

Aus der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
Campus Benjamin Franklin

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Induktion regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katerina Georgieva Rasche, geb. Hadjiyska

aus Botevgrad, Bulgarien

Datum der Promotion: 06.03.2020

Inhaltsverzeichnis

Datum der Promotion:	1
Abkürzungen	1
Abstrakt	4
1. Einleitung	6
1.1 Morbus Crohn	6
Diagnostik und Bewertung des Krankheitsverlaufs	6
Immunaktivierung	8
Therapieoptionen	10
1.2 Regulatorische T-Zellen	12
Eigenschaften	12
Klassifizierung	14
Migration	16
1.3 Die Rolle von Treg bei Patienten mit Morbus Crohn	18
1.4 Treg in der Zelltherapie	19
1.5 Fragestellung	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Reagenzien, Lösungen und Kits	23
2.2. Standardpuffer, -lösungen und -medien	24
2.3. Geräte und Materialien	25
2.4. Antikörper	27
2.5. Zytokine	28
2.6. Probenmaterial	28
2.7. Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut	29
2.8. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	29

2.9. Durchflusszytometrie	30
Prinzip	30
Antikörpercocktails für Färbungen	30
Färbung von Oberflächenmolekülen	32
Färbung intrazellulärer Proteine	32
Durchflusszytometrische Auswertung	33
2.10. Magnetische Zellsortierung	33
Prinzip	33
Isolation von CD4+ CD25+ T-Zellen	33
Isolation von CD4+ CD45RA+ T-Zellen	36
2.11. Induktion des Forkhead Box Protein (FOXP)3 in CD4+ T-Zellen <i>in vitro</i> ..	38
2.12. Bestimmung der suppressorischen Kapazität definierter CD4+ T-Zellpopulationen	40
Prinzip	40
Vorbereitung von Stimulatorzellen	41
Gemischte Lymphozytenreaktion	41
2.13. Statistik	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Phänotyp peripherer Treg bei Patienten mit Morbus Crohn	43
3.1.1. Expression von CD127 und Forkhead-Box Protein (FOXP)3	43
3.1.2. Expression von CD49d	47
3.1.3. Aktivierte Treg (aTreg)	47
3.1.4. Ruhende Treg (rTreg)	50
3.1.5. CD4+CD25+ CD45RA- exprimierende Zellen ohne regulatorische Funktion	50
3.1.6. Expression des Chemokin Rezeptors 4 in den Untergruppen von Treg	51
3.2. Induktion von FOXP3 und Bestimmung der suppressorischen Funktion <i>in vitro</i>	

3.2.1. Konversion von CD4+ CD25-FOXP3- T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn	53
3.2.2. Stabilität der FOXP3-Expression	56
3.2.3. Konversion von naiven CD4+ CD45RA+ T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn	58
3.3. <i>In vitro</i> -Suppressionskapazität	61
3.3.1. Suppressionskapazität von CD4+ CD25-FOXP3- T-Zellen <i>in vitro</i>	61
3.3.2. Suppressionskapazität von TiTreg – generiert aus naiven CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen - <i>in vitro</i>	64
3.3.3. TiTreg exprimieren den Chemokin Rezeptor (CCR)4 und das Integrin β 7	68
4. Diskussion.....	71
4.1. Einführung	71
4.2. Identifikation von Treg anhand definierter Markermoleküle	72
4.3. <i>In vitro</i> konvertierte Treg können die T-Zell-Proliferation supprimieren	75
4.4. Induktion von FOXP3	87
4.5. Ti-Treg exprimieren CCR4 und β 7	89
4.6. Antigen-spezifische Treg	91
4.7 Treg: Ausblick für den klinischen Einsatz	93
5. Zusammenfassung.....	99
6. Literaturverzeichnis	101

Abkürzungen

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
6MP	6-Mercaptopurin
A. dest	destilliertes Wasser, <i>aqua destillata</i>
aMC	Patient mit aktivem Morbus Crohn
AP	Aktivator Protein, <i>activator protein</i>
APC	Allophycocyanin
BSA	Rinderserumalbumin; <i>bovine serum albumin</i>
CCL	Chemokin (C-C Motif) Ligand
CCR	Chemokin (C-C Motif) Rezeptor
CD	Unterscheidungsgruppe, <i>cluster of differentiation</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
cpm	Frequenzeinheit, <i>counts per minute</i>
CTLA	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen, <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein</i>
-Cy	-Cyanin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie; <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum; <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXP3	Forkhead-Box Protein 3
Foxp3	Forkhead-Box Protein 3, Maus
<i>FOXP3</i>	Forkhead-Box Gen 3, Mensch
<i>Foxp3</i>	Forkhead-Box Gen 3, Maus
FSC	Vorwärtsstreulicht
GIT	Gastrointestinaltrakt
GvHD	Graft-versus-Host Erkrankung
Gy	Gray
IFN	Interferon
IL	Interleukin

iMC	Patient mit inaktivem Morbus Crohn
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung; <i>magnetic-activated cell sorting</i>
MAdCAM	Integrin, <i>mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MALT	Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe, <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MC	Morbus Crohn
MDC	Chemokin, <i>macrophage-derived chemokine</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>major histocompatibility complex</i>
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion; <i>mixed lymphocyte reaction</i>
NFAT	Transkriptionsfaktor, <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
PBMC	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut; <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung; <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
RBCL	Erythrozyten-Lysepuffer; <i>red blood cell lysis buffer</i>
SMAD	Wachstumsfaktor, <i>similar to mother against decapentaplegic</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht
STAT	Transkriptionsfaktor, <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TARC	thymusaktivitätsreguliertes Chemokin, <i>thymus and activation regulated chemokine</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor, <i>T cell receptor</i>
TGF	transformierender Wachstumsfaktor; <i>transforming growth factor</i>
Th	T-Helfer-Zelle
TiTreg	TGF β -induzierte regulatorische T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle

TSDR	Treg-spezifisch demethylierte Region
VCAM	Adhäsionsmolekül, <i>vascular cell adhesion molecule</i>
VLA	Integrin, <i>very late antigen</i>

Abstrakt

Background: Deficient immunoregulation through CD4⁺CD25⁺ Forkhead-box protein(FOXP3)⁺ regulatory T-cells (Treg) can cause Crohn's disease. Therefore, Treg were phenotypically characterized. Establishing transforming growth factor (TGF) β induced Treg (TiTreg), effector T-cells can acquire FOXP3 expression in the presence of cytokine in vitro. Which progenitor T-cell subpopulation either naive or effector T-cells will generate TiTreg with regulatory function?

Methods: Using flow cytometric analysis, the expression of CD127, CD49d and CD45RA were investigated. Naive and effector T-cells isolated from peripheral blood mononuclear cells via magnetic cell sorting were treated with anti-CD3/CD28 and in the presence of TGF β and interleukin(IL)-2 in vitro. Suppressive capacity was assessed by mixed lymphocyte reactions.

Results: Patients with Crohn's disease had significantly more CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T-cells than healthy donors, independent of treatment with infliximab or disease activity. Patients with Crohn's disease had significantly more activated Treg and equal resting Treg in comparison to healthy donors. Naive and effector T-cells give rise to approx. 60% -80% CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-cells from both, healthy donors and patients with CD. Only FOXP3⁺ T-cells TiTreg converted from naive CD4⁺ T-cells suppressed mixed lymphocyte reactions and express CCR4, beta7.

Conclusions: The generation of TiTreg from naive T cells from patients was at least equally effective as from healthy donors. These cells express homing markers for potential migration to the inflammation.

Hintergrund: Ungenügende Immunregulation durch CD4+CD25+ Forkhead Box (FOX)P3+ regulatorische T-Zellen (Treg) kann Morbus Crohn verursachen. Treg wurden zunächst phänotypisch charakterisiert. Durch die Bildung von transformierten Wachstumsfaktor (TGF) β ; -induzierten Treg (TiTreg) kann FOXP3 in T-Zellen *in vitro* induziert werden. Welche Vorläufer-T-Zell-Subpopulation entweder naiv (CD4+CD25-CD45RA+) oder Effektor-T-Zellen (CD4+CD25-) erzeugt TiTreg mit regulatorischer Funktion?

Methoden: Mit durchflusszytometrischen Analysen wurde die Expression von CD127, CD49d und CD45RA untersucht. Naive und Effektor-T-Zellen, die aus peripheren mononukleären Blutzellen durch magnetische Zellsortierung isoliert wurden, wurden *in vitro* mit anti-CD3/CD28 und in Gegenwart von TGF β ; und Interleukin(IL)-2 behandelt. Die suppressive Kapazität wurde mit einer gemischte Lymphozytenreaktionen untersucht.

Ergebnisse: Patienten mit Morbus Crohn hatten signifikant mehr CD4+ CD25+ CD127- T-Zellen, unabhängig von der Behandlung mit Infliximab oder der Krankheitsaktivität. Patienten mit Morbus Crohn wiesen signifikant mehr aktivierte Treg und gleich viele ruhende Treg als Gesunde. Naive und Effektor T-Zellen ergeben ca. 60% -80% CD4+CD25+FOXP3+ T-Zellen. Nur FOXP3+ T-Zellen (TiTreg), die aus naiven CD4+ T-Zellen umgewandelt wurden, entwickeln suppressive Eigenschaften und exprimieren CCR4, beta7.

Schlussfolgerungen: Die Bildung von TiTreg aus naiven T-Zellen von Patienten ist möglich. Diese Zellen exprimieren Homing-Marker für eine mögliche Migration zu der Entzündung.

1. Einleitung

1.1 Morbus Crohn

Diagnostik und Bewertung des Krankheitsverlaufs

Morbus Crohn ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung (CED), die schubförmig verläuft und transmural alle Wandschichten des Intestinums erfassen kann [1]. Als histomorphologisches Charakteristikum der Entzündung können Epitheloidzellgranulome ausgebildet werden [2]. Die Inzidenz beträgt 4/100.000 Einwohner pro Jahr und die Prävalenz zwischen 30 - 50/100.000 Einwohner in Deutschland [3]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 15-34 Jahren [1]. Die Symptome sowie die extraintestinale Ausprägung sind sehr variabel. Dazu gehören kolikartige, abdominelle Schmerzen, meistens im rechten Unterbauch, chronische Diarrhö, Gewichtsverlust, Fieber und allgemeine Krankheitszeichen [4].

Mit der Montreal-Klassifikation wird die Erkrankung beschrieben und systematisiert (Tabelle 1) [5].

Tabelle 1: Montreal-Klassifikation des Morbus Crohn. Modifiziert nach Satsangi [5].

Parameter	Klassifikation	Merkmal
Alter bei Erstdiagnose	A1	<16 Jahre
	A2	17-40 Jahre
	A3	>40 Jahre
Lokalisation	L1	terminales Ileum
	L2	Kolon
	L3	Ileokolon
	L4	oberer und unterer Gastrointestinaltrakt
Verhalten (<i>behavior</i>)	B1	nicht strikturierend, nicht fistulierend
	B2	strikturierend
	B3	intern penetrierend
	B3p	perianal penetrierend
	B4	perianaler Befall

Zentrale Parameter, die auch für die Einschätzung des Krankheitsverlaufes und der Entscheidung für die Therapieform eine Rolle spielen, sind das Alter bei der

Erstdiagnose, die genaue Lokalisation entzündeter Bereiche und die mit *behavior* bezeichnete Beschreibung des Krankheitsverhaltens, also nur entzündlich oder strikturierend oder auch penetrierend mit Fisteln. Ein 30-jähriger Patient mit einem Befall des terminalen Ileums und nicht strikturierenden und nicht fistulierenden Verlauf würde als A2, L1, B1 klassifiziert werden.

Morbus Crohn ist häufig sowohl mit Komplikationen als auch mit extraintestinalen Manifestationen assoziiert. Komplikationen sind unter anderem die Entstehung eines mechanischen Ileus durch Stenosen oder Strikturen, Fisteln (enteroenterisch, -vesikal, -vaginal, -kutan und perianal), Fissuren, Abszesse, orale Aphten. Die häufigsten extraintestinalen Manifestationen sind Arthralgien, Erythema nodosum oder Pyoderma gangraenosum, Uveitis und Erkrankungen des hepatobiliären Systems wie z.B. die primär sklerosierende Cholangitis [6].

Neben den einordnenden Kriterien der Montreal-Klassifikation werden anhand der klinischen Symptome und des Befallsmusters Aktivitätsindizes gebildet, um das Ausmaß der Symptomatik im Verlauf der Erkrankung quantitativ bewerten zu können (Tabelle 2).

Tabelle 2: Harvey-Bradshaw-Score zur Beurteilung der Aktivität des Morbus Crohn.
Modifiziert nach Harvey und Bradshaw [7].

Klinische Parameter	Wert	Merkmale
Allgemeinbefinden	0	gut
	1	beeinträchtigt
	2	schlecht
	3	sehr schlecht
	4	unerträglich
Abdominelle Schmerzen	0	keine
	1	leicht
	2	mittel
	3	stark
Anzahl der flüssigen Stühle	1	pro Stuhlgang pro Tag
Abdominelle Resistenz	0	nein
	1	fraglich
	2	sicher

	3	sicher und schmerzhaft
Komplikationen*	Arthralgie, Uveitis, Erythema nodosum, orale Aphten, Pyoderma gangraenosum, Analfissur, neue Fistel, Abszess	
	Gesamtsumme <4 wird als Remission gewertet	

*Bewertung mit je einem Punkt

Der Harvey-Bradshaw-Score aus den 1980er Jahren bewerten fünf klinische Parameter separat hinsichtlich des Schweregrades ihrer Ausprägung, die anhand einer ausführlichen Anamnese erhoben werden. Ein Harvey-Bradshaw Score unter 4 Punkten wird als Remission gewertet.

Immunaktivierung

Genetische Prädisposition, Veränderung der intestinalen Mikrobiota und der intestinalen Barriere sowie bestimmte Umwelteinflüsse wie Wohnort und Nikotinabusus werden als Risikofaktoren für die Entstehung des Morbus Crohn diskutiert [8].

In Inzidenzstudien wird ein weltweites Nord-Süd- sowie Stadt-Land-Gefälle beobachtet [9]. Nach der Hygiene-Theorie tritt Morbus Crohn vor allem in Ländern mit einem hohen Sauberkeitsstandard auf [10]. Des Weiteren ist der Zusammenhang zwischen Tabakrauch und dem Ausbruch der Erkrankung gut untersucht [11].

Die intestinale Mikrobiota variiert in Abhängigkeit zeitlicher [12], individueller [13, 14], diätetischer [15] und medikamentöser Faktoren [16]. Studien des Mikrobioms bei Patienten mit Morbus Crohn zeigen eine Dysbiose mit reduzierter Diversität [17, 18].

Die intestinale Barriere bietet den ersten Schutz vor Pathogenen [19]. Der Mukusfilm ist bei Patienten mit Morbus Crohn nachweislich reduziert [20]. Zudem sind die Schlussleisten (*Tight Junctions*) zwischen den einzelnen Epithelzellen bei Patienten mit Morbus Crohn undicht [21]. Von Bedeutung ist auch eine gestörte Toleranz gegenüber der intestinalen Mikrobiota.

Genetische Faktoren wie bestimmte Mutationen im zytosolischen Rezeptor Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne (NOD)2 erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Morbus Crohn beim Menschen [22]. Der individuelle Krankheitsverlauf kann durch das Vorliegen von *NOD2*-Mutationen jedoch nicht prognostiziert werden. Da Morbus Crohn durch eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine charakterisiert ist, lag bisher die Vermutung nahe, dass eine genetische Mutation zu einer erhöhten Freisetzung dieser Zytokine führt. NOD2 ist als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr an der Erkennung bakterieller Bestandteile beteiligt [23]. Nach Stimulation von NOD2 wird über bestimmte Kinasen der NF-kappa-B-Signalweg aktiviert. Damit kommt es zu einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 und IL-12 [24,25]. Des Weiteren führen *NOD2*-Polymorphismen zu einer reduzierten Autophagie von invasiven Bakterien durch Makrophagen, was zu einer reduzierten Effektor-T-Zell-Antwort führt [26].

Morbus Crohn geht also mit einer Immundysbalance im Sinne einer übermäßigen Aktivierung der pro-inflammatorischen Komponenten und einer verringerten Aktivität gegensteuernder, anti-inflammatorischer Mechanismen einher [27, 28]. Neben dem angeborenen Immunsystem spielt auch das adaptive Immunsystem bei Morbus Crohn eine kritische Rolle [29, 30, 31]. Durch die Verwendung von spezifischen Mausmodellen untersuchte die Arbeitsgruppe um Bamias die Hypothese, dass der natürliche Verlauf der Ileitis durch mehrere immunologisch unterschiedliche Phasen charakterisiert werden kann und auch T-Helfer-Zell (Th)2-Immunreaktionen in der Erhaltungsphase der Ileitis wichtig sein können [32]. Der Beginn der Erkrankung geht mit einer erhöhten Produktion der Th1-Typ-Zytokine TNF- α und Interferon (IFN)- γ einher, gefolgt von einer chronischen Phase, die mit einer fortgesetzten, erhöhten Produktion von Th1-Zytokinen verbunden ist, aber auch ein erhöhtes Niveau der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 aufweist [32]. Jüngste Studien haben die Rolle der IL-12/IL-23 und IL-17 Blockade als neuartige Therapie für Patienten mit Morbus Crohn untersucht, was unter anderem zu der Zulassung des monoklonalen Antikörpers Ustekinumab für die Behandlung der Erkrankung führte [33].

Therapieoptionen

Eine kausale Therapie des Morbus Crohn ist bis heute nicht möglich. Die aktuellen Therapieoptionen zielen auf eine Verringerung der Entzündung im Darm, den Erhalt des Organes und somit eine Verbesserung der Lebensqualität ab. Alle heute eingesetzten Therapieformen sind mit systemischen Nebenwirkungen behaftet [34] (Tabelle 3).

Tabelle 3: Medikamentöse Therapie des Morbus Crohns in Abhängigkeit der Krankheitsaktivität. Modifiziert nach der S3 – Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohns“ von 2014.

Medikament	Krankheitsaktivität	Remissionserhaltung	Fistelabheilung
5-ASA*	leicht bis mäßig	k.A.**	k.A.**
Budesonid	leicht bis mäßig	nein	nein
Glukokortikoide	mäßig bis schwer	nein	k.A.**
Azathioprin/6-MP*	mäßig bis schwer	ja	ja
Methotrexat	mäßig bis schwer	ja	n.b.**
TNF*- α -Antikörper	mäßig bis schwer	ja	ja
Ustekinumab	mäßig bis schwer	ja	k.A.**
Vedolizumab	mäßig bis schwer	ja	k.A.**

*Abkürzungen: 5-ASA, 5-Aminosalicylsäure; 6-MP, 6-Mercaptopurin; TNF, Tumornekrosefaktor; **k.A., keine Aussage; n.b., nicht beobachtet

Eine leichte bis mäßige Krankheitsaktivität mit Ileozökalbefall kann mit dem Glukokortikoid Budesonid therapiert werden [35]. Vorteile sind die hohe topische Aktivität und die niedrige systemische Wirkung [36]. Bei stärkerer Krankheitsaktivität sind initial systemische Glukokortikoide wie Prednisolon wirkungsvoll [37, 38]. Die Steroidtherapie sollte jedoch aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen keine Dauertherapie darstellen. Bei steroidrefraktären Verläufen werden andere Arzneimittelgruppen wie die klassischen Immunsuppressiva Azathioprin sowie 6-Mercaptopurin (MP) aus der Gruppe der Purinanaloga, Methotrexat oder Antikörper

wie Infliximab, Ustekinumab, Vedolizumab [39, 40] verwendet. Das Ziel jeder Therapie ist die Remission. In wenigen Fällen kann in der Remission auf eine dauerhafte Medikation verzichtet werden [41]. Die weitere medikamentöse Therapie in der Remission ist abhängig vom Krankheitsverlauf [42]. Bei komplizierten Verläufen können Azathioprin oder 6-MP zur Remissionserhaltung eingesetzt werden [43, 44]. Wird unter dieser Therapie mit Purinanaloga kein Remissionserhalt erreicht, kann Methotrexat, ein Folsäure-Antagonist, eingesetzt werden. Bei einigen Patienten führte die Behandlung mit Präparaten, die das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α blocken – TNF- α -spezifische monoklonale Antikörper, z.B. Infliximab, Adalimumab oder Certolizumab-Pegol – zu einem Therapieerfolg [45, 46, 47]. Als Reservemedikamente stehen Vedolizumab und Ustekinumab zur Verfügung. Diese können eingesetzt werden, wenn Patienten auf die oben beschriebenen Medikamente nicht gut genug angesprochen haben oder diese aufgrund von Kontraindikationen nicht eingesetzt werden können [48, 49]. Vedolizumab ist der erste für Morbus Crohn zugelassene Migrationshemmer in Deutschland. Vedolizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch an das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin bindet. Integrine sind zelluläre Adhäsionstransmembranproteine, die die Passage über das Endothel in das Darmgewebe vermitteln [50]. Das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin vermittelt selektiv die Migration von T-Zellen in die intestinale Mukosa [51]. Damit wird die Infiltration von Lymphozyten in den Darm verhindert, was zu einer darmspezifischen Entzündungshemmung führt [52]. Ustekinumab ist gegen die Zytokine IL-12/IL-23 gerichtet.

Allen bisher verfügbaren medikamentösen Therapieformen ist gemeinsam, dass sie wegen ihrer systemischen Wirkung auf das Immunsystem mit verschiedenen Nebenwirkungen verbunden sind.

So setzt der Einsatz von Budesonid eine intakte Leberfunktion voraus und kann in höheren Dosen die gleichen Nebenwirkungen aufweisen wie systemische Steroide [35]. Die längere Einnahme von Steroiden erhöht das Infektions- [53] und Osteoporoserisiko [54] und kann zu Nebennierenrindenfunktionsstörungen mit Cushing-Syndrom führen [55].

Azathioprin und 6-MP können Übelkeit, Erbrechen sowie eine Pankreatitis verursachen [56]. Bei der Einnahme von Azathioprin kann es zu einer Leberwerterhöhung kommen [57]. Bei beiden Präparaten können schwere Leukopenien entstehen [58]. Zudem führt der Einsatz von Immunsuppressiva zu einer

erhöhten Infektneigung und kann zu einer Reaktivierung von Tuberkulose [59] oder Virus-Hepatitis [60] führen. Ein leicht erhöhtes Risiko für maligne Erkrankung wie Nicht-Melanom-Hautkrebs und Lymphome wird beschrieben [61].

Infliximab und Adalimumab können zu schweren allergischen Reaktionen und einer erhöhten Neigung zu viralen Infekten führen. Eine Kombinationstherapie von TNF- α -Antikörpern und Thiopurinen kann das Risiko für Lymphome zusätzlich erhöhen [62, 63, 61].

Vedolizumab zeigt in einem Beobachtungszeitraum von fünf Jahren bisher ein positives Sicherheitsprofil. Es gibt keine Hinweise für ein erhöhtes Risiko schwerer opportunistischer Infektionen und die Rate an malignen Erkrankungen ist vergleichbar mit der im restlichen Morbus Crohn Patientenkollektiv. Die am häufigsten aufgetretenen Nebenwirkungen waren im Allgemeinen mild und beinhalteten Nasopharyngitiden, Kopfschmerzen, Arthralgien und Übelkeit [64].

Ustekinumab ist mit Kopfschmerzen und leicht erhöhten Infektionsraten des Nasopharynx assoziiert [65, 66]

Der Zuwachs an Wissen auf dem Gebiet der Immunologie, insbesondere das Verständnis zu Grunde liegender zellulärer und molekularer Mechanismen, eröffnet auch die rationale Entwicklung neuartiger Therapieformen. Aktuell werden unter anderem Antikörper gegen weitere pro-inflammatorische Zytokine oder Adhäsionsmoleküle sowie Wachstumsfaktoren, koloniestimulierende Faktoren und Fusionsproteine auf ihre Wirksamkeit bei CED untersucht. Im Hinblick auf die gute Wirksamkeit von TNF- α -Antikörpern wurden weitere Strategien gegen pro-inflammatorische Zytokine untersucht. Während Infliximab und Adalimumab sich als effektiv bei Morbus Crohn erwiesen, hatten lösliche TNF- α -Rezeptor Antikörper wie Etanercept [67] und Onercept [68] keine Wirkung.

1.2 Regulatorische T-Zellen

Eigenschaften

Suppressierende T-Zellen wurden erstmals in den frühen 1980er Jahren beschrieben, sind aber, aufgrund der technischen Schwierigkeiten, diese Zelltypen genau zu erfassen, zunächst wissenschaftlich im Hintergrund geblieben [69]. Erst Mitte der

1990er Jahre wurden sie von Sakaguchi et al., die eine Population von *cluster of differentiation* (CD) 4+ T-Zellen beschrieben, welche CD25, die α -Kette des IL-2-Rezeptors stark exprimiert und regulatorische Eigenschaften besitzt, in den Fokus der Forschung zurückgeholt worden [70].

Regulatorische T-Zellen (Treg) stellen 4-10% der Gesamtfraktion der CD4+ T-Zellen im peripheren Blut dar und spielen eine zentrale Rolle für den Erhalt der immunologischen Homöostase im Darm und in der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen [71]. Treg erkennen durch ihren T-Zellrezeptor (TCR) bestimmte Peptidantigene, die an den Haupthistokompatibilitätskomplex, *major histocompatibility complex* (MHC)-II, gebunden sind [72]. Sie inhibieren autoreaktive Lymphozyten durch verschiedene Mechanismen, u.a. sezernieren sie die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 [73] und den transformierenden Wachstumsfaktors (TGF) β [74] oder vermitteln die Zytolyse durch die Expression von Granzymen und des zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen, *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen* (CTLA)4 [75, 76].

Ein wichtiger Marker für die Analyse von Treg ist die konstitutive Expression des intrazellulären Forkhead-Box Proteins (FOXP)3 [77, 78]. Die intrazelluläre Färbung für den Transkriptionsfaktor FOXP3 ist eine etablierte Methode Treg zu identifizieren [79]. Eine Anreicherung lebender Treg für Untersuchungen *in vivo* oder für therapeutische Zwecke ist über dieses Protein jedoch nicht möglich. Ein weiterer Nachteil ist, dass FOXP3 transient auch in aktivierten T-Zellen exprimiert werden kann [80] und somit eine stabile Treg-Population nicht hinreichend beschreibt [81]. Die *FOXP3*-Aktivierung führt zu einer Expression des Transkriptionsfaktors, *nuclear factor of activated T cells* (NFAT), der die Hochregulierung von CTLA4 und CD25 auslöst. Treg exprimieren auf der Zelloberfläche CD25, die α -Kette des IL-2-Rezeptors [82]. CD25 wird auch auf aktivierten T-Zellen exprimiert und ist nicht spezifisch für Treg [83]. Treg exprimieren jedoch mehr CD25 (CD25++) als T-Zellen [70] und können lokales IL-2 absorbieren und so dieses Wachstumszytokin anderen T-Zellen entziehen.

Moleküle wie das Adhäsionsmolekül α E/CD103 [84] und der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 83 [85] werden ebenfalls durch Treg exprimiert.

Der IL-7-Rezeptor befindet sich auf der Zelloberfläche von T-Zellen und besteht als Heterodimer aus zwei Proteinuntereinheiten: Interleukin-7-Rezeptor- α (CD127) und

Common-γ-Kettenrezeptor (CD132) [86]. Veränderungen des IL-7-Rezeptors spielen eine Rolle bei der Entstehung von Lymphomen [87] und rheumatoider Arthritis [88]. Studien im Menschen zeigen, dass Treg CD127, die α -Kette des IL-7-Rezeptors nicht exprimieren [89]. Diese CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ T-Zellen wurden bereits 2007 als suppressiv beschrieben, sowohl in einem entzündlichen Milieu wie auch bei gesunden Spendern [89, 90, 91]. Zwischen der Expression von CD127 (Teil der α -Kette des IL-7 Rezeptors) und der FOXP3-Expression besteht eine inverse Korrelation [92].

CD49d entspricht der α 4 Untereinheit des *very late antigen* (VLA)-4 Integrins. Der Komplex aus α 4 und β 1 wird als VLA-4 bezeichnet [93]. Das Integrin α 4 ist ein Zelladhäsionsmolekül und bildet mit dem β 1 und β 7 einen für das Adhäsionsmolekül *vascular cell adhesion molecule* ([94]. Das Integrin α 4 hat bereits als Ligand des Medikaments Natalizumab große Bedeutung in der Therapie der Multiplen Sklerose erhalten [95]. CD49d wird auf 80% der mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) exprimiert, nicht jedoch auf CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg [89, 90]. Durch die Abwesenheit von CD49d kann zwischen nicht suppressierenden, pro-inflammatorische Zytokine produzierenden CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen und Treg unterschieden werden [89]. Die CD127⁻ CD49d⁻ T-Zellen sind laut der Arbeitsgruppe von Kleinewietfeld suppressiv wirksam und nicht in der Lage pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren [89].

Klassifizierung

Treg, die als FOXP3⁺ CD25⁺⁺ CD4⁺ T-Zellen beschrieben sind, werden in zwei Gruppen, die natürlichen Treg (nTreg) und die induzierten Treg (iTreg), unterteilt [96].

Die nTreg werden im Thymus aus Lymphozytenvorläufern generiert und erkennen Autoantigene, die im Thymus exprimiert werden [97, 98]. Sie sind von der Expression des Autoimmunregulators oder AIRE genannten Transkriptionsfaktors abhängig und erkennen vor allem auto-reaktive Effektor-T-Zellen [99]. Die Bildung der nTreg ist unabhängig von TGF β und IL-2 [100, 101, 102]. Der Suppressionsmechanismus verläuft über Zell-Zell-Kontakt und über negatives Feedback durch das Molekül CTLA4 [103].

Im Gegensatz zu den nTreg entstehen iTreg in der Peripherie [104, 96] und befinden sich in den mesenterialen Lymphknoten und im darmassoziierten lymphatischen

Gewebe [105]. iTreg sind besonders an intestinalen Mukosaoberflächen vorherrschend, wo Toleranz gegen verschiedene Antigene der Mikrobiota notwendig ist [106]. Darüber hinaus enthält die aufgenommene Nahrung eine Fülle von Antigenen. Immunreaktionen gegen Nahrungsmittelbestandteile können aktiv unterdrückt werden [107]. Der Gastrointestinaltrakt ist das größte Reservoir für iTreg des Gewebes. Neuere Studien zeigen, dass Treg auch im viszeralen Fettgewebe stark angereichert sind [108]. Welches Mikromilieu die Entstehung von iTreg vermittelt, ist im Detail noch nicht bekannt. Sicher scheint aber zu sein, dass sie durch TGF β gesteuert wird [109]. Der T-Zellwachstumsfaktor IL-2 ist essentiell für die Proliferation der iTreg, da er die TGF β -induzierte Apoptose verhindert [110, 111]. iTreg erkennen Gewebs- und Fremdartigene [80] und supprimieren das Immunsystem durch die Bildung inhibitorischer Zytokine wie IL-10 und TGF β . Der Einfluss kommensaler Bakterien des Darms auf die Bildung von Treg wurde bei keimfreien Mäusen untersucht, die eine verringerte Anzahl an Treg im Vergleich zu normal kolonisierten Mäusen aufwiesen [112]. Dendritische Zellen in der Lamina propria sezernieren TGF β und tragen so *in vivo* zur Konversion von CD4⁺ T-Zellen zu iTreg bei [113]. Damit bietet der Darm ein Milieu für die Induktion von iTreg.

In vitro können CD4⁺ T-Zellen über Antikörper-vermittelte Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern in Gegenwart von TGF β zu iTreg konvertiert werden [80]. Mittels der Transkriptionsfaktoren *signal transducer and activator of transcription* (STAT)3 und NFAT aktiviert TGF β das *Foxp3*-Gen [114]. Blockiert man *in vitro* die Wirkung von TGF β , entsteht kein regulatorischer Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen [115]. Zur Abgrenzung von *in vivo* vorkommenden iTreg bezeichnet man diese Zellen daher TGF β -induzierte Treg (TiTreg) [116]. Werden solche TiTreg in Mausmodellen der Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) oder einer chronisch allergischen Lungenentzündung eingesetzt, so wirken sie ebenfalls als potente Inhibitoren der Wirkung von Effektor-T-Zellen *in vivo* [117, 118].

Es gibt wenige Hilfsmittel zur Differenzierung von nTreg und iTreg. Die meisten Moleküle, die eine erhöhte Expression auf Treg zeigen (zum Beispiel CD25, CTLA4) scheinen durch die *Foxp3*-Transkriptionsaktivierung beeinflusst zu sein und werden daher in ähnlicher Weise auf iTreg- und nTreg-Zellen exprimiert [119]. Einzig der Methylierungsstatus des *Foxp3*-Genortes erlaubt die Unterscheidung in nTreg- und iTreg-Subpopulationen. In nTreg ist ein definiertes Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-

Motiv im Exon 1 des *Foxp3*-Genlocus demethyliert, die so genannte Treg-spezifisch demethylierte Region (TSDR). Es gibt Hinweise, dass die TSDR bei TiTreg nur teilweise demethyliert ist [79] und dass FOXP3 in TiTreg nicht stabil exprimiert wird und die Expression nach Restimulation meist verloren geht [120].

Die exakte T-Zell-Ausgangspopulation für iTreg ist bis heute unklar. Hoffmann et al. postulieren, dass nur naive CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺ T-Zellen zu stabilen iTreg differenzieren [121, 109]. Andere Arbeitsgruppen beschreiben, dass auch unfraktionierte CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen *in vitro* [114, 122] und *in vivo* [101] zu Foxp3-exprimierenden Zellen konvertieren können. Zudem schlagen Miyara et al. eine Aufteilung der Treg in drei Subpopulationen vor, welche anhand der Expression von FOXP3 und CD45RA erfolgt:

CD25⁺⁺ CD45RA⁻ FOXP3⁺ aktivierte Gedächtnis-Treg (aTreg), CD25⁺ CD45RA⁺ FOXP3⁺ ruhende Treg (rTreg) und schließlich die CD25⁺ CD45RA⁻ FOXP3-exprimierenden Zellen ohne regulatorische Funktion, welche pro-inflammatorische Zytokine produzieren [71]. Das Verhältnis dieser Subpopulationen untereinander unterscheidet sich bei chronischen Erkrankungen [71].

Aufgrund ihrer suppressiven Eigenschaft sind Treg potentielle Angriffspunkte für eine Zelltherapie im Rahmen von chronischen Entzündungen wie der CED.

Migration

Die Migration von Lymphozyten aus dem Blutstrom in einen Inflammationsherd im Gewebe wird über Membranrezeptoren dirigiert. Besonders die Chemokin Rezeptoren, die zur Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren gehören, sowie Integrine sind hier entscheidend [123]. Treg aus dem Blut verlassen die Zirkulation, passieren zunächst die mesenterialen Lymphknoten und gelangen dann in die intestinale Mukosa [84]. In den mesenterialen Lymphknoten werden Treg aktiviert und beginnen spezifische Chemokin Rezeptoren für das Homing in die intestinale Mukosa zu exprimieren [124] wie z.B. Chemokin (C-C Motif) Rezeptor (CCR) 4 [125, 126]. Es gibt auch Hinweise dafür, dass nTreg zunächst das entzündete Gewebe durch die Chemokine CCR2, CCR4, CCR5 und die E- und P-Selektine erreichen und im Anschluss daran in die zugehörigen Lymphknoten durch die Chemokin Rezeptoren

CCR2, CCR5 und CCR7 einwandern [127]. Im Gegensatz dazu scheinen iTreg zuerst in die Lymphknoten einzuwandern und erst im zweiten Schritt den Ort der Entzündung zu erreichen [127]. Denkbar ist, dass iTreg erst in den Lymphknoten, mit Hilfe von dort ortsständigen dendritischen Zellen, in Gegenwart von Retinolsäure generiert werden [128] und erst danach Integrine exprimieren, welche die Einwanderung in die Mukosa ermöglichen [129]. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass Treg bereits vor dem Erreichen des Zielorgans IL-10 und TGF β produzieren und damit die Akkumulation und Proliferation von Effektor-T-Zellen in den Lymphknoten und den sekundär lymphatischen Organen verhindern [127].

