenders und eines SLE-Patienten.

6.9 FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen in SLE-Patienten sezernieren keine Effektorzytokine

Für die Unterscheidung, ob FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen in SLE-Patienten eine aktivierte konventionelle T-Zell-Subpopulation oder eher einer Subpopulation mit regulatorischen Potential entsprechen, untersuchten wir zusätzlich deren Fähigkeit zur Effektorzytokin-Produktion. Hierfür wurden angereicherte CD4⁺ T-Zellen mit PMA und Ionomycin für 5 h stimuliert und anschließend die Zytokinproduktion durch intrazelluläre Anfärbung von FoxP3⁺ T-Zellen gemessen. In gesunden Spendern konnte in der FoxP3⁺ Population eine geringe, aber doch bedeutende Anzahl von IL-2- und IFN- γ sezernierenden Zellen nachgewiesen werden. Wie

in vorherigen Studien beschrieben (37), waren diese Zellen ausschließlich der FoxP3⁺ Helios⁻ Population zuzuordnen. In SLE-Patienten waren die FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen ebenfalls zu einer Effektorzytokin-Produktion von IL-2 und IFN- γ größtenteils nicht fähig. Dagegen konnten wir in der FoxP3⁺ Helios⁻ Population von SLE-Patienten signifikant mehr zytokinsezernierende T-Zellen, mit einer deutlich erhöhten IL-2 Produktion verglichen zu gesunden Spendern (Median: 29,5% vs. 23,5%, p=0.002) nachweisen (Abb. 15).

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen in SLE-Patienten, im Gegensatz zu FoxP3⁺ Helios⁻ T-Zellen, nicht zu den Effektor-T-Zellen gerechnet werden können.



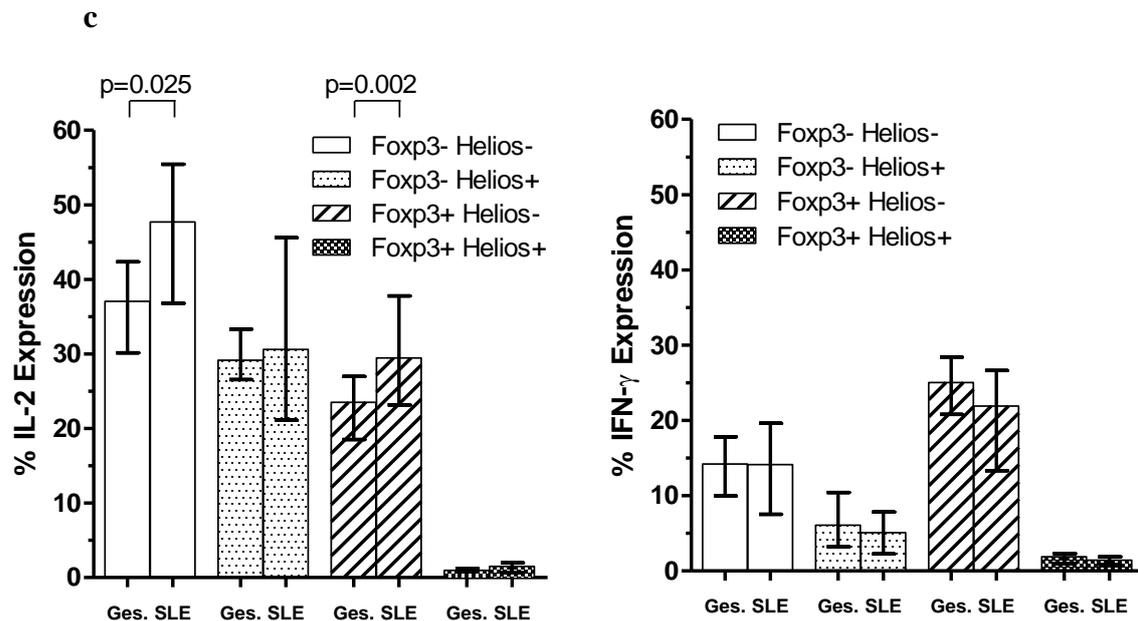


Abbildung 15: FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorische T-Zellen sezernieren keine Effektorzytokine

Aufbereitete CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern und SLE-Patienten wurden intrazellulär angefärbt und auf ihre IL-2- und IFN- γ -Produktion nach PMA/Ionomycin Stimulation für 5 h und Brefeldin A für 4 h untersucht. Abb. 15 a-b) zeigen repräsentative Dot plots eines gesunden Spenders und eines SLE-Patienten. Abb. 15c) zeigt die entsprechende Expression von IL-2 und IFN- γ in den FoxP3/Helios exprimierenden CD4⁺ T-Zellsubpopulationen (Ges.=Gesund), gezeigt sind Median und Interquartilsabstand.

6.10 FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen in SLE-Patienten besitzen eine demethylierte TSDR

Aufgrund der notwendigen Zellfixierung/Permeabilisation sind *in vitro* Suppressions-Nachweisverfahren für Helios-exprimierende regulatorische T-Zellen nicht durchführbar. Eine Zellsortierung von Helios⁺ Tregs ist durch fehlende spezifische humane Zellmarker im Gegensatz zu murinen Untersuchungen (CD103, GITR) nicht möglich (82). Daher untersuchten wir alternativ den Methylierungsstatus der "Treg specific demethylation region" (TSDR) des FoxP3-Gens (87). Die Demethylierung der TSDR korreliert mit einer stabilen FoxP3-Expression und repräsentiert eine konstante Suppressorzelllinie. Wir isolierten durch FACS-Sortierung drei verschiedene CD4⁺ Subpopulationen (FoxP3⁻ Helios⁻, FoxP3⁺ Helios⁻ und FoxP3⁺ Helios⁺) von fünf gesunden Spendern und fünf aktiven SLE-Patienten und analysierten

den Methylierungsstatus der TSDR in jeder Subpopulation. In gesunden Spendern zeigten die FoxP3⁻ T-Zellen eine vollständig methylierte TSDR, wohingegen FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorische T-Zellen nahezu vollständig demethyliert und FoxP3⁺ Helios⁻ T-Zellen zu ~ 30 % demethyliert waren (Abb. 16). Diese Ergebnisse sind mit früheren Studien vereinbar (88). In der Untersuchung der CD4⁺ T-Zellsubpopulation von SLE-Patienten fiel ein zu den gesunden Spendern identisch hoher Demethylierungsstatus der TSDR in Helios-exprimierenden FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Zellen über funktionelle suppressive Eigenschaften verfügen.

