

Die Bedeutung Regulatorischer T-Zellen für den Verlauf einer Sepsis

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Roman Tatura

aus Krappitz

Oktober 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jan Buer

2. Gutachter: Prof. Dr. Sven Brandau

Vorsitzender für den Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Ralf Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Das Immunsystem.....	7
1.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	7
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	8
1.2 T-Lymphozyten.....	9
1.2.1 Regulatorische T-Zellen	11
1.2.2 Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen.....	11
1.2.3 Differenzierung zwischen natürlichen und induzierten Treg-Zellen	14
1.2.4 Die <i>FOXP3</i> Regulation	17
1.3 Sepsis.....	21
1.3.1 Pathogenese einer Sepsis.....	22
1.3.2 Regulatorische T-Zellen in der Sepsis.....	26
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Mauslinien	29
2.1.1 BALB/c	29
2.1.2 Foxp3-GFP	29
2.1.3 DEREK.....	29
2.1.4 TLR2 ^{-/-}	29
2.1.5 C57BL/6	29
2.2 Zelllinien und Bakterienstämme	30
2.2.1 Jurkat-Zelllinie	30
2.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
2.2.3 FOXP3 transduzierte T-Zellen (Treg-Zelllinie).....	30
2.3 Patientenproben	30
2.4 Chemikalien.....	30
2.5 Puffer, Kulturmedien und Lösungen	31

2.6 Oligonukleotide & Plasmide.....	34
2.7 Enzyme, Antikörper und Fluorochrome	36
2.8 Kommerzielle Standardsets (<i>Kits</i>)	38
2.9 Geräte	38
2.10 Molekularbiologische Methoden	39
2.10.1 Plasmid Isolierung und Gewinnung von genomischer DNA	39
2.10.2 Genotypisierung transgener Mäuse.....	39
2.10.3 Bestimmung der mRNA-Expression	40
2.10.4 Methylierungssensitive qRT-PCR (QAMA-Methode).....	43
2.10.5 DNA-Sequenzierung.....	46
2.10.6 Bestimmung der globalen DNA-Methylierung.....	47
2.11 Zellbiologische Methoden.....	47
2.11.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen	47
2.11.2 Gewinnung von CD4 ⁺ T-Zellen und CD11c ⁺ dendritischen Zellen.....	49
2.11.3 Gewinnung von PBMCs	49
2.11.4 Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i> , FACS).....	50
2.11.5 Markierung von Lymphozyten zur Bestimmung der Proliferation	51
2.11.6 Bestimmung von sezernierten Zytokinen.....	53
2.11.7 Kultivierung von Jurkat- und CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen mit DNMT-Inhibitoren.....	53
2.11.8 Identifikation von bakteriellen Erregern mittels MALDI-MS.....	54
2.12 Tierexperimentelle Methoden	54
2.12.1 Induktion einer polymikrobiellen Sepsis.....	54
2.12.2 Blutentnahme bei Versuchstieren.....	55
2.12.3 Intratracheale Infektion mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
2.12.4 Depletion regulatorischer T-Zellen in DEREK-Mäusen	56
2.13 Statistische Auswertung	56
3 Ergebnisse	57
3.1 Quantifizierung humaner regulatorischer T-Zellen	57

3.1.1 Etablierung einer methylierungssensitiven qRT-PCR.....	57
3.1.2 Generierung der <i>FOXP3</i> -TSDR-QAMA Standardkurve.....	58
3.1.3 Quantifizierung von natürlichen regulatorischen T-Zellen in septischen Patienten und gesunden Probanden	60
3.2 Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die murine Sepsis	63
3.2.1 Charakterisierung einer polymikrobiellen Sepsis	63
3.2.2 Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Frühphase einer Sepsis.....	72
3.2.3 Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Spätphase einer Sepsis .	76
3.2.4 Die Rolle des TLR2 für den Verlauf einer Sepsis	80
3.2.5 Identifizierung von Bakterien im Blut septischer Mäuse	85
3.3 <i>In vitro</i> -Induktion von Treg-Zellen aus CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen mittels DNMT-Inhibitoren 5-Aza-dC und EGCG.....	85
3.3.1 Induktion Treg-spezifischer Gene in Jurkat-Zellen durch DNMT-Inhibitoren	86
3.3.2 Einfluss von 5-Aza-dC und EGCG auf die Treg-Differenzierung aus CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen.....	87
4 Diskussion	96
5 Zusammenfassung.....	112
6 Literatur.....	113
7 Anhang	132
8 Danksagung	140
9 Lebenslauf.....	141
10 Erklärungen.....	144

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einer Reihe von spezialisierten Zellen und Molekülen, die den Organismus vor Erkrankungen schützen. Dazu gehört die Eliminierung von Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten genauso wie die Beseitigung von eigenen abgestorbenen und entarteten Zellen. Unterschieden wird das angeborene vom erworbenen (adaptiven) Immunsystem. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen konservierte Pathogenmuster und stellen die erste Immunantwort dar. Die Zellen des erworbenen Immunsystems reagieren mittels hochspezifischer Rezeptoren und Antikörper und schützen zusätzlich vor einer Reinfektion. Ausschlaggebend für eine effektive Immunantwort ist die Interaktion zwischen beiden Teilen des Immunsystems, aber auch die Regulation von Immunantworten und die Aufrechterhaltung einer Homöostase (Hoebe et al., 2004; Janeway et al., 2009; Palm and Medzhitov, 2009).

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Zum angeborenen Immunsystem zählen physische Barrieren wie die Haut oder Schleimhäute der Lunge, des Magens oder des Darms, welche ein Eindringen von Pathogenen verhindern sollen (Janeway et al., 2009). Zu den zellulären Bestandteilen zählen Makrophagen, dendritische Zellen (engl. *dendritic cells*, *DCs*), neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Darüber hinaus wird die angeborene Immunantwort über lösliche Faktoren wie das Komplementsystem, Enzyme oder Zytokine unterstützt (Hoebe et al., 2004; Iwasaki and Medzhitov, 2010). Sollten Pathogene die physischen Barrieren durchdringen, werden sie als erstes von Makrophagen erkannt. Hierfür werden Pathogene über Pathogen-assoziierte Muster (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, *PAMPs*) identifiziert, welche auf der Oberfläche von Bakterien, Pilzen oder Viren in Form von hochkonservierten Molekülen vorhanden sind. Diese werden über Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern-recognition receptors*, *PRRs*), zu denen auch *Toll*-ähnliche Rezeptoren (engl. *toll-like receptors*, *TLRs*) gehören, auf Makrophagen erkannt, aktivieren diese und leiten die Phagozytose des Pathogens ein (Iwasaki and Medzhitov, 2010; Palm and Medzhitov, 2009). Beispielsweise erkennt TLR4 Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien und TLR2 Peptidoglykan von grampositiven Bakterien (Poltorak et al., 1998; van der Poll and Opal, 2008). Dies

führt zur Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α (engl. *tumor necrosis factor alpha*), wodurch eine Entzündungsreaktion eingeleitet wird. Zusätzlich können über die Freisetzung von IL-8 neutrophile Granulozyten rekrutiert werden, die bei gesunden Menschen etwa 50 % aller im Blut zirkulierenden Leukozyten ausmachen. Die rekrutierten neutrophilen Granulozyten erkennen durch das Komplementsystem markierte Pathogene und phagozytieren diese ebenfalls. Das Komplementsystem besteht aus zirkulierenden Plasmaproteinen, die Pathogene direkt eliminieren oder für andere Zellen markieren können (Hoebe et al., 2004). Weitere Unterstützung erfolgt durch aktivierte NK-Zellen, die in der Lage sind, intrazellulär infizierte Zellen abzutöten (Amador-Molina et al., 2013). Im Anschluss an die Phagozytose wird das entstandene Phagosom mittels Lysosom degradiert und auf der Zelloberfläche über die Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. *major histocompatibility complex, MHC*) der Klasse I und II präsentiert. Zeitgleich migrieren unreife DCs zum Entzündungsort und erkennen die präsentierten Antigene der Makrophagen oder aber auch das Pathogen selbst über eigene TLRs. Durch diesen Antigenkontakt reifen DCs, wandern in die nächsten Lymphknoten und präsentieren das Antigen naiven T-Zellen, wodurch diese aktiviert werden (Jin et al., 2012). Somit spielen professionell antigen-präsentierende Zellen (engl. *antigen-presenting cells, APCs*) wie Makrophagen und DCs eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort, stellen aber gleichzeitig eine essentielle Kopplung zur adaptiven Immunantwort dar (Hoebe et al., 2004).

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die Grundlagen des ausschließlich in Wirbeltieren vorhandenen adaptiven Immunsystems bilden die T- und B-Lymphozyten. Beide Lymphozytenpopulationen entstehen aus der frühen lymphatischen Vorläuferzelle (engl. *early lymphoid progenitor, ELP*) im Knochenmark (Janeway et al., 2009). B-Lymphozyten reifen im Knochenmark und differenzieren nach Aktivierung zu Plasmazellen, deren Aufgabe die Antikörperproduktion darstellt und bilden somit den humoralen Teil des adaptiven Immunsystems (Jin et al., 2012). Hingegen wandern T-Lymphozyten-Vorläuferzellen über das Blut in den Thymus, wo die Reifung des T-Zell-Rezeptors (engl. *T cell receptor, TCR*) stattfindet. Während dieser Selektion durchwandern diese sogenannten Thymozyten verschiedene, durch die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle gekennzeichnete Entwicklungsstadien, von einem doppelt negativen ($CD4^-CD8^-$) über ein doppelt positives ($CD4^+CD8^+$), und interagieren mit den

Epithelzellen des Thymus, wodurch eine positive und negative Selektion stattfindet. Während der positiven Selektion wird in den T-Zellen eine Apoptose induziert, deren TCRs keine körpereigenen MHC-Komplexe erkennen. In der negativen Selektion werden T-Zellen aussortiert, deren TCRs eine zu starke Affinität gegenüber körpereigenen Antigenen besitzen (Jameson and Bevan, 1998). Letztlich erfolgt die Entwicklung zu einfach positiven, naiven $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen, von denen ein Teil in die peripheren lymphatischen Organe wandert und ein anderer Teil im Blutkreislauf verbleibt und den zellulären Teil des adaptiven Immunsystems darstellt (Shah and Zuniga-Pflucker, 2014; Starr et al., 2003).

1.2 T-Lymphozyten

Die zelluläre Immunität umfasst zwei T-Zellpopulationen, $CD8^+$ T-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen. Die Charakterisierung von T-Zellen erfolgt aufgrund ihres Phänotyps, ihrer intrazellulären Proteine und ihrer Zytokinproduktion. Dabei wird bei den $CD4^+$ T-Zellen zwischen den Hauptpopulationen Th1, Th2, Th17 und regulatorischen T (Treg)-Zellen und in der $CD8^+$ T-Zellpopulation zwischen zytotoxischen T-Effektorzellen (engl. *cytotoxic T lymphocyte*, CTL) und $CD8^+$ Memory-Zellen unterschieden (Jin et al., 2012). Diese entwickeln sich aus naiven T-Zellen nach Antigenpräsentation unter dem Einfluss von verschiedenen sezernierten Zytokinen (Kapsenberg, 2003). Um dabei das Risiko autoreaktiver T-Zellen zu minimieren, werden zur Aktivierung zwei Signale benötigt (Janeway et al., 2009). Zusätzlich zur Stimulation des TCRs durch Antigenpeptide, die durch APCs mittels MHC präsentiert werden, wird ein co-stimulatives Signal durch die Bindung von CD80/CD86 der APCs an CD28 der T-Zellen benötigt (Jin et al., 2012).

Nach Antigenstimulation über den TCR und co-stimulatorische Signale differenzieren naive $CD8^+$ T-Zellen entweder in CTLs oder in Memory $CD8^+$ T-Zellen. Die Hauptaufgabe der CTLs ist die Eliminierung von virusinfizierten und entarteten Zellen. Damit diese durch CTLs erkannt werden können, tragen alle kernhaltigen Zellen MHC Klasse-I Moleküle, welche die Identifikation einer Virusinfektion ermöglichen. Die Eliminierung durch CTLs erfolgt mittels Fas/FasL-Bindung oder durch die Sezernierung von Perforinen/Granzymen, welche in der Zielzelle eine Apoptose auslösen. Hingegen besitzen Memory $CD8^+$ T-Zellen keine zytotoxischen Eigenschaften. Sie zeigen eine, mit einigen Jahren, deutlich längere Lebensdauer als CTLs und bilden das immunologische Gedächtnis, welches im Falle einer erneuten

Infektion eine effiziente DC-Stimulation ermöglicht (Janeway et al., 2009; Jin et al., 2012; Lau et al., 1994; Russell and Ley, 2002).