Für den ursprünglich als konstitutiv im Thymus exprimiert beschriebenen Chemokin (C-C Motif) Ligand (CCL)17 und das aus Makrophagen stammende Chemokin CCL22 ist eine erhöhte Konzentration in der intestinalen Mukosa bei Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen [130, 131]. Beide Chemokine binden an den Rezeptor CCR4, der auf der Oberfläche von Treg vorliegt, und beeinflussen deren Migration. CCR4 wurde ursprünglich als ein Chemokin Rezeptor für das Homing in die Haut [132, 133] beschrieben. Mittlerweile ist seine Bedeutung für das Homing in den Darm durch viele Mausmodelle unbestritten [134, 135]. Die Liganden *thymus and activation regulated chemokine* (TARC) und *macrophage-derived chemokine* (MDC), werden von dendritischen Zellen in der Lamina propria produziert [135]. Daher sind in der gesunden Mukosa reichlich CCR4+ Treg zu finden [136]. Eine Gruppe von Integrinen, die die β 7-Untereinheit rekrutieren und mit dem *mucosal addressin cell adhesion molecule* (MAdCAM)1 in Epithelzellen des Darmes interagieren, beeinflussen die Wanderung der Lymphozyten in die Peyerschen Plaques und mesenterialen Lymphknoten [137]. In den ersten drei Lebensjahren vollziehen die Treg einen Tausch von einem naiven Treg-Phänotyp, der das Darm-Homing Integrin α 4 β 7 ausprägt, zu einem Gedächtnisphänotyp, der CCR4 exprimiert [138].

Für nTreg wird also angenommen, dass sie ähnliche Migrationsmoleküle wie Effektor-T-Zellen exprimieren, das heißt CCR7 und CD62L für das Homing in die sekundären lymphatischen Organe [139]. Im Gegensatz dazu sind iTreg selten in den sekundärlymphatischen Organen zu finden. iTreg haben ein höheres Repertoire an Darm-Homing-Chemokinen wie CCR9 und Integrin β 7 [137].

Die Expressionanalyse der Chemokin Rezeptoren CCR4 und der β 7-Untereinheiten von Integrinen auf Treg gestattet eine Aussage über das Potential dieser Zellen, z.B.

in die intestinale Mukosa einzuwandern und dort eine lokale Immunantwort zu beeinflussen [134, 137].

1.3 Die Rolle von Treg bei Patienten mit Morbus Crohn

Morbus Crohn betrifft die größte Oberfläche des Menschen, den Gastrointestinaltrakt (GIT). Im GIT spielt die Homöostase von Epithelzellen, *Tight Junctions*, Makrophagen, dendritischen Zellen und Lymphozyten für die Erhaltung der Immuntoleranz und der Kommunikation mit der Umwelt eine große Rolle [140]. So entwickeln Treg-depletierte Mäuse eine Autoimmungastritis, Thyreoiditis, Diabetes mellitus und chronische Entzündungen des GIT und werden als *scurfy*-Mäuse bezeichnet [141]. Eine Entsprechung findet dieses Maus-Modell im IPEX-Syndrom des Menschen (Immun Dysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-linked) [142]. Hierbei handelt es sich um eine tödlich verlaufende Erkrankung, die mit einer Mutation im *FOXP3*-Gen und einer Dysfunktion von Treg einhergeht [143]. Die Patienten entwickeln Autoantikörper und leiden an einer chronischen Enteritis, Diabetes mellitus und Thyreoiditis [144]. Eine weitere, häufigere Erkrankung, die mit einer chronischen Entzündung des GIT einhergeht, ist der in dieser Arbeit untersuchte Morbus Crohn. In entzündeten Darmläsionen vom Patienten mit Morbus Crohn sind erhöhte Spiegel an Th-assoziierten Zytokinen einschließlich IFN- γ , IL-12, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23 nachgewiesen [31]. Es ist jedoch unbekannt, ob das Übermaß an aktivierten Th1- und Th2-Zellen in Patienten mit Morbus Crohn das Ergebnis eines rein numerischen Mangels an FOXP3⁺ Treg, eines Funktionsfehlers, einer Resistenz von Effektor-T-Zellen zur Suppression oder einer Kombination dieser Möglichkeiten ist. Daran wird die Bedeutung von FOXP3⁺ Zellen im Rahmen von Immunerkrankungen deutlich. Der genaue Mechanismus für die Dysregulation der Treg bei Patienten mit Morbus Crohn ist nicht vollständig geklärt, es ist jedoch klar, dass es mehr sein muss als nur eine numerische Verminderung der Treg [145].

Zusammenfassend besitzen Treg vermutlich eine wichtige Funktion bei der Pathogenese des Morbus Crohn. Auf welche Weise und auf welchen Ebenen ihre anti-inflammatorische Wirkung gestört ist, ist bisher nicht klar.

1.4 Treg in der Zelltherapie

Treg könnten aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Wirkung eine mögliche Ergänzung zu den bisherigen medikamentösen Therapien darstellen. Generell sind zum Verständnis der Mechanismen beim therapeutischen Einsatz von Treg noch viele Fragen offen. Powrie et al. zeigten bereits 1993 in einem Mausmodell, dass der gleichzeitige Transfer von Treg, die nicht in nTreg und iTreg unterschieden wurden, mit Effektor-T-Zellen die Entstehung der Kolitis verhindert [146, 144]. Darüber hinaus konnten Mottet et al. nachweisen, dass der Transfer von Treg aus dem peripheren Blut vom Mäusen eine Kolitis sogar heilen kann [148].

Bisher ist sicher, dass eine Störung der Treg eine Rolle bei der Entstehung von Erkrankungen wie etwa CED, Diabetes mellitus Typ 1, GvHD und Rheumatoider Arthritis bei Menschen spielt [149, 150, 151]. In diesem Kontext stellt die Zelltherapie mit Treg zur Wiederherstellung der Balance eine hypothetische Therapieoption bei diesen Patienten dar. Erste zelltherapeutische Erfahrungen gibt es bereits aus der GvHD, einer starken akuten oder chronischen Immunreaktion nach allogener Stammzelltransplantation, bei der Spender-T-Zellen aus dem Transplantat gegen Organstrukturen des Empfängers reagieren [152, 153]. Die Symptome äußern sich häufig an Haut, Darm, Leber und Auge, wobei die Lebensqualität der Patienten erheblich eingeschränkt wird [154, 155]. Erste Phase-1- und Phase-2-Studien mit Transfer nTreg bei GvHD-Patienten zeigen, dass die Transfusion von nicht expandierten [156, 157] sowie expandierten [155] Treg bei Menschen sicher ist. Weitere Studien müssen nun die Wirksamkeit dieser nTreg in der Regulation der Effektor-T-Zellen unter Beweis stellen. Für eine erfolgreiche Zelltherapie muss zunächst die beste Treg-Ausgangsratio definiert werden. Es wird angenommen, dass Treg in einem Verhältnis von 1:1 zu den Effektor-T-Zellen bei der GvHD wirksam sind [158]. Es gibt auch eine Studie bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ 1, bei der *ex vivo* expandierte CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ Treg in Patienten infundiert wurden und deren sicherer Transfer gezeigt werden konnte [159].

Die Möglichkeit eines therapeutischen Einsatzes von Treg bei CED im Menschen wird aktuell noch diskutiert [160]. Die CED-Behandlungen, die auf Treg fokussiert sind, fallen in zwei Kategorien: zellbasierte Behandlungen, die den Transfer von *in vitro* expandierten oder stimulierten Treg in Patienten umfassen oder pharmakologische Ansätze, die versuchen, Treg *in vivo* zu beeinflussen.

Die Nutzung von nTreg in der Zelltherapie erfordert aufwendige Aufreinigungs- [92] und Expansionsprozesse [161], um die Reinheit der Zellfraktion zu gewährleisten. iTreg können *in vitro* in Gegenwart dendritischer Zellen, die definierte Antigene präsentieren oder über die simultane Stimulation von CD28 und CD3, aus der Gesamtpopulation peripherer CD4+ T-Zellen generiert werden [114, 162]. iTreg können *in vitro* aus CD4+ T-Zellen durch die Zugabe von TGF β generiert werden und werden dann als TiTreg bezeichnet [122, 147, 163, 110, 104]. Hinweise für unfraktionierte CD4+ CD25- Zellen, die im Mausmodell suppressive T-Zellen bilden, gibt es bereits [116]. Hoffmann et al. definierten, dass nur naive CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen stabile und suppressive TiTreg bilden [121]. Expandierte CD45RA+ Treg behalten einen epigenetisch stabilen *FOXP3*-Locus und konvertieren nicht in einen CD4+ *FOXP3*- Th-Phänotyp in der *in vitro*-Kultur [164]. Ein erster Versuch im Rahmen der CATS1-Studie im Menschen wurde mit Ovalbumin-spezifischen Treg durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Applikation dieser Zellen sicher ist [165].

1.5 Fragestellung

Patienten mit Morbus Crohn weisen eine Dysbalance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Komponenten des mukosalen Immunsystems auf. Es gibt Hinweise, dass bei Patienten mit Morbus Crohn die Frequenz der FOXP3+ T-Zellen im peripheren Blut erniedrigt ist [145]. Eine Zelltherapie mit Treg wäre damit eine mögliche neue therapeutische Option. Um eine Regeneration der betroffenen Darmabschnitte über die Treg-vermittelte Suppression von Effektor-T-Zellen zu erreichen, muss die Wirksamkeit einer Treg-Therapie in der lokalen Entzündung bei CED gezeigt werden. Neben der therapeutischen Wirksamkeit geht es dabei auch um den Nachweis der Migration transfundierter Zellen an den Ort der Entzündung, der Stabilität der suppressorischen Funktion der Treg und das Abschätzen der generellen Risiken einer Therapie mit autologen Zellen. Bevor diese Punkte für die CED in Angriff genommen werden können, muss zuerst geprüft werden, welche Ausgangspopulation von iTreg am effektivsten ist.

Mit dem Ziel geeignete TiTreg für einen therapeutischen Einsatz bei Patienten mit Morbus Crohn zu definieren, wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit folgende Fragen anhand von Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu gesunden Spendern untersucht:

1. Welche Oberflächenmarker sind für die Definition und Aufreinigung von vitalen Treg geeignet? Dazu werden die peripheren Treg, eine Mischpopulation aus nTreg und iTreg, bei gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn insbesondere mit Bezug auf die Moleküle CD127 und CD49 und deren Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität und der Medikation untersucht.
2. Welche Population peripherer CD4+-T-Zellen ist als Ausgangspopulation für die Generierung von TiTreg für die Zelltherapie des Morbus Crohn geeignet? Dazu wurden mögliche Vorläuferpopulationen anhand der Expression von CCR4, CD25 und CD45RA untersucht.
3. Unter welchen Bedingungen konvertieren periphere CD4+-T-Zellen *in vitro* zu TiTreg? Dazu wurde die Konversionskapazität dieser Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn untersucht und geprüft, ob man FOXP3+ Zellen genauso potent von Erkrankten wie von Gesunden generieren kann. Hierbei wurden die Stabilität der

FOXP3-Expression sowie die *in vitro*-Suppressionskapazität der TiTreg untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien, Lösungen und Kits

Soweit nicht anders angegeben, wurden folgende Reagenzien, Lösungen und Kits verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: In den Experimenten verwendete Reagenzien, Lösungen und Kits

[3H] -Methylthymidin, spezifische Aktivität 5.0 Ci/mmol	Amersham Buchler, Freiburg, Deutschland
Destilliertes Wasser (A. dest.); Ampuwa, endotoxinfrei, steril	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Erythrozyten-Lysepuffer (RBCL)	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ficoll-Lösung (Dichte: 1,1 g/ml); Biocoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fixations-/Permeabilisationspuffer (4fach konzentriert) mit Verdünnungslösung	eBioscience
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Grundmedium RPMI 1640; NaHCO ₃ -gepuffert, ohne L-Glutamin	Biochrom
Kit für Isolation naiver CD ⁴ + T-Zellen: Naive CD ⁴ + T Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, , Deutschland
Kit für Treg-Isolation: CD ⁴ +CD ²⁵ +CD ⁴⁵ RA+ Regulatory T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec
L-Glutaminlösung; 200 mM, steril	Biochrom
MACS* Puffer (PBS, 0,5 % BSA, EDTA 2 mM)	Miltenyi Biotec
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Reiss Laborbedarf, Mainz, Deutschland
Natrium-EDTA-Lösung, 5 mM	Reiss Laborbedarf
Penicillin/Streptomycin-Lösung, (105 U/ml) / (10 mg/ml), steril	Biochrom
Permeabilisationspuffer (10fach konzentriert)	eBioscience

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS; 1fach oder 10fach konzentriert)	PAA, Pasching, Österreich
Rattenserum	eBioscience
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Tryptanblaulösung, steril	Biochrom
Szintillationscocktail	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

*Abkürzungen: MACS Puffer, Puffer für magnetisch aktivierte Zellsortierung

2.2. Standardpuffer, -lösungen und -medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden folgende Standardpuffer, -lösungen und -medien verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammensetzung der in den Experimenten verwendeten Standardpuffer, -lösungen und -medien

PBS* (1fach)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KHPO ₄ pH 7,4
Natriumazidlösung	10 g Natriumazid ad 100 ml mit A. dest. *
BSA*-Lösung (4%)	2 g BSA ad 50 ml mit PBS
Puffer für die Durchflusszytometrie (FACS* Puffer)	480 ml PBS 2,5 ml Natriumazidlösung 12,5 ml BSA-Lösung 5 ml Natrium-EDTA*-Lösung
Verdünnungsmedium	450 ml Grundmedium RPMI1640 50 ml FCS
Kulturmedium:	440 ml Grundmedium RPMI1640 50 ml FCS* 5 ml L-Glutaminlösung 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung

*Abkürzungen: PBS, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung; A. dest., destilliertes Wasser; BSA, Rinderserumalbumin; FACS, Durchflusszytometrie, EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; FCS, fetales Kälberserum

2.3. Geräte und Materialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden folgende Geräte und Materialien für die Experimente und die Auswertung benutzt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Für die Auswertung und Experimente verwendeten Geräte und Materialien

4-Farben-Durchflusszytometer; FACS* Calibur mit CellQuest Software (Version 3.3)	Becton Dickinson, San Jose, USA
8-Farben-Durchflusszytometer; BD FACS Canto I mit FACS Diva Software (Version 6.0)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav; Varioklav 500E	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Begasungsbrutschrank; Heraeus 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Bestrahlungsanlage Gamma Cell 40	Atomic Energy, Mississauga, Kanada
Beriglobin	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
Calibrite - Beads für die Kompensation in der Durchflusszytometrie	BD Biosciences
Cell Harvester	Skatron, Lier, Norwegen
Elektrische Pipettierhilfe; Pipettboy	Integra Bioscience, Ruhberg, Deutschland
Entnahmeröhrchen für Vollblut mit 90 Einheiten Natrium-Heparin; Vacutainer	BD Biosciences
FACS-Röhrchen; 12x75 mm	BD Biosciences
Glasfaser-Filtermatte für Cell Harvester	Skatron, Lier, Norwegen
Inkubator; 400H4	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Biberach, Deutschland
Kühlzentrifuge; Biofuge fresco	Heraeus/Kendro, Hanau, Deutschland

Kühlzentrifuge; Megafuge 2.0R	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer; Ikamag RH	IKA, Staufen, Deutschland
Midi MACS: Midi MACS™ Separator mit LS-Säulen	Miltenyi Biotec
Mikrotiterplatte: 96-Loch, Rundboden, mit Deckel, steril	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mini MACS*: Mini MACS™ Separator mit MS-Säulen	Miltenyi Biotec
Mixer, Vortex Reax 2000	Heidolph, München, Deutschland
Mixer; Ultraturrax	IKA, Staufen, Deutschland
Multipipette mit Combitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Oberschalenwaage	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
pH-Meter; 766 Calimatic mit Einstab-Messelektrode	Knick, Berlin, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter, steril	Nerbe, Winsen/Luhe, Deutschland
Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom; Herasafe 1.8	Kendro
Software für die Auswertung von Daten aus der Durchflusszytometrie; FlowJo (Version 3.7.1 für Mac)	Treestar, San Carlos, USA
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr
Tiefkühlschrank -80°C	Forma Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbad	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim, Deutschland
Zellkulturschale: 48-Loch	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugenröhrchen 50 ml und 15 ml, Polypropylen; Falcon	BD Biosciences
β-Counter	LKB Wallace, Turku, Finnland

*Abkürzungen: FACS, Durchflusszytometrie, MACS, magnetisch aktivierte Zellsortierung

2.4. Antikörper

Alle für die Durchflusszytometrie und in Stimulationsexperimenten eingesetzten Antikörper waren spezifisch für humane Proteine (Tabelle 7).

Tabelle 7: In den Experimenten verwendete, unkonjugierte und direkt fluoreszenzmarkierte, monoklonale Antikörper.

Antigen*	Klon	Herkunft, Subtyp	Markierung*	Hersteller**
CCR*4	1G1	Maus IgG*1, κ	PE, PECy7	BD Pharmingen
CD*127	R34.34	Maus IgG1	PE	Beckmann Coulter
CD25	M-A251	Maus IgG1, κ	FITC, PE	BD Pharmingen
CD25	3G10	Maus IgG1	PE, APC	Miltenyi Biotec
CD28	CD28.2	Maus IgG1, κ	ohne	BD Biosciences
CD3	OKT3	Maus IgG2a	ohne	Janssen-Cilag
CD4	RM 4-5	Maus IgG1, κ	PerCP	BD Biosciences
CD4	M-T466	Maus IgG1	FITC, PE, APC, VioBlue	Miltenyi Biotec
CD45RA	5H9	Maus IgG2b, κ	PE, FITC	BD Biosciences
CD45RA	HI100	Maus IgG2b, κ	PerCP-Cy5.5	Biolegend
CD49d	MZ18-24A9	Maus IgG2b	FITC	Miltenyi Biotec
FOXP*3	PCH101	Ratte IgG2a, κ	PE, APC	eBioscience
Integrin β7	M293	Maus IgG2a, κ	PE	BD Pharmingen

*Abkürzungen: FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin; -Cy, -Cyanin; CD, Unterscheidungsgruppe; CCR, Chemokin Rezeptor; FOXP, Forkhead-Box Protein, IgG, Immunglobulin G

**Abkürzungen: BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland; Beckmann Coulter, Marseille, Frankreich; Biolegend, London, Großbritannien; CSL Behring, Hattersheim, Deutschland; eBioscience, Frankfurt, Deutschland; Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland

2.5. Zytokine

Humanes IL-2 und humanes TGF β wurden von der Firma eBioscience (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Beides waren rekombinante, in *Escherichia coli* produzierte Zytokine und wurden in PBS bei -80°C aufbewahrt.

2.6. Probenmaterial

Die Spender wurden über die Gastroenterologische Hochschulambulanz am Campus Benjamin Franklin der Charité - Universitätsmedizin Berlin rekrutiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: In die Studie eingeschlossene Spender.

Patienten mit Morbus Crohn (n=60)	
Lebensalter zum Zeitpunkt der Probeentnahme*: 39 Jahre (18-77)	
Erkrankungsdauer*: 8,5 Jahre (1-40)	
Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Probeentnahme**:	
Aktiver Schub (n=27)	
Lebensalter zum Zeitpunkt der Probeentnahme*: 32,5 Jahre (20-67) *	
weiblich: n=21, männlich: n=6	
unter anti-TNF- α -Therapie***: n=10	
Remission (n=33)	
Lebensalter zum Zeitpunkt der Probeentnahme*: 43 Jahre (18-77) weiblich: n=14, männlich: n=14	
unter anti-TNF- α -Therapie***: n=17	
Gesunde Spender (n=17)	
Alter zum Zeitpunkt der Probeentnahme*: 30,5 Jahre (24-80)	

*Median (Minimum-Maximum); **retrospektiv mit Hilfe der Patientenakten nach Harvey-Bradshaw-Score [7]; ***Infliximab (Remicade®; Janssen-Cilag)

Bei den Patienten mit Morbus Crohn wurde die Diagnose bei Vorstellung in der Ambulanz gesichert bzw. bestätigt; die Erkrankungsausprägung wurde mit Hilfe der Montreal-Klassifikation [5] definiert. Die Krankheitsaktivität wurde anhand des Harvey-Bradshaw-Scores bestimmt und eine aktive Erkrankung ab einem HBI-Score über 5 definiert [7]. Alle Spender wurden aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung, bevor ihnen 80 ml heparinisertes Vollblut entnommen wurde. Für die Studie lag ein Votum der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin vor (Antragsnummer EA4/025/07).

2.7. Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Die Isolation mononukleärer Zellen erfolgte nach einem etablierten Protokoll über eine Dichtegradientenzentrifugation mit hydrophilem Ficoll [166]. Während der Zentrifugation erfolgt die Auftrennung der Zellen entsprechend ihrer Dichte. Thrombozyten verbleiben im Blutplasma, Lymphozyten und Monozyten reichern sich als weiße Interphase zwischen dem gelblichen Plasma und der klaren Ficollschicht an. Die Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren und bilden einen Pellet am Boden des Zentrifugengefäßes [166].

Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Vollblut zu gleichen Teilen mit Verdünnungsmedium verdünnt und jeweils 35 ml verdünntes Vollblut vorsichtig so über 15 ml Ficoll-Lösung geschichtet, dass keine Verwirbelungen am Phasenübergang entstanden. Die Proben wurden 25 Minuten bei 400xg, Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert, die Zellen der Interphase entnommen und diese zweimal mit Verdünnungsmedium gewaschen. Dazu wurden sie 15 Minuten bei 200xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Abschließend wurden diese PBMC für die Färbung von Oberflächenmolekülen in 1 ml FACS Puffer oder für die weitere Aufreinigung definierter Zellpopulationen in 1 ml *magnetic-activated cell sorting* (MACS) Puffer resuspendiert.

2.8. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Trypanblaufärbung beruht auf der geringen Durchlässigkeit der Membran lebender Zellen, die ungefärbt bleiben, während sich das Zytoplasma toter Zellen blau anfärbt [167]. In einer Neubauer-Zählkammer errechnet sich das Zählvolumen aus der Fläche

eines Großquadrates, das sich jeweils in 4 x 4 Kleinquadrate aufteilt und 1 mm² überdeckt und dem Abstand zu dem Deckgläschen, der 0,1 mm beträgt. Zählt man vier Großquadrate aus, ergibt sich die Zellzahl/ml als (Zellzahl in vier Großquadraten/4) x 10⁴ x Verdünnungsfaktor. Für die Bestimmung von Zellzahl und Vitalität wurden 5 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblaulösung verdünnt. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen aus vier Großquadraten im Lichtmikroskop gezählt und bei der Berechnung ein Verdünnungsfaktor von ‚3‘ berücksichtigt. Der Verdünnungsfaktor berücksichtigt alle vorherigen Verdünnungsschritte, einschließlich der Färbung mit Trypanblau. Wurden die Zellen anschließend in der MACS oder der *in vitro*-Kultur verwendet, waren mindestens 95% der Zellen Trypanblau-negativ.

2.9. Durchflusszytometrie

Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen aus einer Suspension mit Hilfe eines Piezoelements in einem laminaren Flüssigkeitsstrom beschleunigt, so dass sie einzeln nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) hängt von der Größe einer Zelle ab, das Seitwärtsstreulicht (SSC) ist ein Anhaltspunkt für die Granularität der Zelle. So haben Granulozyten ein hohes SSC, weil sie viele Vesikel enthalten und T-Zellen ein niedriges SSC. Zur weiteren Charakterisierung von Zellpopulationen werden Antikörper, die gegen Proteine auf der Zelloberfläche oder in der Zelle gerichtet und mit Fluorochromen markiert sind, verwendet. Durch den Einsatz mehrerer Laser und Fluorochromen mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren können zeitgleich mehrere Epitope auf und in einer definierten Zelle erfasst werden. Hohe Flussraten erlauben eine Untersuchung hoher Zellzahlen innerhalb kurzer Zeit.

Antikörpercocktails für Färbungen

Für die Darstellung von Zellen im 4- bzw. 8-Farben-Durchflusszytometer wurden die in der Tabelle 9 zusammengefassten Antikörpercocktails mit den Zellen eingesetzt.

Tabelle 9: Antikörpercocktails für den Nachweis von Proteinen von der Zelloberfläche oder in den Zellen.

Ansatz	Antikörper (Verdünnung)
Oberfläche 1	CD25 FITC* CD45RA PE* CD4 PerCP*
Oberfläche 2	CD25 FITC CCR*4 PE CD4 PerCP
Oberfläche 3	CD25 FITC β7 PE CD4 PerCP
Oberfläche 4	CD49d FITC CD127 PE CD45RA PerCP-Cy5.5* CD25 APC* CCR4 PE-Cy7 CD4 VioBlue
Intrazellulär 1	FOXP3* APC und Beriglobin in Kombination mit Oberfläche 1, 2 oder 4
Treg nach MACS*	CD25 PE CD4 PerCP
Naive CD4+ T-Zellen nach MACS	CD25 FITC CD45RA PE CD4 PerCP
Treg nach Induktion	CD25 PE CD4 PerCP
Intrazellulär 2	FOXP3 APC und Beriglobin in Kombination mit Treg nach MACS und Naive CD4+ T-Zellen nach MACS

*Abkürzungen: FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin; -Cy, -Cyanin; CCR, Chemokin Rezeptor; FOXP, Forkhead-Box Protein; MACS, magnetisch aktivierte Zellsortierung

Färbung von Oberflächenmolekülen

In FACS-Puffer aufgenommene, frisch isolierte PBMC oder Zellen aus der *in vitro*-Kultur ($0,5 \times 10^5$ /Ansatz) wurden in einem FACS-Röhrchen mit einem Antikörpercocktail für Oberflächenmoleküle (vgl. Tabelle 9) für zehn Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und dazu jeweils für zehn Minuten bei 200xg und 4°C zentrifugiert. Wurden die Zellen unmittelbar nach dieser Färbung durchflusszytometrisch gemessen, wurde das Pellet der Zellen in 400 µL FACS-Puffer resuspendiert. Für eine anschließende Färbung intrazellulärer Proteine wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und vor der Färbung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Färbung intrazellulärer Proteine

Unmittelbar vor der Verwendung wurde aus dem vierfach konzentrierten Fixations-/Permeabilisationspuffer und der Verdünnungslösung eine entsprechende Fixations-Permeabilisationslösung hergestellt. Zusätzlich wurde aus dem zehnfach konzentrierten Permeabilisationspuffer und sterilem, destilliertem Wasser der Permeabilisationspuffer hergestellt. Die Zellen wurden nach der Oberflächenfärbung in PBS aufgenommen und zehn Minuten bei 200xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nun in Fixations-Permeabilisationslösung aufgenommen und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Dadurch wurden in der zunächst stabilisierten Zellmembran Poren erzeugt, die den Durchtritt der Antikörper für eine intrazelluläre Färbung ermöglichten. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisationspuffer gewaschen und dazu für zehn Minuten bei 200xg und 4°C zentrifugiert. Vor der FOXP3-Färbung wurden die Zellen mit der Rattenserumarbeitslösung für 15 Minuten bei 4°C inkubiert, diese verhindert eine unspezifische Bindung des Antikörpers. Danach wurde direkt der FOXP3-spezifische Antikörper dazugegeben und für 30 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert, anschließend erneut zweimal mit Permeabilisationspuffer gewaschen und in 400 µl FACS Puffer resuspendiert.

Durchflusszytometrische Auswertung

Vor jeder Messung wurde eine Kompensation durchgeführt, um eine Spektralüberlappung zu vermeiden. Die automatische Kompensation am 8-Farben-Durchflusszytometer erfolgte mit einzeln gefärbten Beads: Fluoreszenzkanal 1 = Fluoresceinisothiocyanat (FITC); Fluoreszenzkanal 2 = Phycoerythrin, PE; Fluoreszenzkanal 3 = Peridinin-Chlorophyll (PerCP); Fluoreszenzkanal 4 = Phycoerythrin-Cyanin, (PECy7); Fluoreszenzkanal 5 = Allophycocyanin (APC) und Fluoreszenzkanal 6 = Allophycocyanin-Cyanin, (APCCy7). Für die Kompensation im 4-Farben-Durchflusszytometer wurden mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbte PBMC wie folgt genutzt: Fluoreszenzkanal 1 = CD25 oder CD4 FITC; Fluoreszenzkanal 2 = CD25 oder CD4 PE; Fluoreszenzkanal 3 = CD4 PerCP und Fluoreszenzkanal 4 = CD4 APC.

Von den gefärbten Zellen wurden entsprechend der Färbung zwischen 1×10^5 und 1×10^6 Zellen erfasst. Unabhängig vom genutzten Gerät wurden alle FACS-Daten anschließend mit der FlowJo Software (FlowJo LLC, Ashland, Oregon) analysiert.

2.10. Magnetische Zellsortierung

Prinzip

Das Prinzip der MACS, also die magnetischen Aufreinigung von Zellen anhand definierter Oberflächenmerkmale, wurde erstmalig 1989 beschrieben [168]. Die Zellen werden mit 50 nm großen paramagnetischen MicroBeads beladen, die an einen Antikörper konjugiert und enzymatisch degradierbar sind, um nachfolgende Versuche nicht zu beeinflussen. Beim Passieren einer Säule innerhalb eines Magnetfeldes werden die Antikörper-beladenen Zellen zurückgehalten (positive Selektion). Nach dem Herausnehmen der Säulen aus dem Magneten können die Zellen herausgespült werden. Sind die unmarkierten Zellen, die die Säule ungehindert passiert haben die Zielpopulation, wird dieses Verfahren negative Selektion genannt.

Isolation von CD4+ CD25+ T-Zellen

Treg wurden entsprechend der Vorgaben des Herstellers des Isolationskits in zwei Schritten unter sterilen Bedingungen isoliert. Alle Schritte erfolgten bei 4°C und es

wurden sterile, auf 4°C vorgekühlte Puffer und Materialien verwendet. Soweit möglich, wurde in Dunkelheit gearbeitet. Der erste Schritt war eine negative Selektion aller CD4⁺ Zellen. Frisch isolierte PBMC (1×10^7) in 90 µl MACS Puffer wurden mit 10 µl Antikörpercocktail und 2 µl Beriglobin inkubiert, der biotinylierte monoklonale Antikörper gegen humanes CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, CD235a und den γ/δ - T-Zellrezeptor (TCR γ/δ) enthielt. Nach fünf Minuten im Kühlschrank bei 4-8°C wurden 20 µL anti-Biotin-MicroBeads dazugegeben, sorgfältig resuspendiert und die Suspension weitere zehn Minuten im Kühlschrank inkubiert. Das Volumen wurde mit MACS Puffer auf 500 µl aufgefüllt und die Suspension direkt auf eine in einem Magneten hängende LS-Säule pipettiert, die mit 3 ml MACS Puffer vorgespült war. Die Antikörper-beladenen B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen, dendritische Zellen und Erythrozyten-Vorläufer verblieben auf der Säule, die zweimal mit jeweils 3 ml MACS Puffer gespült wurde. Der komplette Durchlauf enthielt alle CD4⁺ Zellen.

Im zweiten Schritt wurden die Treg als CD4⁺ CD25⁺ Zellen positiv selektiert. Dazu wurde der Durchlauf der ersten Säule zehn Minuten bei 200xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 90 µL MACS Puffer aufgenommen, 10 µl CD25-Beads dazu gegeben und 15 Minuten bei 4°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden zwei MS-Säulen mit jeweils 1 ml MACS Puffer gespült. Das Volumen der Zellsuspension wurde mit MACS Puffer auf 500 µl aufgefüllt und die Zellen auf eine der MS-Säulen aufgetragen. Nach dem vollständigen Einlaufen der Suspension wurde die Säule dreimal mit jeweils 1 ml MACS Puffer gespült. Alle Durchläufe wurden in einem Röhrchen gesammelt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Die Säule wurde aus dem Magneten genommen. Mit 1 ml MACS Puffer und dem Kolben wurden die nun positiv selektierten CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen aus der einen Säule direkt auf die zweite vorbereitete MS-Säule gespült. Diese Säule wurde, wie die erste, gespült, die Zellen eluiert und die Durchläufe der Negativfraktion gesammelt. Aus der finalen CD4⁺ CD25⁺ Fraktion wurden 1×10^4 Zellen mit dem Antikörpercocktail „Treg nach MACS“ (vgl. Tabelle 9) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Alle für die nachfolgenden in vitro-Versuche verwandten Präparationen enthielten mindestens 30% CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen (Abbildung 1).

Zusätzlich zum Standardprotokoll wurden auch die CD4⁺ CD25⁺-Zellen aus den gesammelten Negativfraktionen genutzt. Dazu wurden alle Durchläufe der beiden MS-

Säulen (7 ml) zehn Minuten bei 200xg und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 90 µl MACS Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 µl CD25-Beads wurden die Ansätze 15 Minuten bei 4°C inkubiert, das Volumen wieder mit MACS Puffer auf 500 µl aufgefüllt und die Zellsuspension über eine neue, mit 1 ml MACS Puffer gespülte MS-Säule gegeben. Der Durchlauf und die Zellen der drei Waschschriffe wurden in den *in vitro*-Experimenten genutzt. Zur Kontrolle der Reinheit wurden 1×10^5 Zellen mit dem Antikörpercocktail „Treg nach MACS“ (vgl. Tabelle 9) gefärbt. Die durchflusszytometrische Auswertung ergab einen Mindestanteil von 90% CD4+ CD25- T-Zellen (Abbildung 1).

Um den MACS Puffer auszutauschen, wurden alle Zellsuspensionen für zehn Minuten bei 200xg und 4°C zentrifugiert und die Pellets in Kulturmedium aufgenommen.

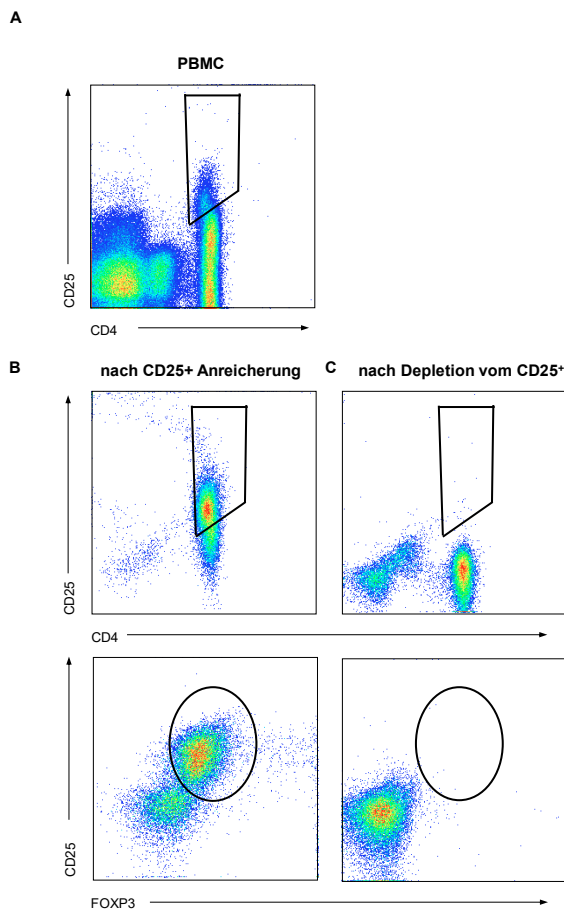


Abbildung 1: Reinheit von CD4⁺ CD25⁺ und CD4⁺ CD25⁻ Zellpopulationen nach Anreicherung durch magnetisch aktivierte Zellsortierung. **A.** Aus frisch isolierten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurden durch ein Zwei-Schritt-Verfahren mit **B.** Depletion aller CD4⁻ Zellpopulationen und anschließender zweifacher positiver Selektion von CD25⁺ Zellen aus der CD4⁺ Fraktion des ersten Schrittes Treg angereichert. **C.** Aus der Negativfraktion wurden nochmals CD25⁺ Zellen depletiert. Für die Kontrolle der Reinheit wurden die Zellen mit anti-CD4 PerCP, anti-CD25 PE und anti-Forkhead-Box Protein (FOXP)3 APC gefärbt und durchflusszytometrisch dargestellt. Die Dot Plots sind repräsentativ für 25 Isolationen. *Abkürzungen: PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

Isolation von CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen

Naive T-Zellen wurden über die Expression von CD4 und CD45RA durch MACS nach der Vorschrift des Herstellers isoliert. Wie auch bei den Treg wurden alle Schritte bei 4°C und mit sterilen, vorgekühlten Puffer und Materialien sowie, wenn möglich,

abgedunkelt durchgeführt. PBMC (1×10^7) in einem Volumen von 38 μl wurden mit 2 μl Beriglobin und 10 μl Cocktail biotinylierte Antikörper spezifisch für humanes CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD45RO, CD56, CD123, CD235a, HLA-DR und TCR γ/δ für zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 60 μl MACS Puffer und 20 μl Antikörpercocktail aus anti-Biotin-MicroBeads und anti-CD61 MicroBeads sowie 20 μl CD25MicroBeads hinzugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden die Zellen einmal mit 50 ml MACS Puffer gewaschen. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 500 μl MACS Puffer resuspendiert und auf eine mit 3 ml MACS Puffer äquilibrierte LS-Säule gegeben. Die Antikörper-beladenen Zellen waren an die Säule gebunden. Im Durchlauf der Zellsuspension und nach dreimaligem Spülen mit jeweils 3 ml MACS Puffer wurden die naiven CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen gesammelt. Auch diese Zellen wurden nach dem letzten Waschen mit MACS Puffer in Kulturmedium aufgenommen.