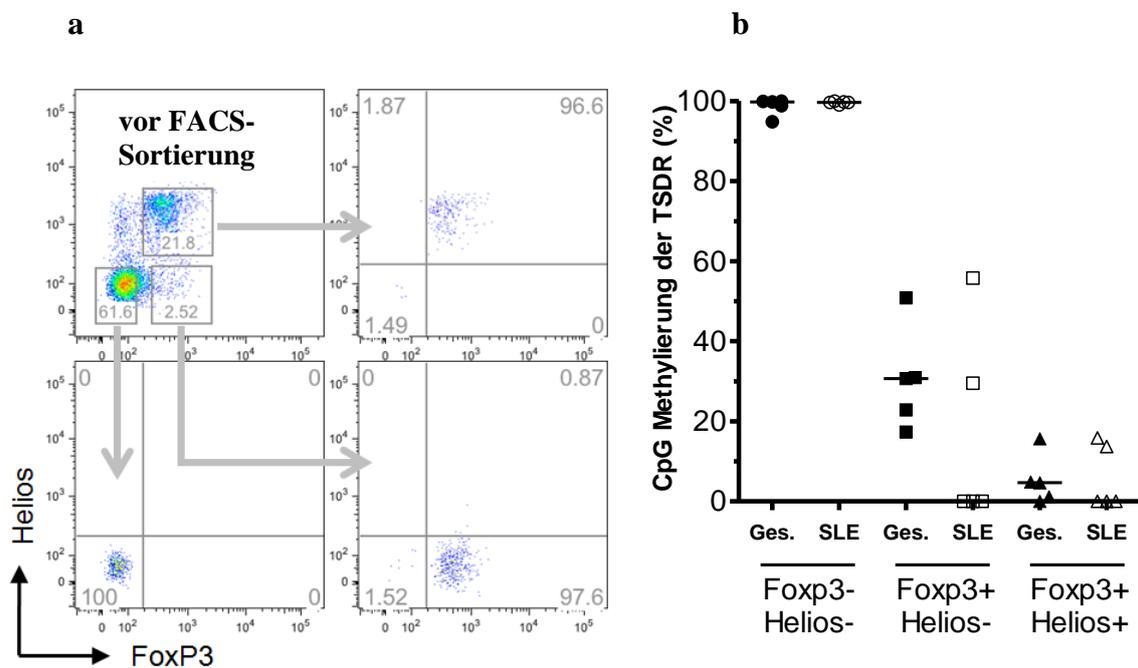


Abbildung 16: Methylierungsstatus der TSDR in gesunden Spendern und SLE-Patienten

Frisch isolierte CD4⁺ Lymphozyten wurden mit intrazellulären Markern für die Analyse der FoxP3- und Helios-Expression angefärbt und anschließend mittels FACS-Sortierung mit einer Reinheit >94% in drei verschiedene Subpopulationen separiert: FoxP3⁻ Helios⁻, FoxP3⁺ Helios⁻ und FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen. Abb. 16 a) zeigt eine repräsentative Analyse vor und nach der FACS-Sortierung. In der Abb. 16 b) ist der Methylierungsstatus der TSDR in den einzelnen Subpopulationen von fünf gesunden Spendern und fünf aktiven SLE-Patienten zu sehen. (Ges.= Gesund, Median).

6.11 Erhöhte basale Expression von pSTAT5a in aktiven SLE-Patienten

Die Zytokine des gemeinsamen Zytokin-gamma-Ketten-Rezeptors spielen in der Entwicklung, Proliferation, Überleben und Differenzierung von verschiedenen Zelllinien sowohl in den konventionellen als auch in den regulatorischen T-Zellen eine entscheidende Rolle (89). Um ihren Einfluss auf die erhöhte zelluläre Proliferation von T-Zellen in SLE-Patienten zu untersuchen, analysierten wir in frisch isolierten Tregs *ex vivo* die basale Phosphorylierung von STAT5a, welcher die Signale von der Membranoberfläche des common-gamma-chain-receptors zum Zellkern weiterleitet und damit die Expression von Zielgenen reguliert. Hierfür verwendeten wir in CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern und SLE-Patienten phospho-spezifische Antikörper mit einer anschließenden durchflusszytometrischen Messung. Verglichen zu gesunden Spendern war die Phosphorylierung von STAT5a in Tregs von SLE-Patienten nicht nur wie in anderen Studien beschrieben in konventionellen CD4⁺ T-Zellen (90), sondern auch in den Helios⁺ und Helios⁻ FoxP3⁺ T-Zellsubpopulationen mit einer hohen Assoziation zu den Krankheitsaktivitäten der SLE-Patienten erhöht (Abb. 17). Dies weist darauf hin, dass die Treg-Zellpopulation bei SLE-Patienten kürzlich durch die gemeinsamen Gamma-Ketten-Zytokine stimuliert wurde.