Für eine gezielte Immunantwort gegen verschiedene Pathogene ist die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen in bestimmte T-Helferzellen notwendig.

Während einer Infektion mit intrazellulären Bakterien findet eine verstärkte Th1-Differenzierung statt. Die Freisetzung von $IFN-\gamma$ und IL-12 induziert die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet (engl. *T-box transcription factor expressed in T-cells*) und STAT (engl. *signal transducer and activator of transcription*) 4 in naiven T-Zellen. Die Expression von T-bet ermöglicht eine verstärkte Bildung von $IFN-\gamma$. Die Sezernierung von $IFN-\gamma$ und IL-2 verstärkt die Phagozytoseaktivität von Makrophagen und unterstützt ebenfalls CTLs. Zugleich inhibiert die $IFN-\gamma$ -Ausschüttung eine Th2-Zelldifferenzierung (Jin et al., 2012; Palm and Medzhitov, 2009).

Die Induktion einer Th2-vermittelten Immunantwort erfolgt beispielsweise durch die Infektion mit Helminthen oder anderen Parasiten. Die Differenzierung zu Th2-Zellen wird durch IL-4 und IL-2 eingeleitet, wodurch die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA3, STAT5 und STAT6 induziert wird. Durch die Bindung von GATA3 an die Promotoren von *IL-4*, *IL-5*, *IL-13* und *IL-25* erfolgt die Bildung und Sezernierung dieser Mediatoren, wodurch eine B-Zell-gesteuerte Immunantwort mit der Bildung von Antikörpern bewirkt wird. Gleichzeitig inhibiert die Freisetzung von IL-4 die Differenzierung zu Th1-Zellen (Hoebe et al., 2004; Jin et al., 2012; Palm and Medzhitov, 2009).

Hingegen führt eine Infektion mit extrazellulären Bakterien oder Pilzen zu einer Th17-vermittelten Immunantwort. Unter Einfluss von TGF (engl. *transforming growth factor*)- β , IL-6 und IL-21, erfolgt die Expression der Transkriptionsfaktoren $ROR\gamma T$ (engl. *RAR-related orphan receptor gamma*) und STAT3. Th17-Zellen sezernieren IL-17 und IL-22 wodurch die Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten erfolgt (Jin et al., 2012).

Treg-Zellen differenzieren sowohl im Thymus durch Selektion über den TCR als auch in der Peripherie durch Stimulation des TCR in Anwesenheit von TGF- β und IL-2. Ihre Aufgabe ist die Regulation von Immunantworten und die Gewährleistung eines immunologischen Gleichgewichtes (Bennett et al., 2001; Zheng et al., 2007). Die Entstehung und Charakterisierung dieser Zellen wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

1.2.1 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T (Treg)-Zellen wurden erstmals im Jahr 1995 durch Sakaguchi *et al.* als spezielle CD4⁺ T-Zellpopulation beschrieben, die CD25 exprimiert und suppressive Eigenschaften besitzt. Die Injektion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen konnte eine Abstoßung von Hauttransplantaten in Treg-defizienten Mäusen unterdrücken (Sakaguchi *et al.*, 1995). Treg-Zellen sind essentiell für das Gleichgewicht zwischen einer Immunantwort und Immuntoleranz (Bennett *et al.*, 2001). Fehlfunktionen regulatorischer T-Zellen oder ein Ungleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen und T-Effektorzellen können Ursachen für schwerwiegende Erkrankungen sein (Lyssuk *et al.*, 2007; Scumpia *et al.*, 2006; Valencia and Lipsky, 2007).

Der größte Teil der Treg-Zellen exprimiert in hohem Maß konstitutiv die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) auf seiner Zelloberfläche (Sakaguchi, 2004). Das Überleben von Treg-Zellen ist stark IL-2 abhängig, was sich in der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen nach IL-2 Neutralisation oder aufgrund von CD25-Defekten äußert (Setoguchi *et al.*, 2005). Später wurde festgestellt, dass diese CD25-Expression nicht ausschließlich auf Treg-Zellen vorkommt. Die Aktivierung von CD4⁺ T-Effektorzellen, die keinen suppressiven Phänotyp besitzen, führt ebenfalls zur temporären CD25-Expression (Ziegler, 2007). Ein weiteres Treg-Merkmal ist eine reduzierte Expression des IL-7 Rezeptors (CD127), wodurch die CD127-Expression invers mit der CD25-Expression korreliert. Somit kann durch die Verwendung der Oberflächensignatur CD4⁺CD25⁺CD127⁻ eine Zellpopulation isoliert werden, die über 90% Treg-Zellen enthält (Liu *et al.*, 2006b; Seddiki *et al.*, 2006).

Spätere Forschungsarbeiten identifizierten den Transkriptionsfaktor Foxp3 (engl. *Forkhead box protein P3*) als essentiell für die Entwicklung und Funktion von Treg-Zellen (Sakaguchi, 2004). Dessen Bedeutung zeigt sich insbesondere bei „*scurfy*“-Mäusen, die aufgrund eines *foxp3*-Defekts keine funktionellen Foxp3⁺ Treg-Zellen besitzen und infolge dessen an letalen Autoimmunerkrankungen leiden (Brunkow *et al.*, 2001). Im Menschen verursacht eine *FOXP3*-Mutation das IPEX (engl. *immuno-dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*)-Syndrom, welches mit schweren Autoimmunerkrankungen verschiedener Organe, Allergien und IBD (engl. *inflammatory bowel disease*) einhergeht (Bennett *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2013).

1.2.2 Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen

Für ihre regulativen Funktionen besitzen Treg-Zellen ausgeprägte suppressive Aktivität gegenüber Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität, welche maß-

geblich über vier verschiedene Mechanismen vermittelt wird (Apostolou and von Boehmer, 2004; Schmetterer et al., 2012; Workman et al., 2009).

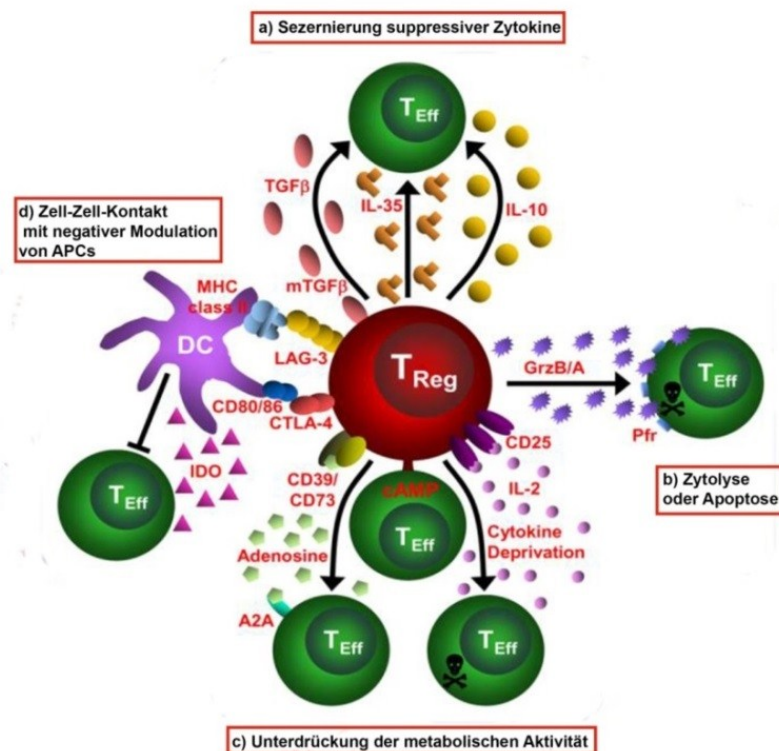


Abb. 1.1: Inhibitionsmechanismen regulatorischer T-Zellen. Abgebildet sind die vier wesentlichen Mechanismen der Zellsuppression: (A) Sezernierung suppressiver Zytokine (B) Zytolyse oder Apoptose der Zielzelle (C) Unterdrückung der metabolischen Aktivität (D) Zell-Zell-Kontakt mit negativer Modulation von APCs. (Modifiziert nach Workman *et al.*, 2009)

Ein Mechanismus erfolgt mittels direktem Zell-Zell-Kontakt. Für die Unterdrückung der T-Zellaktivierung spielt die Reifung von DCs eine entscheidende Rolle. Das auf Treg-Zellen exprimierte CD4-Homolog, LAG3 (engl. *lymphocyte activation gene 3*), bindet an den MHC Klasse-II Rezeptor der DCs und aktiviert eine Signalkaskade, welche die Reifung von DCs inhibiert (Abb. 1.1 D) (Liang et al., 2008; Workman and Vignali, 2005). Zusätzlich induziert die Bindung des konstitutiv exprimierten CTLA4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) an CD80/CD86 der DCs die Bildung von IDO (engl. *indoleamine 2,3 dioxygenase*) (Takahashi et al., 2000; Wing et al., 2008) wodurch pro-apoptische Mediatoren über einen Tryptophan-Katabolismus freigesetzt werden und die Proliferation reduziert wird (Fallarino et al., 2006; Mellor and Munn, 2004). Die Analyse von Treg-Zellen aus LAG3-defizienten Mäusen zeigte eine verringerte suppressive Aktivität *in vitro*, jedoch bildeten sich in diesen Mäusen keine Autoimmunerkrankungen aus (Huang et al., 2004). Hingegen verursacht eine Fehl-

funktion von *CTLA-4* in Mäusen Autoimmunerkrankungen wie IBD, die ähnlich in Treg-defizienten Mäusen beobachtet wurden (Takahashi et al., 2000; Wing et al., 2008).

Die Suppression durch Treg-Zellen kann auch durch Sezernierung der inhibitorischen Zytokine IL-10, TGF- β und IL-35 erfolgen (Abb. 1.1 A). Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 inhibiert die Proliferation von T-Zellen und Makrophagen und reduziert die Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen (Fiorentino et al., 1991; Makarenkova et al., 2006; Pillay et al., 2012). TGF- β wird für die Induktion von Treg-Zellen benötigt und ist außerdem in der Lage die Aktivierung und Proliferation von Makrophagen und T-Zellen zu hemmen (Bogdan and Nathan, 1993; Faria and Weiner, 2005). Die Funktion von IL-35 ist noch weitgehend unklar und Gegenstand aktueller Forschung, allerdings wird IL-35 für die maximale suppressive Funktion von Treg-Zellen benötigt und eine Überexpression in naiven T-Zellen induziert einen suppressiven Phänotyp (Collison et al., 2007).

Ein weiterer Mechanismus ist die Suppression durch Zytolyse oder Apoptose (Abb. 1.1 B). Hierfür sekretieren humane Treg-Zellen Granzym A und Perforin, um in Effektor-T-Zellen eine Apoptose einzuleiten (Grossman et al., 2004). In Mäusen hingegen lösen Treg-Zellen eine gezielte Apoptose mittels Granzym B aus (Gondek et al., 2005). Granzyme sind Serin-*Proteasen*, die durch die Perforin-Poren der Zellen ins Zellinnere gelangen und Apoptose-induzierende *Caspasen* aktivieren. Zusätzlich kann eine Apoptose auch durch den TRAIL (engl. *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*)-DR5 Signalweg oder aber auch mittels Galectin-1 durch aktivierte Treg-Zellen vermittelt werden (Garin et al., 2007; Ren et al., 2007).

Der vierte bekannte Inhibitionsmechanismus geschieht durch Unterdrückung der metabolischen Aktivität in Effektor-T-Zellen (Abb. 1.1 C). Die hohe konstitutive Expression des IL-2 Rezeptors auf der Oberfläche regulatorischer T-Zellen ermöglicht die Bindung von IL-2, welches proliferierende T-Effektorzellen zum Überleben benötigen, so dass der Mangel an IL-2 eine Apoptose einleitet (de la Rosa et al., 2004; Pandiyan et al., 2007; Thornton and Shevach, 1998). Zudem wird extrazelluläres ATP durch CD39 und CD73 auf Treg-Zellen über Adenosinmonophosphat (AMP) zu Adenosin gespalten welches anschließend an den A2A-Rezeptor bindet und eine Inhibition bewirkt (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007). Zusätzlich induziert diese Bindung eine zusätzliche Freisetzung von TGF- β und eine Minimierung der IL-6 Sekretion (Zarek et al., 2008). Durch die Freisetzung

von TGF- β wird die Induktion von weiteren Treg-Zellen eingeleitet, gleichzeitig verhindert die Abwesenheit von IL-6 die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und fördert die Treg-Zelldifferenzierung (Doganci et al., 2005; Oukka, 2007). Eine zusätzliche Inhibition von Effektorzellen kann außerdem durch den Transfer von zyklischem AMP über *gap junctions* erfolgen (Bopp et al., 2007).