Die Reinheit der Präparation wurde durchflusszytometrisch nach der Färbung von 1×10^4 Zellen mit dem Antikörpercocktail „Naive CD4⁺ T-Zellen nach MACS“ (vgl. Tabelle 9) bestimmt und der Anteil an CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen lag typischerweise über 90% (Abbildung 2).

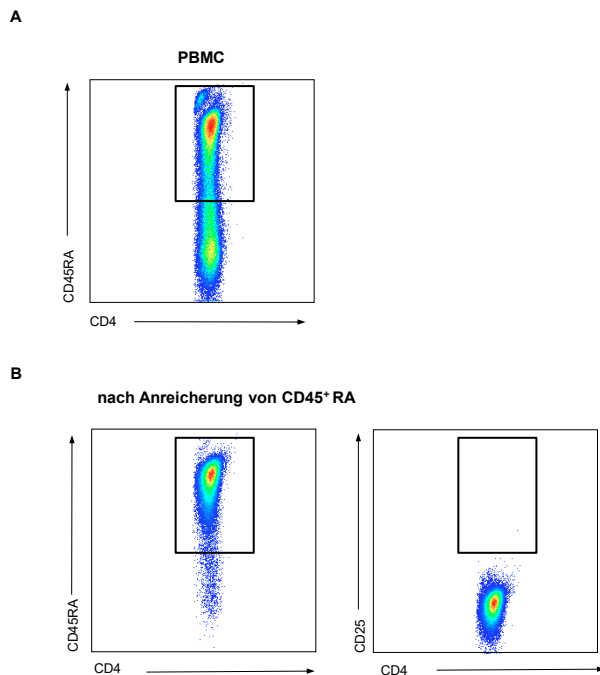


Abbildung 2: Reinheit von CD4⁺ CD45RA⁺ Zellpopulationen nach Depletion anderer Zellen durch magnetisch aktivierte Zellsortierung. **A.** Aus mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurden durch Depletion aller anderen Zellpopulationen die naiven CD4⁺ T-Zellen über CD4 und CD45RA angereichert. **B.** Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen vor der magnetisch aktivierten Zellsortierung und nach der Anreicherung mit anti-CD4 PerCP, anti-CD25 FITC, anti-CD45RA PE und anti-FOXP3 APC gefärbt. Die Dot Plots sind repräsentativ für 18 Versuche. *Abkürzungen: FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

2.11. Induktion des Forkhead Box Protein (FOXP3) in CD4⁺ T-Zellen *in vitro*

Eine Vernetzung mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 auf der Zelloberfläche als Teile des TCR-Komplexes führt zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, die sich in einer Steigerung der Proliferation äußert [169]. *In vitro* kann in Gegenwart von Wachstumsfaktoren wie TGF β und IL-2 die Expression von CD25 und von FOXP3 hoch reguliert werden, die dann einen regulatorischen Phänotyp beschreiben [114].

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt. Die Zellkultur erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 6% in einem CO₂/Luft-Gemisch. In jedes Loch der

48-Loch-Zellkulturplatten wurde 1 ml Antikörperlösung mit 10 µg/ml anti-CD3 (Klon OKT3) in PBS pipettiert und die Platte für vier Stunden im Brutschrank inkubiert (Immobilisierung des Antikörpers an den Boden der Zellkulturplatte). Die Antikörperlösung wurde abgenommen und jedes Loch zweimal mit jeweils 2 ml Kulturmedium gespült, bevor 1×10^5 frisch präparierte CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen oder naive CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺ T-Zellen in 1 ml Kulturmedium transferiert wurden. Das Medium enthielt zusätzlich 2 µg/ml anti-CD28 (Klon CD28.2), und/oder 5 ng/ml TGFβ und/oder 50 U/ml IL-2. Es wurden vier Ansätze mit je acht Löchern pro Ansatz ausgefüllt. Im ersten Ansatz wurden die Zellen ohne Zugabe von Antikörpern nur mit Medium inkubiert, im zweiten mit plattengebundenen anti-CD3 und anti-CD28, im dritten mit Zugabe von TGFβ und im vierten mit TGFβ und IL-2.

Nach fünf Tagen Inkubation wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop begutachtet und ausgezählt. Alle Zellen aus allen Löchern wurden in ein FACS-Röhrchen transferiert mit 2 ml FACS-Puffer aufgefüllt und zehn Minuten bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Das im Restvolumen nach dem Dekantieren resuspendierte Pellet wurde mit den Antikörpergemischen „Oberfläche Treg“ (vgl. Tabelle 9) nach Induktion in Kombination mit der intrazellulären Färbung für FOXP3 gefärbt. Im Durchflusszytometer wurden jeweils 2×10^5 Ereignisse aufgenommen und entsprechend des Expressionsniveaus von FOXP3 ausgewertet (Abbildung 3). Die CD4⁺ T-Zellen wurden anhand ihrer Lichtstreuung eingegrenzt. Bei vergleichbar hoher Expression von CD25 wurde die Subpopulation, die FOXP3, stark exprimiert (FOXP3^{high}) als die eigentlichen TiTreg definiert [71]. Die CD4⁺ CD25⁺ FOXP3^{low} T-Zellen wurden als Zellen betrachtet, die FOXP3 transient exprimieren [71]. Für die Analyse wurden die FOXP3^{high} und FOXP3^{low} Subpopulationen als FOXP3⁺ zusammengefasst. Um als TiTreg in weiteren Experimenten eingesetzt zu werden, war der Anteil der FOXP3⁺ Zellen an der CD4⁺ T-Zellfraktion $\geq 40\%$.

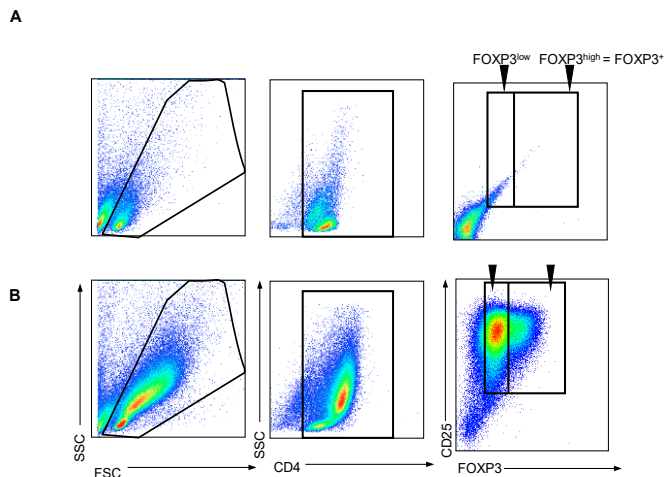


Abbildung 3: Definition von regulatorischen T-Zellen (Treg) aus *in vitro*-Kulturen über die Expression von Forkhead-Box Protein (FOXP)3. CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen wurden **A.** ohne Zugabe von Antikörpern und **B.** in Gegenwart von immobilisiertem anti-CD3 (1,5µl), gelöstem anti-CD28 (2 µl/ml) transformierendem Wachstumsfaktor (TGF)β (5 ng/ml) und Interleukin (IL)-2 (150 U/ml) fünf Tage inkubiert, anschließend mit anti-CD4 PerCP, anti-CD25 PE und anti-Forkhead-Box-Protein (FOXP)3 APC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentative Dot Plots zeigen die peripheren Blut- T-Zellen in Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) sowie die Definition der CD4⁺ T-Zellen und verschiedene Expressionshöhen von Forkhead-Box Protein (FOXP)3 innerhalb der CD25⁺ CD4⁺ T-Zellpopulation **A.** vor Zellkulturbedingungen und **B.** danach. Die Quadrate zeigen die Stimulierten FOXP3⁺ Zellen und deren Aufteilung in die Untergruppen FOXP3^{low}, FOXP3^{high} sowie deren Summe als Forkhead-Box Protein (FOXP)3⁺. *Abkürzungen: FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

2.12. Bestimmung der suppressorischen Kapazität definierter CD4⁺ T-Zellpopulationen

Prinzip

Die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) – *in vitro*-Kulturen mit Lymphozyten zweier Spender, bei denen die Lymphozyten eines Spenders inaktiviert sind (Stimulator) – ist eine klassische Methode, um die Proliferation von Lymphozyten (Effektorzellen) als Reaktion auf Alloantigene zu bestimmen [170]. Der Einbau radioaktiv-markierten Thymidins in die neu synthetisierte Desoxyribonukleinsäure (DNS) wird als

proportional zur Zellteilung angenommen und stellt damit einen Marker der Proliferation bei der vitalen Lymphozytenreaktion dar [171]. Gibt man zu einer MLR eine dritte, selbst nicht proliferierende Zellpopulation dazu, kann über eine Veränderung der DNS-Neusynthese die suppressorische Kapazität dieser dritten zellulären Komponente ermittelt werden.

Vorbereitung von Stimulatorzellen

Isolierte PBMC (1×10^6) wurden in die Kammer des Bestrahlungsgerätes eingestellt und die Zellsuspension für fünf Minuten mit 5 Gray (Gy) bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, gezählt und eingefroren. Zur Kontrolle des Erfolgs der Inaktivierung wurde in der nachfolgenden MLR jeweils eine Kultur ausschließlich mit Stimulatorzellen angesetzt. Die Zellen galten als vollständig inaktiviert, wenn nach der Kultur der Thymidineinbau ≤ 150 Zerfälle/Minute (cpm) war.

Gemischte Lymphozytenreaktion

Wie oben bereits beschrieben, wurden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In jedes Loch einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurden $0,5 \times 10^5$ CD4+ CD25- T-Zellen als Effektorzellen und $0,5 \times 10^5$ bestrahlte PBMC eines anderen Spenders als Stimulatorzellen kultiviert. Dazu wurden frisch isolierte CD4+ CD25+ Treg bzw. konvertierte TiTreg so dazu gegeben, dass sie in Verhältnissen von 1:1, 1:10 und 1:100 zu den CD4+ CD25- Effektorzellen vorlagen. In allen Löchern betrug das Kulturvolumen 200 μ l. Die MLR wurden insgesamt für fünf Tage in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 6% inkubiert. In den letzten 18 Stunden wurde in jedes Loch 1 μ Ci [3H] –Thymidin in einem Volumen von 15 μ l zugesetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturen entweder direkt geerntet oder zum Stopp des [3H] –Thymidineinbaus bei -20°C tiefgefroren.

Alle Kulturen wurden mit einem *cell harvester* direkt auf einem Glasfaserfilter gesammelt. Der Filter wurde in der Mikrowelle bei 180 W für zehn Minuten getrocknet, bevor er mit 15 ml Szintillationscocktail komplett benetzt wurde. Die Filter wurden in einen β -Counter (LKB Wallace, Turku, Finnland) eingestellt und die radioaktiven Zerfälle auf jedem Filterbereich, der einer Mikrokultur entsprach, gemessen. Der Thymidineinbau wurde in cpm registriert.

Das suppressorische Potential von Zellen wurde im Vergleich zur Kontroll-MLR aus CD4+ CD25- T-Zellen und allogenen Stimulatorzellen bestimmt. Diese maximale DNS-Neusynthese wurde als 100% gewertet. Der Proliferationsindex zeigt die prozentuale Suppression im Vergleich dazu an. Ansätze mit 1×10^5 Stimulator- oder 1×10^5 Effektorzellen allein und 1×10^5 Stimulatorzellen mit 1×10^5 Zellen aus den potentiellen Treg-Populationen in Kulturmedium dienten als Negativkontrollen. Das Limit für die Kulturbedingungen wurde in Kulturen von 1×10^5 Stimulatorzellen und 2×10^5 Effektorzellen bestimmt.

2.13. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm Prism (Version 5 für Mac; GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt. Kontinuierliche Parameter wurden als Median und Spannweite (minimaler - maximaler Wert) dargestellt. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde von der Abwesenheit einer Normalverteilung ausgegangen und der nichtparametrische Mann-Whitney U-Test für Gruppenvergleiche verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Phänotyp peripherer Treg bei Patienten mit Morbus Crohn

3.1.1. Expression von CD127 und Forkhead-Box Protein (FOXP3)

Treg werden durch die konstitutive Expression von FOXP3 [77] charakterisiert. Dafür ist eine intrazelluläre Färbung für den Transkriptionsfaktor FOXP3 nötig. Dies verhindert aktuell die Anreicherung lebender Treg für *in vivo*-Experimente oder therapeutische Zwecke über diesen Marker. Es wurden Oberflächenmoleküle beschrieben, wie zum Beispiel CD127, die α -Kette des IL-7-Rezeptors, die auf Treg antiproportional zu FOXP3 exprimiert werden. Daher wurde CD127 bei Patienten mit Morbus Crohn in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität (bestimmt mittels Harvey-Bradshaw-Score) und der Medikation mit Infliximab untersucht.

Die Expression von CD127 in peripheren CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn wurde durch durchflusszytometrische Analysen bestimmt. Treg wurden als CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ T-Zellen definiert. In ersten Voruntersuchungen wurde sichergestellt, dass CD127 ähnlich stark wie FOXP3 auf T-Zellen exprimiert wird (Abbildung 4). Die prozentuale Verteilung von FOXP3 und CD127 innerhalb der CD4⁺ Lymphozytensubpopulation ist in Tabelle 10 für fünf individuelle Patienten zusammengefasst. Patienten mit Morbus Crohn hatten signifikant mehr CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ T-Zellen als gesunde Spender im peripheren Blut (Morbus Crohn: 5,9% (3,1-12%); gesunde Spender: 4,3% (3,04-6,3%); p=0,0178) (Abbildung 5A). Verglichen mit Patienten mit einer akuten Erkrankung war dieser Unterschied sogar noch deutlicher (aktiver Morbus Crohn: 6,48% (4,8-12%); gesunde Spender: 4,3% (3,04-6,3%); p=0,0192). Subgruppenvergleiche zwischen Patienten mit aktivem versus nicht aktivem Morbus Crohn ergaben keinen signifikanten Unterschied. Die Therapie mit Infliximab und die Aktivität der Erkrankung führten zu keinen Unterschieden in diesen Verhältnissen (Abbildung 5 B, C)

Zusammengefasst hatten Patienten mit Morbus Crohn einen höheren Anteil an CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ Treg im peripheren Blut als gesunde Spender.

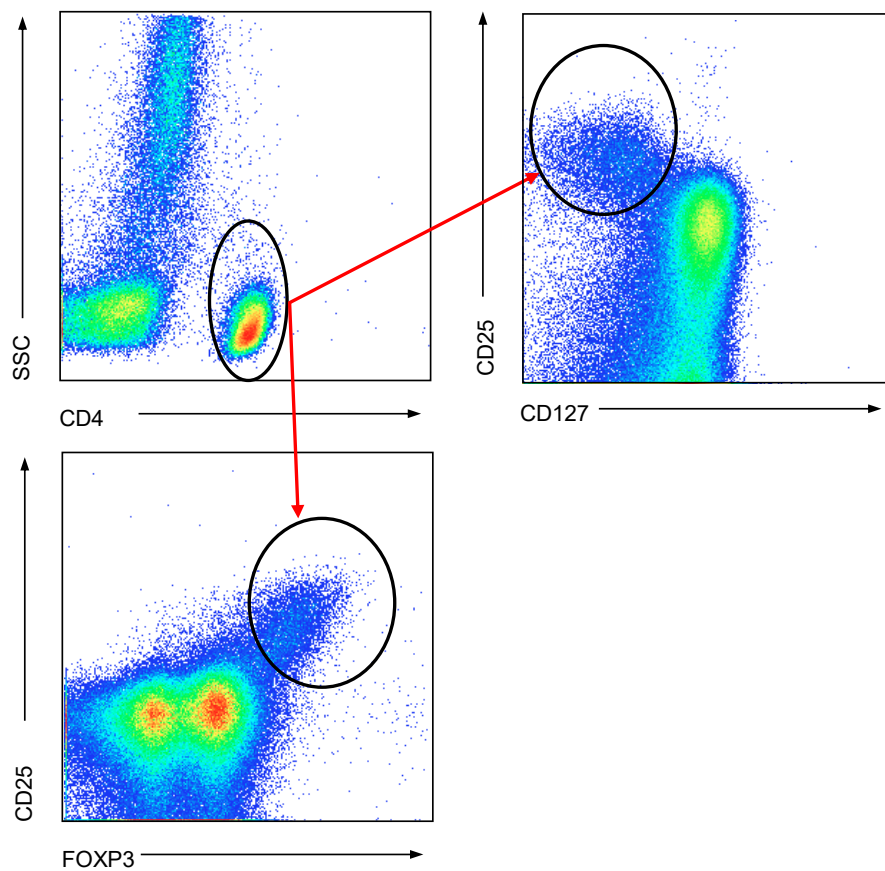


Abbildung 4: Korrelation der Expression von Forkhead-Box Protein (FOXP)3 und CD127. Frisch isolierte mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut desselben Patienten wurden einerseits mit anti-CD4 PerCP, anti-CD25 APC und anti-CD127 PE oder andererseits mit anti-CD4 PerCP, anti-CD25 APC und anti-FOXP3 PE gefärbt. Die Bindung der Antikörper an die Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert. Ein repräsentatives Dot Plot aus 5 Ansätzen von Patienten mit Morbus Crohn zeigt die peripheren Blutzellen im Seitwärtsstreulicht (SSC) und die Definition der CD4+ T-Zellen sowie die verschiedenen Expressionshöhen von Forkhead-Box Protein (FOXP)3 und CD127. *Abkürzungen: PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

Tabelle 10: Vergleich der Expression von CD127 und Forkhead-Box Protein (FOXP)3.

Proband	CD25+ CD127- Zellen (% CD4+ Zellen)	CD25+ FOXP3+ Zellen (% CD4+ Zellen)
Proband 1	3,37	3,40
Proband 2	4,27	3,97
Proband 3	9,01	7,70
Proband 4	4,61	4,19
Proband 5	4,72	3,67
Median (Minimum- Maximum)	4,61 (3,3-9,01)	3,97 (3,40-7,70)

p=ns

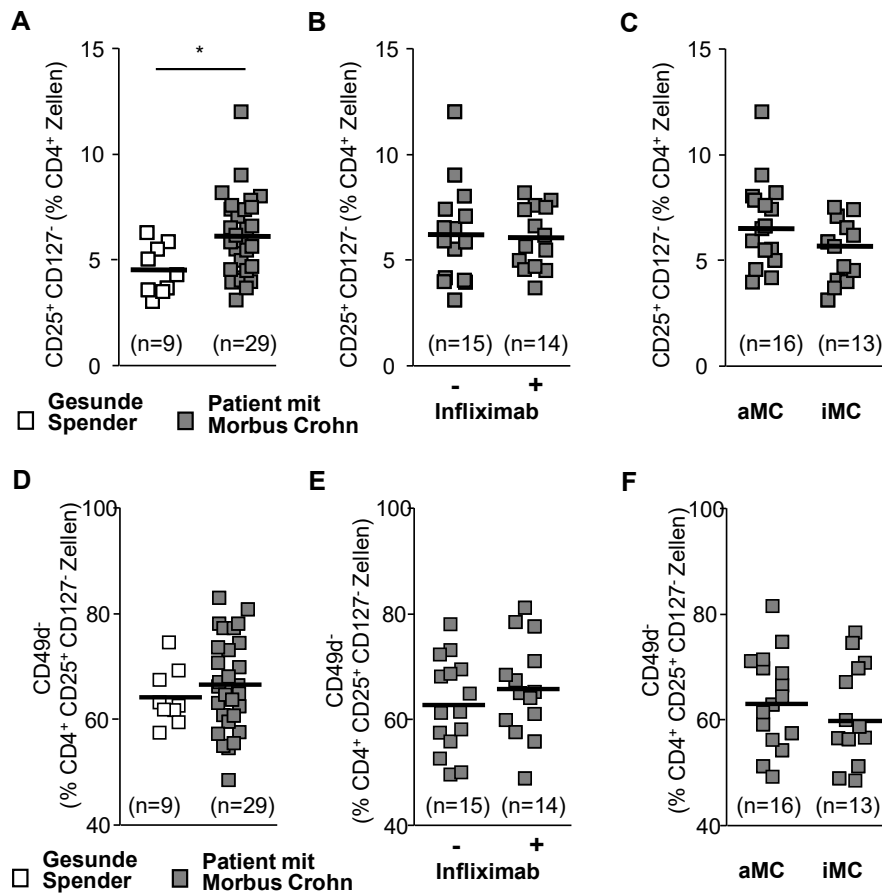


Abbildung 5: Expression von CD127 und CD49d bei gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn. Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CD25, CD127 und CD49d innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Subpopulation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut. Dabei wurden 9 gesunde Spender und 29 Patienten mit Morbus Crohn (MC) eingeschlossen. Von den Patienten mit MC waren 14 mit Infliximab therapiert. 16 hatten eine aktive (aMC) und 13 eine inaktive Erkrankung (iMC). Verteilung der CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ T-Zellen (**A-C**) und CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ CD49d⁻ T-Zellen (**D-F**) bei gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn in Abhängigkeit von der Therapie mit Infliximab und der Krankheitsaktivität (beurteilt mittels Harvey-Bradshaw-Score). Für die durchflusszytometrische Auswertung der CD127⁻ und CD49d⁻ T-Zellsubpopulation wurden die Zellen mit anti-CD4 PerCP, anti-CD25 APC, anti-CD127 PE und anti-CD49d FITC markiert. Statistischer Vergleich mit dem Mann-Whitney U Test. Die Linie zeigt den Median an. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Patienten. *Abkürzungen: PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

3.1.2. Expression von CD49d

Die Expression der doppelnegativen CD4+CD25+ T-Zellen für CD127 und CD49d wurde in Abhängigkeit der Krankheitsaktivität und Behandlung mit Infliximab bei Patienten mit Morbus Crohn und bei gesunden Spendern untersucht.

Im Vergleich der Gruppen „gesund“ mit „krank“ zeigte sich hinsichtlich der Expression von CD49d in der CD4+ CD25+ CD127- T-Zellfraktion kein signifikanter Unterschied. Ebenso fand sich kein Unterschied bei der Analyse der Expression in Abhängigkeit von Krankheitsaktivität (aktiver vs. inaktiver Crohn) oder der Therapie mit Infliximab (Abbildung 5 D-F).

3.1.3. Aktivierte Treg (aTreg)

Die Expansion von Treg ist mit potenziellen Risiken verbunden. So können Treg einen pro-inflammatorischen Phänotyp annehmen und damit die Entzündung nach Zelltransfer verstärken. Hoffman et al. fanden heraus, dass nur naive CD45RA+ T-Zellen eine stabile Treg-Population bei der *in vitro*-Expansion darstellen [121]. Daher wurde die Expression von CD45RA an CD4+ CD25++ T-Zellen durchflusszytometrisch bei Patienten mit Morbus Crohn untersucht (Abbildung 6).

Der Anteil von aTreg CD4+ CD25++ CD45RA- T-Zellen war im peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu gesunden Spendern (Morbus Crohn 1,06% (0,38-5,80%) vs. gesunde Spender 0,35% (0,10-2,85%); $p=0,0134$) signifikant erhöht (Abbildung 7A). Dieser Unterschied wurde sogar noch deutlicher bei Patienten, die eine aktive Erkrankung hatten (aktiver Morbus Crohn: 1,3% (0,41-5,80%); gesunde Spender: 0,35% (0,10-2,85%); $p=0,03$). Eine Infusionstherapie mit Infliximab führte zu keinen signifikanten Unterschieden (Abbildung 7B). Die Aktivität der Erkrankung (aktiver vs. inaktiver Morbus Crohn) hatte keinen Einfluss auf die aTreg (Abbildung 7C).

Zusammenfassend war der Anteil der aTreg bei PBMC von Patienten mit Morbus Crohn signifikant erhöht gegenüber gesunden Spendern. Der Unterschied bei Patienten mit einer aktiven Erkrankung war sogar noch deutlicher ausgeprägt.

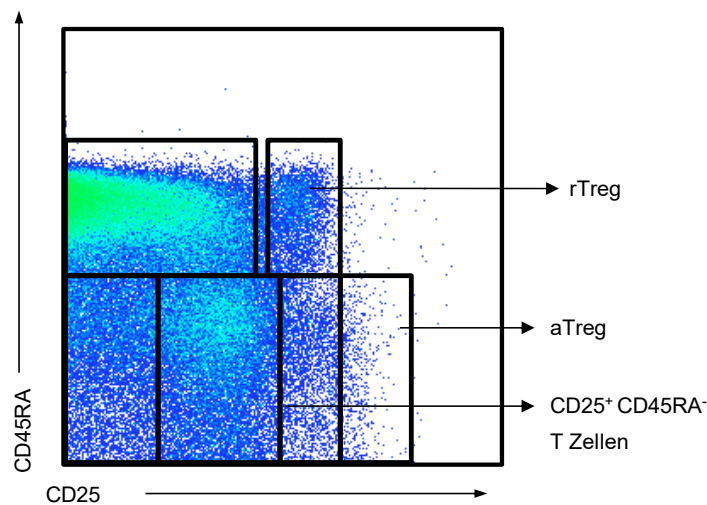
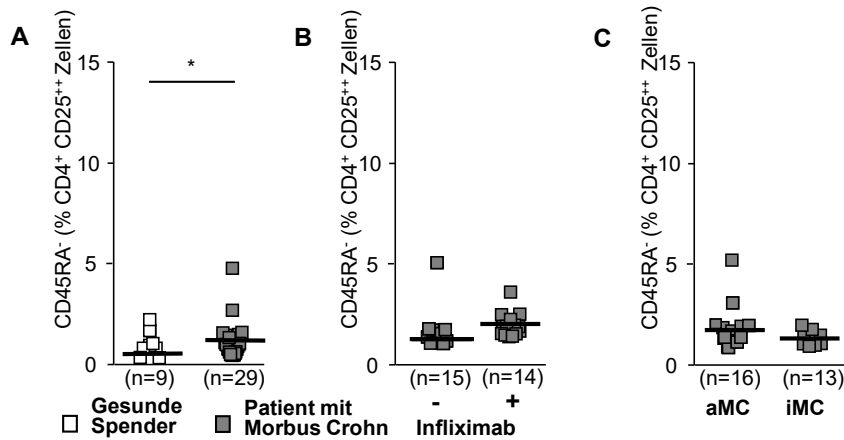


Abbildung 6: Einteilung der regulatorischen T-Zellen (Treg) in Untergruppen nach Miyara et al., 2009 "*Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor*" [71]. Darstellung von CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit der Oberflächenmarker CD25 und CD45RA in einem repräsentativen Dot Plot. Dabei werden drei Untergruppen abgegrenzt. Die erste Untergruppe sind CD25⁺ CD45RA⁺ T-Zellen, auch ruhende Treg (rTreg) genannt, die zweite Untergruppe sind die aktivierten Treg (aTreg), die CD25⁺⁺ und CD45RA⁻ sind. Die Zellen der dritten Untergruppe produzieren laut Miyara et al. proinflammatorische Zytokine und sind CD25⁺ CD45RA⁻ T-Zellen ohne regulatorische Funktion. Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn wurden entnommen, mit anti-CD4 VioBlue, anti-CD25 APC und anti-CD45RA PerCP Cy5.5 gefärbt und am FACS Canto gemessen. *Abkürzungen: PE, Phycoerythrin; PerCP Cy 5.5, Peridinin-Chlorophyll Cyan 5.5; APC, Allophycocyanin

aTreg



rTreg

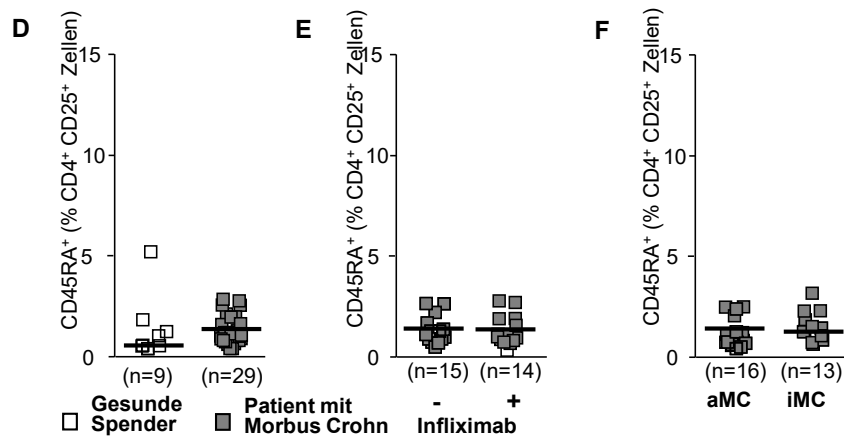


Abbildung 7: Einfluss von Morbus Crohn auf aktivierte regulatorische T-Zellen (aTreg) und ruhende Treg (rTreg). Durchflusszytometrische Analyse von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut. Analyse der Expression von anti-CD25 APC, anti-CD45RA PerCP Cy5.5 und anti-CD4 VioBlue. Dabei wurden 9 gesunde Spender und 29 Patienten mit Morbus Crohn (MC) untersucht. Von den Patienten mit Morbus Crohn wurden 14 Patienten mit Infliximab therapiert, 16 Patienten hatten eine aktive (aMC) und 13 Patienten eine inaktive Erkrankung (iMC). Verteilung der aTreg Zellen (**A-C**) und rTreg (**D-F**) bei gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn in Abhängigkeit von der Therapie mit Infliximab und der Krankheitsaktivität (beurteilt mittels Harvey-Bradshaw-Score). Statistisch Analyse mit dem Mann-Whitney U Test. Die Linie zeigt den Median an. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Patienten. *Abkürzungen: PE, Phycoerythrin; PerCP Cy 5.5, Peridinin-Chlorophyll; Cyan 5.5 APC, Allophycocyanin

3.1.4. Ruhende Treg (rTreg)

Die rTreg CD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁺ T-Zellen rTreg - CD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁺ waren bei gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn im peripheren Blut zu gleichen prozentualen Anteilen vorhanden und wurden somit durch die chronische Erkrankung nicht beeinflusst (Morbus Crohn: 1,17% (0,29-3,37%); gesunde Spender: 0,5% (0,29-6,33%)) (Abbildung 7D-F).

3.1.5. CD4⁺CD25⁺ CD45RA⁻ exprimierende Zellen ohne regulatorische Funktion

Im Vergleich mit gesunden Spendern waren CD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁻ T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn signifikant erhöht (Morbus Crohn: 3.9% (1,18-11,60%); gesunde Spender: 2,09% (1,30-3,54%); p=0,0175) (Abbildung 8). Die Subgruppenanalyse aktive vs. inaktive Erkrankung und Behandlung mit Infliximab erbrachte keinen weiteren Unterschied.

CD4+CD25+CD45RA- T Zellen

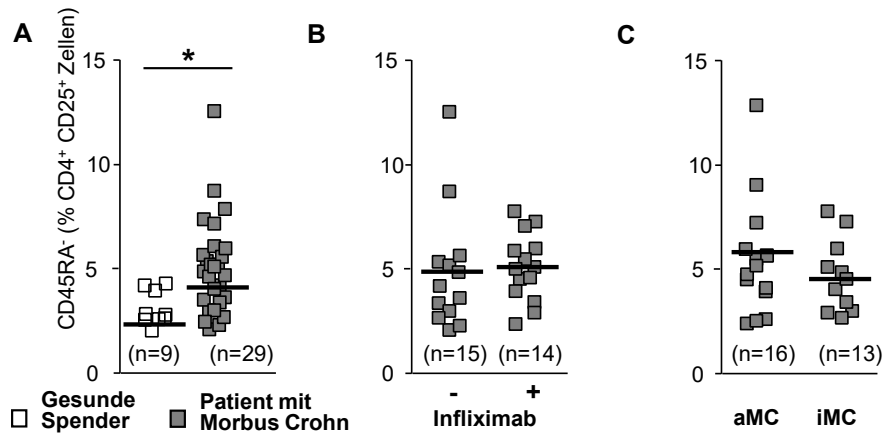


Abbildung 8: Einfluss der Erkrankung Morbus Crohn auf die CD4+ CD25+ CD45RA- T-Zellen ohne regulatorische Funktion nach Miyara et al. 2009 [71]. Durchflusszytometrische Analyse von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut. Analyse der Expression von anti-CD25 APC und anti-CD45RA PerCP Cy5.5, anti-CD4 VioBlue. Dabei wurden 9 gesunde Spender und 29 Patienten mit Morbus Crohn (MC) eingeschlossen. Von den Patienten mit Morbus Crohn wurden 14 Patienten mit Infliximab therapiert, jeweils 16 Patienten hatten eine aktive (aMC) und 13 Patienten eine inaktive Erkrankung (iMC). **A-C.** Verteilung der aktivierten Treg bei gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn in Abhängigkeit von der Therapie mit Infliximab und Krankheitsaktivität (beurteilt mittels Harvey-Bradshaw-Score). Statistischer Vergleich mit dem Mann-Whitney U-Test. Die Linie zeigt den Median an. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Patienten. *Abkürzungen: FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

3.1.6. Expression des Chemokin Rezeptors 4 in den Untergruppen von Treg

Migration-assoziierte Chemokin Rezeptoren und Integrine wie CCR4 und $\alpha 4\beta 7$ -Integrin spielen eine wichtige Rolle bei der intestinalen immunologischen Homöostase und eine defekte Expression dieser Rezeptoren führt zu einer verminderten Migration von Treg in den Darm [172]. Um die unterschiedliche Expression des

Migrationsmarkers CCR4 bei aTreg und rTreg zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt und die Expression von CCR4 in den Treg-Subpopulationen nach Miyara et al. untersucht [71].

Zwei Drittel der aTreg der Patienten mit Morbus Crohn exprimierten CCR4 (77,6% (51,80-96,40%)), gefolgt von den CD4+ CD25+ CD45RA- Zellen ohne regulatorische Funktion (54,9% (2,70-86,4%); $p=0,0001$, im Vergleich zu aTreg). Am geringsten wurde CCR4 auf rTreg (19,3% (3,09-28,20%); $p\leq 0,0001$, im Vergleich zu aTreg) exprimiert (Abbildung 9).

Bei Zellen von gesunden Spendern waren diese Unterschiede nicht so deutlich ausgeprägt. aTreg exprimierten CCR4 zu 83,95% (76,70-96,80%) und CD4+ CD25+ CD45RA- T-Zellen zu 84,20% (34,90-86,30%). rTreg waren zu 27,7% CCR4+ (16,30-36,30%). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Spendern und Patienten.