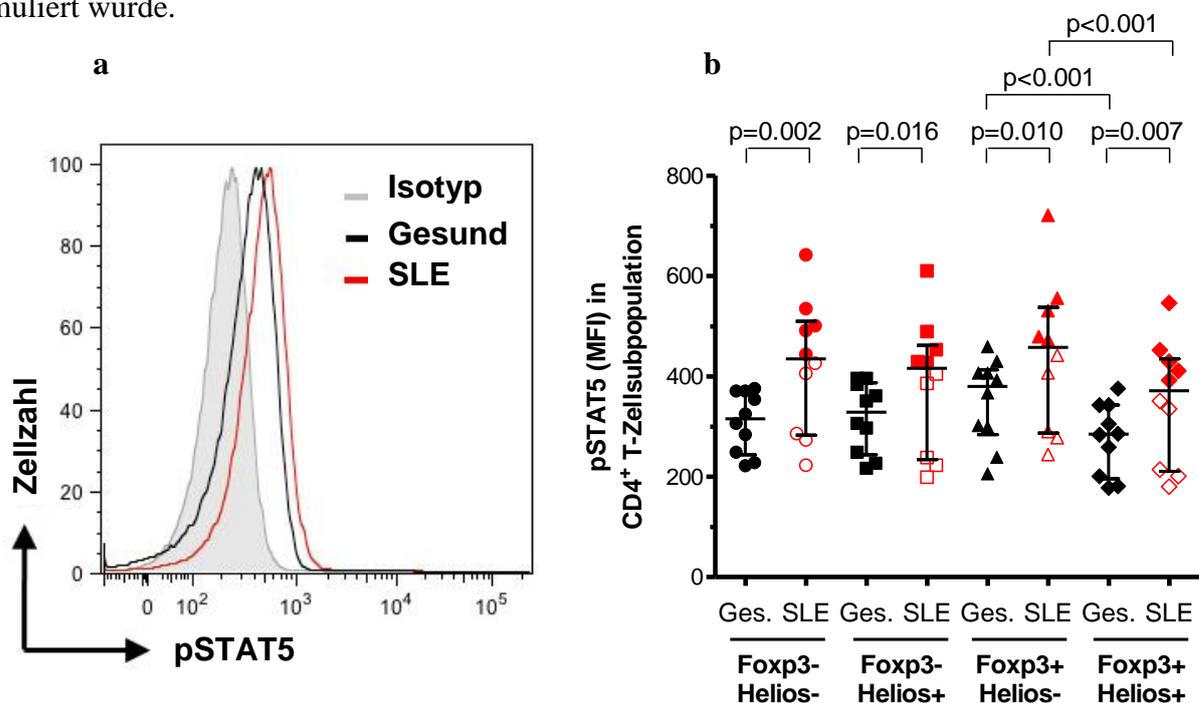


Abbildung 17: Erhöhte basale Expression von pSTAT5a in aktiven SLE-Patienten

CD4⁺ T-Zellen wurden auf ihre Ko-Expression von Helios, FoxP3 und pSTAT5a in Blutproben von gesunden Spendern (Ges., n=10) und SLE-Patienten (n=10) untersucht. SLE-Patienten mit einem inaktiven Krankheitszustand (SLEDAI < 6) sind mit offenen Symbolen und Patienten mit einem aktiven Krankheitszustand (SLEDAI ≥ 6) mit geschlossenen Symbolen dargestellt (Abb.

17b), gezeigt sind Median und Interquartilsabstand. Das Dot plot zeigt repräsentative Proben der pSTAT5a Expression in CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern und Patienten mit aktiven SLE verglichen zu einer Isotyp-Kontrolle (Abb. 17a).

7. Diskussion

Im Rahmen der Dissertation wurde erstmalig die Expression von Helios, einem potentiellen Marker für Thymus-generierte "natürliche" Tregs (nTregs), in FoxP3⁺ Tregs bei SLE-Patienten untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikant vermehrte Expression von Helios in zirkulierenden FoxP3⁺ Tregs und insgesamt erhöhte Frequenzen Helios⁺ FoxP3⁺ nTregs bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden, wohingegen bei Helios⁻ Tregs keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz FoxP3⁺ Helios⁻ induzierter Tregs und FoxP3⁻ Helios⁺ T-Zellen feststellbar waren. Dabei korrelierte die Frequenz der FoxP3⁺ Helios⁺ nTregs mit der zu dem Zeitpunkt der Blutentnahme vorliegenden Krankheitsaktivität der SLE-Patienten. Hieraus resultiert die Frage nach dem Ursprung und der Funktionalität dieser Helios-exprimierenden Tregs in SLE-Patienten sowie die Frage, welche Faktoren diese Treg-Expansion beeinflussen. Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Frequenzen der FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellen in SLE-Patienten nicht mit der Thymusaktivität korrelierten, sondern vielmehr, dass FoxP3⁺ Helios⁺ Tregs erhöhte Ki-67-Expressionen aufwiesen., was darauf hindeutet, dass die erhöhten Helios⁺ Treg-Frequenzen durch eine gesteigerte Zellproliferation und nicht durch eine vermehrte Neubildung der Tregs bedingt ist. Eine erhöhte basale Expression von pSTAT5a weist darauf hin, dass die Zellproliferation durch die Zytokine des gemeinsamen Zytokin-gamma-Ketten-Rezeptors beeinflusst ist. Dabei produzieren Helios⁺ Tregs im Gegensatz zu FoxP3⁺ Helios⁻ T-Zellen wie bei gesunden Probanden kaum Effektor-Zytokine und besitzen eine hohe demethylierte TSDR des FoxP3-Gens, was darauf hindeutet, dass die expandierenden nTregs bei SLE-Patienten tatsächlich potentiell supprimierendes Potential besitzen.