1.2.3 Differenzierung zwischen natürlichen und induzierten Treg-Zellen

Abhängig vom Ursprung werden natürliche und induzierte Treg (iTreg) Zellen unterschieden. Natürliche Treg (nTreg)-Zellen reifen aus T-Vorläuferzellen während der T-Zellreifung im Thymus heran während iTreg-Zellen aus konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Antigenkontakt in Anwesenheit von TGF- β und IL-2 in der Peripherie entstehen (Horwitz et al., 2008; Josefowicz and Rudensky, 2009; Zheng et al., 2007; Zhou et al., 2010). Beide unterscheiden sich in der Spezifität ihrer TCRs. Während ihrer Reifung werden Lymphozyten, die körpereigene Antigene erkennen durch die negative Selektion aussortiert und eine Apoptose induziert. Dabei spielt die Höhe der Affinität eine entscheidende Rolle. Natürliche Treg-Zellen zeigen eine mittlere Affinität gegenüber eigenen Antigenen im Thymus, welche allerdings nicht stark genug ist um durch die negative Selektion aussortiert zu werden. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings scheinen mTECs (engl. *medullary thymic epithelial cells*), die die Antigene präsentieren, eine wichtige Rolle dabei zu spielen (Hinterberger et al., 2010). Hingegen entstehen iTreg-Zellen aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, die während der negativen Selektion im Thymus eine sehr geringe Affinität zu eigenen Antigenen besitzen, jedoch eine erhöhte Affinität zu fremden Antigenen aufweisen (Aschenbrenner et al., 2007; Lee et al., 2012). Natürliche Treg-Zellen zeichnen sich durch eine konstitutive Expression von *Foxp3* sowie stabilen suppressiven Eigenschaften gegenüber anderen Zellen aus. Hingegen ist die *Foxp3*-Expression in iTreg-Zellen instabil und auch die suppressiven Eigenschaften können verloren gehen (Huehn et al., 2009). Eine *in vivo* Neutralisation von TGF- β verhindert eine Differenzierung zu iTreg-Zellen, beeinflusst jedoch nicht die Entwicklung von nTreg-Zellen (Fahlen et al., 2005; Marie et al., 2006; Sun et al., 2007). iTreg-Zellen können durch orale Applikation von Antigenen, durch Antigenkontakt in der *Lamina propria* im Darm, in chronisch entzündetem Gewebe und in Tumorerkrankungen induziert werden (Curotto de Lafaille et al., 2004; Liu et al., 2007; Mucida et al., 2005; Sun et al., 2007). Induzierte regulatorische T Zellen können unter bestimmten Bedingungen in andere T-Zell-

populationen differenzieren, was auch als Plastizität bezeichnet wird (Komatsu et al., 2009; Miyao et al., 2012).

Eine Treg-Zelltherapie könnte den Krankheitsverlauf verschiedener Erkrankungen positiv beeinflussen. Beispielsweise besitzen Treg-Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis eine deutlich minimierte suppressive Aktivität, welche allerdings mit der Induktion von iTreg-Zellen mittels TGF- β kompensiert werden kann (Nadkarni et al., 2007). Treg-Zellen aus SLE (systemischer Lupus erythematodes)-Erkrankten oder Menschen mit einer multiplen Sklerose zeigen ebenfalls einen funktionellen Defekt, der die suppressiven Kapazitäten von Treg-Zellen einschränkt (Haas et al., 2005; Valencia et al., 2007). In diesen Fällen könnte der Transfer von *in vitro* generierten stabilen Treg-Zellen eine vielversprechende Therapie sein (Kohm et al., 2002; Scalapino et al., 2006). Solche Zellen könnten *ex vivo* aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch den Einfluss von TGF- β und IL-2, aber auch durch DNA-Methyltransferase-Inhibitoren wie 5-aza-2'-deoxycytidin, expandiert werden (Chen et al., 2003; Moon et al., 2009). Es wird jedoch befürchtet, dass ein Transfer von instabilen *in vitro* induzierten Treg-Zellen schädliche Auswirkungen haben könnte, da iTreg-Zellen unter bestimmten Bedingungen dazu neigen, ihre FOXP3-Expression und suppressiven Eigenschaften zu verlieren und *in vivo* zu konventionellen aktivierten T-Zellen zu differenzieren (Zhou et al., 2009). Besonders in pro-inflammatorischem Milieu konnte eine Differenzierung von iTreg-Zellen in IL-17 und IFN- γ sezernierende Th17-Zellen beobachtet werden (Ayyoub et al., 2009; Komatsu et al., 2009). Bislang fehlt eine Methode zur *in vitro* Induktion von stabilen Treg-Zellen.

Heutzutage ist es auch noch nicht möglich, natürliche von induzierten regulatorischen T-Zellen zuverlässig zu unterscheiden. Für eine Differenzierung zwischen nTreg- und iTreg-Zellen sind in den letzten Jahren einige Moleküle in Betracht gezogen worden. Die Treg-Zelltypischen Oberflächenmoleküle CTLA4, LAG3, GITR (engl. *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), ENTPD1 (engl. *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1* – CD39) und 5'-NT (engl. *5'-nucleotidase* - CD73) werden konstitutiv in nTreg-Zellen exprimiert, eignen sich jedoch nicht für die Differenzierung zwischen nTreg- und iTreg-Zellen, da CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Aktivierung diese Moleküle ebenfalls transient exprimieren können (Gagliani et al., 2013; Gandhi et al., 2010; Han et al., 2009; Kataoka et al., 2005; Levings et al., 2002; Lin et al., 2013; Seddiki et al., 2006). Auch die Expression des Transkriptionsfaktors Helios wurde von Thornton *et al.* als nTreg-spezifisch postuliert

(Kim et al., 2012; Thornton et al., 2010). Mittlerweile konnte jedoch eine Expression von Helios sowohl in humanen als auch in murinen aktivierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen gezeigt werden, so dass Helios ebenfalls nicht zur Differenzierung zwischen nTreg und iTreg-Zellen geeignet ist. (Akimova et al., 2011; Gottschalk et al., 2012).

In Mäusen konnten Bruder *et al.* zeigen, dass das Oberflächenmolekül Neuropillin-1 (Nrp1) spezifisch auf $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen gebildet wird während T-Effektorzellen auch nach Aktivierung kein Nrp1 exprimieren (Bruder et al., 2004). Yadav *et al.* demonstrierten kürzlich, dass Nrp1 kaum von *in vitro* generierten iTregs exprimiert wird, sondern größtenteils auf der Zelloberfläche von nTreg-Zellen zu finden ist und dort die Bindung zu DCs stabilisiert (Feuerer et al., 2010; Sarris et al., 2008; Weiss et al., 2012; Yadav et al., 2012). Die genaue Funktion von Nrp1 auf Treg-Zellen ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten (Corbel et al., 2007; Hansen et al., 2012; Solomon et al., 2011). Nrp1 wird jedoch nicht auf humanen Treg-Zellen exprimiert und ist deshalb für die Charakterisierung humaner nTreg-Zellen ungeeignet (Milpied et al., 2009).

Für die Differenzierung zwischen nTreg- und iTreg-Zellen im Menschen kommt besonders erschwerend hinzu, dass aktivierte $CD4^+CD25^-$ T-Zellen ohne suppressive Eigenschaften, ebenfalls temporär *FOXP3* exprimieren können (Allan et al., 2007; Gavin et al., 2006; Ziegler, 2007).

Das Oberflächenprotein GARP (engl. *glycoprotein A repetitions predominant*), das durch *LRRC32* codiert ist, wird spezifisch auf humanen und murinen aktivierten natürlichen Treg-Zellen gebildet jedoch nicht auf aktivierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, iTreg-Zellen oder inaktiven nTreg-Zellen (D'Alise et al., 2011; Edwards et al., 2013; Probst-Kepper et al., 2009; Tran et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass GARP die *FOXP3*-Expression reguliert und ein Rezeptor für latentes TGF- β ist (Wang et al., 2009; Zhou et al., 2013). Nach Bindung von TGF- β wird weniger GARP gebildet, während bei einer Reduktion von TGF- β eine erhöhte GARP-Bildung induziert wird (Zhou et al., 2013). Zugleich wurde gezeigt, dass $CD4^+CD25^+GARP^+$ Treg-Zellen eine höhere suppressive Aktivität als $CD4^+CD25^+GARP^-$ Treg-Zellen aufweisen (Wang et al., 2009).

Vor kurzem wurden epigenetische Unterschiede zwischen natürlichen und induzierten Treg-Zellen beschrieben. Anhand eines Treg-spezifischen DNA-Methylierungsmusters ermöglichten Baron *et al.* erstmals eine exakte Differenzierung zwischen nTreg- und iTreg-Zellen (Baron et al., 2007). Natürliche Treg-Zellen be-

sitzen exklusiv eine spezifische unmethylierte Region in *FOXP3*, welche als *FOXP3*-TSDR (engl. *Treg specific demethylated region*) bezeichnet wird. Diese epigenetische DNA-Modifikation ist essentiell für eine stabile *FOXP3*-Expression und wird ebenso wie die Regulationsmechanismen der *FOXP3*-Expression in Kapitel 1.2.4 näher beschrieben (Baron et al., 2007; Floess et al., 2007).

1.2.4 Die *FOXP3* Regulation

FOXP3 (*Foxp3*) ist zwischen Menschen und Mäusen stark konserviert, was sich in einer Übereinstimmung von 86 % in der Proteinsequenz widerspiegelt (Lankford et al., 2008). Das Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und besteht aus 11 kodierenden und 3 nicht-kodierenden Exons (Brunkow et al., 2001). Die Regulation der *FOXP3/foxp3* Expression erfolgt mittels epigenetischer DNA-Modifikation (Baron et al., 2007; Floess et al., 2007).

Bislang wurden epigenetische DNA-Modifikationen in Form von Histon-Modifizierung, Nukleosom-Positionierung, RNA-Interferenz und Cytosin-Methylierung der DNA beschrieben, welche wichtige Mechanismen der Transkriptionsregulierung darstellen (Cedar and Bergman, 2011; Gibney and Nolan, 2010; Wilson et al., 2009).

Die DNA-Methylierung von Cytosinen ermöglicht eine langfristige und stabile Regulation der Transkription von Genen ohne Veränderung der DNA-Sequenz (Reik et al., 2001). Vereinfacht dargestellt bedeutet eine DNA-Methylierung eine Verhinderung der Transkription des betroffenen Gens, wie es beispielsweise bei der Geninaktivierung auf dem zweiten X-Chromosom geschieht (Baron et al., 2006; Bird, 2002; Gibney and Nolan, 2010). Die DNA-Methylierung erfolgt in Wirbeltieren ausschließlich über CG-Dinukleotide (engl. *cytosine phosphodiester guanosine*, CpG) und kommt durch die kovalente Bindung einer Methylgruppe an das 5'-Ende von Cytosinen zustande, woraus 5-Methylcytosine resultieren (Abb. 1.2) (Newell-Price et al., 2000; Weber and Schubeler, 2007).

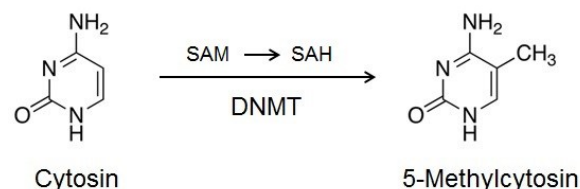


Abb. 1.2: Enzymatische Reaktion von Cytosin zu 5-Methylcytosin. DNA-Methyltransferasen (*DNMT*) verwenden SAM als Substrat und binden eine Methylgruppe an ein Cytosin wodurch 5-Methylcytosin entsteht.

In Wirbeltieren wird eine CpG-Methylierung von etwa 60 % angenommen, welche durch drei der bislang vier bekannten *DNA-Methyltransferasen* (*DNMT1*, *DNMT3a*

und *DNMT3b*) aufrechterhalten wird (Antequera and Bird, 1993; Bestor and Coxon, 1993; Weber and Schubeler, 2007).