Treg von Patienten mit Morbus Crohn exprimieren CCR4, wobei sich aTreg und rTreg in der Expression unterscheiden. aTreg exprimieren zu einem hohen prozentualen Anteil CCR4 und können damit hypothetisch in den Darm migrieren. Im Vergleich dazu wird CCR4 auf rTreg signifikant weniger exprimiert und die Migration in den Darm könnte dadurch erschwert sein.

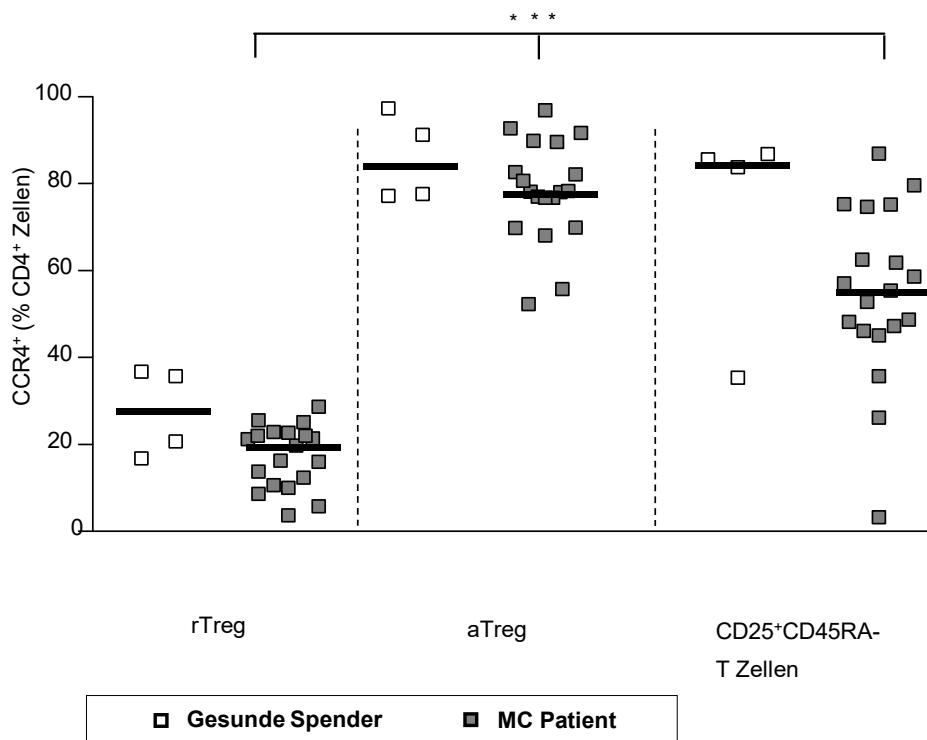


Abbildung 9: Analyse der Expression des Chemokin Rezeptors (CCR)4 innerhalb der Treg-Subpopulationen nach Miyara et al.[71] und durchflusszytometrische Analyse von CCR4 PE Cy7, anti-CD25 APC und anti-CD45RA PerCPCy5.5, anti-CD4 VioBlue, innerhalb der CD4+ T-Zell-Subpopulation. Dabei wurden 4 gesunde Spender und 19 Patienten mit Morbus Crohn (MC) eingeschlossen. Statistischer Vergleich mit dem Mann-Whitney U-Test. Die Linie zeigt den Median an. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Patienten. *Abkürzungen: PE Cy7, Phycoerythrin Cyan 7; PerCP Cy 5.5, Peridinin-Chlorophyll Cyan 5.5; APC, Allophycocyanin

3.2. Induktion von FOXP3 und Bestimmung der suppressorischen Funktion *in vitro*

3.2.1. Konversion von CD4+ CD25-FOXP3- T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn

Die Applikation von iTreg bei Patienten mit Morbus Crohn stellt ein attraktives therapeutisches Konzept dar. Daher sollte in diesem Teil geklärt werden, aus welcher

ursprünglichen Zellpopulation sich TiTreg generieren lassen und wie ihre regulatorische Funktion im Vergleich zu nTreg ist. Haben Patienten mit Morbus Crohn möglicherweise ein Konversionsdefizit der Treg?

Zunächst wurde die Kapazität unfraktionierter CD4+ CD25- FOXP3- T-Zellen in CD4+ CD25+ FOXP3+ T-Zellen zu konvertieren zwischen gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn verglichen. Dabei wurde der Effekt von anti-CD28 und TGF β auf CD4+ CD25- FOXP3- T-Zellen aus dem peripheren Blut untersucht (Abbildung 3). Ohne zusätzliche Stimuli behielten die CD4+ CD25- FOXP3- T-Zellen ihren Phänotyp über einen Zeitraum von fünf Tagen in der Zellkultur. Die Stimulation durch CD3 und CD28 erhöhten die Expression von CD25 und FOXP3 bei T-Zellen von gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn auf 75-80% (Morbus Crohn: 79,5,00% (56,60-85,70%); gesunde Spender: 75,50% (44,50-85,10%); p=ns). Die Zugabe von 5 ng/ml TGF β erhöhte das Expressionsniveau der Rezeptoren nicht wesentlich (Morbus Crohn: 81,90% (59,00-87,40%); gesunde Spender: 74,70% (38,10-88,00%)). Auch die Zugabe von 150 U/ml IL-2 veränderte das Expressionsniveau nicht (Morbus Crohn: 84,50% (82,40-88,40%); gesunde Spender: 79,30% (65,70-92,90%)) (Abbildung 10).

Es wurde die Expressionshöhe von FOXP3 in den konvertierten CD4+ CD25+ FOXP3+ T-Zellen nach Zugabe von anti-CD28 und TGF β durchflusszytometrisch untersucht. Periphere Blutzellen von Patienten mit Morbus Crohn hatten eine ähnliche Kapazität zu FOXP3^{low} Zellen zu konvertieren, verglichen mit gesunden Spendern (Morbus Crohn: 65,40% (20,30-80,00%); gesunde Spender: 71,80% (36,30-82,30%)). Erneut erhöhte die Zugabe von IL-2 die Konversionsrate nicht zusätzlich.

Im Gegenteil dazu hatten Zellen von Patienten mit Morbus Crohn eine signifikant höhere Kapazität zu FOXP3^{high} Zellen zu konvertieren als die der gesunden Spender (Morbus Crohn: 15,1% (7,9-38,6%); gesunde Spender: 3,60% (1,60-16,0%); p=0,0079). Durch die Zugabe von IL-2 konnte dieser Effekt bestätigt werden (p=0,028). Des Weiteren und unabhängig vom Ausgangsmaterial konnte die Zugabe von IL-2 die Ausbeute erhöhen (Morbus Crohn: 0,28x10⁶ Zellen; 0,17-2,00x10⁶ Zellen; gesunde Spender: 0,4x10⁶ Zellen, 0,071-1,81x10⁶ Zellen) im Gegensatz zu einer Gabe von TGF β allein (Morbus Crohn: 0,18 x10⁶ Zellen, 0,09-1,09x10⁶ Zellen; gesunde Spender: 0,12x10⁶ Zellen, 0,04-0,89x10⁶ Zellen).

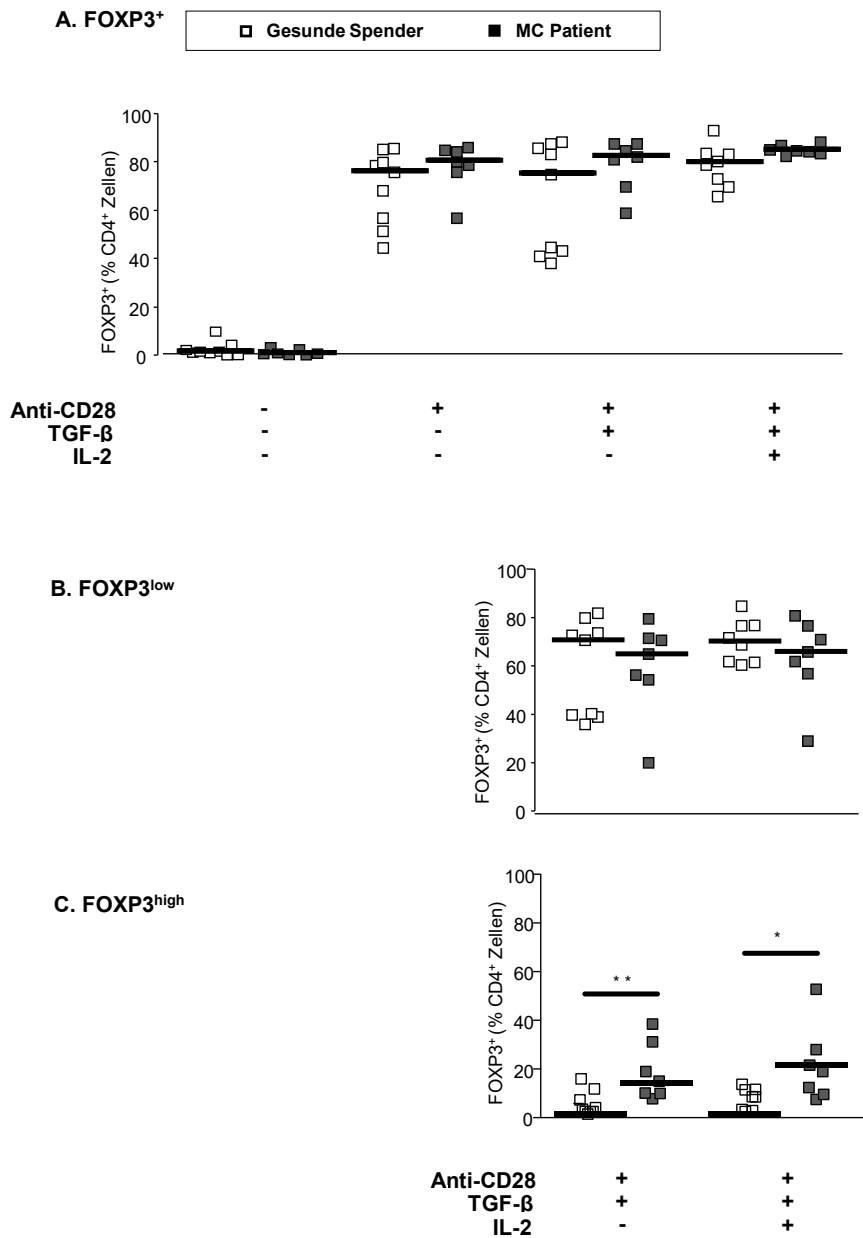


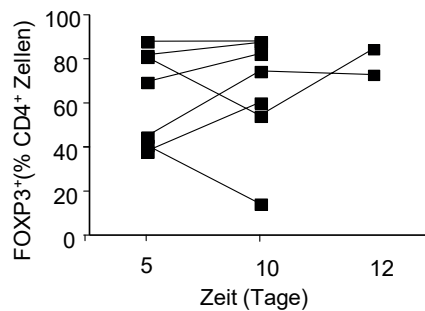
Abbildung 10: *In vitro*-Induktion von Forkhead-Box Protein (FOXP3) in CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen. Aufgereinigte CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen wurden in Gegenwart von immobilisiertem anti-CD3 (1,5 µl) sowie von gelöstem anti-CD28 (2 µl/ml), transformierender Wachstumsfaktor (TGF)β (5 ng/ml) und mit/ohne Interleukin (IL)-2 (150 U/ml) kultiviert. Nach fünf Tagen wurde die FOXP3-Expression durch durchflusszytometrische Analysen bestimmt. **A.** FOXP3⁺, **B.** FOXP3^{low} und **C.** FOXP3^{high} Zellen wurden aus Proben von 7 Patienten mit Morbus Crohn und 9 gesunden Spendern bestimmt. Die durchflusszytometrische Färbung wurde mit anti-CD4 PerCP, anti-CD25 PE und anti-FOXP3 APC durchgeführt. Statistischer Vergleich mit dem Mann-Whitney U-Test. Die Linie zeigt den Median an. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Patienten. *Abkürzungen: PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

3.2.2. Stabilität der FOXP3-Expression

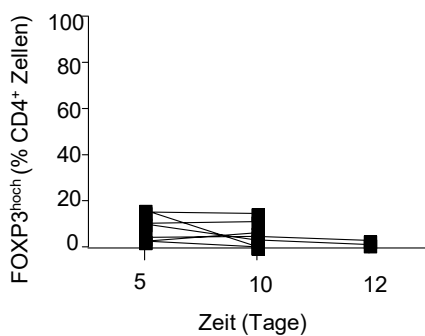
Die Stabilität der konvertierten FOXP3+ T-Zellen wird kontrovers diskutiert [173]. Daher wurden die konvertierten, nun FOXP3+ T-Zellen, über fünf Tage nur in Kulturmedium kultiviert. Bei einem Teil der Zellen wurde die Restimulation durch den Zusatz von 150 U/ml IL-2 durchflusszytometrisch untersucht.

Es zeigte sich, dass die Expression von FOXP3+ der konvertierten T-Zellen auch nach viertägiger Ruhephase stabil blieb (Abbildung 11). Diese Untersuchung wurde an Patienten mit Morbus Crohn durchgeführt.

A. FOXP3+



B. FOXP3^{hoch}



C. FOXP3^{niedrig}

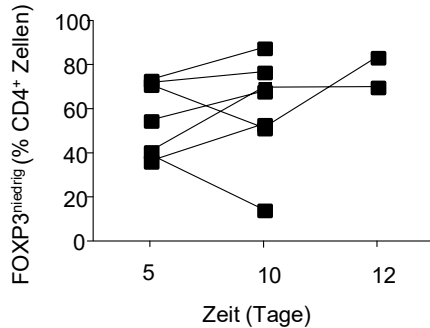


Abbildung 11: Die Stabilität der Forkhead-Box Protein (FOXP)3 Expression wurde bei CD4+ CD25+ FOXP3+ T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn bestimmt. Im ersten Schritt wurden T-Zellen für fünf Tage in Zellkultur genommen in Gegenwart von immobilisiertem anti-CD3 (1,5 µl) sowie von gelöstem anti-CD28 (2 µl/ml) transformierendem Wachstumsfaktor (TGF)β (5 ng/ml) ± Interleukin (IL)-2 (150 U/ml). Es entstanden konvertierte FOXP3+ T-Zellen. Im zweiten Schritt wurden dieselben Zellen in Kulturmedium aufgenommen und danach durchflusszytometrisch analysiert (Tag 10). Im dritten Schritt wurde erneut IL-2 hinzugegeben und die Zellen nach zwei Tagen durchflusszytometrisch analysiert (Tag 12). Die Färbung für die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit anti-CD4 PerCP, anti-CD25 PE und anti-FOXP3 APC. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Patienten. *Abkürzungen: PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

3.2.3. Konversion von naiven CD4+ CD45RA+ T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn

Viele Arbeitsgruppen spekulierten, dass die Quelle der T_H17 naive CD4+ CD45RA+ T-Zellen sind [121, 174]. Daher wurde im ersten Schritt die Konversionskapazität der CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen *in vitro* unter dem Einfluss von anti-CD28, TGF β in An- oder Abwesenheit von IL-2 untersucht (Abbildung 12). Auch hier konnte sowohl bei gesunden Spendern als auch bei Patienten mit Morbus Crohn FOXP3 nach einer Zellkulturperiode von fünf Tagen unter dem Einfluss von anti-CD28 und/oder TGF β induziert werden. Während anti-CD28 allein eine Konversionsrate von rund 50% der T-Zellen von gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn aufwies (Morbus Crohn: 53,20% (7,52-67,70%); gesunde Spender: 44,70% (1,71-6,80%)), veränderte die Zugabe von TGF β die Ausbeute an FOXP3+ Zellen nicht (Morbus Crohn: 52,50% (6,96-72,30%); gesunde Spender: 44,80% (1,10-83,30%)). Die Zugabe von IL-2 hingegen erhöhte die Rate an FOXP3+ auf etwa 70% (Morbus Crohn: 70,60% (2,20-91,90%); gesunde Spender: 72,00% (36,60-91,90%;)) (Abbildung 13).

CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn und gesunden Spendern hatten eine vergleichbar starke Konversionsrate zu CD4+ CD25+ FOXP3+ und CD4+ CD25+ FOXP3^{high} unter Zugabe von TGF β und IL-2, welche zwischen 6 und 10% lag (Morbus Crohn: TGF β : 6,60% (0,50-32,70%); IL-2: 13,4% (0,10-46,70%); gesunde Spender: TGF β : 10,60% (0,40-17,20%); IL-2: 14,60% (8,40-46,70%)).

Die Konversionskapazität wurde zudem in Bezug auf die Krankheitsaktivität betrachtet (Abbildung 14). CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen hatten ein leicht erhöhtes Konversionspotential in Patienten mit inaktivem Morbus Crohn im Vergleich zu naiven T-Zellen von Patienten mit einem aktiven Morbus Crohn. Zellen, die mit anti-CD28 und TGF β behandelt wurden, wurden bei Patienten mit inaktivem Morbus Crohn zu 55,5% (7,14-72,3%) in FOXP3+ Zellen konvertiert, während dies bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn in nur 16,70% (6,9-69%; p=ns) der Fälle nachweisbar war. Die Analyse der FOXP3 Subpopulationen ergab ähnliche Resultate mit einer etwas verstärkten Konversionsrate für inaktiven Morbus Crohn (FOXP3^{high}: inaktiver Morbus Crohn: 7,40% (1,70-32,70%); aktiver Morbus Crohn: 0,80% (0,50-18,5%);

p=ns. FOXP3^{low}: inaktiver Morbus Crohn: 43,2% (5,5-66,30%); aktiver Morbus Crohn:15,9% (6,5-48,6%); p=ns)).

Zusammenfassend stellen CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺ T-Zellen ebenfalls eine gute Quelle für FOXP3⁺ Zellen *in vitro* dar. Zellen von Patienten mit aktivem Morbus Crohn haben im Vergleich zu Zellen aus einem nicht akut entzündlichen Milieu eine leicht reduzierte Fähigkeit FOXP3 zu exprimieren, ohne jedoch statistisch signifikant zu sein.

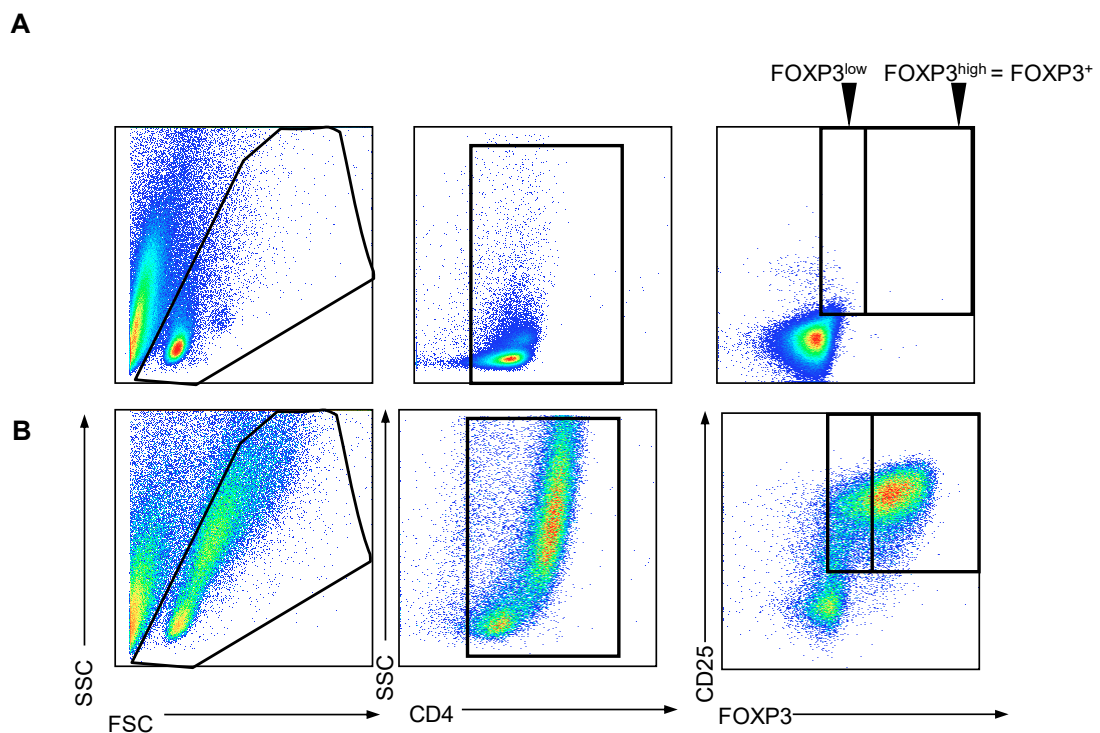


Abbildung 12: Gating-Strategie der CD4⁺ CD25⁺ Forkhead-Box Protein (FOXP)3⁺ T-Zellpopulation nach Isolation von CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen. Repräsentative Dot Plots zeigen die peripheren Blut T-Zellen im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC), CD4⁺ T-Zellen und in dieser Subpopulation das Gating von CD25 und FOXP3. **A.** CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen wurden ohne Zugabe von Antikörpern für fünf Tage kultiviert. **B.** CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen wurden für fünf Tage inkubiert, in Gegenwart von immobilisiertem anti-CD3 (1,5 µl), gelöstem anti-CD28 (2 µl/ml), transformierender Wachstumsfaktor (TGF)β (5 ng/ml) ± Interleukin (IL)-2 (150 U/ml); danach wurden die Zellen mit anti-CD4 PerCP, anti-CD25 PE, anti-FOXP3 APC gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Quadrate zeigen die FOXP3⁺ Zellen und deren Aufteilung in FOXP3^{low}, FOXP3^{high} sowie deren Summe als FOXP3⁺. *Abkürzungen: PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

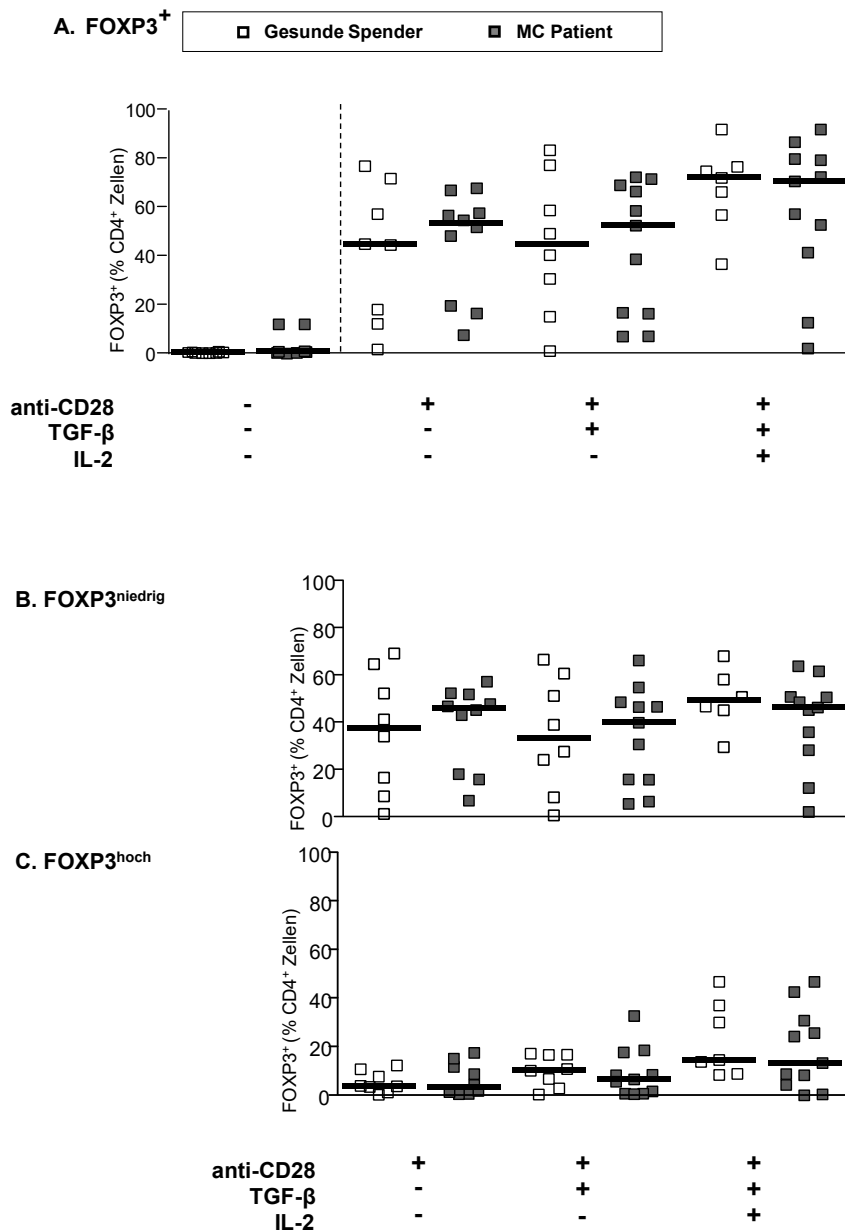


Abbildung 13: *In vitro*-Induktion von Forkhead-Box Protein (FOXP3) in CD4⁺ CD45RA⁻ T-Zellen. Aufgereinigte CD4⁺ CD45RA⁻ T-Zellen wurden in Gegenwart von immobilisiertem anti-CD3 (1,5 μ l) sowie von gelöstem anti-CD28 (2 μ l/ml), transformierender Wachstumsfaktor (TGF) β (5ng/ml) mit/ohne Interleukin (IL)-2 (150 U/ml) für fünf Tage kultiviert. Die FOXP3-Expression wurde durchflusszytometrisch bestimmt. **A.** FOXP3⁺, **B.** FOXP3^{low} und **C.** FOXP3^{high} Zellen wurden aus Proben von mindestens 9 Patienten mit Morbus Crohn und 8 gesunden Spendern bestimmt. Die Färbung für die Durchflusszytometrie wurde mit anti-CD25 FITC, anti-CD45RA PE, anti-CD4 PerCP und anti-FOXP3 APC durchgeführt. Jedes Symbol repräsentiert einen einzelnen Patienten. Die Linie zeigt den Median an. *Abkürzungen: FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

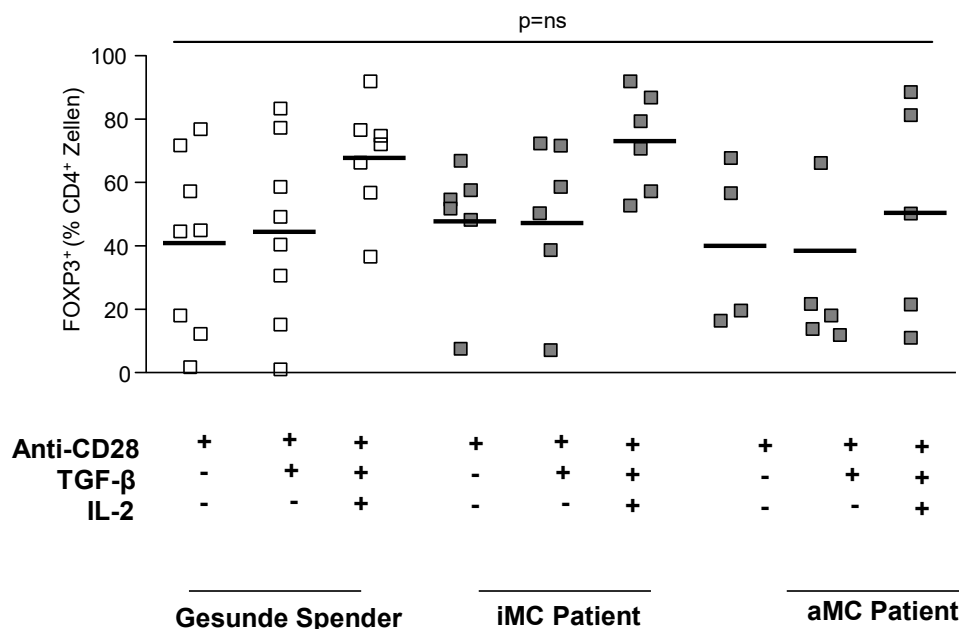


Abbildung 14: *In vitro*-Konversion von Forkhead-Box Protein (FOXP)3 bei naiven CD4+ CD25- CD45RA- T-Zellen wurde in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität (beurteilt mittels Harvey-Bradshaw-Score) bestimmt. Die FOXP3-Expression wurde aus Proben von 10 Patienten mit Morbus Crohn (6 Patienten mit einem inaktiven Morbus Crohn und 4-5 mit einem aktiven Morbus Crohn) und 8 gesunden Spendern bestimmt. Die Färbung für die Durchflusszytometrie wurde mit anti-CD25 FITC, anti-CD45RA PE, anti-CD4 PerCP und anti-FOXP3 APC durchgeführt. Statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U-Test. Die Linie zeigt den Median an. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Patienten. *Abkürzungen: FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

3.3. *In vitro*-Suppressionskapazität

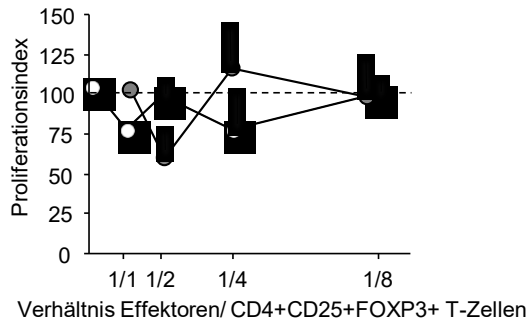
3.3.1. Suppressionskapazität von CD4+ CD25-FOXP3- T-Zellen *in vitro*

Um die Funktionalität der konvertierten FOXP3+ T-Zellen aus unfraktionierten CD4+ CD25- T-Zellen zu überprüfen, wurde eine allogene MLR *in vitro* angesetzt. Die

konvertierten FOXP3+ T-Zellen hatten keinen signifikanten Effekt auf die DNS-Neusynthese von CD4+ CD25- Effektorzellen (Abbildung 15), vergleiche Tabelle 11.

Obwohl unfraktionierte CD4+ CD25- FOXP3- T-Zellen *in vitro* eine hohe Kapazität besaßen in FOXP3+ T-Zellen zu konvertieren, zeigten sie keine suppressorischen Eigenschaften. Damit sind sie eine unwahrscheinliche Quelle für die *in vivo* gefundenen TiTreg.

A. Konvertiert mit anti-CD28, TGF β



B. Konvertiert mit anti-CD28, TGF β und IL-2

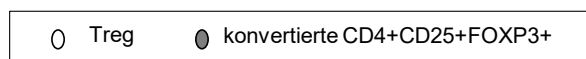
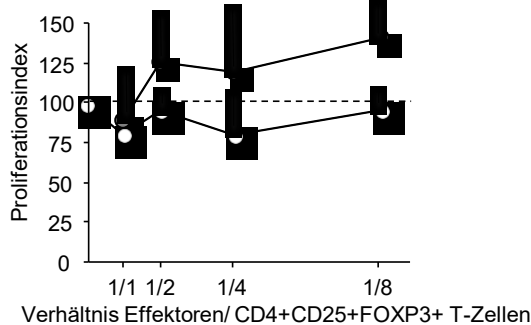


Abbildung 15: Suppressionseigenschaften der *in vitro*-induzierten FOXP3+ CD4+ CD25+ T-Zellen konvertiert aus CD4+ CD25- T-Zellen **A.** mit immobilisiertem anti-CD3 (1,5 μ l), gelöstem anti-CD28 (2 μ l/ml), transformierender Wachstumsfaktor (TGF) β (5 ng/ml) und **B.** mit Interleukin (IL)-2 (150 U/ml) von 3 Patienten mit inaktivem Morbus Crohn und 3 gesunden Spendern in einer allogenen Reaktion. Die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) wurde aus frisch isolierten CD4+ T-Zellen, inaktivierten allogenen mononukleären Zellen sowie autologen konvertierten CD4+ CD25+ FOXP3+ T-Zellen hergestellt. Die *de-novo* DNS-Synthese wurde durch den Einbau von [3 H]-Thymidin in den letzten 18 Stunden der Zellkultur bestimmt. Die Proliferation wurde als Proliferationsindex, als Verhältnis der MLR ohne suppressive Zellen (100%) zu den jeweiligen Ansätzen mit CD4+ CD25+ FOXP3+ T-Zellen bestimmt. Median aus 3 Ansätzen aus Zellen von gesunden Spendern. Für jedes einzelne Experiment wurden Triplets angesetzt.

Tabelle 11: Suppression der aus CD4+ CD25- T-Zellen generierten CD4+ CD25+ FOXP3+ T-Zellen von gesunden Spendern n=1-3 in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) mit regulatorischen T-Zellen. Median und minimaler und maximaler Wert der Proliferationsindizes sind angegeben.

Verdünnungsfaktor	Treg*	anti-CD3/CD28, TGFβ*	anti-CD3/CD28, TGFβ, IL-2*
1:1	63,9 (63,9)	107,9 (78,1-137,6)	80,6 (80,6)
1:2	92,5 (83,1-92,5)	65,5 (3,2-119,3)	150,9 (142,7-159,1)
1:4	63,5 (13-69,4)	121,3 (88,4-544,3)	138,8 (93,6-183,9)
1:8	93,3 (89,8-107,7)	103,7 (88,9-197,8)	180 (147,6-212,3)

*Abkürzungen: Treg, regulatorische T-Zelle; transformierender Wachstumsfaktor (TGF)β, Interleukin (IL)-2, Effektor-T-Zelle, iTreg, TGFβ-induzierte regulatorische T-Zellen

3.3.2. Suppressionskapazität von iTreg – generiert aus naiven CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen - *in vitro*

Der Nachweis der suppressorischen Eigenschaft ist essentiell zur Charakterisierung funktionaler iTreg. Diese Eigenschaft wurde nach der Konversion aus naiven CD4+ CD25+ CD45RA+ T-Zellen zu CD4+ CD25+ FOXP3+ iTreg in einer allogenen MLR untersucht. Hierfür wurden nicht nur die Zellen, die mit TGFβ und/oder IL-2 konvertiert wurden, untersucht, sondern ebenfalls die Zellen, welche nur unter dem Einfluss von anti-CD28 standen. iTreg, die mit anti-CD3, anti-CD28 sowie TGFβ aus

naiven CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺ T-Zellen induziert wurden, hatten *in vitro* eine stärkere suppressive Kapazität als Treg, die direkt aus dem peripheren Blut desselben Patienten isoliert wurden (Proliferationsindex als Ratio 1:1: Morbus Crohn: 29,85 (21,42-44,11); gesunde Spender: 35,40 (0,80-40,07)). Durch Zugabe von IL-2 während der Konversion entstanden TiTreg, welche die höchste Suppressionskapazität zeigten (Proliferationsindex als Ratio 1:1: Morbus Crohn: 26,70 (6,92-33,06); gesunde Spender: 37,10 (0,35-40,60)) (Abbildung 16), vergleiche Tabelle 12 und 13.

Für diese Versuche wurden Zellen von Patienten mit inaktiver Erkrankung verwendet. CD4⁺ CD25⁻ CD4RA⁺ T-Zellen konnten *in vitro* zu TiTreg konvertiert werden und sind eine mögliche Quelle für TiTreg *in vivo*. Die TiTreg in Patienten mit inaktivem Morbus Crohn und gesunden Spendern wiesen eine gleich starke suppressorische Kapazität auf, die durch die Zugabe von TGFβ und IL-2 während der Konversion gesteigert werden konnte.