Regulatorische T-Zellen nehmen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz sowie in der Vorbeugung von Autoimmunerkrankungen ein. Bei SLE-Patienten liegen trotz umfangreicher Voruntersuchungen widersprüchliche Daten zur Frequenz und Funktion regulatorischer T-Zellen vor. Da Helios kürzlich als potentieller Marker für Thymus-generierte Tregs identifiziert wurde, erfolgte zunächst eine Analyse der Frequenzen der Helios-Expression sowie anschließend eine Phänotypisierung und eine Analyse der Funktionalität dieser Zellen bei gesunden Probanden und SLE-Patienten. Hierfür analysierten wir zunächst die Helios-Expression in CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen in gesunden Probanden und in SLE-Patienten. Die von uns ermittelte durchschnittliche Helios-Expression von 69,8% in FoxP3⁺ Tregs in gesunden Probanden deckt sich mit den Ergebnissen von Thornton et al. (37). In der Literatur lagen bislang keine hinreichenden Angaben über die Helios-Expression in SLE-Patienten vor. Wir konnten

zeigen, dass 82,5% der CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen in SLE-Patienten Helios exprimieren und damit im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht waren. Da bei SLE-Patienten zusätzlich die Frequenz zirkulierender FoxP3⁺ Tregs erhöht war, resultiert eine signifikant erhöhte Frequenz zirkulierender Helios⁺ FoxP3⁺ nTregs bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz FoxP3⁺ Helios⁻ induzierter Tregs und FoxP3⁻ Helios⁺ T-Zellen bei SLE-Patienten und in einer gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Für die weitere Charakterisierung der FoxP3⁺ Helios⁺ Tregs erfolgte eine Phänotypisierung dieser Zellen anhand Treg-spezifischer Marker bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Hierfür erfolgte zunächst eine Analyse der Differenzierung der FoxP3 Subpopulationen anhand der Expression von CD45RA und FoxP3 in SLE-Patienten und gesunden Probanden. Basierend auf Daten von Miyara et al. ist hierdurch die Einteilung der FoxP3⁺ T-Zellen in drei funktionell verschiedene FoxP3-Subpopulationen möglich (20). Übereinstimmend mit publizierten Vordaten waren die drei Subpopulationen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen nahezu gleich verteilt. Bei den analysierten SLE-Patienten zeigte sich eine signifikant höhere Frequenz CD4⁺ T-Zellen in jeder der drei FoxP3⁺-Subpopulation im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe, wobei die höchste Signifikanz für die CD45RA⁻ FoxP3^{low} Subpopulation nachweisbar war (Median: 2,6% vs. 5.3%, p< 0.001). Die Analyse der Helios-Expression in den drei Treg-Subpopulationen offenbarte bei den gesunden Spendern eine nahezu in allen drei Subpopulationen gleiche Verteilung. Bei der Analyse der Helios⁺ Tregs konnten wir zeigen, dass die FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen in SLE-Patienten im Gegensatz zu gesunden Probanden einen vorwiegenden CD45RA⁻ FoxP3^{low} Phänotyp aufweisen. FoxP3⁺ Helios⁻ T-Zellen waren dagegen sowohl in gesunden Probanden als auch in SLE-Patienten ebenfalls hauptsächlich in der nicht-regulatorischen CD45RA⁻ FoxP3^{low} Subpopulation vermehrt.

Für die weitere Phänotypisierung der FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen untersuchten wir die Expression von Interleukin-2-Rezeptor-alpha (CD25), welcher konstitutionell auf Tregs exprimiert wird (17), sowie die alpha Untereinheit des Interleukin-7-Rezeptors (CD127), welcher gegensätzlich mit der FoxP3-Expression und der supprimierenden Treg-Funktion korreliert (31). Helios⁺ regulatorische T-Zellen von gesunden Probanden und SLE-Patienten zeigten eine signifikant höhere Expression von CD25 und eine geringere Expression von CD127 verglichen zu FoxP3⁺ Helios⁻ T-Zellen. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit den Ergebnissen von Akimova et al. und Zabransky et al., welche die CD25 und CD127 Expression in gesunden Spendern untersucht haben (42;82). Diese Daten deuten an, dass FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen im Vergleich zu Helios⁻ Tregs scheinbar über erhöhte supprimierende Eigenschaften verfügen. In Voruntersuchungen

konnte eine geringe CD25-Expression auf Tregs von SLE-Patienten nachgewiesen werden, was als Zeichen der IL-2 Deprivation gedeutet wurde (91). Korrelierend hierzu war die Expression von CD25 auch auf Helios⁺ Tregs bei SLE-Patienten geringer im Vergleich zu gesunden Spendern.

Experimentelle Vordaten von Thornton et al. weisen auf eine Rolle von Helios als Marker für Thymus-generierte "natürliche" Tregs hin (37). Wir fragten uns daher, ob Helios⁺ nTregs tatsächlich kürzlich im Thymus generierte Tregs repräsentieren und mit Markern für erst kürzlich vom Thymus in die Peripherie gelangende regulatorische T-Zellen korreliert. Hierfür analysierten wir die Helios-Expression in FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen bei Patienten mit verschiedenen Thymusaktivitätszuständen anhand des Oberflächenmarkers CD31, der entsprechend der Thymusaktivität ein Marker für erst kürzlich vom Thymus in die Peripherie gelangende regulatorische T-Zellen ist (33;34;84). Zu unserer Überraschung konnten wir dabei keine Abhängigkeit zwischen der Helios-Expression und der Entwicklung der regulatorischen T-Zellen im Thymus feststellen. Hierzu untersuchten wir die Helios-Expression in FoxP3⁺ Tregs bei gesunden Probanden mit unterschiedlichen Alter und unterschiedlichen Thymus-Aktivitätszuständen, z.B nach Thymektomie oder autologer Stammzelltransplantation. Die Helios-Expression war hierbei unabhängig ca. 70% von der Thymusaktivität. Im Gegensatz dazu korrelierte die Thymusaktivität mit der Expression von CD31 in FoxP3⁺ Helios⁺ Tregs. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Helios-Expression entweder durch die homöostatische Proliferation der regulatorischen T-Zellen oder peripher durch die Aktivierung von T-Zellen aufrechterhalten wird.