Durch diese CpG-Methylierung werden methylbindende Repressoren wie z.B. MBD (engl. *methyl-CpG-binding domain*) rekrutiert, welche die Ladung der Histone verändern und somit die Formation des DNA-Stranges verdichten. Dies hat zur Folge, dass die Transkriptionsmaschinerie nicht binden kann und das entsprechende Gen nicht transkribiert wird (Tost, 2010). Eine Fehlregulation dieser CpG-Methylierung verursacht die Transkription unerwünschter Gene und kann somit die Entstehung von Krankheiten beeinflussen, wie beispielsweise die Erkrankung Systemischer Lupus erythematodes, bei der das T-Zell-Genom eine reduzierte DNA-Methylierung aufweist, wodurch eine Überexpression von Integrinen toxisch wirkt (Bjornsson et al., 2004; Takeuchi et al., 1993).

Ähnlich wie in Treg-Zellen wird auch in Th1-, Th2- und Th17-Zellen die Expression essentieller Transkriptionsfaktoren über spezifische DNA-Methylierung reguliert (Allan et al., 2012; Ansel et al., 2003; Collier et al., 2014; Lee et al., 2002; Wilson et al., 2009).

Die *FOXP3*-Expression wird in vier verschiedenen Regionen durch epigenetische Veränderungen reguliert. Diese Genregionen sind der Promotor, die CNS (engl. *conserved non-coding sequences*) 1, CNS2 und CNS3 (Abb. 1.3).

Der *FOXP3/foxp3*-Promotorbereich ist in humanen und murinen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen größtenteils methyliert und in nTreg-Zellen vollständig unmethyliert (Janson et al., 2008; Kim and Leonard, 2007). Aufgrund fehlender Methylierung und stärker acetylierter Histone in nTreg-Zellen ist der Promotorbereich für Transkriptionsfaktoren wie NFAT, AP1, STAT5, SP1 und TIEG1 zugänglich, wodurch die Transkription ermöglicht wird (Fayyad-Kazan et al., 2010; Kim and Leonard, 2007). Jedoch unterscheidet sich im Menschen und der Maus die Stabilität der Methylierung in diesem Promotorbereich. Murine $CD4^+CD25^-$ T-Zellen weisen nach TGF- β induzierter *foxp3*-Expression eine geringere Methylierung als konventionelle $CD4^+CD25^-$ T-Zellen auf (Kim and Leonard, 2007). Hingegen ist in humanen iTreg-Zellen keine Veränderung der Methylierung nach Stimulation mit TGF- β festzustellen (Janson et al., 2008). Unabhängig davon findet sowohl im Menschen als auch in Mäusen in iTreg-Zellen eine Acetylierung der Histone statt, wodurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren begünstigt wird (Abb. 1.3) und eine instabile *FOXP3/foxp3*-Expression induziert werden kann (Mantel et al., 2006; Ohkura et al., 2012).

Die CNS1, auch als TGF- β Sensor bezeichnet, besitzt keine CpG-Dinukleotide, jedoch existiert eine transkriptionelle Regulation durch Histon-Acetylierung (Tone et al., 2008). Es wird angenommen, dass diese Region die *FOXP3*-Expression durch Bindung von Transkriptionsfaktoren verstärken kann (Polansky et al., 2008). In $CD4^+CD25^-$ T-Zellen sind keine acetylierten Histone vorhanden, hingegen ist eine deutliche Acetylierung sowohl in iTreg- als auch in nTreg-Zellen zu finden (Tone et al., 2008). Die *in vitro* Stimulation von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen über den TCR in Anwesenheit von TGF- β kann eine Acetylierung in der CNS1 induzieren, somit die Bindung von NFAT und SMAD3 ermöglichen und die *FOXP3*-Expression in iTreg-Zellen verstärken (Ohkura et al., 2012; Samstein et al., 2012). Sobald TGF- β entzogen wird verlieren diese iTreg-Zellen allerdings ihre *FOXP3*-Expression (Huehn et al., 2009). Diese Genregion ist für die Reifung von nTreg-Zellen nicht relevant, allerdings führt eine spezifische Deletion in Mäusen zur Reduzierung von iTreg-Zellen, da diese Region für die TGF- β induzierte *foxp3*-Expression benötigt wird (Zheng et al., 2010).

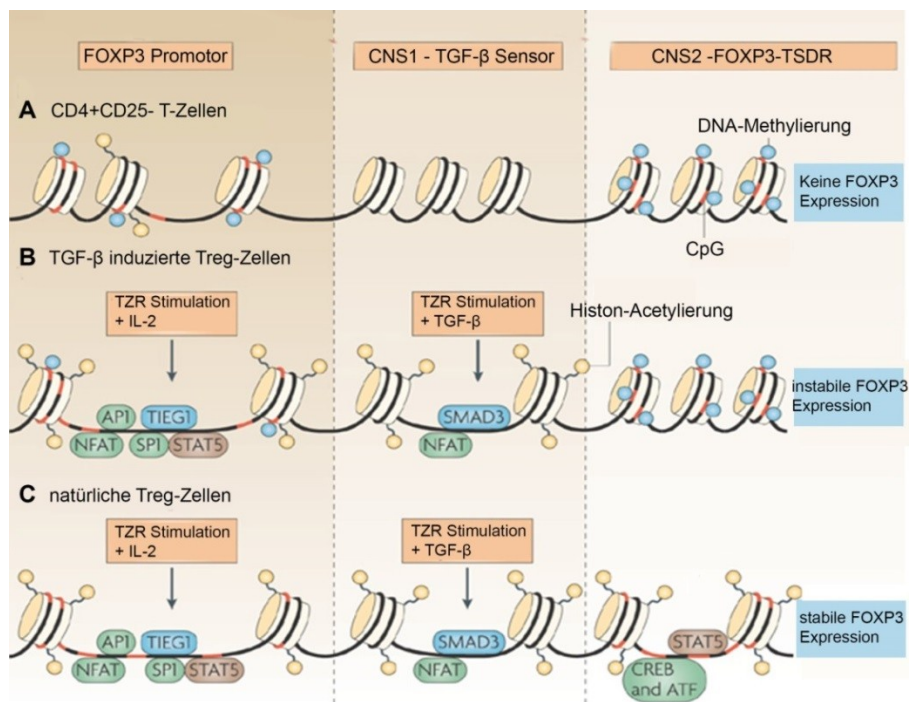


Abb. 1.3: Darstellung epigenetischen Regulationsmechanismen der *FOXP3*-Expression. (A) Epigenetische DNA-Modifikation in *FOXP3* von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen. (B) Einfluss von TGF- β und IL-2 auf die epigenetische Genregulation und daraus folgende induzierte *FOXP3*-Expression (C) Stabile *FOXP3*-Expression in nTreg-Zellen. (Modifiziert nach Huehn et al., 2009)

Ein spezifisches Merkmal von nTreg-Zellen ist die fehlende DNA-Methylierung in der CNS2, die auch als *FOXP3*-TSDR bezeichnet wird (Abb. 1.3) (Baron et al., 2007).

CpG-Methylierungsstudien konnten zeigen, dass ausschließlich nTreg-Zellen in dieser *FOXP3*-Genregion vollständig unmethyliert sind. Alle anderen Leukozytenpopulationen wie z.B. neutrophile Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen, B-Zellen und nicht-regulatorische T-Zellen besitzen eine vollständige Methylierung in der *FOXP3*-TSDR (Baron et al., 2007; Floess et al., 2007). Auch mittels TGF- β induzierte iTreg-Zellen besitzen im Menschen in dieser Region eine vollständige DNA-Methylierung wodurch die Bindung von MBD bestehen bleibt (Floess et al., 2007; Polansky et al., 2008). Murine, mittels TGF- β oder DEC-205 induzierte Treg-Zellen zeigen in dieser Region eine partielle Demethylierung (Floess et al., 2007; Miyao et al., 2012; Polansky et al., 2008). Diese spezifische Demethylierung findet bereits bei der Entwicklung von nTreg-Zellen im Thymus statt und gewährleistet eine stabile *FOXP3/foxp3*-Expression durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie CREB, ATF und STAT5 (Klein and Jovanovic, 2011; Toker et al., 2013). Dementsprechend kann eine Demethylierung dieser Region eine *Foxp3*-Expression induzieren (Schmidl et al., 2009). Der Methylierungsstatus der *FOXP3*-TSDR ist nicht entscheidend für das Level der *FOXP3*-Expression, da iTreg-Zellen ein identisches Maß an *FOXP3* exprimieren können (Polansky et al., 2008). Die unmethylierte *FOXP3*-TSDR ist jedoch verantwortlich für die konstitutive Expression von *foxp3* und den stabilen suppressiven Phänotyp natürlicher Treg Zellen (Miyao et al., 2012). CNS2-defiziente Mäuse zeigten erst nach sechs Monaten eine verringerte Anzahl an Treg-Zellen, was bestätigt, dass diese Region eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung einer stabilen suppressive Funktion in Treg-Zellen besitzt (Zheng et al., 2010).

Aufgrund der differentiellen Methylierung zwischen nTreg-Zellen und allen anderen Leukozyten in der *FOXP3*-TSDR, eignet sich diese Region besonders gut für eine zuverlässige Quantifizierung von humanen nTreg-Zellen. Hierbei bietet sich im Vergleich zur Quantifizierung mittels Proteinexpression der große Vorteil einer aktivierungsunabhängigen, stabilen DNA-Methylierung (Reik et al., 2001). Dadurch ist auch in stark aktiviertem Milieu, verursacht durch Infektionen oder Tumorerkrankungen, eine exakte Quantifizierung von nTreg-Zellen möglich.

CNS3-defiziente Mäuse weisen eine verringerte Anzahl an nTreg-Zellen auf, jedoch exprimieren die vorhandenen Zellen in unverändertem Maß *foxp3*, so dass die CNS3 eine wichtige Funktion in der Entstehung von Treg-Zellen im Thymus besitzt, jedoch nicht an der Regulation der *foxp3*-Expression beteiligt ist (Zheng et al., 2010).

1.3 Sepsis

Bei einer Sepsis handelt es sich um eine lebensbedrohliche systemische Entzündungsreaktion infolge einer Infektion durch Bakterien oder Pilze.

Seit 1992 wird eine Sepsis durch die *American College of Chest Physicians* (ACCP) und die *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) Consensus Conference in vier Schweregrade eingeteilt (Bone et al., 1992a):

- SIRS (engl. *systemic inflammatory response syndrome*)
- Sepsis
- schwere Sepsis
- septischer Schock

SIRS ist eine systemische Reaktion des Immunsystems auf eine Inflammation, die dann vorliegt, wenn zwei der in Tabelle 1.1 aufgeführten Kriterien erfüllt sind (Levy et al., 2003).

Tab. 1.1 Klinische Anzeichen einer SIRS

Kriterium	Abweichung
Körpertemperatur	>38°C oder <36°C
Herzschlagfrequenz	>90 min ⁻¹
Atmung	>20 min ⁻¹ oder PaCO ₂ <32mm Hg
Leukozyten	4000< oder >12000 weiße Blutkörperchen µl ⁻¹

Diese Symptome müssen jedoch nicht zwangsläufig durch eine bakterielle oder Pilzinfektion ausgelöst werden, sondern können auch durch andere Ursachen, wie Traumata, Verbrennungen oder eine Pankreatitis hervorgerufen werden.

Eine Sepsis liegt vor, wenn zusätzlich zu einem SIRS ein begründeter klinischer Verdacht oder der Nachweis einer durch Bakterien oder Pilze verursachten Infektion vorliegt.

Bei der schweren Sepsis tritt zusätzlich eine akute Organfehlfunktion, beispielsweise der Nieren, Lungen oder des Gehirns auf (Bone et al., 1992b).