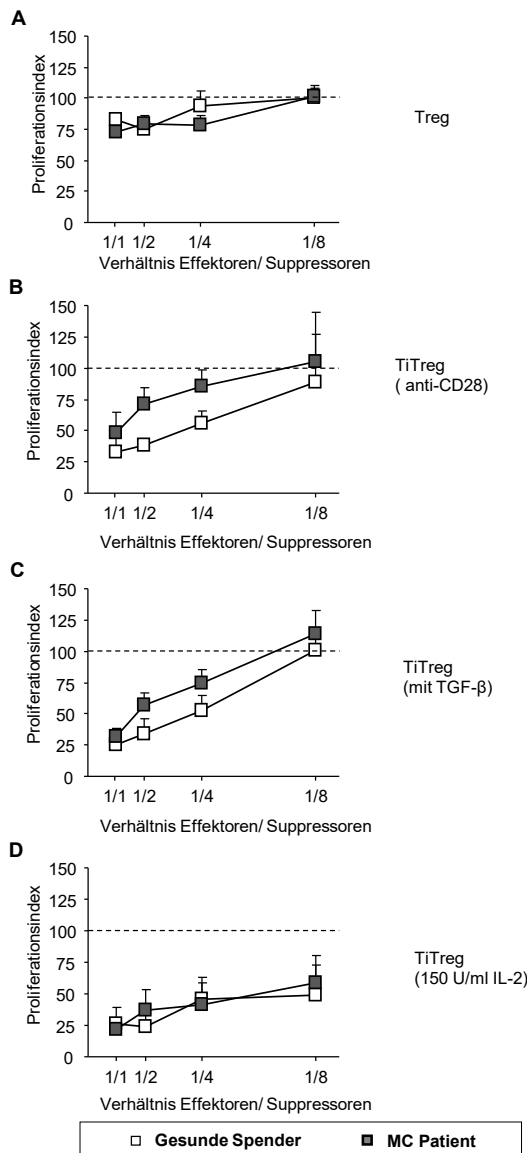


Abbildung 16: Suppressionseigenschaften der *in vitro* konvertierten mit transformierendem Wachstumsfaktor (TGF) β -induzierte regulatorische T-Zellen (TiTreg), generiert aus CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen von 3 Patienten mit inaktivem Morbus Crohn und 3 gesunden Spendern in einer allogenen Reaktion. Die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) wurde aus frisch isolierten CD4⁺ T-Zellen und allogenen mononukleären Zellen zusammengestellt. Suppressive Zellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen zu den CD4⁺ T-Zellen hinzugegeben. Als suppressive Zellen wurden benutzt: periphere Treg und TiTreg aus konvertierten CD4⁺CD25⁻ CD45RA⁺ T-Zellen. Die *de-novo* DNS-Synthese wurde durch den Einbau von [³H]-Thymidin in den letzten 18 Stunden der Zellkultur bestimmt. Die Proliferation wurde als Verhältnis der MLR ohne suppressive Zellen (100%) zu den jeweiligen Ansätzen mit Suppressoren bestimmt. Median aus n= 2-3 Ansätzen aus Zellen von Patienten mit Morbus Crohn und gesunden Spendern. Für jedes einzelne Experiment wurden Triplets angesetzt.

Tabelle 12: Suppression der mit dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) β -induzierte regulatorische T-Zellen (TiTreg), generiert aus CD4+ CD45RA+ T-Zellen von 3 gesunden Spendern in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) mit regulatorischen T-Zellen. Mittelwert und Standardfehler der Proliferationsindizes sind angegeben.

Verdünnungsfaktor	Treg*	TiTreg*		
		Effektoren/ Suppressoren	Anti- CD3/CD28	Anti- CD3/CD28, TGF β *
1:1	82,6; 4,4	33,3; 10,3	25,4; 12,39	26,0; 12,87
1:2	74,9; 9,3	37,8; 3,4	34,1; 12,1	24,3; 10,8
1:4	94,0; 11,4	56,3; 9,5	52,1; 12,7	46,0; 12,83
1:8	100,1; 7,8	89,0; 5,6	100,4; 12	48,7; 24,5

*Abkürzungen: Treg, regulatorische T-Zelle; transformierender Wachstumsfaktor (TGF) β , Interleukin (IL)-2, Effektor-T-Zelle, TiTreg, TGF β -induzierte regulatorische T-Zellen

Tabelle 13: Suppression der mit dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) β -induzierte regulatorische T-Zellen (TiTreg), generiert aus CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen von 3 Patienten mit inaktivem Morbus Crohn in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) mit regulatorischen T-Zellen. Mittelwert und Standardfehler der Proliferationsindizes sind angegeben.

Verdünnungsfaktor	Treg*	TiTreg*		
		Effektoren/ Suppressoren	Anti- CD3/CD28	Anti- CD3/CD28, TGF β *
1:1	73,1; 2,3	48,4; 16,6	31,8; 6,6	22,2; 7,9
1:2	79,8; 5,9	71,3; 13,3	57,1; 9,3	37,5; 15,9
1:4	78,8; 7,1	85,9; 12,3	74,3; 11,2	41,4; 21,9
1:8	101,5; 8,6	105,6; 21	114,4; 18,2	58,3; 22,3

*Abkürzungen: Treg, regulatorische T-Zelle; transformierender Wachstumsfaktor (TGF) β , Interleukin (IL)-2, Effektor-T-Zelle, TiTreg, TGF β -induzierte regulatorische T-Zellen

3.3.3. TiTreg exprimieren den Chemokin Rezeptor (CCR)4 und das Integrin β 7

Um zu überprüfen, ob die Zellen potentiell in den Darm migrieren können, wurde die Expression von Homing-Rezeptoren wie CCR4 und β 7 in der generierten TiTreg - Population bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu gesunden Spendern untersucht. TiTreg wurden mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CCR4 und β 7 gefärbt.

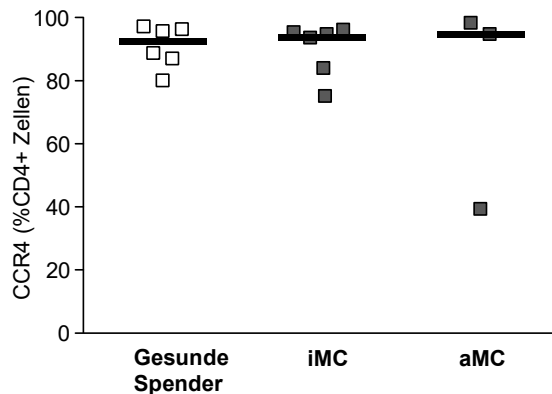
Die Färbung für CCR4 zeigte konstant erhöhte Frequenzen (95%) bei TiTreg in aktivem und inaktivem Morbus Crohn sowie in gesunden Spendern (Abbildung 17).

TiTreg exprimierten β 7 zu 80% bei gesunden Spendern. Prozentuale Anteile der β 7-Expression bei Patienten mit einer inaktiven Erkrankung entsprachen der von

gesunden Spendern (inaktiver Morbus Crohn: 80,30% (15,20-96,80%); gesunde Spender: 86,30% (24,30-91,50%)). Im Gegensatz dazu exprimierten TiTreg von Patienten mit einem aktiven Morbus Crohn nur niedrige Level an $\beta 7$ (26,5% (17,10-54,4%); p=ns) (Abbildung 17).

Zusammenfassend generierten Patienten mit Morbus Crohn suppressive TiTreg, welche die Oberflächenmarker $\beta 7$ und CCR4 exprimierten.

A. CCR4



B. $\beta 7$

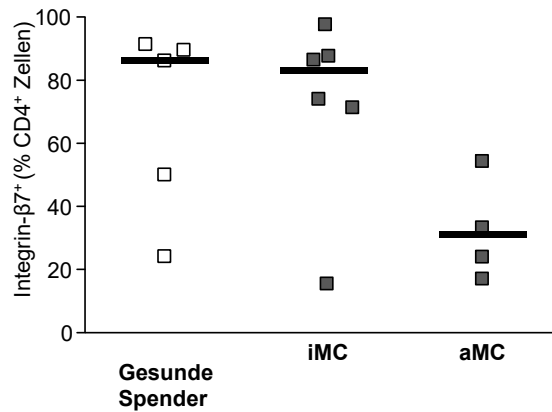


Abbildung 17: Expression der Oberflächenmarker Chemokin Rezeptor (CCR)4 und $\beta 7$ bei mit transformierendem Wachstumsfaktor (TGF) β -induzierten regulatorischen T-Zellen (TiTreg). Durchflusszytometrische Analyse der TiTreg nach fünf Tagen Zellkultur in Gegenwart von immobilisiertem anti-CD3 (1,5 μ l) sowie von gelöstem anti-CD28 (2 μ l/ml), TGF β (5 ng/ml) und/oder IL-2 (150 U/ml). Die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker wurden mit anti-CD25 FITC, anti-CCR4 oder anti- $\beta 7$ PE, anti-CD4 PerCP, anti-FOXP3 APC durchgeführt. Dabei wurden 5-6 gesunde Spender und 3-6 Patienten mit Morbus Crohn eingeschlossen. Die CCR4- und $\beta 7$ -Expression wurde in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität (beurteilt mittels Harvey-Bradshaw-Score) bestimmt. Statistische Analyse mit dem Mann-Whitney U-Test. Die Linie zeigt den Median an. Jedes Quadrat repräsentiert einen einzelnen Patienten. *Abkürzungen: FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin-Chlorophyll; APC, Allophycocyanin

4. Diskussion

4.1. Einführung

Regulatorische T-Zellen (Treg) modulieren die Immunantwort auf Pathogene und sind außerdem entscheidend an der Erhaltung der Selbsttoleranz des Organismus beteiligt [98]. Die Expression von FOXP3, welches für die Entwicklung von Treg zuständig ist, gilt als deren Marker [175, 176]. Dass Ungleichgewichte der Treg zu Effektorzellen eine Rolle in der Pathogenese von sogenannten Autoimmunerkrankungen spielen könnten, wird schon länger vermutet [177, 178, 166]. Ziel dieser Arbeit war es, den Phänotyp und die Funktionalität von Treg und konvertierter TiTreg von gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn zu charakterisieren. Insbesondere stellte sich die Frage nach einer verlässlichen CD4⁺ T-Zell-Ausgangspopulation, von welcher aus funktionale TiTreg unter stabilen Bedingungen generiert werden konnten. Dabei wurde auch die Expression von Migrationsmarkern wie CCR4 und β 7 untersucht, die es den Zellen erlauben sollten, an den Ort der Entzündung zu gelangen. Zunächst untersuchten wir durchflusszytometrisch die Expression von CD127 und CD49d bei Patienten mit Morbus Crohn. CD127 wird antiproportional zu FOXP3 exprimiert. In unseren Experimenten hatten Patienten mit Morbus Crohn signifikant mehr CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ T-Zellen als gesunde Spender. CD49d wurde allerdings gleich stark bei Gesunden und Kranken exprimiert. Des Weiteren untersuchten wir die von Miyara et al. postulierten Treg Subgruppen der aktivierten und ruhenden Treg sowie CD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁻ exprimierende Zellen ohne regulatorische Funktion bei Patienten mit Morbus Crohn [71]. Unsere Analysen haben gezeigt, dass diese Patienten signifikant mehr aktivierte Treg und CD4⁺CD25⁺ CD45RA⁻ exprimierende Zellen ohne regulatorische Funktion aufwiesen als Gesunde. In einem zweiten Schritt wurde mit Hilfe von Konversions- und Suppressionsassays die Generierung von TiTreg untersucht. Die *in vitro*-Konversion von FOXP3⁺ T-Zellen aus unfraktionierten CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen und naiven CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺ T-Zellen war in unseren Experimenten möglich. Nur TiTreg, die aus naiven CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺ T-Zellen generiert wurden, entwickelten suppressive Eigenschaften und exprimierten Migrationsmarker wie den Chemokin Rezeptor β 7 und CCR4.

4.2. Identifikation von Treg anhand definierter Markermoleküle

Die phänotypische Charakterisierung von Treg ist bis heute nicht eindeutig möglich. In dieser Arbeit wurde im peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn sowie gesunden Spendern die Expression von CD127 und CD49d bei CD4⁺ CD25⁺⁺ Treg untersucht. Vorteil dieser Oberflächenmarker ist, dass sie nicht auf Treg exprimiert werden. Damit können sie für eine magnetische Aufreinigung benutzt werden, bei der die Treg keinen Kontakt zu den zur Aufreinigung verwendeten Antikörpern hätten. Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen wurde die Expression von CD127 und CD49d bei Patienten mit Morbus Crohn und die Veränderungen in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität und Therapie mit Infliximab untersucht. CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ T-Zellen zeigten im peripheren Blut von gesunden Spendern (4,3%) und bei Patienten mit Morbus Crohn (6%) einen signifikanten Unterschied. Eine Therapie mit dem TNF- α Antikörper Infliximab oder die Aktivität der Erkrankung (PBMC von Patienten mit aktivem versus inaktivem Morbus Crohn) hatten keinen Einfluss auf die prozentuale Anzahl der CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ T-Zellen.

Als erster Marker für Treg wurde im Jahre 1995 CD25 benutzt. CD25 wird auf CD4⁺ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften exprimiert [70]. Treg wurden also in der CD4⁺ CD25⁺⁺ T-Zellpopulation vermutet. Diese Population macht 10% der peripheren CD4⁺ T-Zellen in der Maus [70] und circa 5% im Menschen [145] aus. Die durchflusszytometrische *Gating*-Strategie dieser Population variiert stark zwischen unterschiedlichen Publikationen, welches den Vergleich der Ergebnisse der Arbeitsgruppen erschwert. Die CD4⁺ CD25⁺⁺ T-Zellen sind suppressiv [163] und können Erkrankungen wie eine Colitis in der Maus unterdrücken [116]. T-Zellen exprimieren jedoch nach Aktivierung auch CD25 und können damit nicht mittels Oberflächenmarker von Treg unterschieden werden [175]. Der bisher etablierte Weg zur Aufreinigung von Treg ist die magnetische Zellsortierung. Dabei werden Treg mittels einer zweistufigen magnetischen Aufreinigung gewonnen. Die so gewonnenen Zellen haben im Rahmen der Aufreinigung jedoch Kontakt zu Antikörpern [108]. Mit diesen Aufreinigungsprotokollen können Reinheiten von CD25⁺ Zellen über 95% erreicht werden, diese sind jedoch nur zu 60% FOXP3⁺ [157]. Damit sind CD4⁺ CD25⁺⁺ T-Zellen eine heterogene Zellpopulation und können nicht sicher für weitere *in vitro*-Experimente genutzt werden.

FOXP3 ist bis heute der am häufigsten verwendete Marker für die Beschreibung von Treg [180]. FOXP3 ist ein Transkriptionsfaktor und wird damit intrazellulär exprimiert, was die Zellsortierung lebender Zellen über diesen Marker unmöglich macht. Er wird in PBMC von Patienten mit Morbus Crohn zu einem Anteil von 4-5% exprimiert und schwankt mit der Aktivität der Erkrankung [181]. Treg-Zahlen bei Patienten mit Morbus Crohn variieren innerhalb unterschiedlicher Studien und Organsysteme. Studien, in denen die Zellzahlen im peripheren Blut untersucht wurden, haben gegensätzliche Ergebnisse geliefert. Saruta et al. zeigten eine Erhöhung peripherer CD4+ FOXP3+ Treg bei Patienten mit Morbus Crohn [182]. Takahashi et al. hingegen zeigten eine inverse Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und Anzahl der Treg im peripheren Blut [183]. In der Homöostase liegen die Anteile der Treg an den Lymphozyten in der intestinalen Mukosa bei $1 \pm 3\%$ [184]. Bei Entzündungen wie der Divertikulitis sind Treg im Darmgewebe stark erhöht, Patienten mit einem akuten Schub des Morbus Crohn haben im Verhältnis dazu nur eine geringe Erhöhung der Treg im Darmgewebe [145]. In der Lamina propria des entzündeten Darmes und in den mesenterialen Lymphknoten von Patienten mit Morbus Crohn sind zwar die Treg-Zahlen erhöht, sie können jedoch der pro-inflammatorischen Reaktion nicht ausreichend entgegenwirken [73, 185]. Darüber hinaus beeinflusst die medikamentöse Therapie die Treg-Zahlen. So kann eine Therapie mit dem TNF- α Antikörper Infliximab den Anteil der Treg im peripheren Blut und in der Lamina propria des Darmes erhöhen [185, 186, 187]. Treg von Patienten mit Morbus Crohn zeigen im Vergleich zu gesunden Spendern die gleiche Suppressionskapazität – ein Hinweis auf eine unveränderte Funktion [182, 188, 151]. Werden die Treg als CD4+ FOXP3+ Zellen beschrieben, kann eine Erhöhung im peripheren Blut bei Patienten mit Morbus Crohn beobachtet werden [182].

Im entzündlichen Milieu wurde schon 2007 eine Suppression von CD127 auf T-Zellen beobachtet [189]. Eine suppressive Kapazität von CD4+ CD25+ CD127- Treg in gesunden Spendern konnte *in vitro* bereits gezeigt werden [89, 90, 91]. Zwischen der Expression von CD127 (Teil der α -Kette des IL-7 Rezeptors) und der FOXP3-Expression besteht eine inverse Korrelation [92]. In anderen entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis konnte die CD127-Expression mit der Krankheitsaktivität (Erhöhung in der Remission, Erniedrigung im akuten Schub) korreliert werden [190]. Unter einer Therapie mit dem TNF- α Antikörper Infliximab wird

bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eine Erhöhung der CD4+ FOXP3+ Zellen beschrieben [191, 192]. In unserer Arbeit konnte die Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und eingesetzter Therapie bei Patienten mit Morbus Crohn nicht reproduziert werden. Daher sehen wir CD127 als keinen soliden Marker für die Beschreibung von Treg an.

CD49d entspricht der $\alpha 4$ -Untereinheit des Integrins VLA-4 und ist ein Zielmolekül des Medikamentes Natalizumab [95]. Natalizumab führt auch bei Patienten mit Morbus Crohn zu einer Verminderung der Krankheitsaktivität [193, 194]. CD49d wird auf 80% der PBMC exprimiert, nicht jedoch auf CD25+ FOXP3+ Treg [89, 90]. Durch die Abwesenheit von CD49d kann zwischen nicht supprimierenden, pro-inflammatorische Zytokine produzierenden CD4+ CD25+ T-Zellen und Treg unterschieden werden [89]. Die CD127- CD49d- T-Zellen sind laut der Arbeitsgruppe von Kleinewietfeld suppressiv wirksam und nicht in der Lage pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren [89]. Wir untersuchten die Expression von CD49d auf Treg von Patienten mit Morbus Crohn und konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Gesunden feststellen.

Um Treg besser charakterisieren zu können, wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen die Methylierung in der sogenannten Treg-spezifischen Region (TSDR) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht. Der Demethylierungsgrad der TSDR, bei Treg im Bereich des *Foxp3*-Gens, ist im Vergleich zu Effektor-T-Zellen hoch [79]. Untersuchungen an CD4+ CD25+ CD127- sowie CD4+ CD25+ CD127- CD49d- T-Zellen konnten einen niedrigen Demethylierungsgrad und eine niedrigere Suppressionskapazität im Vergleich zu CD4+ CD25++ Zellen aufzeigen [195]. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte, dass unter den CD4+ CD25+ CD127- CD49d- Zellen signifikant weniger naive CD45RA+ Treg im Vergleich zu CD4+ CD25++ Treg vorhanden waren [195]. Im Gegensatz zu diesen Daten wurde in unseren Analysen keine Veränderung der Frequenz von CD4+ CD25+ CD127- Treg im peripheren Blut bei Patienten mit Morbus Crohn in Abhängigkeit der Krankheitsaktivität noch der Therapie mit TNF- α Antikörpern nachgewiesen. Auch Brandhorst et al. postulieren, dass FOXP3+ Treg und CD127- Treg nicht dieselbe Treg-Subgruppe repräsentieren [196]. Basierend auf diesen Daten sollten CD127 und CD49d nicht als stabile Marker für Treg bei Patienten mit Morbus Crohn verwendet werden.

.Gedächtnis- und naive Treg

Miyara et al. beschrieben drei Gruppen FOXP3-exprimierender Zellen, die sich in ruhende/naive Treg – CD25+ CD45RA+ FOXP3+, Gedächtnis-/aktivierte Treg – CD25++ CD45RA- FOXP3+ und CD25+ CD45RA- FOXP3-exprimierende Zellen ohne regulatorische Funktion [71] unterteilen. CD45RA+ Treg von gesunden Spendern produzieren keine pro-inflammatorischen Zytokine, tragen einen epigenetisch stabilen *FOXP3*-Locus und sind *in vitro* suppressiv, während CD45RA- Treg pro-inflammatorische Zytokine produzieren und nach repetitiver Stimulation die FOXP3 Expression verlieren [161, 121].

In dieser Arbeit wurden die Verhältnisse dieser Gruppen zueinander bei Patienten mit Morbus Crohn untersucht. Dabei wurden Treg als CD4+ CD25+ Zellen definiert und in dieser Subpopulation die Expression von CD45RA durchflusszytometrisch untersucht. Der Anteil der aktivierten Treg (aTreg) CD4+ CD25++ CD45RA- an den CD4+ Zellen lag bei 1,06% und war damit signifikant höher als bei CD4+ Zellen von gesunden Spendern (0,35%; p=0,01). Der Anteil der ruhenden Treg (rTreg) CD4+ CD25+ CD45RA+ wurde im peripheren Blut durch die Erkrankung nicht beeinflusst. Von Bedeutung ist, dass die Zellen der dritten Gruppe, der CD4+ CD25+ CD45RA- exprimierenden Zellen ohne regulatorische Funktion, bei Patienten mit Morbus Crohn signifikant erhöht waren.

Patienten mit Morbus Crohn weisen zwar mehr CD4+ CD25++ CD45RA- Zellen – aTreg – auf, die schnell proliferieren und keine stabile suppressorische Funktion besitzen, doch nur die naiven CD4+ CD25+ CD45RA+ rTreg behalten ihre Suppressionskapazität *in vitro* nach Expansion und qualifizieren sich damit als mögliche Ausgangspopulation für eine Zelltherapie [121, 164].

In Anlehnung daran stellten wir die Frage, welche Vorläufer- T-Zellpopulation *in vitro* benutzt werden muss, um stabile und funktionale induzierte Treg (TiTreg) zu generieren.

4.3. *In vitro* konvertierte Treg können die T-Zell-Proliferation supprimieren

Zellbasierte Behandlungsansätze beschäftigen sich mit dem Transfer von *in vitro* expandierten oder aus Th-Zellen induzierten Treg in Patienten. Welche Zellpopulation die Quelle dieser induzierten Treg sein könnte, ist noch unklar. Neben nTreg, die dem

Thymus entstammen und Foxp3 exprimieren [175], können iTreg auch in der Peripherie entstehen und ebenfalls suppressiv wirken [197]. Wenn man die Dynamik der peripheren Treg-Induktion besser versteht, könnte dies einen Teil der Pathophysiologie des Morbus Crohn aufdecken und die Basis zur Entwicklung einer Treg-basierten Therapie legen. *In vitro* können aus T-Zellen mit Hilfe von Zytokinen wie TGF β , TGF β -induzierte-Treg – TiTreg – generiert werden [114]. Es gibt jedoch keine eindeutigen Marker, um nTreg und iTreg zu unterscheiden. Bisher ist die Unterteilung in aTreg und rTreg das am weitesten verbreitete Modell. So wurden in dieser Arbeit die PBMC von Patienten mit Morbus Crohn in Hinblick darauf untersucht, welche T-Zell-Ausgangspopulation zu stabilen TiTreg führen kann und es wurden deren Konversionskapazität und Funktionalität in Suppressionsassays verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Konversion von FOXP3- T-Zellen in CD4+ FOXP3+ T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn möglich ist. In dieser Arbeit wurden CD4+ CD25- und CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn verglichen. Beide T-Zellgruppen exprimierten FOXP3, nachdem sie mit anti-CD28 und anti-CD3 stimuliert wurden. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von TGF β und IL-2 leicht gesteigert. Aus CD4+ CD25- T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn wurden signifikant mehr CD4+ CD25+ FOXP3^{high} Zellen generiert als bei gesunden Spendern. Während FOXP3-exprimierende Zellen, die aus CD4+ CD25- T-Zellen mit Hilfe von TGF β stimuliert wurden, keine suppressive Wirkung *in vitro* zeigten, entstanden aus der Konversion von CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen suppressive TiTreg. Die suppressive Kapazität dieser Zellen ist bei Patienten mit Morbus Crohn vergleichbar zu der von gesunden Spendern.

Auch andere Arbeitsgruppen konnten bestätigen, dass durch die Stimulation durch anti-CD3 monoklonale Antikörper und Antigen-präsentierende Zellen die FOXP3 - Expression in naiven humanen T-Zellen (CD4+ CD25- CD45RA+) induziert werden kann [198]. Hinsichtlich der suppressiven Kapazität gibt es gegensätzliche Ergebnisse. Während einige Arbeitsgruppen zeigten, dass diese Zellen suppressiv gegenüber T-Zellen sind [198,199], wurde in anderen Studien eine nur mäßige oder sogar keine Suppressionskapazität beobachtet [197,200].

Es wurden verschiedene Strategien untersucht, um eine stabile Suppressionskapazität in TGF β -induzierten regulatorischen T-Zellen (TiTreg) sicherzustellen. Hippen et al. zeigten 2013, dass durch die Aktivierung von humanen

naiven CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺ T-Zellen in Gegenwart von Rapamycin und TGFβ eine stabile FOXP3-Expression und ein starker supprimierender Phänotyp gebildet werden kann. Hierbei ist von Bedeutung, dass humane TGFβ-iTreg im Mausmodell *in vivo* funktionell waren und die Krankheitsaktivität in einem Modell der xenogenen Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) reduzierten [198]. Dies war der erste Beweis dafür, dass humane, induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) *in vivo* funktionell suppressiv sind. Da derzeit für alle Komponenten des Isolierungs- und Expansionsverfahrens Reagenzien der *Good Manufacturing Practice* (GMP) verfügbar sind, ebnet diese Daten den Weg für die klinische Herstellung von iTreg. Analog zu den von Hippen et al. publizierten Daten, konnten wir feststellen, dass aus humanen CD4⁺ CD25⁻ und naiven CD45RA⁺ T-Zellen in Anwesenheit von TGFβ FOXP3⁺ Zellen hergestellt werden können. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden ebenfalls humane CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺ T-Zellen, die aus dem peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn isoliert wurden, *in vitro* zu suppressiven iTreg konvertiert. Einer der methodischen Hauptunterschiede ist die Art und Weise der Stimulation. Hippen et al. führten eine Stimulation mittels artifizieller Antigen-präsentierender Zellen durch, während wir plattengebundene anti-CD3 und anti-CD28 monoklonale Antikörper benutzten. Auch führten wir keine weitere Stimulation mit Rapamycin durch. Ähnlich wie in den beschriebenen Experimenten konnten wir in der induzierten iTreg Population FOXP3 Reinheiten zwischen 50-70% feststellen. Die Zugabe von Interleukin (IL)-2 hingegen erhöhte die Rate an FOXP3⁺ auf etwa 70% – bei Hippen et al. wurden FOXP3⁺ Reinheiten um die 55% berichtet [198]. In der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass mittels Stimulation mit monoklonalen Antikörpern CD3 und CD28 allein sowie in Kombination mit TGFβ vergleichbare Konversionsraten von rund 50% der T-Zellen von gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn erreicht werden konnten. Ein weiterer Unterschied zwischen unseren Experimenten und denen von Hippen et al., bezieht sich auf die Suppressionskapazität von aus CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen konvertierten iTreg. Wir konnten zeigen, dass obwohl unfraktionierte CD4⁺ CD25⁻ FOXP3⁻ T-Zellen *in vitro* eine hohe Kapazität besaßen in FOXP3⁺ T-Zellen zu konvertieren, sie keinen signifikanten Effekt auf die Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Neusynthese von CD4⁺ CD25⁻ Effektorzellen hatten. Hippen et al. untersuchen ebenfalls die Konversionskapazität von unfraktionierten CD4⁺ CD25⁻ und CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺ T-Zellen. Ähnlich wie bei naiven T-Zellen waren konvertierte

CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen starke Suppressoren im xenogenen Mausmodell. Zusammengefasst zeigen die Daten von Hippen et al., dass für die Erzeugung von iTreg in Gegenwart von Rapamycin und TGFβ keine positive Selektion von CD45RA erforderlich ist. Weiterhin wurde auch die Suppressionskapazität von natürlichen regulatorischen T-Zellen nTreg und TiTreg verglichen. Analog zu den Ergebnissen der o.g. Arbeitsgruppe zeigten auch unsere Experimente, dass TiTreg *in vitro* eine ähnliche bis etwas stärkere Suppressionskapazität als Treg besaßen, die direkt aus dem peripheren Blut desselben Patienten isoliert wurden (Unterschiede statistisch nicht signifikant). Die TiTreg von Patienten mit inaktivem Morbus Crohn und gesunden Spendern wiesen eine vergleichbare suppressive Kapazität auf. Die Ergebnisse zwischen den Experimenten der Arbeitsgruppe um Hippen und unseren sind jedoch nur bedingt vergleichbar. Hauptunterschied ist die Art und Weise der Durchführung der Suppressionsassays. Bei Hippen et al. wurde die *in vitro* Fähigkeit zur Suppression expandierter Kulturen mit einem 5-Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidester (CFSE) -Suppressionsassay durchgeführt. Mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) wurden gereinigt, mit CFSE markiert und mit anti-CD3 monoklonalen Antikörper-beschichteten Beads in An- oder Abwesenheit von kultivierten nTreg oder iTreg stimuliert (ohne Anpassung der prozentualen FOXP3⁺ Zellen in der Kultur) [198]. Wir hingegen bestimmten die DNS *de novo* Synthese mittels [³H] –Thymidin Assay. Außerdem benutzen wir PBMC von Patienten mit einem nicht aktiven Morbus Crohn. Daher wäre es wichtig, diese Daten weiter auszubauen, um die therapeutische Relevanz dieser Ergebnisse zu erweitern. Unter anderem sollten diese Daten unter Einschluss von einer größeren Anzahl von Patienten bestätigt werden, der Einfluss eines akuten Schubes der Erkrankung auf die Funktionalität der TiTreg.

Unsere Daten stimmen mit denen von Levings et al. überein. Diese Arbeitsgruppe versuchte nachzuweisen, dass die Suppressionsfähigkeit eine intrinsische Eigenschaft von T-Zellen ist, die CD25 *in vivo* konstitutiv exprimieren [201]. Sie untersuchten, ob humane CD25⁻ CD4⁺ T-Zellen, die CD25 nach Aktivierung *in vitro* exprimieren, regulatorische Effekte zeigten. Dafür wurden CD25⁻ CD4⁺ T-Zellen mit anti-CD3- und anti-CD28 monoklonalen Antikörpern sowie durch Zugabe von TGFβ und IL-2 aktiviert. Nach 5 Tagen wurden die so gewonnenen CD25⁺ T-Zellen isoliert und auf ihre Fähigkeit getestet, frisch isolierte autologe CD25⁻ T-Zellen zu supprimieren. Diese Zellen waren *in vitro* nicht suppressiv [201]. Auch in unseren Experimenten konnte aus CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen keine suppressive Treg Population gebildet werden, nur aus

naiven T-Zellvorläufern entstanden suppressive Treg. Es bestehen viele methodische Gemeinsamkeiten zwischen den Experimenten von Levings et al. und unseren, unter anderem die Art des Suppressionsassays ([³H] –Thymidin Einbau) sowie die Dauer der Inkubation der CD4+ CD25- T-Zellen und die Aufreinigungsmethode.

Auch weitere Arbeitsgruppen bestätigten, dass die Expansion und die Konversion von induzierten regulatorischen T-Zellen (iTreg) durch die periphere Aktivierung von Effektor-T-Zellen in Gegenwart von TGFβ möglich ist [114,182,202,203]. Die Umwandlung von peripheren CD4+ CD25- T-Zellen zu CD4+ CD25+ regulatorischen T-Zellen (Treg) durch TGF-β kann auch *in vitro* in einer Zellkultur durchgeführt werden, was zu *in vitro* iTreg führt [114]. Ähnlich wie bei der *in vitro* Generierung von iTreg ist die periphere Induktion von iTreg *in vivo* im Mausmodell von der Aktivierung des T-Zellrezeptors (TCR) in Gegenwart von TGFβ möglich [182,203–205]. Viele dieser Studien wurden vor der Beschreibung von FOXP3 als essentiellen Marker regulatorischer T-Zellen durchgeführt [182].

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stehen die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Tran et al. [197]. Sie zeigen, dass die Stimulation des TCR und TGFβ die FOXP3-Expression in CD4+ CD25- CD127-CD45RA+ T-Zellen induzieren. Obwohl die FOXP3-Expression stabil war, waren die TGFβ-induzierten FOXP3+ T-Zellen weder anerg noch suppressiv und erzeugten hohe Spiegel an Effektorzytokinen [197]. Es bestehen jedoch vielfältige methodische Unterschiede: Die Suppressionsassays wurden mit Antikörpern anderer Herstellerfirmen und in anderen Konzentrationen angesetzt. Wir benutzten zum Beispiel 10 µg/ml anti-CD3 von Janssen-Cilag, 2 µg/ml anti-CD28 von Miltenyi Biotec und folgende Zytokine von eBioscience 5 ng/ml TGFβ und 50 U/ml IL-2. Die Arbeitsgruppe von Tran et al. setzten 10 µg anti-CD3, 2 µg/ml anti-CD28 von BD Pharmingen und TGFβ von Peprotech, Rocky Hill ein. Als Stimulatoren wurden einerseits bei Tran et al reife dendritische Zellen und in unseren Experimenten andererseits CD4+ CD25- Zellen eingesetzt. Die Suppressionskapazität wurde mittels CFSE gemessen und die Auswahl der Ausgangspopulation für die Proliferation unter anderem über die Expression von CD127 getroffen.

Eine weitere Einschränkung unserer Konversionsexperimente ist, dass keine Zytokinbestimmung durchgeführt wurde. Es wäre denkbar, dass die von uns generierten iTreg trotz ihrer Suppressionskapazität auch pro-inflammatorische Zytokine produzierten. Ebenso haben wir keine epigenetische Charakterisierung der

verschiedenen konvertierten Treg-Gruppen durchgeführt. Bekannt ist aus den Expansionsexperimenten von Canavan et al. zwar, dass expandierte CD45RA+ Treg einen epigenetisch stabilen FOXP3-Locus exprimieren und die so genannte Treg-spezifisch demethylierte Region (TSDR) in allen getesteten CD45RA+ Treg-Linien vollständig demethyliert war, jedoch benutzte die Gruppe verschiedene Protokolle zur Bestimmung der Suppression. Darüber hinaus wurde auch keine Konversion von TiTreg durchgeführt. Eine weitere Studie an Mäusen zeigte, dass ein erheblicher Prozentsatz der Treg *in vivo* eine vorübergehende oder instabile Expression von Foxp3 aufwies, insbesondere in den entzündeten Geweben [206].

Es liegen aktuell verschiedene Protokolle für die Aufreinigung, Konversion und Bestimmung der Suppressionskapazität von Treg vor. Die Arbeitsgruppe um Cao et al., konnte zeigen, dass humane CD4+ CD25+ Treg aus PBMC von Patienten mit Autoimmun- und Entzündungskrankheiten sowie aus gesunden Spendern unter Verwendung des MACS-Systems und humaner CD4+ CD25+ Treg Isolationskits aufgereinigt werden konnten [207]. Nach dieser Isolation lag der Anteil an CD4+ FOXP3+ Zellen innerhalb der CD4+ CD25+ im Bereich von 40-80%. Auch wir reinigten CD4+ CD25-, CD4+ CD45RA+ und CD4+ CD25+ Zellen unter Verwendung des MACS-Systems auf. Wir erreichten im Bereich der CD4+ CD25+ Zellen jedoch etwas geringere Reinheiten (circa 30% CD4+ CD25++ Zellen). Die Reinheiten der anderen Zellpopulationen lag typischerweise über 90%. Die geringe Reinheit der CD4+ CD25++ Zellpopulation, später in den Suppressionsassays als „Treg“ benannt und angewendet, ist eine deutliche Einschränkung der vorliegenden Daten [164,208,209]. Somit könnten aufgrund des geringen Prozentsatzes der Treg, die in Suppressionsassays ohne weitere Aufreinigung angewendet wurden, falsch niedrige Suppressionskapazitäten der Treg Subpopulation gemessen worden sein. Damit sind unsere Ergebnisse der Suppressionsassays in Bezug auf den Vergleich der Suppressionskapazität TiTreg *versus* Treg nur eingeschränkt aussagekräftig. Für zukünftige Experimente wäre damit das Hauptziel die Treg Zahlen zu erhöhen, indem z.B. die Konversion und Expansion kombiniert werden.