Da die erhöhten Frequenzen zirkulierender FoxP3⁺ Helios⁺ Tregs scheinbar nicht auf einer erhöhten Produktion dieser T-Zellen im Thymus zurückzuführen sind, gingen wir der Frage nach, ob eine erhöhte periphere Proliferation hierfür verantwortlich sein könnte. Tatsächlich war anhand der Analyse des zellulären Proliferationsmarker Ki-67 in SLE-Patienten verglichen mit gesunden Spendern in allen FoxP3⁻ und FoxP3⁺ T-Zellsubpopulationen eine signifikant höhere zelluläre Proliferationsrate nachweisbar. Die höchsten Proliferationsraten beobachteten wir in der FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellsubpopulation, interessanterweise mit einer engen Korrelation zur Krankheitsaktivität. Dies weist insgesamt darauf hin, dass diese FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellen in SLE-Patienten nicht durch vermehrte Neubildung im Thymus generiert werden, sondern vielmehr peripher expandiert sind.

Nachfolgend gingen wir der Frage nach, welche Faktoren die vermehrte Treg-Proliferation beeinflussen könnten. Die Zytokine des gemeinsamen Zytokin-gamma-Ketten-Rezeptors spielen

eine entscheidende Rolle in der Entwicklung, Proliferation, Überleben und Differenzierung von verschiedenen Zelllinien sowohl in den konventionellen als auch in den regulatorischen T-Zellen (89). Um deren Einfluss auf die erhöhte zelluläre Proliferation von T-Zellen in SLE-Patienten zu untersuchen, analysierten wir die basale Phosphorylierung von STAT5a, welcher die Signale von der Membranoberfläche des IL-2-Rezeptors zum Zellkern weiterleitet und damit die Expression von Zielgenen reguliert. Verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe war die Expression von pSTAT5a in SLE-Patienten nicht nur in konventionellen T-Zellen, sondern auch in der FoxP3⁺ Helios⁺ Subpopulation mit einer hohen Assoziation zu den Krankheitsaktivitäten der SLE-Patienten erhöht. Dies suggeriert, dass die Treg-Stimulation durch Gamma-Ketten-Zytokine wie IL-2, IL-7, IL-15 und IL-21 erfolgen könnte. Innerhalb dieser Gamma-Ketten-Zytokine nimmt IL-2 eine Schlüsselrolle ein. Elkord et al. konnten belegen, dass es bei Patienten mit Nierenzellkarzinom unter einer IL-2 Therapie zu einer im Gegensatz zu FoxP3⁺ Helios⁻ T-Zellen signifikant vermehrten Expansion von FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellen kommt (92). Kim et al. publizierten, dass Oligodesoxynukleotide in der Lage sind, FoxP3⁺ Helios⁺ regulatorische T-Zellen während der Expansion in vitro zu stabilisieren (88). Es ist bekannt, dass bei SLE-Patienten eine erhöhte Menge an Autoantigen, einschließlich DNA-Molekülen, vorhanden ist (93). Daher kann vermutet werden, dass Oligodesoxynukleotide die Expansion von FoxP3⁺ Helios⁺ Tregs in SLE-Patienten beeinflussen könnten. Insgesamt bleibt weiterhin unklar, welche Zytokine die Proliferation der T-Zellen bei SLE-Patienten vorantreiben.

Für die Beantwortung der Frage, ob es sich bei den expandierten FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen um "echte" Tregs mit suppressivem Potential handelt, untersuchten wir zunächst die Zytokin-Sekretion dieser T-Zellen. Mit Hilfe der Stimulation durch PMA/Inomycin konnten wir nachweisen, dass die Helios exprimierenden regulatorischen T-Zellen in SLE-Patienten kaum in der Lage sind Effektorzytokine wie IL-2 und IFN- γ zu produzieren. Innerhalb der FoxP3⁺ T-Zellen fanden wir Zytokin-sezernierende Zellen hauptsächlich in der Helios⁻ FoxP3⁺ T-Zellsubpopulation. Auffälligerweise konnten wir mit unseren Daten zeigen, dass die FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen im Gegensatz zu gesunden Probanden in der CD45RA⁻ FoxP3^{low}-Subpopulation überrepräsentiert waren. Basierend auf Vordaten ist diese Subpopulation von Zytokin-sezernierenden "nicht-regulatorischen" Effektor-T-Zellen angereichert (20). Obwohl FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen in dieser Subpopulation bei SLE-Patienten vermehrt waren, konnten wir nachweisen, dass diese T-Zellen im Gegensatz zu Helios⁻ FoxP3⁺ T-Zellen keine Zytokine sezernieren. Dies deutet auf eine echte Treg-Funktionalität der FoxP3⁺ Helios⁺ T-Zellen hin. Eine genaue Analyse der Funktionalität dieser Zellen wäre mit einem Suppressions-Assay zu

untersuchen, dieses ist aber aufgrund der notwendigen Zellfixierung nicht möglich. Daher untersuchten wir anschließend den Methylierungsstatus der "Treg specific demethylation region" (TSDR) des FoxP3-Gens (87). Die Demethylierung der TSDR korreliert mit einer stabilen FoxP3-Expression und repräsentiert daher eine konstante Suppressorzelllinie. Wir beobachteten hier in den Foxp3⁺ Helios⁺ regulatorischen T-Zellen in SLE-Patienten genauso wie in gesunden Spendern eine komplette Demethylierung der TSDR des FoxP3 Gens. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Zellen über funktionelle suppressive Eigenschaften verfügen.

Diskrepanz zu unseren Ergebnissen sind Daten veröffentlicht, wonach FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen im peripheren Blut bei SLE-Patienten erniedrigt sind. In unserer Versuchsreihe fanden wir eine signifikante erhöhte relative Anzahl von FoxP3⁺ T-Zellen in SLE-Patienten. Die in der Literatur angegebenen Daten für zirkulierende Tregs bei SLE-Patienten sind extrem widersprüchlich und schwanken von erhöht über normal bis hin zu vermindert im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (68;94;95). Die Diskrepanz in den verschiedenen Analysen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in den Voruntersuchungen CD25 verwendet wurde. Da SLE-Patienten eine verminderte CD25-Expression auf FoxP3⁺ Tregs aufweisen (83;96), könnte hieraus eine Unterrepräsentierung der Frequenzen von regulatorischen T-Zellen resultieren. Insgesamt ist die Helios-Expression daher besser als Marker für regulatorische T-Zellen geeignet als FoxP3 in Kombination mit der CD25-Expression.