Im schlimmsten Fall kann sich ein septischer Schock entwickeln, bei dem eine lebensbedrohliche Hypotension (Blutdruck <90 mm Hg für mindestens eine Stunde) und ein Multiorganversagen auftreten (Bone et al., 1992a)

Eine Sepsis ist meist bakteriell, seltener durch Pilzinfektionen verursacht, wobei in einigen Fällen auch Mischinfektionen vorkommen (Martin et al., 2009). Die letzte in Deutschland durchgeführte Prävalenzstudie aus dem Jahr 2003 zeigte, dass jährlich 75000 Einwohner an einer schweren Sepsis und 79000 Einwohner an einer Sepsis erkranken. Damit ist die Sepsis die siebthäufigste lebensbedrohliche, in Krankenhäusern behandelte, Erkrankung. Mehr als die Hälfte aller an schwerer Sepsis erkrankten Menschen versterben trotz maximaler medizinischer Behandlung innerhalb von 90 Tagen. Aufgrund dieser hohen Mortalitätsrate ist eine Sepsis mit ca. 60000 Todesfällen im Jahr die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Als Sepsisfokus sind Lungenentzündungen die häufigsten Erkrankungen (63 %), gefolgt von intraabdominalen (25 %) und urogenitalen (7 %) Infektionen. Aufgrund intensiver medizinischer Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis fallen jährlich Behandlungskosten in Höhe von 1,77 Milliarden Euro an (Brunkhorst, 2006).

1.3.1 Pathogenese einer Sepsis

Damit eine Sepsis entstehen kann, müssen Pathogene in den Blutkreislauf gelangen. Nachdem Pathogene die physischen Barrieren des Körpers durchdringen, werden diese in der Regel von der angeborenen Immunität erkannt und eliminiert. Diese ideal verlaufende Immunantwort kann jedoch in einigen Fällen scheitern. Besonders gefährdet sind immunsupprimierte Menschen nach einer Tumorerkrankung oder Organtransplantation, aber auch Säuglinge und ältere Menschen (Angus et al., 2001).

Kann der eingedrungene Erreger der primären Antwort des Immunsystems entgehen, tritt eine systemische Entzündungsreaktion (SIRS) auf, deren Ausmaß von Vorerkrankungen, dem Ernährungsstand des Betroffenen und zugleich der Menge an Pathogen und dessen Virulenzfaktoren abhängig ist (Hotchkiss and Opal, 2010). In diesem frühen Stadium einer Sepsis wird die angeborene Immunität durch die Identifizierung der Pathogene aktiviert, wobei insbesondere Makrophagen pro-inflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, Interferon(IFN)- γ , IL-1 β , IL-6 und IL-12 sezernieren, um eine Immunantwort gegen das Pathogen auszulösen (Abb. 1.5). Infolge einer übermäßigen pro-inflammatorischen Reaktion des Immunsystems kann es zu Gewebeschäden kommen, wodurch DAMPs (engl. *damage-associated molecular patterns*) freigesetzt werden, welche Makrophagen über TLRs aktivieren und weitere Inflammation induzieren (Bianchi, 2007). Des Weiteren ist die pro-inflammatorische Phase durch die Freisetzung von Mediatoren wie HMGB1 (engl. *high mobility group*

protein B1), Anaphylatoxin C5a und MIF (engl. *migration inhibitory factor*) charakterisiert (Abb. 1.5), welche eine zusätzliche Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen, aber auch die Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen bewirken (Huber-Lang et al., 2006; Lotze and Tracey, 2005; Sha et al., 2008; Ward, 2004). Diese Zytokine, besonders aber durch Monozyten sezerniertes IL-6, rekrutieren Zellen aus dem adaptiven Immunsystem, insbesondere CD4⁺ T-Zellen. Diese rekrutierten T-Zellen werden durch IL-6 und IL-12 aktiviert und es erfolgt eine Th1- und Th17-vermittelte Immunantwort mit zusätzlicher Sezernierung von TNF α , INF- γ , IL-2 und IL-17 (Weaver et al., 2007). Diese unkontrollierte, massive Immunantwort beeinträchtigt die Endothelfunktion, besonders TNF α verursacht eine erhöhte Permeabilität von Kapillaren wodurch es zu einer stärkeren Invasion der eingedrungenen Pathogene kommen kann. Zusätzlich können sich Blutgerinnsel bilden um die Infektion einzudämmen, wobei eine intravaskuläre Gerinnung und eine Erschöpfung der Vorräte an Gerinnungsfaktoren auftreten können. Die Folge davon sind Blutungen in die Haut und innerer Organe, die letztendlich zu einem letalen Organversagen führen können (Denk et al., 2012; Janeway et al., 2009; Rivers et al., 2001).

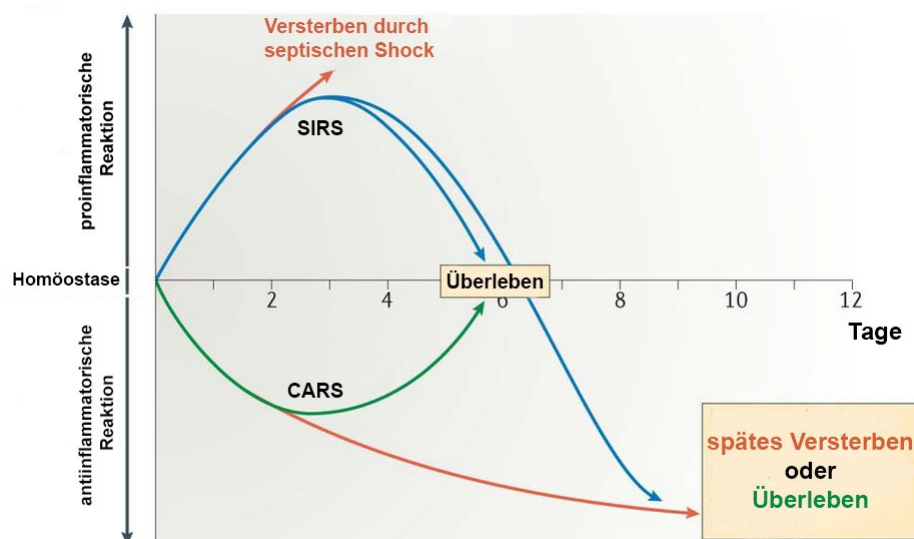


Abb. 1.4: Darstellung der Inflammationskinetik einer Sepsis. Zu Beginn einer Sepsis findet gleichzeitig eine pro-inflammatorische (SIRS) und anti-inflammatorische (CARS) Immunreaktion statt. Ein Ausufern einer dieser Reaktionen fördert das Versterben eines Patienten. Eine Kompensation beider Reaktion führt zur erneuten Homöostase und fördert das Überleben septischer Patienten. (Modifiziert nach Hotchkiss *et al.*, 2013)

Im Gegenzug zu diesem stark pro-inflammatorischen SIRS findet zeitgleich das CARS (engl. *compensatory anti-inflammatory response syndrom*) statt (Abb. 1.4), welches mit anti-inflammatorischen Mediatoren einer zu starken Hyperinflammation

entgegenwirkt (Adib-Conquy and Cavillon, 2009). Zu diesen Mediatoren gehören IL-10, TGF- β , IL-4 und die lösliche Rezeptoren IL-1R und TNFR (Abb. 1.5). IL-10 wird durch Th2- und Treg-Zellen sezerniert und inhibiert die Proliferation und die Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ , TNF α , IL-1, IL-6 und IL-2 in Th1-Zellen und Makrophagen (Fiorentino et al., 1991; Makarenkova et al., 2006; Pillay et al., 2012). Gleichzeitig regt es die Produktion von IL-1R und TNFR als Liganden für IL-1 und TNF α an (Seitz et al., 1995). Zusätzlich wird die MHC Expression auf APCs negativ stimuliert und somit die T-Zellaktivierung reduziert (Moore et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass zwischen dem IL-10 Serumlevel und dem Anteil an Treg-Zellen eine Korrelation besteht (Hiraki et al., 2012). TGF- β induziert Treg-Zellen und inhibiert gleichzeitig die T-Zellproliferation und die Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, TNF α und HMGB1 (Bogdan and Nathan, 1993; Gilbert et al., 1997). Die T-Zelldifferenzierung wird durch IL-4 beeinflusst indem eine Verschiebung von Th1 zu Th2 stattfindet (Seder et al., 1992). Damit wird deutlich, dass es sich bei einer Sepsis um einen interaktiven und dynamischen Prozess zwischen pro- und anti-Inflammation handelt, wobei eine Fehlregulation auf beiden Seiten letal sein kann (Abb. 1.4).

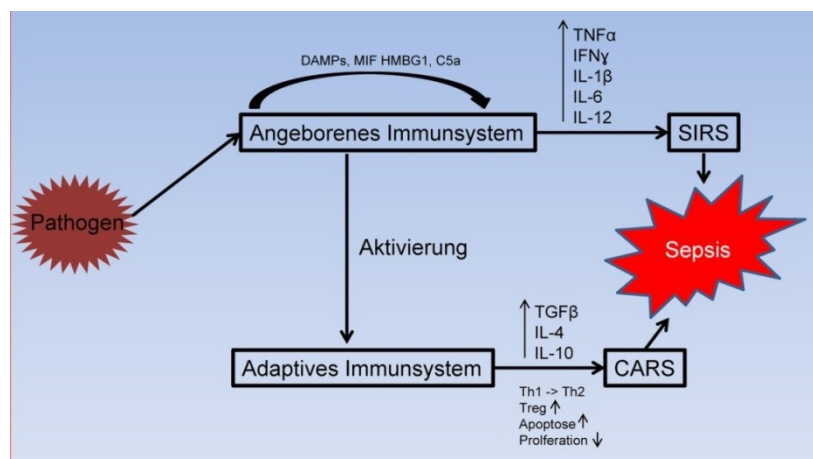


Abb. 1.5: Reaktionskaskade des angeborenen und adaptiven Immunsystems während einer Sepsis. Ein eingedrungenes Pathogen aktiviert das angeborene Immunsystem, wodurch es zu einer exzessiven Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren kommt (SIRS). Gleichzeitig wird das adaptive Immunsystem involviert und eine anti-inflammatorische Gegenreaktion (CARS) gestartet.

Lange Zeit wurde angenommen, dass diese unkontrollierte pro-inflammatorische Reaktion auf in den Körper eingedrungene Pathogene die wesentliche Ursache für den Tod septischer Patienten sei (Bone et al., 1992a). Die durchgeführten anti-inflammatorischen Therapien mit Corticosteroiden, anti-Endotoxin Antikörpern, TNF-Antagonisten, oder IL1-Rezeptor-Antagonisten waren jedoch erfolglos (Bone et al.,

1987; Fisher et al., 1996; Fisher et al., 1994; Ziegler et al., 1991). Jahre später konnte gezeigt werden, dass sich in vielen Patienten, die die Frühphase einer Sepsis überleben, nach der akuten Hyperinflammation eine Immunsuppression ausbildet (Abb. 1.4), in der häufig lebensbedrohliche sekundäre Infektionen erworben werden (Boomer et al., 2011; Hotchkiss et al., 2013; Otto et al., 2011; Ward, 2011).

Die Pathophysiologie dieser immunsuppressiven Bedingungen während einer Sepsis ist jedoch nicht vollständig geklärt. Im Rahmen einer Sepsis kommt es zur Apoptose von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, DCs und B-Zellen in der Milz, im Thymus und in den Lymphknoten (Hotchkiss et al., 1999; Hotchkiss et al., 2002; Hotchkiss et al., 2001). Das Absterben der Immunzellen ist unabhängig vom Alter der Patienten oder der Art des Pathogens zu beobachten (Felmet et al., 2005; Hotchkiss et al., 2000; Toti et al., 2004). Ein Entgegenwirken dieser Apoptose von Immunzellen verbessert die Überlebensrate septischer Mäuse (Chung et al., 2003).

Eine wichtige Rolle in der Entstehung der Immunsuppression wird auch den neutrophilen Granulozyten zugeschrieben. In gesunden Menschen sind neutrophile Granulozyten mit einer Lebensdauer von etwa 24 Stunden sehr kurzlebig, doch während einer Sepsis kommt es zu einer verspäteten Apoptose und einer Anhäufung dieser Zellen. Allerdings bilden diese neutrophilen Granulozyten deutlich weniger ROS (engl. *reactive oxygen species*) wodurch ihre Phagozytoseaktivität erheblich reduziert ist (Kovach and Standiford, 2012; Stephan et al., 2002). Darüber hinaus wurde während einer Sepsis eine suppressive Neutrophilen-Population identifiziert, die mittels IL-10 die Proliferation und Zytokinsekretion von IFN- γ , TNF α , IL-1, IL-6 und IL-2 in T-Zellen und Makrophagen inhibieren kann (Fiorentino et al., 1991; Makarenkova et al., 2006; Pillay et al., 2012). Zudem zeigte eine Studie in septischen Mäusen, dass eine reduzierte Neutrophilenaktivität eine *Pseudomonas aeruginosa* verursachte Pneumonie begünstigen kann (Delano et al., 2011).