Auch weitere Arbeitsgruppen konnten belegen, dass Treg aus PBMC erfolgreich mit Methoden der Zellsortierung gereinigt und *in vitro* expandiert werden können [210]. Die Zellsortierung ist jedoch eine Herausforderung im Rahmen des GMP-Verfahrens [210]. Wir haben uns daher speziell auf ein magnetkugelbasiertes Verfahren (MACS) zur Treg-Isolierung konzentriert, um die derzeit verfügbaren Isolationswerkzeuge der GMP

zu nutzen, mit dem Ziel, ggf. die Umsetzung in die klinische Anwendung zu erleichtern. Die CD4⁺ CD25⁺⁺ Treg-Isolation ist mit dem MACS-System möglich [210,211], obwohl die Treg-Reinheit suboptimal ist (50–60%) [212]. In Bezug auf die Reinheit der Ausgangspopulation ist die Isolierung mit MicroBeads eindeutig der Sortierung mittels Durchflusszytometrie (FACS) unterlegen, aber das letztere Verfahren ist unter GMP-Bedingungen zur klinischen Anwendung nicht ohne weiteres verfügbar. Mit den zum Zeitpunkt der Arbeit verfügbaren MACS-Systemen ist eine Aufreinigung der Treg für eine Anwendung die Klinik nicht ausreichend [210].

Es wurden weitere Methoden gesucht, um die Stabilität der TiTreg in Zellkultur zu sichern. So kann Rapamycin, das bevorzugt die Zytokinausschüttung und das Überleben von Effektor-T-Zellen hemmt zu Beat-gereinigten Expansionskulturen hinzugefügt werden - allerdings auf Kosten einer 5-10-fachen Reduktion der Treg-Expansion [213]. Die Kontamination mit Nicht-Treg ist entscheidend für die Etablierung einer nTreg-Zelltherapie. Drei Studien konnten zeigen, dass CD4⁺ CD25⁺ Treg um das 1000-fache expandiert werden können, wenn sie in Abwesenheit von Rapamycin erneut stimuliert werden. Aber die Kulturen enthielten jeweils einen hohen Anteil von IL-2- und Interferon (IFN) γ -sekretierenden Zellen, die sowohl FOXP3⁻ als auch FOXP3⁺ waren [161,208]. Alle Treg-Kulturen enthalten einen gewissen Anteil an FOXP3⁻ T-Zellen, die insbesondere das Potenzial haben, nach der Restimulation Effektor-T-Zellen zu polarisieren und somit potenziell pro-inflammatorische Effekte haben könnten. Es gibt wiederholt aus der Literatur Hinweise, dass Treg, die aus CD45RA⁺ Treg (in Abwesenheit von Rapamycin) expandiert wurden, keine Zytokinproduzenten und stark supprimierend sind, während Treg, die aus CD45RA⁻ T-Zellen expandiert wurden, pro-inflammatorische Zytokine exprimieren und die FOXP3-Expression mit repetitiver Stimulation *in vitro* verlieren [121,214]. Hoffmann et al. publizierten ein Protokoll zur Aufreinigung und Expansion von CD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁺ Treg für die klinische Anwendung [214]. Wir haben uns in unseren Experimenten dafür entschieden, kein Rapamycin zu den Zellkulturen hinzuzugeben, um eine höhere Zellausbeute für weitere Experimente zu gewinnen. Unsere Experimente konzentrierten sich auf naive CD4⁺ CD45RA⁺ Zellen als potenzielle Vorläufer für TiTreg.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die *in vitro* gemessene erhöhte Suppressionskapazität auf eine erhöhte Proliferation von CD4⁺ CD25⁺ und CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen im Assay zurückzuführen ist. Zellen in Zellkultur konkurrieren

um Ressourcen wie kostimulatorische Signale, Nährstoffe des Mediums und Platz in der 96-Wellplatte [163,215]. Durch mikroskopische und makroskopische Kontrollen der Platten, konnten wir sichergehen, dass der pH-Wert der Zellkulturen optimal blieb und die Zellen im Well weiterhin mikroskopisch vital aussahen. Obwohl die meisten Arbeitsgruppen die Fähigkeit von Treg zur Suppression der T-Zell-Proliferation als primären Endpunkt von *in vitro* Suppressionsassays nutzen, gibt es viele Möglichkeiten, diesen Endpunkt zu bestimmen. Die Suppression im Assay geht zum Beispiel verloren, wenn exogene Zytokine wie IL-2 hinzugefügt werden, wohingegen andere suppressive Effekte in Gegenwart von IL-2 zeigen [215]. Darüber hinaus ergab sich keine Korrelation zwischen der *in vivo* und *in vitro* gemessenen Suppressionskapazität [215].

Wir haben in der vorliegenden Doktorarbeit den Fokus nicht auf der Bestimmung der Treg-Frequenzen gelegt. Um TiTreg-Frequenzen zu bestimmen, wäre es notwendig verschiedene Kompartimente, wie zum Beispiel das Blut und den akut entzündeten Darmbereich zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen. Das Ziel der Arbeit war es Treg qualitativ zu beschreiben und zu überprüfen, ob funktionale TiTreg überhaupt hergestellt werden können. Um Aussagen über die TiTreg Frequenzen machen zu können, sind daher weitere Experimente notwendig.

Es ist wichtig festzuhalten, dass die funktionellen Treg-Assays in diesen Studien *in vitro* durchgeführt wurden und damit nicht notwendigerweise der *in vivo*-Situation entsprechen. Zum Beispiel hat das Zusammenspiel zwischen der Mikrobiota und Treg, die Anwesenheit von dendritischen Zellen sowie das lokale Zytokin-Mikromilieu einen großen Einfluss auf die Plastizität und Funktion von Treg [216]. Darüber hinaus wurde bisher nur die Unterdrückung von T-Zell-Antworten untersucht. Die Möglichkeit, dass Treg von Patienten mit Morbus Crohn die Fähigkeit zur Unterdrückung anderer Zelltypen wie Antigen-präsentierende Zellen oder B-Zellen haben, ist nicht adressiert. In anderen Autoimmunerkrankungen, einschließlich des Diabetes mellitus Typ 1 und der Multiplen Sklerose, gibt es umfangreiche Hinweise darauf, dass der Defekt in der Immunregulation innerhalb der Effektor-T-Zellen Subpopulation und nicht in den Treg selbst liegt [217].

Expansion

Die geringe Häufigkeit von Treg im peripheren Blut von Menschen wird für die meisten Anwendungen eine *ex vivo*-Treg-Expansion erforderlich sein wird. In

Expansionsansätze, die starke TCR-Signale liefern, wurden Effektor-T-Zellen bevorzugt auf Kosten von Treg expandiert [218]. Daher ist es wichtig, entweder die Expansionskultur mit hochgereinigten Treg zu initiieren oder Kulturbedingungen zu schaffen, die das Wachstum von Treg begünstigen. Die meisten präklinischen Daten zur Analyse menschlicher Treg wurden unter Verwendung von mit Antikörpern beschichteten MicroBeads erstellt [218]. Diese Ansätze lassen sich nicht ohne weiteres auf GMP-Bedingungen übertragen. Hoffmann et al. bestimmten die Stabilität der FOXP3 Expression in *in vitro* Expansionskulturen, um zu beurteilen, ob CD25⁺⁺ Zellen mit ihrer einheitlichen Expression von FOXP3 eine homogene Population mit stabilen Treg-Zellcharakteristika darstellen. Dafür haben sie CD25⁺⁺ und CD25⁺ Zellen 7 Tage lang mit 300 U/ml IL-2 und mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern expandiert und analysierten anschließend den Phänotyp und die Funktionalität [164]. Die expandierten CD4⁺ CD25⁺⁺ T-Zellen wiesen eine fast vollständige Expression von FOXP3 auf. Nach Restimulation und Expansion für eine weitere Woche behielten diese CD25⁺⁺ Zellen die Expression von FOXP3 auf RNA Ebene und Proteinebene bei, während die CD25⁺ Subpopulation keinen stabilen Phänotyp aufwies. Weitere Funktionsanalysen der Subpopulationen zeigten eine stark supprimierende Aktivität von CD25⁺⁺ Zellen, selbst bei einem niedrigen Treg / Effektor-T-Zell-Verhältnis. Im Gegensatz dazu waren CD25⁺ weit weniger suppressiv [218]. Die Arbeitsgruppe untersuchte weiter, wie sich diese Subpopulation von expandierten CD25⁺ Treg unterscheiden und fanden heraus, dass nur die naiven CD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁺ eine homogene Population von FOXP3⁺ Treg darstellen [121]. Sie postulierten, dass die selektive Expansion von CD45RA⁺ naiven Treg die beste Strategie für adaptive Treg-Zelltherapien sei [121]. Die Zelllinien behielten die Expression von FOXP3 für mehrere Wochen bei, sezernierten nach Stimulation durch anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 *in vitro* keine pro-inflammatorischen Zytokine und zeigten in funktionellen Assays eine stabile Suppressionskapazität von Effektor-T-Zellen. Im Vergleich hatten die Zelllinien, die von CD45RA⁻ CD4⁺ CD25⁺⁺ T-Zellen abgeleitet waren, bereits zu Beginn der Zellkulturen die FOXP3-Expression und die Suppressionskapazität nach weiterer *in vitro*-Expansion verloren [121]. Bestätigt wurden diese Ergebnisse auch durch die Experimente von Canavan et al. [164] und Afzali et al. [219]. Dabei waren expandierte CD45RA⁺ Treg *in vitro* aus PBMC von Patienten mit Nierenversagen, systemischem Lupus erythematoses, rheumatoider Arthritis, multipler Sklerose und Asthma stärker

suppressiv wirksam als frisch isolierte Treg von demselben Spender [219]. Die expandierten CD45RA⁺ Treg exprimierten einen epigenetisch stabilen FOXP3-Locus und der TSDR war vollständig demethyliert [164]. Im Gegensatz dazu wurden in CD45RA-Treg-Linien unterschiedliche Grade der TSDR-Demethylierung beobachtet [220]. Daher sind strikte Phänotyp-Charakterisierungen, Bestimmung der Zytokinprofile und DNS-Methylierung am FOXP3-Locus von expandierten oder induzierten humanen Treg von Patienten mit Morbus Crohn für die endgültige Beurteilung dieser Zellen wichtig. Diese sind jedoch in der vorliegenden Doktorarbeit nicht durchgeführt worden.

Zusammenfassend haben wir uns aufgrund der Voruntersuchungen, insbesondere von Hoffmann et al. in unseren Experimenten dafür entschieden, naive T-Zellen als Vorläufer für *in vitro* konvertierte TiTreg weiter zu untersuchen.

Stabilität

nTreg scheinen bisher im inflammatorischen Milieu eine stabile Foxp3-Expression im Mausmodell und im Menschen aufzuweisen [221]. iTreg sind hingegen „flexibler“. Es gibt Hinweise dafür, dass sie zu IFN γ -produzierenden Effektor-T-Zellen differenzieren können [206]. Auch andere Gruppen beschrieben die Instabilität der FOXP3-Expression der iTreg [205, 206, 207]. Obwohl die konvertierten CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Zellen phänotypisch der iTreg Subpopulation *in vivo* ähneln [222], wird ihre Funktionalität, d.h. die Fähigkeit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu supprimieren, kontrovers diskutiert [199, 200]. Eine mögliche Erklärung könnte die Instabilität der FOXP3-Expression von TiTreg sein [173,206,223,224].

Mehrere Studien haben jedoch darauf hingewiesen, dass Treg, die aus entzündlichen Stellen isoliert wurden, reduzierte Mengen an FOXP3 exprimieren, was möglicherweise die Anfälligkeit für Autoimmunität erhöht [225]. Die Analyse der phänotypischen und funktionellen Stabilität natürlicher Foxp3⁺ T-Zellen ist bisher vor allem im Mausmodell untersucht worden. Xu et al. und Yang et al. fanden heraus, dass eine Fraktion der peripheren Foxp3⁺ T-Zellen die Foxp3-Expression verlor und nach *in vitro* Stimulation pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-6 und IL-17 produzierte [226,227]. Komatsu et al. und Duarte et al. übertrugen Foxp3⁺ T-Zellen in Mäuse mit Lymphopenie und stellten nach 4–5 Wochen fest, dass etwa 50% der Zellen die Expression von Foxp3 und anderen Treg-Zelloberflächenmarkern verloren hatten [224,228]. Diese Zellen zeigten keine supprimierende Aktivität *in vitro* [206,224,228].

Wan et al. untersuchten die Foxp3 Expression transplanteder Treg *in vivo* im Mausmodell nach über 3 Monaten. 80% der CD4+ CD25+ FOXP3+ Zellen wurden im Verlauf Foxp3 negativ [225]. Obwohl diese „ex-iTreg-“ einige Elemente der Treg-Transkriptionssignatur beibehielten, waren die TCR-Repertoires von iTreg- und ex-iTreg im Wesentlichen nicht überlappend. Daher postulieren sie, kann die Erzeugung einer großen Population von ex-iTreg *in vivo* die Folge einer *in vitro* Umwandlung sein, die auf einer nicht-spezifischen TCR-Vernetzung beruht [225]. *In vitro* generierte iTreg sind aufgrund einer nicht vollständigen Demethylierung der TSDR instabil [79,229].

Hori und Kollegen beschrieben, dass eine kleine Untergruppe von Treg, insbesondere die Untergruppe der CD25- FOXP3+, instabil war und schnell die Foxp3-Expression bei der Übertragung in einen lymphopenen Wirt verlor [77]. Diese Zellen entwickelten einen Effektor-Memory-Phänotyp, produzierten inflammatorische Zytokine und könnten die Entwicklung einer Autoimmunität auslösen. Daher postulierten Hori et al., dass eine dynamische FOXP3-Expression unter normalen physiologischen Bedingungen besteht [77,230]. Diese Studien waren jedoch auf *in vitro* Kulturen oder *in vivo* Übertragungen an lymphopenen Empfänger beschränkt. Die Stimulation von CD4+ CD25+ T-Zellen mit anti-CD3 monoklonalen Antikörpern und IL-2 änderte das Expressionsniveau von FOXP3 nicht. Somit postulieren Hori et al., dass die Foxp3-Expression in CD4+ CD25+ T-Zellen unabhängig von der Art der Aktivierung dieser Zellen ist [230].

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Stabilität der konvertierten FOXP3+ T-Zellen über fünf Tage nur in Kulturmedium untersucht. Bei einem Teil der Zellen wurde die Restimulation durch den Zusatz von 150 U/ml IL-2 durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression von FOXP3+ der konvertierten T-Zellen auch nach viertägiger Ruhephase stabil blieb. Diese Untersuchungen wurde an Patienten mit inaktivem Morbus Crohn durchgeführt und lediglich mit der CD4+ CD25- T-Zellvorläuferpopulation. Funktionsanalysen wurden jedoch nicht durchgeführt, wodurch die Aussagekraft unserer Experimente eingeschränkt ist.

Entscheidend für unsere Analysen war die Entdeckung, dass die FOXP3-Expression in menschlichen T-Zellen, die ursprünglich FOXP3-negativ waren, durch TCR-Aktivierung in Gegenwart von TGF β induziert werden konnte [114,116]. Der scheinbar paradoxe Überschuss an FOXP3+ Zellen in der entzündeten Schleimhaut der Patienten mit Morbus Crohn könnte demnach einer Population lokal aktivierter

CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen entsprechen. Von einigen Arbeitsgruppen wird berichtet, dass T-Zellen des peripheren Blutes, die zur Expression von FOXP3 induziert werden, dennoch *in vitro* wirksame Regulatoren anderer Immunzellen sind [231,232]. Ob diese „induzierten Treg“ (iTreg) *in vivo* alle dieselbe supprimierende Funktion haben wie die FOXP3⁺ „natürlichen“ Treg (nTreg) [200] ist umstritten und lässt sich beim Menschen nur schwer experimentell untersuchen. Auch wir können aufgrund der geringen Fallzahlen keine endgültige Aussage darüber treffen. Eine weitere Limitation stellt die Analyse des peripheren Blutes dar, da die Lamina propria des Darmes ein anderes Mikromilieu als das periphere Blut aufweist.

Die beobachtete Plastizität von Foxp3⁺ Treg kann auch auf epigenetischer Ebene erfasst werden. Kürzlich durchgeführte Studien haben gezeigt, dass es mehrere potenziell redundante Wege der Foxp3-Induktion gibt [233]. Die Foxp3-Induktion und Aufrechterhaltung der Expression scheinen zwei voneinander getrennte Prozesse zu sein, die durch verschiedene cis-regulatorische Elemente innerhalb des *Foxp3*-Gens reguliert werden [79,119,120].

Zusätzlich wurden Treg mit gleichzeitig vorhandenen gegensätzlichen Phänotypen beschrieben. Foxp3⁺ TCR *RAR-related orphan receptor gamma* (ROR) γ ⁺ Zellen beispielsweise besitzen Effektor-T-Zellmerkmale, ohne die Foxp3-Expression verloren zu haben [234,235].

Patienten mit einer chronischen Entzündung weisen mehr Gedächtnis- T-Zellen als naive T-Zellen auf [71]. Interessanterweise zeigen in der vorliegenden Arbeit nur naive CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu gesunden Spendern eine ähnliche Konversionskapazität und ausschließlich diese Zellen bilden eine stabile und suppressive TiTreg Population *in vitro*. Dies wurde von Hoffmann et al. in Konversionsexperimenten mit gesunden Spendern bestätigt [121]. Die Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass die so generierten TiTreg durch eine stabile FOXP3-Expression charakterisiert sind [121,198]. Auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die FOXP3-Expression in konvertierten T-Zellen über mindestens fünf Tage stabil bleibt. Diesbezüglich sind die Ergebnisse mit denen von Zheng et al. im Mausmodell vereinbar [236].

Zusammengefasst gibt es viele Hinweise aus der Literatur, die für eine Plastizität der humanen FOXP3-Expression und damit der Treg-Population sprechen [71,77,89]. Die Interpretation der Ergebnisse dieser Experimente ist jedoch wie oben ausgeführt kontrovers. Aus den Experimenten in der Maus von Komatsu et al. kann man die

Hypothese ableiten, dass eine Foxp3+ irreversibel exprimierende Treg Population existiert und eine kleine Subgruppe die Foxp3-Expression als Reaktion auf externe Stimuli verliert [228]. Weitere Arbeiten werden diese Subpopulation tiefergehend charakterisieren müssen.

4.4. Induktion von FOXP3

Eine weitere Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Rolle von CD28-Aktivierung als kostimulatorisches Signal für die Generierung für TiTreg. Suboptimale Stimulation mit plattengebundenem anti-CD3 und anti-CD28 führen ebenfalls zu einer Konversion von CD4+ T-Zellen in TiTreg [212, 213, 101]. Die Induktion von FOXP3 ist also durch eine TCR-Stimulation mittels anti-CD3 und anti-CD28 möglich [222]. Im Gegensatz dazu wurde TGF β von anderen Gruppen als essentiell für die Funktionalität von Treg identifiziert [116]. Die durch Aktivierung von CD28 induzierte Signalkaskade führt zu einer Transaktivierung des *FOXP3*-Gens [239]. Um die Rolle von CD28 zu definieren, müssen die molekularen Mechanismen der *FOXP3*-Regulation erklärt werden. Mantel et al. haben in Experimenten mit humanen Zellen zeigen können, dass anti-CD3 die *FOXP3*-Promoter Region beeinflusst und zu einer leichten FOXP3-Expression in CD25- Zellen führen kann [240]. Tone et al. führten ähnliche Experimente in murinen und humanen Zellen durch [241]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass aus peripheren naiven CD4+ CD45RA+ T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn durch Zugabe von anti-CD28 und anti-CD3 allein, sowie in Kombination mit TGF β funktionale TiTreg induziert werden können. Damit gibt es einen zusätzlichen Hinweis für die Rolle der Kostimulation über CD28 bei der Bildung von TiTreg.

TGF β stellt einen essentiellen Faktor für die Konversion dar [217, 218]. Ein TGF β -Mangel, wie bei Patienten mit Morbus Crohn beschrieben, kann die Konversion der TiTreg *in vivo* erschweren [243]. Obwohl einige Gruppen erhöhte Konzentrationen an TGF β in einer chronischen Entzündung beschreiben [244], können neutralisierende, intrinsische Antikörper den Effekt von TGF β bei Patienten mit Morbus Crohn abschwächen [243]. TGF β bindet an den TGF-Rezeptor, der zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren *similar to mother against decapentaplegic* (SMAD) führt. Der SMAD-Komplex wird internalisiert und transloziert in den Nukleus. Die Aktivierung von SMAD2-3 aus der SMAD-Superfamilie, wird durch TGF β reguliert [241]. Im Nukleus

werden daraufhin Gene aktiviert, die die Zellproliferation steuern. Auch bei einer SMAD3-Deletion erfährt die Zelle eine leichte Aktivierung von *FOXP3* durch CD3-/CD28-Kostimulation, welche den Nukleären Transkriptionsfaktors (NFAT)-Signalweg nutzt [241]. Tone et al. führten Luciferase-Deletionsassays durch, bei denen abwechselnd die NFAT- und die SMAD3-Regionen deletiert wurden. Bei einer NFAT-Deletion verlor die Zelle jegliche Aktivität. Ein Verlust der SMAD3-Region führte zu einer Restaktivität durch anti-CD3-/CD28-Kostimulation, die durch den NFAT-Signalweg ohne TGF β bestimmt wurde. Dabei postulierten sie, dass in der *enhancer*-Region des *Foxp3* Gens eine Region für NFAT und eine für SMAD3 besteht [241].

Obwohl es noch unklar ist, wie die FOXP3-Expression zur regulatorischen Funktion der Treg beiträgt, korreliert die Frequenz und das zelluläre Expressionsniveau von FOXP3 bei TiTreg mit der suppressiven Kapazität [71]. Nach Stimulation wird der Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1) in Effektor-T-Zellen aktiviert. AP-1 und FOXP3 haben zwei antagonistische Bindungsstellen in der Promotorregion des NFAT für aktivierte T-Zellen [245]. Aufgrund der Wechselwirkung am Promotor können höhere FOXP3-Proteinlevel zu der Konversion von Effektor-T-Zellen zu funktionalen TiTreg erforderlich sein. Wenn die durch TGF β induzierte Konversion von CD4+ T-Zellen zu TiTreg mit suppressiven Eigenschaften führt, könnte in den hier vorgestellten Experimenten ein zu niedriges Expressionsniveau von FOXP3 dazu führen, dass die Funktion der konvertierten Zellen unzureichend ist. Damit übereinstimmend ist bei TiTreg die Demethylierung der TSDR weniger stark ausgeprägt [245]. Daher ist die FOXP3-Expression langfristig nach der Behandlung von CD4+ CD25- T-Zellen mit TGF β und IL-2 nicht suffizient, um funktionale Treg in gesunden Spendern und Patienten mit Morbus Crohn zu generieren.

In Hinblick auf die Konversionskapazität der TiTreg sind die hier vorliegenden Daten vergleichbar mit denen der Arbeitsgruppe um Wang et al. [181]. TiTreg, die aus peripheren CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen von gesunden Spendern unter Zugabe von exogenem TGF β und all-Trans Retinolsäure generiert wurden, wirken stark supprimierend auf Effektorzellen *in vitro* [181].

4.5. Ti-Treg exprimieren CCR4 und β 7

Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz von Treg für eine Zelltherapie ist die Fähigkeit der Zellen an den Ort der Entzündung zu gelangen. Die Antwort auf eine Entzündung wird durch ein Zusammenspiel von Adhäsionsmolekülen und Chemokin Rezeptoren koordiniert [123]. Die erste Barriere für Leukozyten bildet das Endothel. Um dieses zu überwinden, interagieren Leukozyten und das Endothel mit Hilfe von Integrinen [246]. Im Rahmen von chronischen Entzündungen wie dem Morbus Crohn ist die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Entzündung verstärkt [247]. Aktuell wird dies mit der darmspezifischen Integrin-Blockade durch Vedolizumab als Therapie-Ansatz für Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa genutzt [52, 194]. Die Regulation der Migration von Treg ist noch nicht vollständig verstanden. Treg zirkulieren zwischen den Lymphknoten und peripheren Geweben [133]. Durch Expression spezifischer Chemokin Rezeptoren werden sie an den Ort der Entzündung gelockt [130, 224].

Zunächst wurde angenommen, dass CCR4 die Migration der Treg in die Haut leitet [249]. Treg folgen dem Gradienten von CCL17 und CCL22, den CCR4-Liganden, die von dendritischen Zellen ausgeschüttet werden [250]. In einem Mausmodell der intestinalen Entzündung wurde gezeigt, dass Treg, die kein CCR4 exprimieren, nicht in die entzündete Mukosa einwandern und die Erkrankung somit nicht verhindern können [134]. β 7 ist ein Integrin, das als Transmembranprotein die Signalübertragung zwischen Zellen untereinander übermittelt [246]. β 7 leitet hierbei die Migration von Lymphozyten aus dem Gefäß in die lymphatischen Organe [251] und in das *mucosa-associated lymphoid tissue* (MALT)-System [252]. Vor allem die Interaktion von β 7 mit MAdCAM (*mucosal addressin cell adhesion molecule*) befähigt die Lymphozyten zur spezifischen Migration in die intestinale Mukosa durch die Venolen in der Lamina propria [229, 230]. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass iTreg CCR4 und β 7 exprimieren und somit die Voraussetzung erfüllen, in die entzündete Mukosa einzuwandern. Diesbezüglich scheinen die induzierten Zellen von Patienten mit Morbus Crohn kein Defizit gegenüber gesunden Spendern zu haben. Es fanden sich in dieser Arbeit jedoch Unterschiede in der Expression in Bezug auf die Krankheitsaktivität des Morbus Crohn: So war die Expression von β 7 auf iTreg von Patienten mit hoher Entzündungsaktivität reduziert. Es ist denkbar, dass iTreg diesen Marker erst im Lymphknoten exprimieren, damit sie gezielt an den Ort der Entzündung

migrieren können. Die Akkumulation der Treg in der Lamina propria ist wichtig, um die immunologische Balance in der gastrointestinalen Entzündung zu erhalten, exemplarisch dargestellt durch die schwere intestinale Entzündung in Abwesenheit von FOXP3+ Zellen [142].

Expriemieren unterschiedliche Treg-Subgruppen verschiedene Migrationsmoleküle, um definierte Funktionen im Entzündungsgeschehen zu übernehmen? Naive Treg, CD45RA+ CD25++ [71], expriemierten hohe Level an CCR7 und CD62L [255,256], niedrige $\alpha 4\beta 7$ -Level [257] und zirkulieren in die sekundären lymphatischen Organe. Die Zellen schützen vor Allergien, können aber eine aktive Entzündung nicht supprimieren [118, 234]. Die aktivierten Treg, CD45RA- CD25+ [71], expriemieren CCR4 und $\alpha 4\beta 7$, reagieren auf gewebespezifische Chemokine und sind schnell am Ort der Entzündung [84]. So kann postuliert werden, dass die Treg-Subgruppen zu unterschiedlichen Zeiten und Orten in das Entzündungsgeschehen eingreifen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass aktivierte Treg, also CD25+ CD45RA- Treg, das höchste Expressionsniveau für CCR4 haben. TiTreg werden durch $\beta 7$ sowie durch Interaktion mit CCR4 in den entzündeten Dünndarm rekrutiert. Diese Treg entstehen aus CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen nach Aktivierung durch Kostimulation von CD3 und CD28 und/ oder TGF β . Diese Daten konnten in Mausmodell bestätigt werden [134, 135].

Eine weitere Treg-Subgruppe sind gewebeständige Treg. Bisher untersucht sind dabei Treg der intestinalen Mukosa und des Fettgewebes. Treg der intestinalen Mukosa stehen in enger Interaktion mit den kommensalen Darmbakterien, die zu deren Generierung, Proliferation und Migration beitragen [259]. Treg der intestinalen Mukosa besitzen z.B. einen Rezeptor für kurzkettige Fettsäuren, der Treg, die aus peripherem Blut isoliert wurden, fehlt [260].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Zellen von Patienten mit einem akuten Schub des Morbus Crohn, inaktivem Crohn und gesunden Spendern gleichermaßen Migrationsmoleküle expriemieren. TiTreg von Patienten mit Morbus Crohn expriemierten $\beta 7$ und CCR4 und haben die Fähigkeit in den Darm zu migrieren. Damit bleiben sie potenzielle Ausgangszellen für eine zellbasierte Therapie.

4.6. Antigen-spezifische Treg

Organ-spezifische Treg können durch Aktivierung mit dendritischen Zellen generiert werden [261]. Hierzu müssen jedoch die relevanten Organ-spezifischen Antigene zunächst identifiziert werden, um dann die in polyklonalen Populationen vorkommenden niedrig-frequenten Treg zu expandieren. Es gibt einige Nachteile bezüglich der klinischen Anwendung von polyklonal expandiertem Treg. Erstens, polyklonal expandierte Treg können unspezifisch Immunreaktionen supprimieren, wodurch beispielsweise das Risiko für opportunistische Infektionen und Tumorwachstum erhöht werden könnte [262]. Zweitens müssen aufgrund des geringen Prozentsatzes an Treg in einem polyklonalen Zellpool, der für ein bestimmtes Zielantigen spezifisch ist, mutmaßlich eine große Anzahl von Treg infundiert werden [263]. Diese Schwierigkeiten könnten durch die Verwendung von *in vitro* expandierten Antigen-spezifischen Treg überwunden werden [212]. Das Darm-assoziierte Lymphgewebe ist das größte Immunorgan im Körper und der primäre Weg, auf dem wir Antigenen aus der Nahrung ausgesetzt sind. Eine immunologische Toleranzentwicklung ist daher ein notwendiger Anpassungsmechanismus im Darm, zum Beispiel durch Anergie der T-Zellen oder durch Induktion von Treg [107]. Nach Aktivierung können dendritischen Zellen Treg induzieren [107]. Insbesondere wurde bei der Nahrungszufuhr mit bestimmten Antigenen eine TGF β -produzierende CD4+ T-Zellpopulation in der Lamina propria und in dem Darm assoziierten Immunsystem identifiziert, die eine Immunreaktionen auf diese Nahrungsmoleküle durch Induktion der oralen Toleranz aktiv unterdrücken können [107]. In dieser Umgebung induziert die Antigenexposition die Differenzierung von iTreg [114]. Um eine Antigen-spezifische Treg-Therapie zu entwickeln, müssen mindestens einige der vorherrschenden Antigene identifiziert werden, die die Effektor-T-Zell-Reaktionen im Darm verstärken. Unter der Annahme, dass aktivierte Treg T-Zellen mit anderer bzw. unterschiedlicher Antigen-spezifität unterdrücken können, wäre es denkbar, Treg zu verabreichen, die für ein antigenspezifisch sind, das nicht im Zusammenhang mit der Erkrankung steht. Dies wäre vor allem ein Ansatz, wenn die krankheitsassoziierten Antigene nicht bekannt sind. Unter Verwendung von aus Patienten mit Morbus Crohn isolierten T-Zell-Klonen fanden Duchmann et al., dass viele der T-Zell-Klone für die Mikrobiota des Darms spezifisch sind [264]. Die CATS1-Studie konnte erste Ergebnisse für den klinischen Einsatz von Antigen-spezifischen Treg bei Patienten mit refraktärem Morbus Crohn

liefern. Hier erfolgte die adaptive Übertragung von Treg bei Patienten mit Morbus Crohn in einer achtwöchigen Studie mit 20 Patienten [265]. Die übertragenen Treg wurden ausgewählt und kloniert, um spezifisch für ein diätetisches Antigen (Hühnerei-Ovalbumin) zu sein, so dass die antigenspezifische Aktivierung der übertragenen Zellen im Gastrointestinaltrakt durch Eier (orale Applikation in Form einer Nachspeise) stimuliert werden konnte [265]. Vierzig % der Empfänger zeigten eine klinische Verbesserung bezüglich der Morbus Crohn Erkrankung, obwohl die meisten Verbesserungen paradoxerweise bei den Empfängern der kleinsten Anzahl von Treg beobachtet wurden. Es wurde nur eine minimale Verbesserung der Entzündungsaktivität durch objektivierbare Methoden wie C-reaktives Protein und fäkales Calprotectin beobachtet. Weitere Arbeiten werden zeigen müssen, ob dieser Ansatz weiterentwickelt werden kann [265]. Es wird angenommen, dass andere Faktoren, wie die Treg-Antigenspezifität oder die hemmende Funktion, wichtiger sein könnten als die Treg-Zahlen [265].

In einer Studie von Tang et al. mit Patienten mit Diabetes mellitus konnte im Mausmodell festgestellt werden, dass Treg, die für Inselzell-Antigen spezifisch waren, signifikant effizienter waren als polyklonale Treg bei der Regulierung der Erkrankung *in vivo* [266]. Bereits geringere Mengen an Antigen-spezifischen Treg reichten aus, um das Auftreten von Diabetes in einem Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne (NOD)-Modell zu verhindern [267]. In ähnlicher Weise gibt es einige Hinweise, die eine essentielle Rolle für Antigen-spezifische Zellen bei der Behandlung der GvHD unterstützen [266,268,269].

Die größte Herausforderung bei der Antigen-spezifischen Treg-Therapie besteht in der Isolierung ausreichender Mengen an Antigen-spezifischen T-Zellen. Die Zellen müssen entweder *de novo* durch Umwandlung von naiven T-Zellen oder durch FOXP3-Gentransfer generiert werden oder *in vitro* isoliert und expandiert werden, um therapeutisch relevante Zahlen zu erreichen [270]. Zusätzlich müssten Antikörper, die für Selbst- oder Alloantigene spezifisch sind, charakterisiert werden, um Antigen-spezifische Treg produzieren zu können. Die Auswahl von Antigenen, auf die Antigen-spezifische Treg abzielen, und die Entwicklung spezifischer Antikörper sind in einigen Krankheitsmodellen, wie zum Beispiel im murinen Kolitismodell [271], schwierig [272]. Zudem bestehen aktuell noch verschiedene Protokolle zur Erstellung von Antigen-spezifischen Treg, die weiterer Überprüfung bedürfen [273].

4.7 Treg: Ausblick für den klinischen Einsatz

Die Homöostase des Darms hängt von komplexen Wechselwirkungen zwischen der Mikrobiota, dem Darmepithel und dem Immunsystem des Wirtes ab. Verschiedene Regulationsmechanismen arbeiten zusammen, um die Homöostase des Darms aufrechtzuerhalten und ein Zusammenbruch dieser Mechanismen kann eine chronische Entzündung des Darmes auslösen [8,22,29]. Die genaue Ätiologie des Morbus Crohn bleibt unklar, aber es wurden mehrere Faktoren identifiziert, die einen wesentlichen Beitrag zur Pathogenese der Krankheit leisten [274]. Diese lassen sich in drei verschiedene Kategorien einteilen: Genetische Faktoren, das Immunsystem des Wirtes und Umweltfaktoren wie die Darmmikrobiota [106]. Auf zellulärer Ebene stellt das Zusammenspiel zwischen Darmepithelzellen, Darmmikrobiota und lokalen Immunzellen eines der grundlegenden Merkmale der intestinalen Homöostase dar. Man nimmt an, dass die entzündliche Darmerkrankungen durch Barrierestörungen verursacht werden, die zu einer Veränderung der Darmflora und zu einer abweichenden Aktivierung des mukosalen Immunsystems führen [275]. Die daraus resultierende chronische Entzündungsreaktion hängt stark von der Anwesenheit von CD4+ T-Helferzellen ab [146]. In ähnlicher Weise deuten Daten beim Menschen darauf hin, dass Morbus Crohn durch T-Helfer-Zell (Th)1- und Th17-Reaktionen ausgelöst wird, da entzündete Läsionen erhöhte Konzentrationen an Th1-assoziierten und Th17-assoziierten Zytokinen enthalten [29]. Im Vergleich zu allen anderen Geweben hat die intestinale Lamina Propria unter normalen Bedingungen den größten Anteil an Treg [74, 75] von denen angenommen wird, dass sie hauptsächlich für Antigene der Lebensmittel und kommensalen Flora spezifisch sind [276]. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Zunahme aktivierter T-Zellen in Patienten mit Morbus Crohn das Ergebnis eines numerischen Mangels an Treg, eines Funktionsfehlers, einer Resistenz von Effektor-T-Zellen gegen die Suppression *in vitro* oder einer Kombination dieser Möglichkeiten ist [145]. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass die funktionellen Treg-Assays in diesen Studien *in vitro* durchgeführt wurden, unter Verwendung einer unspezifischen Antigenstimulation und unter Bedingungen, bei denen es an der Vielfalt der Zytokine, die sich in der entzündeten Darmumgebung befinden würden, fehlt. Diese Einschränkung gilt auch für die Experimente in dieser Doktorarbeit.