Zusammenfassend konnten wir nachweisen, dass Helios exprimierende FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten expandiert sind. Diese Expansion korreliert eng mit der Krankheitsaktivität der SLE-Patienten und ist durch eine vermehrte Stimulation durch Zytokine des gemeinsamen Zytokin-gamma-Ketten-Rezeptors hervorgerufen. Zwar ist Helios als Marker für nTregs beschrieben, unsere Daten zeigen aber keine Assoziation zu Markern für erst kürzlich vom Thymus in die Peripherie gelangende regulatorische T-Zellen. Daher ist CD31 besser als Marker für Thymus-generierte Tregs geeignet. Weiterhin konnten wir belegen, dass FoxP3⁺ Helios⁺ Tregs in SLE-Patienten, obwohl sie in der CD45RA⁻ FoxP3^{low} vermehrt sind (die als nicht-Tregs vorbeschrieben sind), keine Effektorzytokine produzieren und im Gegensatz zu Helios⁻ Tregs eine komplett demethylierte TSDR aufweisen und damit Tregs mit regulatorischem Potential darstellen und aktiv eine Rolle in der Kontrolle der chronischen Autoimmunantwort spielen könnten.

Basierend auf diesen Ergebnissen könnten FoxP3⁺ Helios⁺ Tregs zukünftig als nützliche Biomarker für die Krankheitsaktivität von SLE-Patienten dienen. Obwohl FoxP3⁺ Helios⁺ T-

Zellen im peripheren Blut von SLE-Patienten vermehrt sind, scheinen diese T-Zellen nicht in der Lage zu sein, die überschießende Autoimmunantwort einzudämmen. Da diese T-Zellen aber scheinbar über eine "echte" Treg-Funktionalität verfügen, könnten künftige Therapiestrategien auf eine Expansion dieser T-Zellen abzielen. Erste Therapieansätze hierzu mit einer gering dosierten IL-2-Therapie sind erfolversprechend. Sie zeigen eine schnelle und anhaltende Reduktion der Krankheitsaktivität mit einer signifikanten Expansion der Treg-Population bei therapierefraktären SLE-Patienten (91).

8. Literaturverzeichnis

- (1) Christine Schütt, Barbara Bröker. 2009 Grundwissen Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- (2) Aumüller AD. 2007 Duale Reihe Anatomie. 2011. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- (3) Arasteh BB. 2009 Duale Reihe Innere Medizin. 2011. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- (4) Lüllmann-Rauch. 2003 Histologie. 2011. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- (5) Janeway Charles A. 2001 Immunobiology, 5th edition. 2011. New York Garland Science.
- (6) Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6(11):1123-32.
- (7) Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203(10):2271-9.
- (8) Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007; 448(7152):480-3.
- (9) Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001; 194(4):519-27.
- (10) Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21(4):467-76.
- (11) Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007; 8(5):457-62.
- (12) Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(7):490-500.
- (13) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133(5):775-87.
- (14) Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212:203-16.

- (15) Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18(5):723-37.
- (16) Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 2007; 37 Suppl 1:S116-S123.
- (17) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3):1151-64.
- (18) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4):330-6.
- (19) Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* 2005; 35(6):1681-91.
- (20) Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30(6):899-911.
- (21) Schreiber L, Pietzsch B, Floess S, Farah C, Jansch L, Schmitz I et al. The Treg-specific demethylated region stabilizes Foxp3 expression independently of NF-kappaB signaling. *PLoS One* 2014; 9(2):e88318.
- (22) Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(16):2603-22.
- (23) Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4):337-42.
- (24) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609):1057-61.
- (25) Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity* 2014; 41(6):1013-25.
- (26) Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol* 2009; 39(4):1088-97.
- (27) Allan SE, Song-Zhao GX, Abraham T, McMurchy AN, Levings MK. Inducible reprogramming of human T cells into Treg cells by a conditionally active form of FOXP3. *Eur J Immunol* 2008; 38(12):3282-9.
- (28) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133(5):775-87.

- (29) Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R et al. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 2007; 27(5):786-800.
- (30) Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 2007; 19(4):345-54.
- (31) Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203(7):1701-11.
- (32) Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203(7):1693-700.
- (33) Kimmig S, Przybylski GK, Schmidt CA, Laurisch K, Mowes B, Radbruch A et al. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J Exp Med* 2002; 195(6):789-94.
- (34) Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and Blood 2009; 113(4):769-74.
- (35) Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3(+)/CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* 2011; 89(3):346-51.
- (36) Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30(5):626-35.
- (37) Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010; 184(7):3433-41.
- (38) Kelley CM, Ikeda T, Koipally J, Avitahl N, Wu L, Georgopoulos K et al. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol* 1998; 8(9):508-15.
- (39) Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R et al. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* 1998; 12(6):782-96.
- (40) Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. *Mol Immunol* 2010; 47(7-8):1595-600.
- (41) Verhagen J, Wraith DC. Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells". *J Immunol* 2010; 185(12):7129.
- (42) Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 2011; 6(8):e24226.