Ein weiterer Faktor für die Entstehung einer Immunparalyse ist die Reduktion von NK-Zellen und DCs während einer Sepsis (Forel et al., 2012; Hotchkiss et al., 2002). Nicht nur die Anzahl an DCs ist während einer Sepsis geringer, sondern auch die Expression des HLA-DR (engl. *human leukocyte antigen receptor*) ist reduziert, wodurch es zu einer deutlich schlechteren Antigenpräsentation kommt. Zugleich wird verstärkt IL-10 ausgeschüttet (Poehlmann et al., 2009). Eine verringerte HLA-DR Expression und zusätzlich reduzierte TNF α , IL-1, IL-6 und IL-12 Bildung und eine erhöhte IL-10 und IL1-RA Produktion während einer Sepsis wurde ebenfalls in

Makrophagen und Monozyten beobachtet (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Monneret et al., 2004).

Den stärksten Einfluss während einer Sepsis erfahren $CD4^+$ T-Zellen, deren Gesamtanteil sich deutlich reduziert (Ono et al., 2013). Hier wird von einer T-Zell-Erschöpfung (engl. *T cell exhaustion*) gesprochen, womit ein anerner Zustand der T-Zellen nach dauerhafter Aktivierung und damit verbundener massiver Zytokinproduktion während einer Sepsis beschrieben wird. Die Folgen dieser permanenten Aktivierung sind der Verlust ihrer Effektorfunktionen, eine stark verminderte Proliferation und eine reduzierte Zytokinproduktion (Wherry, 2011). Zugleich wird weniger CD127 exprimiert und die Expression von PD1 (engl. *programmed cell death*) induziert. Im Gegenzug zeigen Makrophagen eine erhöhte Expression von PD1L, welcher bei Bindung an PD1 die Proliferation inhibiert und eine Apoptose in den betroffenen T-Zellen induziert (Boomer et al., 2011; Chang et al., 2014). Guignant *et al.* postulierten, dass eine erhöhte PD1-Expression auf T-Zellen mit einem erhöhten Risiko einer Sekundärinfektion und der damit erhöhten Mortalität korreliert (Guignant et al., 2011). Dass diese PD1-PDL1 Interaktion eine wichtige Rolle während einer Sepsis spielt, konnten Tierversuche bestätigen, indem eine Blockade der PD1-PDL1 Bindung die Überlebensrate von septischen Tieren deutlich steigerte (Zhang et al., 2010).

1.3.2 Regulatorische T-Zellen in der Sepsis

Treg-Zellen sind während einer Infektion ein zweischneidiges Schwert, da sie einerseits einen Gewebeschaden begrenzen, jedoch auch T-Effektorzellen bei der Pathogenelimination behindern können und dadurch eine Pathogenpersistenz entstehen kann (Venet et al., 2008; Walley et al., 1997).

Während einer Sepsis bleibt die Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors FOXP3 unverändert während die Expression der verschiedenen T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet (Th1), GATA3 (Th2) und ROR γ T (Th17) reduziert wird (Pachot et al., 2005; Venet et al., 2008; Venet et al., 2004). In durchgeführten Studien wurde im Blut septischer Patienten ein erhöhter Anteil an $CD4^+CD25^+$ T-Zellen verglichen mit gesunden Probanden beschrieben (Monneret et al., 2003; Scumpia et al., 2006; Venet et al., 2004). In diesen Arbeiten wurden Treg-Zellen jedoch durch die Proteinexpression von CD4 und CD25 bestimmt, wodurch eine Erfassung von aktivierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen nicht ausgeschlossen ist, da besonders während einer Sepsis Immunzellen stark aktiviert werden und auch nicht

regulatorische T-Zellen nach Aktivierung CD25 exprimieren können (Ziegler, 2007). Es wurde vermutet, dass dieser Anstieg nicht auf die Proliferation, der sonst anergen Treg-Zellen zurückzuführen ist, sondern auf eine Apoptose der CD4⁺ Effektorzellen (Venet et al., 2004). Die Apoptose-Resistenz von Treg-Zellen könnte durch die erhöhte Expression von BCL-2 (engl. *B cell lymphoma 2*) oder aber auch durch die gesteigerte Treg-Induktion mittels Alarminen (*PAMPs* und *DAMPs*) begründet sein (Zanin-Zhorov et al., 2006). Des Weiteren wurde in septischen Patienten ein erhöhter TGF- β Spiegel nachgewiesen, wodurch vermehrt Treg-Zellen induziert werden könnten (Bogdan and Nathan, 1993; Marie et al., 1996). Dieser erhöhte Anteil an Treg-Zellen kann eine effektive Bekämpfung von Pathogenen verhindern. Venet et al. konnten zeigen, dass ein Anstieg an Treg-Zellen mit einer reduzierten Proliferation von T-Zellen in septischen Patienten einhergeht (Venet et al., 2009). Mittels PMXF (engl. *polymyxin-B immobilized fibre*) konnte der erhöhte Anteil an CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen reduziert und eine erneute Zunahme der CD4⁺ T-Zellpopulation erreicht werden (Ono et al., 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass FOXP3-inhibierende siRNA oder aber auch anti-GITR-Antikörper eine Immunantwort gegenüber Bakterien verstärken können (Scumpia et al., 2007; Venet et al., 2009). Treg-Zellen können nicht nur die Proliferation und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch CD4⁺ T-Zellen verhindern, sondern inhibieren auch Zellen des angeborenen Immunsystems wie z.B. Monozyten und neutrophile Granulozyten. Während einer Sepsis können Treg-Zellen in Monozyten und Neutrophilen eine Apoptose induzieren oder aber auch eine Reduktion der HLA-DR, IL-6, IL-8 und TNF α -Expression bewirken (Venet et al., 2008). Da es während einer Sepsis zu einer Fehlregulation zwischen der pro- und anti-inflammatorischen Immunantwort kommt, könnten Treg-Zellen eine Schlüsselrolle während einer Sepsis spielen.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In der Vergangenheit wurden regulatorische T-Zellen während der Sepsis anhand der Expression von charakteristischen Proteinen untersucht. Insbesondere bei einer Sepsis, einer Erkrankung, die eine starke Aktivierung von Immunzellen herbeiführt, besitzt die Quantifizierung regulatorischer T-Zellen mittels Proteinexpression Nachteile, da sich die Expression vieler Proteine während der Zellaktivierung verändert. In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode etabliert und validiert werden, die eine Quantifizierung regulatorischer T-Zellen über das DNA-

Methylierungsmuster in der *FOXP3*-TSDR ermöglicht, welches als stabiles, aktivierungsunabhängiges Merkmal von Zellen im peripheren Blut angesehen wird. Mit Hilfe dieser Methode sollte eine Quantifizierung von Treg-Zellen in septischen Patienten durchgeführt und mit dem mittels Durchflusszytometrie erstellten, charakteristischen Treg-Profil verglichen werden.

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit die Rolle von Treg-Zellen während einer polymikrobiellen Sepsis anhand des CLP (engl. *cecal ligation and puncture*)-Mausmodells genauer untersucht werden. Mittels Analyse der Foxp3- und Nr1-Expression sollten neue Erkenntnisse über das iTreg- und nTreg-Verhältnis während einer Sepsis gewonnen werden. Um die Funktion regulatorischer T-Zellen während einer Sepsis zu charakterisieren, sollten DEREK-Mäuse eingesetzt werden, die eine spezifische Depletierung von Treg-Zellen ermöglichen. Damit der Einfluss von Treg-Zellen auf die Früh und Spätphase einer Sepsis beschrieben werden kann, sollte eine Depletion vor der Induktion einer polymikrobiellen Sepsis oder vor einer Sekundärinfektion durch den typischen Erreger einer nosokomialen Pneumonie, *Pseudomonas aeruginosa* erfolgen. Zusätzlich sollte die Rolle des TLR2 während einer Sepsis und darauffolgenden Sekundärinfektion mittels TLR2-defizienter Mäuse analysiert werden.

In einem anderen Teil dieser Arbeit sollte mit den beiden DNA-Methyltransferase (DNMT)-Inhibitoren Epigallocatechingallat (EGCG) und 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC) die Differenzierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in Treg-Zellen *in vitro* induziert werden, da eine Treg-Zell-Therapie viele Erkrankungen positiv modulieren könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Mauslinien

Nachfolgend aufgelistete Versuchstiere wurden in der tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikum Essen unter SPF-Bedingungen (spezifisch Pathogen-frei) in IVC2-Käfigen (engl. *individually ventilated cage*) gehalten und waren vor Versuchsbeginn mindestens acht Wochen alt. Um Infektionen der Versuchstiere zu erkennen wurden alle drei Monate Sentinel-Mäuse einer histologischen, serologischen und parasitologischen Gesundheitsüberprüfung durch ein externes Labor unterzogen.

2.1.1 BALB/c

BALB/c-Mäuse wurden von Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Die transgenen Foxp3-GFP und DEREK-Mäuse besitzen den genetischen Hintergrund der BALB/c-Mäuse.

2.1.2 Foxp3-GFP

Transgene Foxp3-GFP-Mäuse exprimieren das GFP (engl. *green fluorescent protein*) unter der Kontrolle des *foxp3*-Promotors, wodurch alle Foxp3⁺ Zellen das GFP bilden (Fontenot et al., 2005). Ursprünglich wurden diese Mäuse von Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen und werden nun unter tierärztlicher Kontrolle in der tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikum Essen in homozygoter Form weitergezüchtet.

2.1.3 DEREK

Transgene DEREK (engl. *Depletion of regulatory T cells*)-Mäuse exprimieren einen Diphtherietoxin (DT)-Rezeptor und das GFP unter der Kontrolle des *foxp3*-Promotors (Lahl and Sparwasser, 2011). Die intraperitoneale Applikation von DT führt in diesen Mäusen zu einer selektiven Depletion von Foxp3⁺ Treg-Zellen. Die Bildung des GFP ermöglicht eine direkte Detektion von Treg-Zellen mittels FACS.

2.1.4 TLR2^{-/-}

Transgene TLR2^{-/-} Mäuse besitzen einen globalen Knockout des Toll-like-Rezeptor 2. Der genetische Hintergrund dieser TLR2^{-/-} Mäuse ist C57BL/6.

2.1.5 C57BL/6

C57BL/6-Mäuse wurden von Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen.

2.2 Zelllinien und Bakterienstämme

2.2.1 Jurkat-Zelllinie

Die Jurkat-Zelllinie ist eine humane immortalisierte T-Zelllinie, die im Jahre 1970 aus T-Zellen eines an Leukämie erkrankten Patienten etabliert wurde (Schneider et al., 1977). Diese Zelllinie wurde in dieser Arbeit für Versuche zur Induktion regulatorischer T-Zellen durch DNA-Methyltransferase-Inhibitoren eingesetzt.

2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Zuvor mittels CLP (engl. *cecal ligation and puncture*, Kap. 2.12.1) induzierte septische Mäuse wurden mit dem PAO1-Stamm des gramnegativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* intratracheal sekundärinfiziert, welches eine häufige Ursache für eine nosokomiale Pneumonie bei Patienten auf Intensivstation ist.

2.2.3 FOXP3 transduzierte T-Zellen (Treg-Zelllinie)

In T-Zellen wurde FOXP3-cDNA retroviral transduziert. Infizierte Zellen wurden mittels FACS sortiert und bis zu drei Monate kultiviert (Ocklenburg et al., 2006).

2.3 Patientenproben

Blutproben septischer Patienten (nach ACCP/ACCM-Kriterien) von der Intensivstation des Universitätsklinikums Essen wurden spätestens 48 Stunden nach Diagnosestellung untersucht.