Wenn der entzündete Darm eine normale Anzahl von Treg hat, die zumindest *in vitro* funktionell erscheinen, warum können sie dann die Entzündung nicht blockieren? Bei

anderen Autoimmunkrankheiten, einschließlich Typ-1-Diabetes und Multipler Sklerose, gibt es umfangreiche Hinweise darauf, dass der Defekt bei der Immunregulation in der Effektorzelle / Entzündungsumgebung und nicht in den Treg selbst liegt [66,71,217,219,266,278]. Bei Patienten mit Morbus Crohn stellt sich daher zusätzlich die Frage, ob mukosale T-Zellen gegenüber Treg-vermittelter Suppression resistent sein könnten. Bekannt ist, dass Treg, die aus entzündeter Mukosa von Patienten mit Morbus Crohn gewonnen werden, die Proliferation von herkömmlichem CD4+ CD25- Effektor-T-Zellen supprimieren, die Treg aus dem Blut, jedoch nicht ausreichend suppressiv gegenüber mukosalen Effektor-T-Zellen sind [116]. Mukosale Effektor-T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn überexprimieren Smad7, einen Inhibitor des TGF β -Signalwegs, der Resistenz gegen Treg-vermittelte Suppression verleiht [203,279].

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass der *in vivo*-Transfer von CD4+ CD25+ suppressiven Zellen in der Maus vor immunologisch vermittelten Erkrankungen wie Diabetes mellitus [267], Multiple Sklerose [280] und Colitis [148] schützt.

Allogene Treg wurden in Deutschland und den USA bei Patienten mit GvHD infundiert. Diese Studien verwendeten MACS-Techniken zur Aufreinigung der Treg [281]. Die endgültigen Isolationsprodukte enthielten ~ 50% Treg (CD4+ CD25+ FOXP3+), wie durch Durchflusszytometrie bestimmt wurde. In Phase-I-Dosis-Eskalationsstudien wurde Nabelschnurblut für die Treg-Isolierung verwendet, da Nabelschnurblut praktisch keine Gedächtnis-T-Zellen enthält [156]. Obwohl CD25++ Treg leichter aus dem Nabelschnurblut als aus peripherem Blut aufgereinigt werden können, können nur ~ 5–7,5 $\times 10^6$ Treg aus einer gefrorenen Nabelschnurblut-Einheit isoliert werden [281]. So ist es schwierig, hohe Treg: Effektor-T-Zell-Verhältnisse zu erreichen. Ein weiterer Nachteil von Nabelschnurblut ist, dass es bisher als allogene Zellquelle eingesetzt wurde, was ein Abgleich im Humane Leukozytenantigen-System (HLA System) erforderlich machte.

Es ist noch unklar, was eine therapeutische Dosis von Treg ausmacht. Die Antwort hängt von vielen Faktoren ab, einschließlich der spezifischen Erkrankung und davon, ob polyklonale oder Antigen-spezifische Treg eingesetzt werden. Um Treg-Dosierungsstrategien zu definieren, ist eine hohe Treg-Proliferationskapazität erforderlich. Es wurde berichtet, dass humane Treg unter Verwendung eines auf Mauszellen basierenden künstlichen APC-Systems (aAPC) innerhalb von 3–4 Wochen um das 40.000-fache expandiert werden konnten [218], unter der Annahme

einer stabilen FOXP3 Expression. Nachfolgende Studien haben verschiedene Expansionsgrade unter Verwendung von anti-CD3 / -CD28-beschichteten Beads (wofür GMP-Protokolle verfügbar sind) in Gegenwart von hohen IL-2-Spiegeln berichtet [281,282].

Bisher bestehen zwei Hauptmethoden, um die Treg Zellzahl zu erhöhen. Zum einen ist eine *ex vivo* Expansion mit anschließendem Transfer in den Patienten [155] und zum anderen die Konversion aus Th-Zellen denkbar. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass der Transfer expandierter Treg sicher ist und den Schweregrad der Erkrankungen, wie z.B. der experimentellen Kolitis, verringern kann [239,240,148]. Humane, expandierte CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ CD45RA⁺ Treg tragen einen epigenetisch stabilen FOXP3-Locus und konvertieren nicht in Effektor-T-Zellen in der *in vitro*-Kultur [220]. Die Expansion der Treg wird meist durch Kostimulation von CD3 und CD28 [283] in Gegenwart von IL-2 [284] durchgeführt. Diese Methode ist noch mit Unsicherheiten verbunden. Es muss aufgrund der Heterogenität der FOXP3⁺ Zellen die Ausgangs-Treg-Population für die Expansion genau definiert werden [89]. Die CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ Zellpopulation enthält CD45RA⁻ Treg, die potenziell pro-inflammatorische Zytokine produzieren [29]. CD45RA⁺ FOXP3⁺ Treg haben das höchste Potenzial, nach Expansion eine stabile FOXP3-Expression beizubehalten [121]. Daher wäre die naive CD45RA⁺ Treg Population die am besten geeignete für eine *ex vivo* Expansion. Diese Expansionsmethode hat jedoch auch Nachteile. So gehen Treg nach Expansion in Apoptose [285]. Trotz hoher Reinheiten der Treg kann es bei der Expansion zu einer Dominanz von T-Zellen kommen, die pro-inflammatorische Zytokine produzieren und das Entzündungsgeschehen damit verstärken könnten [121]. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die Unsicherheit, ob *ex vivo* expandierte Treg auch *in vivo* in einem pro-inflammatorischen Milieu ihre FOXP3-Expression und ihre regulatorische Funktion beibehalten.

Mit dem zweiten Ansatz werden aus CD4⁺ CD25⁻ FOXP3⁻ T-Zellen, die in großer Zahl im peripheren Blut des Menschen vorhanden sind, iTreg generiert. Obwohl einige Spezies-spezifische Unterschiede wahrscheinlich sind, können murine iTreg nach *ex vivo* Exposition von naiven CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen mit TGFβ [114,230], insbesondere in Gegenwart von IL-2, erzeugt werden. Aus unseren Experimenten ergeben sich Hinweise, dass aus dieser Vorläuferpopulation potenzielle Treg generiert werden, die nicht nur funktionell in der Lage sind, die Proliferation von T-Zellen einzudämmen, sondern auch aufgrund der von ihnen exprimierten

Oberflächenmoleküle auch das Potential hätten, an den Ort der Entzündung zu gelangen. TiTreg von Patienten mit inaktivem Morbus Crohn und gesunden Spendern wiesen in unseren Versuchen eine gleich starke, suppressorische Kapazität auf, die durch die Zugabe von TGF β und IL-2 während der Konversion gesteigert wurde. Wir führten dafür Suppressionsassays mit TiTreg von Patienten mit inaktiver Erkrankung im Vergleich zu Gesunden durch. Aufgrund der geringen Fallzahlen (3 gesunde Spender und 3 Patienten mit Morbus Crohn) sind unsere Versuche jedoch nur eingeschränkt aussagekräftig.

Im Mausmodell wurde eine starke Plastizität der Treg-Population postuliert [225]. Die iTreg-Subgruppe entwickelt sich wie beschrieben nach peripherer Aktivierung aus Th-Zellen. Wenn hohe Konzentrationen des Zytokins IL-6 vorhanden sind, werden T-Zellen in Anwesenheit von TGF β und über den TCR ROR γ aktiviert und es entwickeln sich pro-inflammatorische Th17-Zellen, die das Zytokin IL-17 produzieren [235]. Th17-Zellen produzieren weitere pro-inflammatorische Zytokine wie IL-21. IL-21 ist in Läsionen von CED-Patienten in hohen Konzentrationen vorzufinden [286]. Th17-Zellen werden auch mit zahlreichen Autoimmunerkrankungen neben CED assoziiert [287]. iTreg- und Th17-Zellen scheinen ein ähnliches Rezeptorrepertoire, Entwicklungsvorläufer und Differenzierungssignale zu haben, doch unterscheiden sie sich in ihrer Rolle in der Immunantwort [288]. Tatsächlich deutet die erhöhte Methylierung des FOXP3-Locus von iTreg gegenüber der von nTreg darauf hin, dass die iTreg-Subgruppe als eine flexiblere Linie dienen kann, die sich an die inflammatorische Umgebung anpasst [118]. Die Beurteilung, ob iTreg die FOXP3-Expression herunterregulieren und zu Th17 werden können, stellt den Gegenstand aktueller Untersuchungen dar. Es ist wahrscheinlich, dass die Kontrolle des iTreg-/Th17-Gleichgewichts und die Stabilität von iTreg wichtige immunregulatorische Kontrollpunkte sind [289]. Obwohl potenziell vielversprechend, gibt es nur wenige Daten bezüglich der Ausbeute, Stabilität und Plastizität von iTreg, die sowohl durch *in vitro*- als auch *in vivo*-Maßnahmen bewertet werden. Es wäre daher verfrüht zu beurteilen, ob die iTreg-Generation die technischen Einschränkungen der Herstellung einer großen Anzahl natürlicher Treg mit GMP-Reagenzien umgehen kann.

Es bleiben weitere Fragen offen: Behalten TiTreg nach Applikation *in vivo* ihren Phänotyp und ihre suppressive Kapazität oder konvertieren sie zurück zu CD4+ FOXP3- T-Zellen? Es ist denkbar, dass T-Zellen, die pro-inflammatorische Zytokine produzieren, Treg zu Th17-Zellen umwandeln können. Hovhannisyanyan et al.

zeigten, dass Patienten mit Morbus Crohn eine erhöhte Anzahl an IL-17 produzierenden FOXP3+ T-Zellen haben und sie trotzdem *in vitro* suppressiv sind [288]. Es bleibt unklar, ob Treg ihre suppressiven Eigenschaften in der Entzündung trotz Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in diesem Milieu behalten. So beschrieben Feng et al., dass Treg aus der Maus IFN- γ produzieren. Trotzdem blieben sie gleichzeitig Foxp3+ und behielten ihre suppressiven Eigenschaften [290]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass konvertierte FOXP3+ Zellen nach einer fünftägigen Ruhephase stabil bezüglich Foxp3+-Expression sind.

Die ersten Experimente im Menschen zeigen, dass die Applikation von Treg sicher ist [155], dennoch bleiben Bedenken bei dem Einsatz von Treg in größerer Anzahl. Erste Versuche im Einsatz von Treg beim Menschen wurden bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1 und der GvHD durchgeführt. In der GvHD konnten bereits *in vitro* induzierte Treg eingesetzt werden und ihre Wirksamkeit zeigen [291]. Beim adaptiven Transfer von *ex vivo* expandierten CD4+ CD25+ CD127- Treg bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ 1 konnte im Verlauf von einem Jahr ein verminderter Insulinbedarf und die Sicherheit der Übertragung von Treg beobachtet werden [254, 255].

Vor einem weiteren Einsatz experimenteller Therapien bei Patienten mit CED stehen auch ethische Fragen: Da Morbus Crohn keine lebensbedrohliche Erkrankung ist, ist es fraglich ob man eine Zelltherapie, die nicht langfristig erprobt ist, mit den oben genannten Risiken einsetzen kann. Globale Immunsuppression geht mit einem erhöhtem Krebsrisiko und Infektionsrisiko einher [131]. Diesem Risiko könnte durch den Einsatz von Antigen-spezifischen Treg vorgebeugt werden [294]. Die Wirksamkeit der gegenwärtigen medikamentösen Optionen, wie TNF- α Antikörper, stellt hohe Anforderung an eine Treg-Therapie. Bisher wurden klinische Studien nur an einer kleinen Fallzahl durchgeführt, die nur relativ geringe Effekte auf die Entwicklung der Erkrankung aufzeigten.

Obwohl viele Unsicherheiten bleiben: Treg spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von anti-inflammatorischen Prozessen. Mit zunehmendem Erkenntnisgewinn der unterschiedlichen Treg-Subgruppen kann ein größeres Verständnis für diese Zellart gewonnen werden. Zudem werden langsam die Mechanismen, die zur Stabilität einer Zellpopulation beitragen und deren Plastizität verhindern, besser verstanden.

Weitere Studien werden benötigt, um Treg für die Zelltherapie zu evaluieren. So sollte der Einfluss der Medikation der Patienten in Betracht gezogen werden, nicht nur in Bezug auf die Treg, sondern auch auf die Generierung und Funktion der TiTreg.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TiTreg aus naiven T-Zellen in Patienten mit Morbus Crohn generiert werden können und deren suppressive Kapazität vergleichbar mit Zellen von gesunden Spendern ist. TiTreg exprimieren Migrationsmoleküle für den Darm und können so theoretisch an den Ort der Entzündung gelangen. Diese Ergebnisse legen für die zellbasierte Therapie von Patienten mit Morbus Crohn nahe, dass naive periphere T-Zellen von Patienten mit Morbus Crohn als potenzielle Quelle für funktionale TiTreg nutzbar sind und bevorzugt in einer Phase mit geringer Krankheitsaktivität gewonnen werden sollten.

5. Zusammenfassung

Morbus Crohn ist eine schubförmig verlaufende, chronisch entzündliche Erkrankung des Darmes. Eine große Rolle in der Krankheitsentstehung scheint eine Dysbalance pro- und anti-inflammatorischer Mechanismen zu spielen. Die Zelltherapie mit regulatorischen T-Zellen (Treg) könnte eine Alternative zu den derzeit bestehenden Therapieoptionen darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden Treg aus dem peripheren Blut phänotypisch charakterisiert und suppressorische Zellen aus unterschiedlichen Lymphozytensubpopulationen generiert sowie deren suppressive Eigenschaft *in vitro* untersucht.

Die phänotypische Definition von Treg bei Gesunden ist bislang nicht einheitlich. Treg sind unter anderem CD4+, CD25+ und FOXP3+ Zellen. Weiterhin wurden Treg als CD4+ CD25+ CD127- CD49d- T-Zellen beschrieben, die suppressiv sind. Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von CD127 und CD49d bei Patienten mit Morbus Crohn und die Veränderungen in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität und Therapie mit Infliximab untersucht. Patienten mit Morbus Crohn hatten signifikant mehr CD4+ CD25+ CD127- T-Zellen als gesunde Spender, CD49d wurde gleich stark bei Gesunden und Kranken exprimiert. In der Literatur wurde eine Erhöhung der FOXP3+ Treg in Patienten mit inaktivem Morbus Crohn, oder unter erfolgreicher Therapie mit Infliximab, beschrieben. Die Marker CD127 und CD49d konnten diese Verschiebungen im Treg-Verhältnis nicht widerspiegeln. Miyara et al. definierten aktivierte und ruhende Treg, sowie CD25+ CD45RA- FOXP3-exprimierende Zellen ohne regulatorische Funktion [71]. Eigene durchflusszytometrische Analysen haben gezeigt, dass Patienten mit Morbus Crohn signifikant mehr aktivierte Treg CD4+ CD25++ CD45RA- T-Zellen und CD4+ CD25+ CD45RA- FOXP3-exprimierende Zellen ohne regulatorische Funktion aufwiesen als Gesunde. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Konversionsassays und Suppressionsassays die Generierung von TiTreg untersucht. Die *in vitro*-Generierung von FOXP3+ T-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Morbus Crohn aus unfraktionierten CD4+ CD25- T-Zellen und aus naiven CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen ist möglich. Mit Treg vergleichbare, suppressive Eigenschaften entwickeln jedoch nur die TiTreg, die aus naiven CD4+ CD25- CD45RA+ T-Zellen generiert werden. TiTreg exprimieren

Migrationsmarker wie den Chemokin Rezeptor $\beta 7$ und CCR4, die ein Einwandern in die intestinale Mukosa ermöglichen.

In zukünftigen Untersuchungen ist es wichtig zu unterscheiden, welche Auswirkungen die Therapie mit Immunsuppressiva und die Krankheitsaktivität auf die Funktionalität der T_HTreg haben. Zudem bedarf es weiterer Untersuchungen zur Stabilität des Phänotyps und der Funktion der induzierten Zellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *The Lancet*. 3. November 2012;380(9853):1590–605.
2. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;170:2–6; discussion 16-19.
3. Daiss W, Scheurlen M, Malchow H. Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in the County of Tübingen (West Germany) [Internet]. 2009 [zitiert 11. Januar 2014]. Verfügbar unter: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/00365528909091349>
4. Burbige EJ, Huang S-S, Bayless TM. Clinical Manifestations of Crohn's Disease in Children and Adolescents. *Pediatrics*. 6. Januar 1975;55(6):866–71.
5. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J-F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. Juni 2006;55(6):749–53.
6. Ardizzone S, Puttini PS, Cassinotti A, Porro GB. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*. Juli 2008;40, Supplement 2:S253–9.
7. Harvey RF, Bradshaw JM. A SIMPLE INDEX OF CROHN'S-DISEASE ACTIVITY. *The Lancet*. März 1980;315(8167):514.
8. Scaldaferri F, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis*. 2007;8(4):171–178.
9. Loftus Jr EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. Mai 2004;126(6):1504–17.
10. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *The Lancet*. 26. März 1994;343(8900):766–7.
11. Tuvlin JA, Raza SS, Bracamonte S, Julian C, Hanauer SB, Nicolae DL, King AC, Cho JH. Smoking and inflammatory bowel disease: Trends in familial and sporadic cohorts. *Inflamm Bowel Dis*. Mai 2007;13(5):573–9.
12. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science*. 18. Dezember 2009;326(5960):1694–7.
13. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. März 2011;108(Suppl 1):4586–91.
14. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, McHardy AC, Yatsunenkov T, Niazi F, Affourtit J, Egholm M, Henrissat B, Knight R, Gordon JI. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20. April 2010;107(16):7503–8.

15. Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, Gonzalez A, Fontana L, Henrissat B, Knight R, Gordon JI. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*. 20. Mai 2011;332(6032):970–4.
16. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. März 2011;108(Suppl 1):4554–61.
17. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto J-M, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, MetaHIT Consortium (additional Members), Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 12. Mai 2011;473(7346):174–80.
18. Knights D, Lassen KG, Xavier RJ. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut* [Internet]. Oktober 2013 [zitiert 26. Januar 2017];62(10). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3822528/>
19. Moussata D, Goetz M, Gloeckner A, Kerner M, Campbell B, Hoffman A, Biesterfeld S, Flourie B, Saurin J-C, Galle PR, Neurath MF, Watson AJM, Kiesslich R. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo. *Gut*. 1. Januar 2011;60(1):26–33.
20. Buisine MP, Desreumaux P, Debailleul V, Gambiez L, Geboes K, Ectors N, Delescaut MP, Degand P, Aubert JP, Colombel JF, Porchet N. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. Februar 1999;5(1):24–32.
21. Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzén LE, Lindmark T, Wirén M, Tagesson C, Sjö Dahl R. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of crohn's disease. *Gut*. 2002;50(3):307–13.
22. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *The Lancet*. 16. Juni 2001;357(9272):1925–8.
23. Hugot J-P. CARD15/NOD2 Mutations in Crohn's Disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1072(1):9–18.
24. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar J-P, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 31. Mai 2001;411(6837):603–6.
25. van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, McGovern DP, Onnie C, Negoro K, Goldthorpe S, Foxwell BM, Mathew CG, Forbes A, Jewell DP, Playford RJ. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *The Lancet*. 21;365(9473):1794–6.

26. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJP, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med.* Januar 2010;16(1):90–7.
27. Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 21. Juli 2008;14(27):4280–8.
28. Huibregtse IL, van Lent AU, van Deventer SJH. Immunopathogenesis of IBD: insufficient suppressor function in the gut? *Gut.* 1. April 2007;56(4):584–92.
29. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3+ Regulatory T Cells, Th17 Effector Cells, and Cytokine Environment in Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Immunol.* 1. Januar 2010;30(1):80–9.
30. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol.* März 1997;150(3):823–32.
31. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut.* 2009;58(8):1152–67.
32. Bamias G, Martin C, Mishina M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Marini M, Cominelli F. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 1. März 2005;128(3):654–66.
33. Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, Blank MA, Johanns J, Gao L-L, Miao Y, Adedokun OJ, Sands BE, Hanauer SB, Vermeire S, Targan S, Ghosh S, de Villiers WJ, Colombel J-F, Tulassay Z, Seidler U, Salzberg BA, Desreumaux P, Lee SD, Loftus EVJr, Dieleman LA, Katz S, Rutgeerts P. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med.* 17. November 2016;375(20):1946–60.
34. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, Lichtiger S, D'Haens G, Diamond RH, Broussard DL, Tang KL, van der Woude CJ, Rutgeerts P. Infliximab, Azathioprine, or Combination Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med.* 2010;362(15):1383–95.
35. Greenberg GR, Feagan BG, Martin F, Sutherland LR, Thomson A, Williams CN, Nilsson L-G, Persson T. Oral Budesonide for Active Crohn's Disease. *N Engl J Med.* 1994;331(13):836–41.
36. Nunes T, Barreiro-de Acosta M, Marin-Jiménez I, Nos P, Sans M. Oral locally active steroids in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 1. April 2013;7(3):183–91.
37. Steinhart AH, Ewe K, Griffiths AM, Modigliani R, Thomsen OO. Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1996 [zitiert 11. Januar 2014]. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD000301/abstract>
38. Benchimol EI, Seow CH, Steinhart AH, Griffiths AM. Traditional corticosteroids for induction of remission in Crohn's disease. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1996 [zitiert 11. Januar 2014]. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD006792.pub2/abstract>

39. Sandborn WJ, Sutherland LR, Pearson D, May G, Modigliani R, Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. In: Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1996 [zitiert 11. Januar 2014]. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD000545/abstract>
40. Pearson D, May G, Fick G, Sutherland L. Azathioprine for maintenance of remission in Crohn's disease. In: Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1996 [zitiert 11. Januar 2014]. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD000067/abstract>
41. Summers RW, Switz DM, Sessions JT Jr, Beckett JM, Best WR, Kern F Jr, Singleton JW. National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment. *Gastroenterology*. Oktober 1979;77(4 Pt 2):847–69.
42. Malchow H, Ewe K, Brandes JW, Goebell H, Ehms H, Sommer H, Jesdinsky H. European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment. *Gastroenterology*. Februar 1984;86(2):249–66.
43. Kamm MA. Review article: chronic active disease and maintaining remission in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. Oktober 2004;20 Suppl 4:102–5.
44. Ludwig D, Stange EF. Efficacy of azathioprine in the treatment of chronic active Crohn's disease: prospective one-year follow-up study. German Imurek Study Group. *Z Für Gastroenterol*. November 1999;37(11):1085–91.
45. LÉmann M, Mary J, Duclos B, Veyrac M, Dupas J, Delchier JC, Laharie D, Moreau J, Cadiot G, Picon L, Bourreille A, Sobahni I, Colombel J. Infliximab Plus Azathioprine for Steroid-Dependent Crohn's Disease Patients: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Gastroenterology*. April 2006;130(4):1054–61.
46. Jilani NZ, Akobeng AK. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P et al. *Gastroenterology* 2007;132:52-65. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. Februar 2008;46(2):226–7.
47. Schreiber S, Rutgeerts P, Fedorak RN, Khaliq-Kareemi M, Kamm MA, Boivin M, Bernstein CN, Staun M, Thomsen OØ, Innes A. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Certolizumab Pegol (CDP870) for Treatment of Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 1. September 2005;129(3):807–18.
48. EMA Entyvio. European Medicines Agency - Find medicine - Entyvio [Internet]. [zitiert 5. Juni 2017]. Verfügbar unter: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002782/human_med_001751.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
49. EMA Stelara. European Medicines Agency - Find medicine - Stelara [Internet]. [zitiert 5. Juni 2017]. Verfügbar unter: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000958/human_med_001065.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
50. Soler D, Chapman T, Yang L-L, Wyant T, Egan R, Fedyk ER. The Binding Specificity and Selective Antagonism of Vedolizumab, an Anti- $\alpha\beta 7$ Integrin Therapeutic Antibody in Development for Inflammatory Bowel Diseases. *J Pharmacol Exp Ther*. 1. September 2009;330(3):864–75.

51. Erle DJ, Briskin MJ, Butcher EC, Garcia-Pardo A, Lazarovits AI, Tidswell M. Expression and function of the MADCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. *J Immunol.* 15. Juli 1994;153(2):517–28.
52. Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel J-F, Sandborn WJ, Van Assche G, Axler J, Kim H-J, Danese S, Fox I, Milch C, Sankoh S, Wyant T, Xu J, Parikh A. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med.* 22. August 2013;369(8):699–710.
53. Webster JI, Sternberg EM. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. *J Endocrinol.* 5. Januar 2004;181(2):207–21.
54. Dempster DW, Arlot MA, Meunier PJ. Mean wall thickness and formation periods of trabecular bone packets in corticosteroid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* Juli 1983;35(4–5):410–7.
55. Tiwari A, Goel M, Pal P, Gohiya P. Topical-steroid-induced iatrogenic Cushing syndrome in the pediatric age group: A rare case report. *Indian J Endocrinol Metab.* Oktober 2013;17(Suppl1):S257–8.
56. Sayani FA, Prosser C, Bailey RJ, Jacobs P, Fedorak RN. Thiopurine methyltransferase enzyme activity determination before treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine: effect on cost and adverse events. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol.* März 2005;19(3):147–51.
57. Sturdevant RA, Singleton JW, Deren JL, Law DH, McCleery JL. Azathioprine-related pancreatitis in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* Oktober 1979;77(4 Pt 2):883–6.
58. Chun JY, Kang B, Lee YM, Lee SY, Kim MJ, Choe YH. Adverse Events Associated with Azathioprine Treatment in Korean Pediatric Inflammatory Bowel Disease Patients. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* September 2013;16(3):171–7.
59. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis Associated with Infliximab, a Tumor Necrosis Factor α -Neutralizing Agent. *N Engl J Med.* 2001;345(15):1098–104.
60. Loras C, Gisbert JP, Mínguez M, Merino O, Bujanda L, Saro C, Domenech E, Barrio J, Andreu M, Ordás I, Vida L, Bastida G, González-Huix F, Piqueras M, Ginard D, Calvet X, Gutiérrez A, Abad A, Torres M, Panés J, Chaparro M, Pascual I, Rodríguez-Carballeira M, Fernández-Bañares F, Viver JM, Esteve M, REPENTINA study, GETECCU (Grupo Español de Enfermedades de Crohn y Colitis Ulcerosa) Group. Liver dysfunction related to hepatitis B and C in patients with inflammatory bowel disease treated with immunosuppressive therapy. *Gut.* Oktober 2010;59(10):1340–6.
61. Long MD, Martin CF, Pipkin CA, Herfarth HH, Sandler RS, Kappelman MD. Risk of Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer Among Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 1. August 2012;143(2):390-399.e1.
62. Deepak P, Sifuentes H, Sherid M, Stobaugh D, Sadozai Y, Ehrenpreis ED. T-Cell Non-Hodgkin's Lymphomas Reported to the FDA AERS With Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) Inhibitors: Results of the REFURBISH Study. *Am J Gastroenterol.* Januar 2013;108(1):99–105.

63. Sokol H, Beaugerie L, Maynadié M, Laharie D, Dupas J-L, Flourié B, Lerebours E, Peyrin-Biroulet L, Allez M, Simon T, Carrat F, Brousse N, CESAME Study Group. Excess primary intestinal lymphoproliferative disorders in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. November 2012;18(11):2063–71.
64. Colombel J-F, Sands BE, Rutgeerts P, Sandborn W, Danese S, D'Haens G, Panaccione R, Loftus EV, Sankoh S, Fox I, Parikh A, Milch C, Abhyankar B, Feagan BG. The safety of vedolizumab for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 18. Februar 2016;gutjnl-2015-311079.
65. Sandborn W, Gasink C, Blank M, Lang Y, Johanns J, Gao L-L, Sands B, Hanauer S, Feagan B, Targan S, Ghosh S, de Villiers W, Colombel J-F, Lee S, Desreumaux P, Loftus E, Vermeire S, Rutgeerts P. O-001 A Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase3 Study of Ustekinumab, a Human IL-12/23P40 mAB, in Moderate-Service Crohn's Disease Refractory to Anti-TFN α : UNITI-1. *Inflamm Bowel Dis*. März 2016;22 Suppl 1:S1.
66. McInnes IB, Kavanaugh A, Gottlieb AB, Puig L, Rahman P, Ritchlin C, Brodmerkel C, Li S, Wang Y, Mendelsohn AM, Doyle MK. Efficacy and safety of ustekinumab in patients with active psoriatic arthritis: 1 year results of the phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled PSUMMIT 1 trial. *The Lancet*. 31. August 2013;382(9894):780–9.
67. Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, Safdi M, Wolf DG, Baerg RD, Tremaine WJ, Johnson T, Diehl NN, Zinsmeister AR. Etanercept for active Crohn's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. November 2001;121(5):1088–94.
68. Rutgeerts P, Lemmens L, Van Assche G, Noman M, Borghini-Fuhrer I, Goedkoop R. Treatment of active Crohn's disease with oncept (recombinant human soluble p55 tumour necrosis factor receptor): results of a randomized, open-label, pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17(2):185–192.
69. Takemori T, Tada T. Selective Roles of Thymus-Derived Lymphocytes in the Antibody Response II. Preferential Suppression of High-Affinity Antibody-Forming Cells by Carrier-Primed Suppressor T Cells. *J Exp Med*. 7. Januar 1974;140(1):253–66.
70. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 8. Januar 1995;155(3):1151–64.
71. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochov G, Sakaguchi S. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity*. 19. Juni 2009;30(6):899–911.
72. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol*. 1. August 2001;167(3):1245–53.
73. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ and IL-10-Secreting CD4⁺CD25⁺ T Cells during Cure of Colitis. *J Immunol*. 1. November 2006;177(9):5852–60.

74. Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Cure Murine Colitis: The Role of IL-10, TGF- β , and CTLA4. *J Immunol*. 15. November 2003;171(10):5012–7.
75. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*. März 2007;13(3):108–16.
76. Coquerelle C, Oldenhove G, Acolty V, Denoeud J, Vansanten G, Verdebout J-M, Mellor A, Bluestone JA, Moser M. Anti-CTLA-4 treatment induces IL-10-producing ICOS+ regulatory T cells displaying IDO-dependent anti-inflammatory properties in a mouse model of colitis. *Gut*. 10. Januar 2009;58(10):1363–73.
77. Hori S. Developmental plasticity of Foxp3+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*. Oktober 2010;22(5):575–82.
78. Khattar M, Chen W, Stepkowski SM. Expanding and converting regulatory T cells: a horizon for immunotherapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1. Juni 2009;57(3):199–204.
79. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang H-D, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. Epigenetic Control of the foxp3 Locus in Regulatory T Cells. *PLoS Biol* [Internet]. Februar 2007 [zitiert 23. Februar 2013];5(2). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1783672/>
80. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. Dezember 2005;6(12):1219–27.
81. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A. FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell*. 28. Juli 2006;126(2):375–87.
82. Rudensky AY. Regulatory T Cells and Foxp3. *Immunol Rev*. Mai 2011;241(1):260–8.
83. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Pillars Article: Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor α -Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *J. Immunol*. 1995. 155: 1151–1164. *J Immunol*. 1. April 2011;186(7):3808–21.
84. Huehn J, Siegmund K, Lehmann JCU, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, Rosa M de la, Schmidt CA, Bräuer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A. Developmental Stage, Phenotype, and Migration Distinguish Naive- and Effector/Memory-like CD4+ Regulatory T Cells. *J Exp Med*. 2. Februar 2004;199(3):303–13.
85. Hansen W, Loser K, Westendorf AM, Bruder D, Pfoertner S, Siewert C, Huehn J, Beissert S, Buer J. G Protein-Coupled Receptor 83 Overexpression in Naive CD4+CD25– T Cells Leads to the Induction of Foxp3+ Regulatory T Cells In Vivo. *J Immunol*. 7. Januar 2006;177(1):209–15.
86. Kroemer RT, Richards WG. Homology modeling study of the human interleukin-7 receptor complex. *Protein Eng Des Sel*. 1. Dezember 1996;9(12):1135–42.
87. Zenatti PP, Ribeiro D, Li W, Zuurbier L, Silva MC, Paganin M, Tritapoe J, Hixon JA, Silveira AB, Cardoso BA, Sarmiento LM, Correia N, Toribio ML, Kobarg J, Horstmann

- M, Pieters R, Brandalise SR, Ferrando AA, Meijerink JP, Durum SK, Yunes JA, Barata JT. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* Oktober 2011;43(10):932–9.
88. O'Doherty C, Alloza I, Rooney M, Vandembroeck K. IL7RA polymorphisms and chronic inflammatory arthropathies. *Tissue Antigens.* 1. November 2009;74(5):429–31.
 89. Kleinewietfeld M, Starke M, Mitri DD, Borsellino G, Battistini L, Röttschke O, Falk K. CD49d provides access to “untouched” human Foxp3⁺ Treg free of contaminating effector cells. *Blood.* 22. Januar 2009;113(4):827–36.
 90. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Groth BF de S. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 7. Oktober 2006;203(7):1693–700.
 91. Nguyen M-TJP, Fryml E, Sahakian SK, Liu S, Cantarovich M, Lipman M, Tchervenkov JI, Paraskevas S. Pretransplant Recipient Circulating CD4⁺CD127^{lo/-} Tumor Necrosis Factor Receptor 2⁺ Regulatory T Cells: A Surrogate of Regulatory T Cell-Suppressive Function and Predictor of Delayed and Slow Graft Function After Kidney Transplantation. *Transplantation.* Februar 2016;100(2):314–24.
 92. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Groth BF de S, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med.* 7. Oktober 2006;203(7):1701–11.
 93. Haase D, Starke M, Puan KJ, Lai TS, Rotzschke O. Immune modulation of inflammatory conditions: regulatory T cells for treatment of GvHD. *Immunol Res.* 1. September 2012;53(1–3):200–12.
 94. Stenner M-P, Waschbisch A, Buck D, Doerck S, Einsele H, Toyka KV, Wiendl H. Effects of Natalizumab Treatment on Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *PLoS ONE.* 6. Oktober 2008;3(10):e3319.
 95. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354(9):899–910.
 96. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* Mai 2009;30(5):626–35.
 97. Apostolou I, Verginis P, Kretschmer K, Polansky J, Hühn J, Boehmer H von. Peripherally Induced Treg: Mode, Stability, and Role in Specific Tolerance. *J Clin Immunol.* 1. November 2008;28(6):619–24.
 98. Sakaguchi S. Naturally Arising CD4⁺ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22(1):531–62.
 99. Yang S, Fujikado N, Kolodin D, Benoist C, Mathis D. Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science.* 1. Mai 2015;348(6234):589–94.