- (43) Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2012; 188(3):976-80.
- (44) Hiepe F, Dorner T, Burmester G. Antinuclear antibody- and extractable nuclear antigen-related diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123(1):5-9.
- (45) Mills JA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1994; 330(26):1871-9.
- (46) Wallace D.J, Hahn B.H. 2007 Dubois` Lupus Erythematosus. 2011. Lippincott Williams & Wilkins.
- (47) Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011; 365(22):2110-21.
- (48) Kleinert S, Feuchtenberger M, Tony HP. [Systemic lupus erythematosus. A problem based approach]. *Internist (Berl)* 2010; 51(8):1013-26.
- (49) Alexander T, Radbruch A, Hiepe F. [Pathogenesis of systemic lupus erythematosus]. *Z Rheumatol* 2015; 74(3):183-90.
- (50) Gross AJ, Hochberg D, Rand WM, Thorley-Lawson DA. EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. *J Immunol* 2005; 174(11):6599-607.
- (51) Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992; 35(3):311-8.
- (52) Ruiz-Irastorza G, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Khamashta MA. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(1):20-8.
- (53) Backhaus M, Hiepe F. [Cyclophosphamide therapy in systemic lupus erythematosus]. *Z Rheumatol* 1997; 56(4):178-89.
- (54) Amano H, Morimoto S, Kaneko H, Tokano Y, Takasaki Y, Hashimoto H. Effect of intravenous cyclophosphamide in systemic lupus erythematosus: relation to lymphocyte subsets and activation markers. *Lupus* 2000; 9(1):26-32.
- (55) Waer M, Van DB, Leenaerts P, Roels L, Van der SE, Vandeputte M et al. Treatment of murine lupus nephritis with cyclophosphamide or total lymphoid irradiation. *Kidney Int* 1988; 34(5):678-82.
- (56) Hiepe F, Burmester GR. [The therapy of systemic lupus erythematosus]. *Dtsch Med Wochenschr* 1996; 121(37):1129-33.
- (57) Jones RB, Walsh M, Smith KG. What is the value of mycophenolate mofetil as induction and maintenance therapy in lupus nephritis? *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21(3):256-61.
- (58) Alexander T, Arnold R, Hiepe F. [Immunoablation followed by autologous stem cell transplantation in lupus: a clinical update]. *Z Rheumatol* 2009; 68(3):205-13.

- (59) Alexander T, Sarfert R, Klotsche J, Kuhl AA, Rubbert-Roth A, Lorenz HM et al. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and ameliorates clinical manifestations of refractory systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2015; 74(7):1474-8.
- (60) Crispin JC, Martinez A, Cacer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2003; 21(3):273-6.
- (61) Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2005; 175(12):8392-400.
- (62) Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, Tutor-Ureta P, Yebra-Bango M, Andreu JL et al. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(4):553-4.
- (63) Lee JH, Wang LC, Lin YT, Yang YH, Lin DT, Chiang BL. Inverse correlation between CD4+ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2006; 117(2):280-6.
- (64) Suen JL, Li HT, Jong YJ, Chiang BL, Yen JH. Altered homeostasis of CD4(+) FoxP3(+) regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2009; 127(2):196-205.
- (65) Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2004; 59(2):198-202.
- (66) Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C. Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(11):1512-7.
- (67) Zhang B, Zhang X, Tang F, Zhu L, Liu Y. Reduction of forkhead box P3 levels in CD4+CD25high T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2008; 153(2):182-7.
- (68) Venigalla RK, Tretter T, Krienke S, Max R, Eckstein V, Blank N et al. Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+, CD25high, CD127-/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008; 58(7):2120-30.
- (69) Varado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Bud-Mendoza C et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2006; 27(2):110-8.
- (70) Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2007; 178(4):2579-88.
- (71) Monk CR, Spachidou M, Rovis F, Leung E, Botto M, Lechler RI et al. MRL/Mp CD4+, CD25- T cells show reduced sensitivity to suppression by CD4+, CD25+

- regulatory T cells in vitro: a novel defect of T cell regulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52(4):1180-4.
- (72) Yan B, Ye S, Chen G, Kuang M, Shen N, Chen S. Dysfunctional CD4+,CD25+ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. *Arthritis Rheum* 2008; 58(3):801-12.
- (73) Yates J, Whittington A, Mitchell P, Lechler RI, Lightstone L, Lombardi G. Natural regulatory T cells: number and function are normal in the majority of patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol* 2008; 153(1):44-55.
- (74) Vargas-Rojas MI, Crispin JC, Richaud-Patin Y, Cocer-Varela J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus* 2008; 17(4):289-94.
- (75) Yu C, Gershwin ME, Chang C. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: a critical review. *J Autoimmun* 2014; 48-49:10-3.
- (76) American College of Rheumatology.
https://www.rheumatology.org/Practice/Clinical/Indexes/Systemic_Lupus_Erythematosus_Disease_Activity_Index_SELENA_Modification/. 27-7-2015.
- (77) Isenberg DA, Rahman A, Allen E, Farewell V, Akil M, Bruce IN et al. BILAG 2004. Development and initial validation of an updated version of the British Isles Lupus Assessment Group's disease activity index for patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44(7):902-6.
- (78) Noble PB, Cutts JH. Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J* 1967; 8(5):110-1.
- (79) Schulz KR, Danna EA, Krutzik PO, Nolan GP. Single-cell phospho-protein analysis by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2012; Chapter 8:Unit-20.
- (80) Sherston SN, Vogt K, Schlickeiser S, Sawitzki B, Harden PN, Wood KJ. Demethylation of the TSDR is a marker of squamous cell carcinoma in transplant recipients. *Am J Transplant* 2014; 14(11):2617-22.
- (81) Markus Pospeschill. *Statistische Methoden: Strukturen, Grundlagen, Anwendungen*. 11-5-2006. Spektrum Akademischer Verlag.
- (82) Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, Park BV, Ceccato CM, Bruno TC et al. Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS One* 2012; 7(3):e34547.
- (83) Bonelli M, von DK, Savitskaya A, Smolen JS, Scheinecker C. Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(5):664-71.
- (84) Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, Kissane S, Agius E, Jackson SE et al. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+

- regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol* 2010; 184(8):4317-26.
- (85) Alexander T, Thiel A, Rosen O, Massenkeil G, Sattler A, Kohler S et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. *Blood* 2009; 113(1):214-23.
- (86) Thiel A, Alexander T, Schmidt CA, Przybylski GK, Kimmig S, Kohler S et al. Direct assessment of thymic reactivation after autologous stem cell transplantation. *Acta Haematol* 2008; 119(1):22-7.
- (87) Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007; 5(2):e38.
- (88) Kim YC, Bhairavabhotla R, Yoon J, Golding A, Thornton AM, Tran DQ et al. Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion. *Blood* 2012; 119(12):2810-8.
- (89) Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(7):480-90.
- (90) Huang X, Guo Y, Bao C, Shen N. Multidimensional single cell based STAT phosphorylation profiling identifies a novel biosignature for evaluation of systemic lupus erythematosus activity. *PLoS One* 2011; 6(7):e21671.
- (91) Humrich JY, von Spee-Mayer C, Siegert E, Alexander T, Hiepe F, Radbruch A et al. Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE. *Ann Rheum Dis* 2015; 74(4):791-2.
- (92) Elkord E, Sharma S, Burt DJ, Hawkins RE. Expanded subpopulation of FoxP3+ T regulatory cells in renal cell carcinoma co-express Helios, indicating they could be derived from natural but not induced Tregs. *Clin Immunol* 2011; 140(3):218-22.
- (93) Munoz LE, Janko C, Schulze C, Schorn C, Sarter K, Schett G et al. Autoimmunity and chronic inflammation - two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE. *Autoimmun Rev* 2010; 10(1):38-42.
- (94) Bonelli M, Smolen JS, Scheinecker C. Treg and lupus. *Ann Rheum Dis* 2010; 69 Suppl 1:i65-i66.
- (95) Lin SC, Chen KH, Lin CH, Kuo CC, Ling QD, Chan CH. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest* 2007; 37(12):987-96.
- (96) Bonelli M, Savitskaya A, Steiner CW, Rath E, Smolen JS, Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of CD4+. *J Immunol* 2009; 182(3):1689-95.

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb, Abbildung

ACR, American College of Rheumatology

ASCT, autologe Stammzelltransplantation

AZA, Azathioprine

BILAG, British Isles Lupus Activity Group

bzw, beziehungsweise

C2H2, zwei Cystein- und zwei Histidinreste

CD, cluster determinant

CpG-Inseln, Cytosin-phosphatidyl-Guanin

CTLA, zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen

d.h., das heißt

DRFZ, Deutschen-Rheuma-Forschungszentrum

dsDNA, doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure

eTregs, Effektor-Tregs

FACS, Fluoreszenz Activated Cell Analysis

FoxP3, Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-P3

FSC, forward scatter

GITR, glukokortikoid-induziertes TNF-Rezeptor bezogenes Protein

HQL, Hydroxychloroquine

IFN, Interferon

IL, Interleukin

IPEX, Immune dysregulation Polyendocrinopathie Enteropathy X-linked Syndrom

iTregs, induzierte Tregs

Ki-67, ein nukleärer Proliferationsmarker

MFI, median fluorescence intensity

MHC, Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex

ml, Milliliter

MMF, Mycophenolate Mofetil

m.s, mit Schwerpunkt

ng, Nanogramm

nTregs, "natürliche" thymus generierte Tregs

PBMC, Periphere mononukleäre Zellen

PBS/BSA, phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PCR, Polymerasekettenreaktion

PECAM1, Platelet endothelial cell adhesion molecule

PMA, Phorbol-12-myristate-13-acetate

Pred, Prednisolon

rpm, rounds per minute

SLE, systemischer Lupus erythematosus

SLEDAI, Systemic Lupus erythematosus Disease Activity Index

SSC, sideward scatter

STAT5, Signal Transducer and Activator of Transcription 5

TCR, T-Zell-Rezeptor

TGF, Transforming growth factor

TH, T-Helferzelle

TNF, Tumornekrosefaktor

TR, regulatorische T-Zelle

Tregs, regulatorische T-Zellen

TSDR, Treg specific demethylation region

z.B., zum Beispiel

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Lars Templin, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung von Helios+ FoxP3+ regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit systemischen Lupus erythematoses selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Lars Templin

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Herr Lars Templin hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

A. Tobias, A. Sattler, L. Templin, S. Kohler, C. Groß, A. Meisel, B. Sawitzki, GR. Burmester, A. Radbruch, A. Thiel, F. Hiepe:

FoxP3⁺ Helios⁺ Regulatory T cells are expanded in active SLE, Ann Rheum Dis 2013; 72(9):1549-58.

Beitrag im Einzelnen: Datenakquirierung, Mitwirkung bei der statistischen Auswertung und Dateninterpretation, Etablierung von Messmethoden

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden Lars Templin

11. Lebenslauf

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

12. Publikationsliste

- 1) Alexander T, Sattler A, Templin L, Kohler S, Gross C, Meisel A et al.: Foxp3⁺ Helios⁺ regulatory T cells are expanded in active systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(9):1549-58.
- 2) Alexander T, Templin L, Kohler S, Groß C, Sattler A, Meisel A, Perka C, Burmester GR, Radbruch A, Thiel A, Hiepe F: Increased levels of circulating Helios⁺ FoxP3⁺ natural regulatory T cells in systemic lupus erythematosus *Ann Rheum Dis* 2011;70:A50 doi:10.1136/ard.2010.148981.19 Abstract Poster EWRR 2011
- 3) Alexander T, Templin L, Kohler S, Groß C, Sattler A, Meisel A, Perka C, Burmester GR, Radbruch A, Thiel A, Hiepe F: Increased levels of circulating Helios⁺ FoxP3⁺ natural regulatory T cells in systemic lupus erythematosus *Lupus* April 2011 20: 348-353 Abstract Oral presentation 8th European Lupus Meeting 2011

13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Falk Hiepe sowie meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. Tobias Alexander, der mich in allen Fragen geduldig und mit großem Fachwissen beraten hat.

Mein Großvater Horst Pietsch hat mich stets ermuntert und mir moralisch beigestanden.

Darüber hinaus möchte ich meinem Vater, der mir mein Medizinstudium ermöglicht hat und stets ein kompetenter Ansprechpartner in medizinischen Fragestellungen war, und meiner Mutter, die in Gedanken stets bei mir war, danken.

Abschließend gilt ein besonderer Dank meiner Ehefrau Carolin, die mich auch in schwierigen Phasen der Doktorarbeit liebevoll unterstützt und bestärkt hat, und meiner Tochter Mila.