2.4 Chemikalien

Tab. 2.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)	Sigma-Aldrich, USA
Agarose	Biobudget, Krefeld
Ammoniumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampli Taq 10-fach Reaktionspuffer	Applied Biosystems, Darmstadt
AutoMACS Pro Washing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
AutoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Biocoll	Biochrom, Berlin
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Diethyldicarbonat-Wasser (DEPC-H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, USA
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Diphtherietoxin (DT)	Merck, Darmstadt
Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol (absolut)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching
Go Taq Flexi 5-fach Puffer	Promega, Mannheim
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Merckle GmbH, Blaubeuren
Isofluran (Forane)	Abbot, Wiesbaden
Kaliumdihydrogencarbonat (KHCO_3)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Ketamin (10 %)	Ceva, Düsseldorf
Lineares Polyacrylamid (LPA)	Ambion, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Promega, Mannheim
MML V-RT 5-fach Puffer	Promega, Mannheim
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Sigma, Hamburg
S-adenosylmethionin (SAM)	New England Biolabs, Frankfurt
TaqMan Probes Mastermix	Roche, Schweiz
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Stain	Invitrogen, Karlsruhe
Xylazin (2 %)	Ceva, Düsseldorf

2.5 Puffer, Kulturmedien und Lösungen

Tab. 2.2 Verwendete Puffer, Medien und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
ACK-Puffer	155 mM	NH_4Cl
	9,98 mM	KHCO_3

	0,5 M	EDTA (pH 8)
	pH auf 7,2 - 7,4 ; sterilfiltriert	
Bisulfitlösung	4,25 g	Sodium bisulfit
	7,5 ml	H ₂ O
	Unter UV-Schutz lösen	
	450 µl	Hydrochinon
	500 µl	10 M NaOH
CD4 Isolation Puffer 1	1x PBS	
	0,1 %	FCS
	2 mM	EDTA (pH 7,4)
CD4 Isolation Puffer 2	RPMI medium	
	1 %	FCS
<i>Collagenase / Dnase-Lösung</i>	1 mg/ml	<i>Collagenase Typ D</i>
	10 µg/ml	<i>Dnase I Typ II</i>
	1-fach	FACS-Puffer
Columbia Blut Agar	12,0 g	Casein
	5,0 g	Tiergewebe
	3,0 g	Hefeextrakt
	3,0 g	Rindfleischextrakt
	1,0 g	Maisstärke
	5,0 g	NaCl
	13,5 g	Agar
	5 %	Schafblut
	Ad 1L	
DNA-Ladepuffer (6x)	10 mM	Tris (pH 7,5)
	0,03 %	Bromphenolblau
	0,03 %	Xyclencyanol FF
	60 %	Glycerin
	60 mM	EDTA
Einfrriermedium für Zellen	90 %	IMDM Komplettmedium
	10 %	DMSO
FACS-Puffer	2 %	FCS
	2 mM	EDTA
	1-fach	PBS

<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> - <i>IMDM Komplettmedium</i> mit GlutaMAX™ und 25 mM Hepes	10 % 100 U/ml 0,1 mg/ml 25 µM	hitzeinaktiviertes FCS Penicillin Streptomycin 2-Mercaptoethanol
Lungenverdau - Lösung	5,39 ml 310 µl 240 µl 60 µl	IMDM FCS <i>Collagenase D</i> (2mg/ml) <i>Dnase</i> (1mg/ml)
PBS	136 mM 2,68 mM 8,09 mM 1,47 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O KH ₂ PO ₄
Maus-Anästhetikum-Mix	875 µl 100 µl 25 µl	NaCl Ketamin (10%) Xylazin (2%)
Roswell Park Memorial Institute-Medium - RPMI1640-Komplettmedium mit GlutaMAX™ und 25 mM Hepes	10 % 100 U/ml 0,1 mg/ml	hitzeinaktiviertes FCS Penicillin Streptomycin
<i>M. Sss1</i> -Puffer (10x)	3,44 ml 1 ml 2 ml 3,56 ml	NaCl (1,45 M) Tris (pH 7,9) EDTA (0,5 M) H ₂ O
TBE-Puffer	89 mM 89 mM 2,53 mM	Tris Borsäure EDTA
TE-Puffer (10/1)	10 mM 1 mM	Tris/HCl (pH 8,0) EDTA
Trypanblau-Lösung	0,5 g 0,9 g ad 100 ml H ₂ O	Trypanblau NaCl
Tryptone Soya Broth - TSB-Medium	15 g 5 g 5 g 15 g	Trypton Soya NaCl Agar

2.6 Oligonukleotide & Plasmide

Alle Oligonukleotide stammen, wenn nicht anders angegeben, von der Fa. Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland). Die TaqMan-Sonden stammen von der Fa. Life Technologies (Carlsbad, USA). Für die cDNA-Synthese wurden Oligo(dT)-*Primer* (0,5 µg / µl) und Random-*Primer* (3,0 µg / µl) der Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet. Die aufgelisteten Oligonukleotide wurden entsprechend ihrer Annealing-Temperatur (AT) im PCR-Programm eingesetzt.

a) qRT-PCR (mRNA Expression)

Tab. 2.3 Verwendete *Primer* für die Bestimmung der mRNA-Expression

Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz	AT
FOXP3_fw	5-GAACGCCATCCGCCACAACCTGA-3	56
FOXP3_rev	5- CCCTGCCCCACCACCTCTGC-3	56
GARP_fw	5-TTCCAGGGCCCCAGCTAACTAATG-3	56
GARP_rev	5- GGGGCCACTTCCTGTCCACTT-3	56
GATA3_fw	5-GTCCTGTGCGAACTGTCAGA-3	56
GATA3_rev	5-GGGGAAGTCCTCCAGTGAGT-3	56
IFN γ _fw	5-TGACCAGAGCATCCAAAAGA-3	56
IFN γ _rev	5-CTCTTCGACCTCGAAACAGC-3	56
IL-4_fw	5-GCCACCATGAGAAGGACACT-3	56
IL-4_rev	5-ACTCTGGTTGGCTTCCTTCA-3	56
IL-10_fw	5-CCCTAACCTCATTCCCCAACCCAC-3	58
IL-10_rev	5-CCGCCTCAGCCTCCCAAAGT-3	58
IL-17_fw	5-ACCAATCCCAAAGGTCCTC-3	56
IL-17_rev	5-GGGGACAGAGTTCATGTGGT-3	56
ROR γ T_fw	5- AGGGCTCCAAGAGAAAAGGA-3	56
ROR γ T_rev	5-CTTTCCACATGCTGGCTACA-3	56
RPS9_fw	5-CGCAGGCGCAGACGGTGGAAAGC-3	56
RPS9_rev	5-CGAAGGGTCTCCGCGGGGTCACAT-3	56
TBX21_fw	5-ACGCTTCCAACACGCATATC-3	56
TBX21_rev	5-ATCTCCCCAAGGAATTGAC-3	56
TGF β _fw	5-TGGCTGTATGAGCACCGTTA-3	56
TGF β _rev	5- TGGATCTTTGCCATCCTTTC-3	56

b) Maus-Typisierung

Tab. 2.4 Verwendete *Primer* zur Typisierung von Mäusen

Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz	AT
DEREG fw1	5-GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA-3	60
DEREG rev1	5-GGGTGTCTGCTGGTAGTGGTCGG-3	60
DEREG fw2	5-CCCAGGTTACCATGGAGAGA-3	60
DEREG rev2	5-GAACTTCAGGGTCAGCTTGC-3	60
FOXP3eGFP fw1	5-CGGCAAGCTGACCCTGAAGT-3	58
FOXP3eGFP rev1	5-GGATGTTGCCGTCCTCCTTG-3	58
FOXP3eGFP fw2	5-GCGTAAGCAGGGCAATAGAGG-3	58
FOXP3eGFP rev2	5-GCATGAGGTCAAGGGTGATG-3	58
TLR2 fw	5-CTTCCTGAATTTGTCCAGTACAGGG-3	58
TLR2 rev	5-GGGCCAGCTCATTCTCCCACTCAT-3	58

c) QAMA-assay

Tab. 2.5 Verwendete *Primer* in der methylierungs-sensitiven qRT-PCR

Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz	AT
FOXP3AMP5 fw	5-CTTGCTTCCTGGCACGAGTGTTTGGGGGTAGAGGATTT-3	55
FOXP3AMP5 rev	5-CAGGAAACAGCTATGACTATCACCCACCTAAACCAA-3	55
hFOXP3qRT -PCR fw	5-GAAATTTGTGGGGTGGGGTATTTGTTTT-3	60
hFOXP3qRT -PCR rev	5-ATCTACATCTAAACCCTATTATCACAACCCCC-3	60
hFOXP3Seq T fw	5-TTCAGAGCTAGGGGCTTGTC-3	55
hFOXP3Seq T rev	5-GGACACTTGCCAGAGCTAA-3	55
mFOXP3 AMP2 fw	5-CTTGCTTCCTGGCACGAGATTTGAATTGGATATGGTTTGT-3	60
mFOXP3 AMP2 rev	5-CAGGAAACAGCTATGACAACCTTAAACCCCTCTAACATC-3	60
mFOXP3qRT	5-AAATTTGTGGGGTAGATTATTTGTTTTT-3	60

-PCR fw		
mFOXP3qRT -PCR rev	5-ATCACAACCTAAACTTAACCAAATTTTTCT-3	60
mFOXP3Seq T fw	5-CTTGCTTCCTGGCACGAGAAAATCCGTTGGCTTTGAGA-3	60
mFOXP3Seq T rev	5-CAGGAAACAGCTATGACGGCGTTCCTGTTTGACTGTT-3	60

d) TaqMan-Sonden

Tab. 2.6 Verwendete TaqMan-Sonden in der methylierungs-sensitiven qRT-PCR

Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz	AT
hFOXP3meth	5-TCGGCGTATTCGG-3	60
hFOXP3unmeth	5-AGTTTGGTGTATTTGGT-3	60
mFOXP3meth	5-ATTCGGTCGTTATGACGTT-3	60
mFOXP3unmeth	5-ATTTGGTTGTTATGATGTTAAT-3	60

e) Plasmide

- RPCIB753C201037Q (Imagenes, Berlin)

2.7 Enzyme, Antikörper und Fluorochrome

Tab. 2.7 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Ampli Taq Gold Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
CpG Methyltransferase (<i>M. Sssl</i>)	New England Biolabs, Frankfurt
Collagenase Typ D	Roche Diagnostics, Mannheim
Deoxyribonuclease (<i>Dnase</i>) I Typ II	Sigma-Aldrich, USA
Go Taq Hot Start Polymerase	Promega, Mannheim
HotStar HiFidelity Polymerase	Qiagen, Hilden
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Rnase H minus point mutant	Promega, Mannheim

Tab. 2.8 Murine Antikörper

Epitop	Fluorophor	Klon	Hersteller
CD3	---	145-2C11	BD Pharmingen
CD4	Apc	RM4-5	BD Pharmingen

CD4	PB	RM4-5	BD Pharmingen
CD8a	Apc	53-6.7	BD Pharmingen
CD11b	PE	M1/70	BD Pharmingen
CD11c	FITC	HL3	BD Pharmingen
CD25	PE	PC61	BD Pharmingen
CD80	Biotin	16-10A	BD Pharmingen
CD69	Biotin	H1.2F3	BD Pharmingen
CD279	PE-Cy7	RMP1-30	BioLegend
Foxp3	FITC	FJK-16s	eBioscience
GATA3	PE-Cy7	L50-823	BD Pharmingen
Nrp1	Apc	---	R&D Systems
RoR γ T	Apc	AFKJS-9	eBioscience
Streptavidin	PE	---	BD Pharmingen
Streptavidin	Apc	---	BD Pharmingen

Tab. 2.9 Humane Antikörper

Epitop	Fluorophor	Klon	Hersteller
CD3	---	OKT3	Miltenyi
CD4	FITC	RPA-T4	BD Pharmingen
CD4	Apc	OKT4	eBioscience
CD4	PB	RPA-T4	eBioscience
CD25	Apc	BC96	eBioscience
CD28	---	15E8	Miltenyi
CD127	PB	eBioRDR5	eBioscience
FOXP3	PE	PCH101	eBioscience

Tab. 2.10 Verwendete Fluorochrome

Fluorochrom	Abkürzung	Absorption(nm)	Emission (nm)
Allophycyanin	Apc	640	660
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	493	525
Pacific Blue®	PB	410	455
PKH26	PKH26	551	567
R-Phycoerythrin	PE	496	575
R-Phycoerythrin-Cyanin7	PE-Cy7	496	774

2.8 Kommerzielle Standardsets (*Kits*)

Tab. 2.11 Verwendete *Kits*

Bezeichnung	Hersteller
BisulFlash DNA Modification Kit	Epigentek, USA
CD11c ⁺ MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit Dynabeads	Life Technologies, Darmstadt
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi, Bergisch Gladbach
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
MethylFlash DNA Quantification Kit	Epigentek, USA
Nucleobond PC 500 Plasmid Preparation	Macherey-Nagel, Düren
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Wizard DNA-Clean up System	Promega, USA