100. Fahlén L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, Powrie F. T cells that cannot respond to TGF- β escape control by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 3. Juli 2005;201(5):737–46.
101. Lafaille MAC de, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25⁻ T Cells Generate CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells by Peripheral Expansion. *J Immunol.* 15. Dezember 2004;173(12):7259–68.
102. D’Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol.* November 2005;6(11):1152–9.
103. Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity.* 22. Mai 2009;30(5):636–45.
104. Furtado GC, Lafaille MAC de, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 Signaling Is Required for CD4+ Regulatory T Cell Function. *J Exp Med.* 16. September 2002;196(6):851–7.
105. Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity.* 18. September 2009;31(3):401–11.
106. Atarashi K, Umesaki Y, Honda K. Microbial influence on T cell subset development. *Semin Immunol.* April 2011;23(2):146–53.
107. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev.* Mai 2011;241(1):241–59.
108. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine A, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Fat Treg cells: a liaison between the immune and metabolic systems. *Nat Med.* August 2009;15(8):930–9.
109. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and Induced CD4+CD25+ Cells Educate CD4+CD25⁻ Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *J Immunol.* 5. Januar 2004;172(9):5213–21.
110. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004;34(9):2480–2488.
111. Nelson BH, Martyak TP, Thompson LJ, Moon JJ, Wang T. Uncoupling of Promitogenic and Antiapoptotic Functions of IL-2 by Smad-Dependent TGF- β Signaling. *J Immunol.* 6. Januar 2003;170(11):5563–70.
112. Östman S, Rask C, Wold AE, Hultkrantz S, Telemo E. Impaired regulatory T cell function in germ-free mice. *Eur J Immunol.* 2006;36(9):2336–2346.
113. Sun C-M, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 2007;204(8):1775–85.
114. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of Peripheral CD4+CD25⁻ Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med.* 15. Dezember 2003;198(12):1875–86.

115. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* Juni 2008;9(6):632–40.
116. Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle P, Neurath MF. Transforming growth factor β induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut.* 5. Januar 2006;55(5):671–80.
117. Knoechel B, Lohr J, Kahn E, Bluestone JA, Abbas AK. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med.* 21. November 2005;202(10):1375–86.
118. Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation. *Immunity.* 18. Juli 2008;29(1):114–26.
119. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu T-T, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature.* 22. Februar 2007;445(7130):936–40.
120. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol.* Februar 2009;9(2):83–9.
121. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreesen R, Edinger M. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood.* 15. Dezember 2006;108(13):4260–7.
122. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4+CD25– T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7. *J Immunol.* 5. Januar 2004;172(9):5149–53.
123. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D’Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med.* 1. Mai 1998;187(1):129–34.
124. Siewert C, Menning A, Dudda J, Siegmund K, Lauer U, Floess S, Campbell DJ, Hamann A, Huehn J. Induction of organ-selective CD4+ regulatory T cell homing. *Eur J Immunol.* 2007;37(4):978–989.
125. Oo YH, Weston CJ, Lalor PF, Curbishley SM, Withers DR, Reynolds GM, Shetty S, Harki J, Shaw JC, Eksteen B, Hubscher SG, Walker LSK, Adams DH. Distinct Roles for CCR4 and CXCR3 in the Recruitment and Positioning of Regulatory T Cells in the Inflamed Human Liver. *J Immunol.* 15. März 2010;184(6):2886–98.
126. Lim HW, Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of Trafficking Receptor Expression in Human Forkhead Box P3+ Regulatory T Cells. *J Immunol.* 15. Juli 2006;177(2):840–51.
127. Zhang N, Schröppel B, Lal G, Jakubzick C, Mao X, Chen D, Yin N, Jessberger R, Ochando JC, Ding Y, Bromberg JS. Regulatory T Cells Sequentially Migrate from Inflamed Tissues to Draining Lymph Nodes to Suppress the Alloimmune Response. *Immunity.* 20. März 2009;30(3):458–69.
128. Ochando JC, Yopp AC, Yang Y, Garin A, Li Y, Boros P, Llodra J, Ding Y, Lira SA, Krieger NR, Bromberg JS. Lymph Node Occupancy Is Required for the Peripheral Development

- of Alloantigen-Specific Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *J Immunol.* 6. Januar 2005;174(11):6993–7005.
129. Cassani B, Villablanca EJ, Quintana FJ, Love PE, Lacy–Hulbert A, Blaner WS, Sparwasser T, Snapper SB, Weiner HL, Mora JR. Gut-Tropic T Cells That Express Integrin $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 Are Required for Induction of Oral Immune Tolerance in Mice. *Gastroenterology.* Dezember 2011;141(6):2109–18.
 130. Salmi M, Jalkanen S. Molecules controlling lymphocyte migration to the gut. *Gut.* 7. Januar 1999;45(1):148–53.
 131. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay J-Y, Ménétrier-Caux C. Regulatory T Cells Recruited through CCL22/CCR4 Are Selectively Activated in Lymphoid Infiltrates Surrounding Primary Breast Tumors and Lead to an Adverse Clinical Outcome. *Cancer Res.* 3. Januar 2009;69(5):2000–9.
 132. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC Chemokine Receptor (CCR)4 and the CCR10 Ligand Cutaneous T Cell–attracting Chemokine (CTACK) in Lymphocyte Trafficking to Inflamed Skin. *J Exp Med.* 19. November 2001;194(10):1541–7.
 133. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Unique Chemotactic Response Profile and Specific Expression of Chemokine Receptors Ccr4 and Ccr8 by Cd4+Cd25⁺ Regulatory T Cells. *J Exp Med.* 17. September 2001;194(6):847–54.
 134. Yuan Q, Bromley SK, Means TK, Jones KJ, Hayashi F, Bhan AK, Luster AD. CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med.* 6. November 2007;204(6):1327–34.
 135. Guo Z, Jang MH, Otani K, Bai Z, Umemoto E, Matsumoto M, Nishiyama M, Yamasaki M, Ueha S, Matsushima K, Hirata T, Miyasaka M. CD4+CD25⁺ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. *Int Immunol.* 1. März 2008;20(3):307–15.
 136. Enarsson K, Lundgren A, Kindlund B, Hermansson M, Roncador G, Banham AH, Lundin BS, Quiding-Järbrink M. Function and recruitment of mucosal regulatory T cells in human chronic *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. *Clin Immunol.* Dezember 2006;121(3):358–68.
 137. Gorfu G, Rivera-Nieves J, Ley K. Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med.* September 2009;9(7):836–50.
 138. Grindebacke H, Stenstad H, Quiding-Järbrink M, Waldenström J, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. Dynamic Development of Homing Receptor Expression and Memory Cell Differentiation of Infant CD4+CD25^{high} Regulatory T Cells. *J Immunol.* 10. Januar 2009;183(7):4360–70.
 139. Lee JH, Kang SG, Kim CH. FoxP3⁺ T Cells Undergo Conventional First Switch to Lymphoid Tissue Homing Receptors in Thymus but Accelerated Second Switch to Nonlymphoid Tissue Homing Receptors in Secondary Lymphoid Tissues. *J Immunol.* 1. Januar 2007;178(1):301–11.

140. Maul J, Duchmann R. Can loss of immune tolerance cause IBD? *Inflamm Bowel Dis*. 1. Oktober 2008;14(S2):S115–6.
141. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko S-A, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. Januar 2001;27(1):68–73.
142. Baud O, Goulet O, Canioni D, Le Deist F, Radford I, Rieu D, Dupuis-Girod S, Cerf-Bensussan N, Cavazzana-Calvo M, Brousse N, Fischer A, Rivet C, Bodemer C, Wildin R, Casanova J-L. Treatment of the Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome (IPEX) by Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *N Engl J Med*. 7. Juni 2001;344(23):1758–62.
143. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, Dagna-Bricarelli F, Sartirana C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Azzari C, Ziegler SF, Levings MK, Roncarolo MG. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest*. 1. Juni 2006;116(6):1713–22.
144. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet*. 8. Januar 2002;39(8):537–45.
145. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and Intestinal Regulatory CD4+CD25high T Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. Juni 2005;128(7):1868–78.
146. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddie LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol*. 11. Januar 1993;5(11):1461–71.
147. Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, Coffman RL. Regulatory interactions between CD45RBhigh and CD45RBlow CD4+ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med*. 2. Januar 1994;179(2):589–600.
148. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol*. 15. April 2003;170(8):3939–43.
149. Glisic S, Ehlenbach S, Jailwala P, Waukau J, Jana S, Ghosh S. Inducible regulatory T cells (iTregs) from recent-onset type 1 diabetes subjects show increased in vitro suppression and higher ITCH levels compared with controls. *Cell Tissue Res*. Februar 2010;339(3):585–95.
150. Yang J, Fan H, Hao J, Ren Y, Chen L, Li G, Xie R, Yang Y, Qian K, Liu M. Amelioration of acute graft-versus-host disease by adoptive transfer of ex vivo expanded human cord blood CD4+CD25+ forkhead box protein 3+ regulatory T cells is associated with the polarization of Treg/Th17 balance in a mouse model. *Transfusion (Paris)*. 2012;52(6):1333–1347.
151. Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. Februar 2007;13(2):191–9.

152. Ferrara JLM, Cooke KR, Teshima T. The Pathophysiology of Acute Graft-versus-Host Disease. *Int J Hematol.* 1. Oktober 2003;78(3):181–7.
153. Jaksch M, Mattsson J. The Pathophysiology of Acute Graft-Versus-Host Disease. *Scand J Immunol.* 2005;61(5):398–409.
154. Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood.* 9. Januar 1986;68(3):770–3.
155. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszek A, Krzystyniak A, Marek N, Myśliwska J, Hellmann A. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127– T regulatory cells. *Clin Immunol.* Oktober 2009;133(1):22–6.
156. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, DeFor T, Levine BL, June CH, Rubinstein P, McGlave PB, Blazar BR, Wagner JE. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood.* 20. Januar 2011;117(3):1061–70.
157. Ianni MD, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Papa BD, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y, Velardi A, Aversa F, Martelli MF. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood.* 4. Juli 2011;117(14):3921–8.
158. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *J Exp Med.* 8. Mai 2002;196(3):389–99.
159. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, Herold KC, Lares A, Lee MR, Li K, Liu W, Long SA, Masiello LM, Nguyen V, Putnam AL, Rieck M, Sayre PH, Tang Q. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 25. November 2015;7(315):315ra189-315ra189.
160. Himmel ME. Phenotypic and functional characterization of T cells and Foxp3⁺ T regulatory cells in inflammatory bowel disease : steps towards T regulatory cell therapy in mucosal disease. 2012 [zitiert 6. Januar 2014]; Verfügbar unter: <https://circle.ubc.ca/handle/2429/42517>
161. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, Olek S, Dietmaier W, Andreesen R, Edinger M. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells upon repetitive *in vitro* stimulation </title>. *Eur J Immunol.* April 2009;39(4):1088–97.
162. Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AMcl. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol.* September 2011;32(9):412–9.
163. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J Exp Med.* 20. Juli 1998;188(2):287–96.
164. Canavan JB, Scottà C, Vossenkämper A, Goldberg R, Elder MJ, Shoval I, Marks E, Stolarczyk E, Lo JW, Powell N, Fazekasova H, Irving PM, Sanderson JD, Howard JK, Yagel S, Afzali B, MacDonald TT, Hernandez-Fuentes MP, Shpigel NY, Lombardi G,

- Lord GM. Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut*. April 2016;65(4):584–94.
165. Desreumaux P, Foussat A, Allez M, Beaugerie L, Hébuterne X, Bouhnik Y, Nachury M, Brun V, Bastian H, Belmonte N, Ticchioni M, Duchange A, Morel–Mandrino P, Neveu V, Clerget–Chossat N, Forte M, Colombel J. Safety and Efficacy of Antigen-Specific Regulatory T-Cell Therapy for Patients With Refractory Crohn's Disease. *Gastroenterology*. November 2012;143(5):1207-1217.e2.
 166. English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J Immunol Methods*. August 1974;5(3):249–52.
 167. Wallbach G. Die Stellung der vitalen Diffusfärbung und der vitalen Kernfärbung unter den funktionellen Erscheinungen an der Zelle. *Z Für Zellforsch Mikrosk Anat*. 1. März 1931;13(1):180–201.
 168. Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A, Tesch H. CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. *J Immunol Methods*. 20. Dezember 1989;125(1–2):19–28.
 169. June CH, Ledbetter JA, Gillespie MM, Lindsten T, Thompson CB. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol*. 12. Januar 1987;7(12):4472–81.
 170. Weksler ME, Kozak R. Lymphocyte transformation induced by autologous cells. V. generation of immunologic memory and specificity during the autologous mixed lymphocyte reaction. *J Exp Med*. 12. Januar 1977;146(6):1833–8.
 171. Rajewsky MF. Zellproliferation in normalen und malignen Geweben:3H-Thymidin-Einbau in vitro unter Standardbedingungen. *Biophysik*. 1. März 1966;3(1):65–93.
 172. Guo Z, Jang MH, Otani K, Bai Z, Umemoto E, Matsumoto M, Nishiyama M, Yamasaki M, Ueha S, Matsushima K, Hirata T, Miyasaka M. CD4+CD25+ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. *Int Immunol*. 1. März 2008;20(3):307–15.
 173. Beres A, Komorowski R, Mihara M, Drobyski WR. Instability of Foxp3 Expression Limits the Ability of Induced Regulatory T Cells to Mitigate Graft versus Host Disease. *Clin Cancer Res*. 15. Juni 2011;17(12):3969–83.
 174. Ruitenberg JJ, Boyce C, Hingorani R, Putnam A, A. Ghanekar S. Rapid assessment of in vitro expanded human regulatory T cell function. *J Immunol Methods*. 30. September 2011;372(1–2):95–106.
 175. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. April 2003;4(4):330–6.
 176. Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev*. 1. August 2006;212(1):86–98.
 177. Crispin JC, Martínez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. November 2003;21(3):273–6.

178. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF α Therapy. *J Exp Med*. 8. Februar 2004;200(3):277–85.
179. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD. Dysfunctional Blood and Target Tissue CD4+CD25high Regulatory T Cells in Psoriasis: Mechanism Underlying Unrestrained Pathogenic Effector T Cell Proliferation. *J Immunol*. 1. Januar 2005;174(1):164–73.
180. Magg T, Mannert J, Ellwart JW, Schmid I, Albert MH. Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur J Immunol*. Juni 2012;42(6):1627–38.
181. Wang J, Huizinga TWJ, Toes REM. De Novo Generation and Enhanced Suppression of Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells by Retinoic Acid. *J Immunol*. 2009;183(6):4119–26.
182. Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel P-Y, Schmidt-Weber CB, Banham AH, Papadakis KA. Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol*. Dezember 2007;125(3):281–90.
183. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*. 12. Januar 1998;10(12):1969–80.
184. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, Fietz T, Wolff D, Terpe H, Steiner B, Berg E, Miehle S, Bornhäuser M, Schneider T, Zeitz M, Stein H, Thiel E, Duchmann R, Uharek L. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood*. 15. Februar 2006;107(4):1717–23.
185. Li Z, Arijis I, De Hertogh G, Vermeire S, Noman M, Bullens D, Coorevits L, Sagaert X, Schuit F, Rutgeerts P, Ceuppens JL, Van Assche G. Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab†. *Inflamm Bowel Dis*. August 2010;16(8):1299–310.
186. Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quarantino S. Anti tumour necrosis- α therapy increases the number of FOXP3+ regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology*. Oktober 2008;125(2):178–83.
187. Hvas CL, Kelsen J, Agnholt J, Dige A, Christensen LA, Dahlerup JF. Discrete changes in circulating regulatory T cells during infliximab treatment of Crohn's disease. *Autoimmunity*. Juni 2010;43(4):325–33.
188. Holmén N, Lundgren A, Lundin S, Bergin A-M, Rudin A, Sjövall H, Öhman L. Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm Bowel Dis*. Juni 2006;12(6):447–56.
189. Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. Februar 2007;7(2):144–54.
190. Kawashiri S-Y, Kawakami A, Okada A, Koga T, Tamai M, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Eguchi K. CD4+CD25highCD127low/- Treg Cell Frequency from

Peripheral Blood Correlates with Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol.* 12. Januar 2011;38(12):2517–21.

191. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *J Exp Med.* 22. Januar 2007;204(1):33–9.
192. Boschetti G, Nancey S, Sardi F, Roblin X, Flourié B, Kaiserlian D. Therapy with anti-TNF α antibody enhances number and function of Foxp3+ regulatory T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* Januar 2011;17(1):160–70.
193. MacDonald JK, McDonald JW. Natalizumab for induction of remission in Crohn's disease. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1996 [zitiert 6. Februar 2014]. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD006097.pub2/abstract>
194. Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, Feagan BG, Hanauer SB, Lawrance IC, Panaccione R, Sanders M, Schreiber S, Targan S, van Deventer S, Goldblum R, Despain D, Hogge GS, Rutgeerts P. Natalizumab Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med.* 3. November 2005;353(18):1912–25.
195. Ukena SN, Höpting M, Velaga S, Ivanyi P, Grosse J, Baron U, Ganser A, Franzke A. Isolation strategies of regulatory T cells for clinical trials: Phenotype, function, stability, and expansion capacity. *Exp Hematol.* Dezember 2011;39(12):1152–60.
196. Brandhorst G, Petrova DT, Weigand S, Eberle C, von Ahsen N, Schmitz J, Schultze FC, Raddatz D, Karaus M, Oellerich M, Walson PD. Lack of correlation between Treg quantification assays in inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol WJG.* 21. März 2015;21(11):3325–9.
197. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3– T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor- β –dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood.* 15. Oktober 2007;110(8):2983–90.
198. Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, Nelson C, Tennis NC, Riley JL, June CH, Miller JS, Wagner JE, Blazar BR. Generation and Large-Scale Expansion of Human Inducible Regulatory T Cells That Suppress Graft-Versus-Host Disease. *Am J Transplant.* 1. Juni 2011;11(6):1148–57.
199. Kang SG, Lim HW, Andrisani OM, Broxmeyer HE, Kim CH. Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. September 2007;179(6):3724–33.
200. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. Activation-Induced FOXP3 in Human T Effector Cells Does Not Suppress Proliferation or Cytokine Production. *Int Immunol.* 1. April 2007;19(4):345–54.
201. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo M-G. Human Cd25+Cd4+ T Regulatory Cells Suppress Naive and Memory T Cell Proliferation and Can Be Expanded in Vitro without Loss of Function. *J Exp Med.* 4. Juni 2001;193(11):1295–302.
202. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A Role for TGF- β in the Generation and Expansion of CD4+CD25+ Regulatory T Cells from Human Peripheral Blood. *J Immunol.* 15. Juni 2001;166(12):7282–9.

203. Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Sarra M, Stolfi C, Becker C, Macdonald TT, Pallone F, Neurath MF, Monteleone G. Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology*. April 2009;136(4):1308–16, e1-3.
204. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. Generation Ex Vivo of TGF- β -Producing Regulatory T Cells from CD4+CD25- Precursors. *J Immunol*. 15. Oktober 2002;169(8):4183–9.
205. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. August 2001;182:207–14.
206. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martínez-Llordella M, Ashby M, Nakayama M, Rosenthal W, Bluestone JA. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol*. September 2009;10(9):1000–7.
207. Cao T, Wenzel SE, Faubion WA, Harriman G, Li L. Enhanced suppressive function of regulatory T cells from patients with immune-mediated diseases following successful ex vivo expansion. *Clin Immunol Orlando Fla*. September 2010;136(3):329–37.
208. Putnam AL, Brusko TM, Lee MR, Liu W, Szot GL, Ghosh T, Atkinson MA, Bluestone JA. Expansion of Human Regulatory T-Cells From Patients With Type 1. Diabetes. 3. Januar 2009;58(3):652–62.
209. Longhi MS, Meda F, Wang P, Samyn M, Mieli-Vergani G, Vergani D, Ma Y. Expansion and de novo generation of potentially therapeutic regulatory T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2008;47(2):581–91.
210. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Piseshka B, Dada A, Niemand C, Assenmacher M, Orsó E, Andreesen R, Holler E, Edinger M. Isolation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells for Clinical Trials. *Biol Blood Marrow Transplant*. März 2006;12(3):267–74.
211. Wichlan DG, Roddam PL, Eldridge P, Handgretinger R, Riberdy JM. Efficient and reproducible large-scale isolation of human CD4+ CD25+ regulatory T cells with potent suppressor activity. *J Immunol Methods*. 31. August 2006;315(1):27–36.
212. Peters JH, Hilbrands LB, Koenen HJPM, Joosten I. Ex Vivo Generation of Human Alloantigen-Specific Regulatory T Cells from CD4posCD25high T Cells for Immunotherapy. *PLoS ONE [Internet]*. 21. Mai 2008 [zitiert 24. Januar 2019];3(5). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2376059/>
213. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo M-G. Rapamycin Promotes Expansion of Functional CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells of Both Healthy Subjects and Type 1 Diabetic Patients. *J Immunol*. 15. Dezember 2006;177(12):8338–47.
214. Hoffmann P, Eder R, Edinger M. Polyclonal Expansion of Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells. In: Cuturi MC, Anegón I, Herausgeber. *Suppression and Regulation of Immune Responses [Internet]*. Totowa, NJ: Humana Press; 2010 [zitiert 4. Juni 2011]. S. 15–30. Verfügbar unter: <http://www.springerlink.com/content/j444184150k6713p/#section=795502&page=1>

215. Riley JL, June CH, Blazar BR. Human T Regulatory Cell Therapy: Take a Billion or So and Call Me in the Morning. *Immunity*. 22. Mai 2009;30(5):656–65.
216. Hardenberg G, Steiner TS, Levings MK. Environmental influences on T regulatory cells in inflammatory bowel disease. *Semin Immunol*. April 2011;23(2):130–8.
217. Putheti P, Pettersson A, Soderstrom M, Link H, Huang YM. Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol*. März 2004;24(2):155–61.
218. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4+CD25high regulatory T cells. *Blood*. 1. August 2004;104(3):895–903.
219. Afzali B, Edozie FC, Fazekasova H, Scottà C, Mitchell PJ, Canavan JB, Kordasti SY, Chana PS, Ellis R, Lord GM, John S, Hilton R, Lechler RI, Lombardi G. Comparison of Regulatory T Cells in Hemodialysis Patients and Healthy Controls: Implications for Cell Therapy in Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 31. Juli 2013;8(8):1396–405.
220. Canavan JB, Scottà C, Vossenkämper A, Goldberg R, Elder MJ, Shoval I, Marks E, Stolarczyk E, Lo JW, Powell N, Fazekasova H, Irving PM, Sanderson JD, Howard JK, Yagel S, Afzali B, MacDonald TT, Hernandez-Fuentes MP, Shpigel NY, Lombardi G, Lord GM. Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut*. April 2016;65(4):584–94.
221. Rubtsov YP, Niec RE, Josefowicz S, Li L, Darce J, Mathis D, Benoist C, Rudensky AY. Stability of the Regulatory T Cell Lineage in Vivo. *Science*. 24. September 2010;329(5999):1667–71.
222. Walker M, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, Bènard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25– T cells. *J Clin Invest*. 1. November 2003;112(9):1437–43.
223. Sakaguchi S. Immunology: Conditional stability of T cells. *Nature*. 4. November 2010;468(7320):41–2.
224. Duarte JH, Zelenay S, Bergman M-L, Martins AC, Demengeot J. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur J Immunol*. 2009;39(4):948–55.
225. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature*. 15. Februar 2007;445(7129):766–70.
226. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng X-H, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. Juli 2008;29(1):44–56.
227. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting Edge: Regulatory T Cells Induce CD4+CD25–Foxp3– T Cells or Are Self-Induced to Become Th17 Cells in the Absence of Exogenous TGF- β . *J Immunol*. 1. Juni 2007;178(11):6725–9.
228. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an

- uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10. Februar 2009;106(6):1903–8.
229. Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio C-W, Santacruz N, Peterson DA, Stappenbeck TS, Hsieh C-S. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*. 13. Oktober 2011;478(7368):250–4.
 230. Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. *Adv Immunol*. 2003;81:331–71.
 231. Walker LSK. CD4⁺ CD25⁺ Treg: divide and rule? *Immunology*. 2004;111(2):129–137.
 232. Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. De novo generation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human CD4⁺CD25⁻ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. März 2005;102(11):4103–8.
 233. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*. Mai 2009;30(5):616–25.
 234. Voo KS, Wang Y-H, Santori FR, Boggiano C, Wang Y-H, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, Zheng B, Littman DR, Liu Y-J. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24. März 2009;106(12):4793–8.
 235. Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature*. 8. Mai 2008;453(7192):236–40.
 236. Zheng SG, Wang J, Horwitz DA. Cutting Edge: Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Induced by IL-2 and TGF- β Are Resistant to Th17 Conversion by IL-6. *J Immunol*. 1. Juni 2008;180(11):7112–6.
 237. Oliveira VG, Caridade M, Paiva RS, Demengeot J, Graca L. Sub-optimal CD4⁺ T-cell activation triggers autonomous TGF- β -dependent conversion to Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 1. Mai 2011;41(5):1249–55.
 238. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC, Ziegler SF, Roncarolo MG, Levings MK. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest*. 1. November 2005;115(11):3276–84.
 239. Soligo M, Camperio C, Caristi S, Scottà C, Porto PD, Costanzo A, Mantel P, Schmidt-Weber CB, Piccolella E. CD28 costimulation regulates FOXP3 in a RelA/NF- κ B-dependent mechanism. *Eur J Immunol*. 1. Februar 2011;41(2):503–13.
 240. Mantel P-Y, Ouaked N, Rückert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, Schmidt-Weber CB. Molecular Mechanisms Underlying FOXP3 Induction in Human T Cells. *J Immunol*. 15. März 2006;176(6):3593–602.
 241. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol*. Februar 2008;9(2):194–202.
 242. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS. TGF- β Induces Foxp3⁺ T-Regulatory Cells from CD4⁺ + CD25⁻ Precursors. *Am J Transplant*. 2004;4(10):1614–1627.

243. Ebert EC, Panja A, Das KM, Praveen R, Geng X, Rezac C, Bajpai M. Patients with inflammatory bowel disease may have a transforming growth factor- β -, interleukin (IL)-2- or IL-10-deficient state induced by intrinsic neutralizing antibodies. *Clin Exp Immunol*. 1. Januar 2009;155(1):65–71.
244. Babyatsky M, Rossiter G, Podolsky D. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. April 1996;110(4):975–84.
245. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, Olek S, Hamann A, von Boehmer H, Huehn J. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol*. 1. Juni 2008;38(6):1654–63.
246. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*. 20. September 2002;110(6):673–87.
247. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet*. 12;369(9573):1627–40.
248. Iellem A, Colantonio L, D'Ambrosio D. Skin-versus gut-skewed homing receptor expression and intrinsic CCR4 expression on human peripheral blood CD4+CD25+ suppressor T cells. *Eur J Immunol*. 2003;33(6):1488–1496.
249. Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The Majority of Human Peripheral Blood CD4+CD25highFoxp3+ Regulatory T Cells Bear Functional Skin-Homing Receptors. *J Immunol*. 10. Januar 2006;177(7):4488–94.
250. Vulcano M, Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struyf S, Transidico P, Bonecchi R, Del Prete A, Allavena P, Ruco LP, Chiabrando C, Girolomoni G, Mantovani A, Sozzani S. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol*. 2001;31(3):812–822.
251. Wang C, Hanly EK, Wheeler LW, Kaur M, McDonald KG, Newberry RD. Effect of $\alpha 4\beta 7$ Blockade on Intestinal Lymphocyte Subsets and Lymphoid Tissue Development. *Inflamm Bowel Dis*. Oktober 2010;16(10):1751–62.
252. Berin MC, Dwinell MB, Eckmann L, Kagnoff MF. Production of MDC/CCL22 by human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 6. Januar 2001;280(6):G1217–26.
253. Denning TL, Kim G, Kronenberg M. Cutting Edge: CD4+CD25+ Regulatory T Cells Impaired for Intestinal Homing Can Prevent Colitis. *J Immunol*. 15. Juni 2005;174(12):7487–91.
254. Hart AL, Ng SC, Mann E, Al-Hassi HO, Bernardo D, Knight SC. Homing of immune cells: Role in homeostasis and intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(11):1969–1977.
255. Lee JH, Kang SG, Kim CH. FoxP3+ T Cells Undergo Conventional First Switch to Lymphoid Tissue Homing Receptors in Thymus but Accelerated Second Switch to Nonlymphoid Tissue Homing Receptors in Secondary Lymphoid Tissues. *J Immunol*. 1. Januar 2007;178(1):301–11.
256. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. Februar 2011;11(2):119–30.

257. Huehn J, Siegmund K, Lehmann JCU, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, Rosa M de la, Schmidt CA, Bräuer R, Buer J, Scheffold A, Hamann A. Developmental Stage, Phenotype, and Migration Distinguish Naive- and Effector/Memory-like CD4+ Regulatory T Cells. *J Exp Med*. 2. Februar 2004;199(3):303–13.
258. Siegmund K, Feuerer M, Siewert C, Ghani S, Haubold U, Dankof A, Krenn V, Schön MP, Scheffold A, Lowe JB, Hamann A, Syrbe U, Huehn J. Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood*. 11. Januar 2005;106(9):3097–104.
259. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 8. August 2013;500(7461):232–6.
260. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*. 8. Februar 2013;341(6145):569–73.
261. Masteller EL, Tang Q, Bluestone JA. Antigen-specific regulatory T cells—Ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin Immunol*. 1. April 2006;18(2):103–10.
262. Corthay A. How do Regulatory T Cells Work? *Scand J Immunol*. 2009;70(4):326–336.
263. Bilate AB, Lafaille JJ. It Takes Two to Tango. *Immunity*. 22. Juli 2011;35(1):6–8.
264. Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, zum B. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, Bacteroides, Bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut*. Juni 1999;44(6):812–8.
265. Desreumaux P, Foussat A, Allez M, Beaugerie L, Hébuterne X, Bouhnik Y, Nachury M, Brun V, Bastian H, Belmonte N, Ticchioni M, Duchange A, Morel–Mandrino P, Neveu V, Clerget–Chossat N, Forte M, Colombel J. Safety and Efficacy of Antigen-Specific Regulatory T-Cell Therapy for Patients With Refractory Crohn’s Disease. *Gastroenterology*. November 2012;143(5):1207-1217.e2.
266. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA. In Vitro–expanded Antigen-specific Regulatory T Cells Suppress Autoimmune Diabetes. *J Exp Med*. 7. Juni 2004;199(11):1455–65.
267. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25+ CD4+ T Cells, Expanded with Dendritic Cells Presenting a Single Autoantigenic Peptide, Suppress Autoimmune Diabetes. *J Exp Med*. 6. Juli 2004;199(11):1467–77.
268. Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JPM. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood*. 1. Juni 2004;103(11):4216–21.
269. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. Februar 2002;168(3):1080–6.
270. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev*. 2008;223(1):371–90.

271. Smithson JE, Warren BF, Young S, Pigott R, Jewell DP. Heterogeneous Expression of Carcinoembryonic Antigen in the Normal Colon and Upregulation in Active Ulcerative Colitis. *J Pathol.* 1996;180(2):146–51.
272. Zhang Q, Lu W, Liang C-L, Chen Y, Liu H, Qiu F, Dai Z. Chimeric Antigen Receptor (CAR) Treg: A Promising Approach to Inducing Immunological Tolerance. *Front Immunol [Internet].* 12. Oktober 2018 [zitiert 13. Juli 2019];9. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6194362/>
273. Adair PR, Kim YC, Zhang A-H, Yoon J, Scott DW. Human Tregs Made Antigen Specific by Gene Modification: The Power to Treat Autoimmunity and Antidrug Antibodies with Precision. *Front Immunol [Internet].* 2017 [zitiert 13. Juli 2019];8. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01117/full>
274. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature.* 16. Juni 2011;474(7351):298–306.
275. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative Colitis. *N Engl J Med.* 3. November 2011;365(18):1713–25.
276. Saleh M, Elson CO. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialogue. *Immunity.* 25. März 2011;34(3):293–302.
277. Panduro M, Benoist C, Mathis D. TISSUE-Tregs. *Annu Rev Immunol.* 20. Mai 2016;34:609–33.
278. Long SA, Buckner JH. CD4+FOXP3+ T Regulatory Cells in Human Autoimmunity: More Than a Numbers Game. *J Immunol.* 9. Januar 2011;187(5):2061–6.
279. Afzali B, Mitchell PJ, Scottà C, Canavan J, Edozie FC, Fazekasova H, Lord GM, John S, Barber LD, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI, Lombardi G. Relative Resistance of Human CD4+ Memory T Cells to Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg [Internet].* August 2011 [zitiert 24. Januar 2019];11(8). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3815568/>
280. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting Edge: CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 11. Januar 2002;169(9):4712–6.
281. Godfrey WR, Ge YG, Spoden DJ, Levine BL, June CH, Blazar BR, Porter SB. In vitro–expanded human CD4+CD25+ T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell–stimulated MLR cultures. *Blood.* 15. Juli 2004;104(2):453–61.
282. Earle KE, Tang Q, Zhou X, Liu W, Zhu S, Bonyhadi ML, Bluestone JA. In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin Immunol.* April 2005;115(1):3–9.
283. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB, Bluestone JA. Cutting Edge: CD28 Controls Peripheral Homeostasis of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol.* 10. Januar 2003;171(7):3348–52.
284. Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 Is Essential for TGF- β to Convert Naive CD4+CD25– Cells to CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells and for Expansion of These Cells. *J Immunol.* 15. Februar 2007;178(4):2018–27.

285. Fritzsching B, Oberle N, Eberhardt N, Quick S, Haas J, Wildemann B, Krammer PH, Suri-Payer E. Cutting Edge: In Contrast to Effector T Cells, CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells Are Highly Susceptible to CD95 Ligand- but Not to TCR-Mediated Cell Death. *J Immunol.* 7. Januar 2005;175(1):32–6.
286. Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, Tersigni R, Alessandrini L, Biancone L, Naccari GC, MacDonald TT, Pallone F. Interleukin-21 enhances T-helper cell type 1 signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology.* März 2005;128(3):687–94.
287. Zenewicz LA, Antov A, Flavell RA. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med.* Mai 2009;15(5):199–207.
288. Hovhannisyan Z, Treatman J, Littman DR, Mayer L. Characterization of Interleukin-17-Producing Regulatory T Cells in Inflamed Intestinal Mucosa From Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology.* März 2011;140(3):957–65.
289. Eisenstein EM, Williams CB. The T(reg)/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. *Pediatr Res.* Mai 2009;65(5 Pt 2):26R-31R.
290. Feng T, Wang L, Schoeb TR, Elson CO, Cong Y. Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *J Exp Med.* 6. Juli 2010;207(6):1321–32.
291. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood.* 15. Mai 2002;99(10):3493–9.
292. Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Derkowska I, Juścińska J, Owczuk R, Szadkowska A, Witkowski P, Młynarski W, Jarosz-Chobot P, Bossowski A, Siebert J, Trzonkowski P. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up. *Clin Immunol Orlando Fla.* Juli 2014;153(1):23–30.
293. Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Siebert J, Trzonkowski P. Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* August 2013;14(5):322–32.
294. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 16. Oktober 1997;389(6652):737–42.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katerina Rasche, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Induktion regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit Morbus Crohn“ 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM 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

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich möchte meine Dankbarkeit all denen Menschen aussprechen, ohne die es nie zu dieser Arbeit gekommen wäre. Zuerst möchte ich mich bei Frau Professor Siegmund für die Übernahme meiner Promotionsarbeit und des entgegen gebrachten Vertrauens herzlich bedanken. Dr. Jochen Maul danke ich für die kontinuierliche Betreuung der Arbeit, der konstruktiven wissenschaftlichen Anleitung und den stetigen Beistand im Schreibprozess.

Außerdem möchte ich meinen Kollegen Dr. Ulrike Erben, Kerstin Flöckner, Karen Großmann und Sarah Wichmann für wichtige Diskussionen, "der Liebe fürs Fragen", der praktischen Unterstützung und den teilweise langen und lustigen Stunden im Labor danken.

Ich möchte mich bei meinen Freunden und Kommilitonen Lea Kredel, Julian Neumann, Marlene Bartram, Jasmin Bildik und Jörg Rasche für die wiederholte Motivation und Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Ich danke dem Graduiertenkolleg „ImmucO“ des Sonderforschungsbereiches 633 der Deutschen Forschungsgemeinschaft e.V. für das Lehrangebot sowie die finanzielle Unterstützung.

Mein Dank gilt insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester Biliana Hadjiyska, die stets an mich geglaubt haben und mir vieles ermöglicht haben. Ludwig Rasche, mein Ehemann, dir gilt mein besonderer Dank für deine liebevolle Unterstützung und stetige Inspiration.