2.9 Geräte

Tab. 2.12: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
AutoMACs pro Cell Separator	Miltenyi Biotec
Axiovert 40C (Mikroskop)	Carl Zeiss, Jena
7500 Fast real-time PCR system	Applied Biosystems, USA
AX120 (Feinwaage)	Shimadzu, Duisburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
CP2202S (Waage)	Sartorius, Göttingen
Dyna-Mag 15 Magnetic Concentrator	Invitrogen, USA
FACS (BD LSR II)	BD Biosciences, Heidelberg
FACS (BD ARIA II)	BD Biosciences, Heidelberg
GelDoc Station	Intas, Göttingen
GL-130 (Sicherheitswerkbank)	Kojair, Niederlande
Hera cell 150i (Inkubator)	Thermo Fisher, USA
Horizon 11.14 (Gellaufkammer)	Whatman, Göttingen
HulaMixer Sample Mixer	Invitrogen, USA
Laryngoskop	Penn Century, USA

LightCycler 480	Roche, Schweiz
MS3 basic Vortexer	IKA, Staufen
MSC-Adantage (Sicherheitswerkbank Kl. 2)	Thermo Scientific, USA
Multifuge 3SR+	Thermo Scientific, USA
Multifuge X3R	Thermo Scientific, USA
Nahtmaterial Prolene 5-0 45 cm	Ethicon, Norderstedt
Nalgene Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Scientific, USA
Nanodrop ND-1000 (Photometer)	Peqlab, Erlangen
pH-Meter 765	Knick, Berlin
PowerPac Universal Netzteil	Bio-Rad, USA
Präzisionswaage 440	Kern, Balingen
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultrospec Cell Density Meter	GE Healthcare, UK
VITEK MS	bioMérieux

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Plasmid Isolierung und Gewinnung von genomischer DNA

Die Plasmid Isolierung wurde mit dem NucleoBond PC500 Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt und die DNA im letzten Schritt in 200 µl H₂O resuspendiert.

Für die Gewinnung von genomischer DNA wurde das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde mit 50 µl H₂O eluiert.

2.10.2 Genotypisierung transgener Mäuse

Die Genotypisierung transgener Mäuse erfolgte mittels PCR. Als *template* wurde genomische DNA verwendet, welche aus Schwanzbiopsien isoliert wurde. Die in der PCR eingesetzten *Primer* sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Der komplette Reaktionsansatz ist in Tab. 2.13 dargestellt.

Tab. 2.13: Reaktionsansatz für die Genotypisierung transgener Mäuse

Bezeichnung	Menge
genomische DNA	20 ng
Reaktionspuffer	1-fach
MgCl ₂	1,5 mM

dNTP Mix (2,5 mM jedes Nukleotid)	1 mM
<i>Primermix</i>	5 μ M fw / 5 μ M rev
<i>GoTaq Hot Start Polymerase</i>	0,5 U
H ₂ O steril	Ad 20 μ l

Dieser PCR-Ansatz wurde nach in Tab. 2.14 aufgeführtem PCR-Programm in einem Thermocycler inkubiert.

Tab. 2.14: PCR-Programm zur Genotypisierung transgener Mäuse

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schritt	95 °C	10 Minuten
10 Zyklen	95 °C	30 Sekunden
	AT	90 Sekunden
	72 °C	90 Sekunden
27 Zyklen	95 °C	15 Sekunden
	AT	45 Sekunden
	72 °C	90 Sekunden
2 Schritt	4 °C	

Mittels Gelelektrophorese (1 % Agarosegel) konnte anschließend anhand der spezifischen PCR-Produktgrößen der Genotyp der untersuchten Mäuse bestimmt werden.

2.10.3 Bestimmung der mRNA-Expression

2.10.3.1 Gewinnung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde mit einem Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorgaben isoliert und ggf. in cDNA (engl. *complementary DNA*) umgewandelt (Kap. 2.10.3.2). Die Gesamt-RNA wurde mit 100 μ l DEPC (Diethylidcarbonat) behandeltem H₂O eluiert.

2.10.3.2 Quantitative *real-time*-PCR für Genexpressionsanalysen

Um die Expression T-Zell-spezifischer Gene auf mRNA-Ebene zu bestimmen, wurde die Gesamt-RNA aus unbehandelten humanen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, Jurkat-Zellen und 5-Aza-dC bzw. EGCG stimulierten Zellen (Kap. 2.11.7) mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

Nach Isolation wurde die RNA durch Zugabe von 1 µl linearem Polyacrylamid (5 mg / ml), 0,5 Vol. Ammoniumacetat (7,5 M) und 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (absolut) bei -80 °C für mindestens eine Stunde gefällt. Nach zweifachem Waschen mit 80%igem Ethanol wurde die RNA anschließend luftgetrocknet, in 13 µl DEPC-H₂O resuspendiert und die Konzentration am Nanodrop ND-1000 (PeqLab, Erlangen) Photometer bestimmt. Anschließend wurden 200 ng bis 8 µg RNA für die reverse Transkription zur cDNA-Synthese eingesetzt.

Tab. 2.15: Reaktionsansatz für die *Primerhybridisierung*

Bezeichnung	Menge
RNA	13 µl
Oligo(dT)- <i>Primer</i>	0,5 µl (0,25 µg)
Random Hexamer- <i>Primer</i>	0,5 µl (1,5 µg)

Der Reaktionsansatz aus Tab. 2.15 wurde 10 Minuten bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Hybridisierung wurden 6 µl Enzymmix (Tab. 2.16) für die reverse Transkription hinzugefügt.

Tab. 2.16: Enzymmix für die cDNA-Synthese

Bezeichnung	Menge
(5-fach) M-MLV-Reverse Transkriptase-Puffer	4 µl
(2,5 mM) dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
(200 U) <i>M-MLV Reverse Transkriptase</i>	1 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42 °C für 60 Minuten im Thermocycler und wurde mit der Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 90 °C für 5 Minuten beendet.

Für die quantitative *real-time*-PCR (qRT-PCR) wurden die cDNA-Proben mit den entsprechenden *Primern* und dem SYBR-Green PCR Master Mix versetzt, der neben dem Fluoreszenzfarbstoff auch die *AmpliAq Gold®* DNA Polymerase, dNTPs und die benötigten Pufferkomponenten enthält.

Tab. 2.17: Reaktionsansatz für eine SYBR-Green qRT-PCR:

Bezeichnung	Menge
cDNA Template (~ 20 ng)	5 µl
<i>Primemix</i> (50 – 900 mM je <i>Primer</i>)	5 µl
SYBR-Green PCR Master Mix (2-fach)	10 µl

Zur Ermittlung der Genexpression wurde für jedes Gen eine Eichreihe aus einem Gemisch aller eingesetzten Proben hergestellt. Mithilfe dieser Eichreihe und des gemessenen Ct (engl. *Cycle threshold*, Fluoreszenzschwellenwert)-Wert wurden die relativen *template*-Konzentrationen bestimmt. Anschließend wurde die ermittelte *template*-Konzentration mit Hilfe von *RPS9* (*ribosomales Protein S9*) normalisiert. Dieses Gen ist ein *housekeeping* Gen und wird von allen Zellen in gleicher Menge konstitutiv exprimiert. Die Echtzeit-Detektion der (SYBR-Green)-Fluoreszenzsignale während der Amplifikation erfolgte mit einem 7500 Fast *real-time* PCR System und wurde im Anschluss mit der „7500 Fast System Software“ (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) analysiert.

Tab. 2.18: PCR-Programm zur Bestimmung der mRNA-Expression

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schritt	95 °C	10 Minuten
40 Zyklen	95 °C	15 Sekunden
	56 °C (IL-10 58 °C)	1 Minute
	72 °C	1 Minute
Schmelzkurvenanalyse	95 °C	15 Sekunden
	60 °C	1 Minute
	95 °C	15 Sekunden

2.10.3.3 Gene Array - Genexpressionsanalysen

Für vergleichende Transkriptomanalysen mittels „*Agilent gene expression chip*“-Technologie (Kooperation mit Dr. Robert Geffers, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus PBMCs (engl. *Peripheral blood mononuclear cells*) mittels FACS (*Fluorescence activated cell sorter*) Aria II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) durchflusszytometrisch sortiert und mit 5-Aza-dC oder EGCG für sieben Tage kultiviert (Kap. 2.11.7). Anschließend wurde die Gesamt-RNA mit dem Rneasy mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert, zum Verdau kontaminierender DNA mit *DNase* behandelt, und ihre Konzentration und Qualität mit Hilfe des Agilent Bioanalyzers 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) elektrophoretisch ermittelt. Nach Umschreibung der RNA in cDNA und dann mittels „Quick Amp Labeling Kit, one-color“ (Agilent Technologies, Waldbronn) in Cy3-markierte cRNA wurde die Konzentration der cRNA und die Markierung durch Cy3 mittels Nanodrop (PEQLAB, Erlangen)

bestimmt. Anschließend wurden von jeder Probe 1,6 µg Cy3-markierter cRNA auf den Genchip „Agilent’s human 4x44k microarrays“ 16 Stunden bei 68°C hybridisiert (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Nach der Hybridisierung und dem Waschen erfolgte das Scannen des Genchips auf dem „DNA Microarray Scanner“ mit „Surescan high Resolution“ gemäß Herstellerangaben (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die Signalintensitäten wurden mit der „Feature Extraction Software 10.5.1.1“ unter Berücksichtigung der empfohlenen Einstellungen durch den Hersteller (GE1_105_Dec08, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) analysiert und mit der „Gene Spring Software“ (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) ausgewertet.

2.10.4 Methylierungssensitive qRT-PCR (QAMA-Methode)

Die QAMA (engl. *quantitative analysis of methylated alleles*)-Methode, ermöglicht die Bestimmung des relativen Anteils der DNA-Methylierung eines Gens in einem einzelnen Reaktionsgefäß (Zeschnik et al., 2004). Grundlegend sind zwei verschiedenen, sequenzspezifische TaqMan-Sonden, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Die FAM (6-FAM-phosphoramidit)-markierte Sonde bindet spezifisch an unmethylierte Bisulfit-DNA und die VIC (4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein)-markierte Sonde bindet spezifisch an methylierte Bisulfit-DNA der gleichen Genregion. In jedem Lauf wird die Standardkurve zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen neu ermittelt.

2.10.4.1 Bisulfit-DNA Synthese

Im Laufe dieser Arbeit wurde die Bisulfit-DNA Synthese von einem von der Humangenetik des Universitätsklinikum Essen publizierten *in-house* Protokolls auf ein kommerzielles Kit umgestellt (Kap. 2.8) (Zeschnik et al., 1999). Für das *in-house* Protokoll wurden zunächst bis zu 2 µg DNA in 50 µl H₂O gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5,5 µl NaOH (3 M) und eine 15 minütige Inkubation bei 37 °C und 850 rpm. Es folgte eine Inkubation für 2 Minuten bei 95 °C mit folgender Abkühlung für 3 Minuten auf Eis. Für die Reaktion über Nacht (16-20 Stunden unter UV-Schutz) wurden 500 µl frisch angesetzte Bisulfitlösung (Kap. 2.5) hinzugegeben. Am nachfolgenden Tag wurden die Proben mittels Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, USA) aufgereinigt, indem die DNA-Lösung mit 1 ml Wizard-Puffer gemischt und nach Herstellerangaben aufgereinigt wurde.

Die Umstellung der Bisulfit-DNA Synthese erfolgte auf das Methylflash Kit (Epigentek, Farmingdale, USA). Hierfür wurden 200 ng bis 1 µg DNA gemäß dem Herstellerprotokoll in Bisulfit-DNA umgewandelt und nach Aufreinigung mit 12 µl H₂O eluiert.

2.10.4.2 Herstellung der Standardkurven für den QAMA-assay

Die humane *FOXP3* Zielregion wurde aus einem *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC; RPCIB753C201037Q, Imagenes, Berlin) amplifiziert. Hierfür wurden die *E.coli* Klone in 400 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (25 mg/L) über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Plasmide mittels NucleoBond PC500 Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert und die Konzentration bestimmt.

Anschließend wurde die Zielregion mittels PCR unter der Verwendung des *FOXP3SeqT-Primer*paar (Kap. 2.6) mit den Komponenten aus Tab. 2.19 und den PCR-Parametern aus Tab. 2.20 amplifiziert.

Tab. 2.19: PCR-Reaktionsansatz

Bezeichnung	Menge
GoTaq Puffer	5 µl
dNTPs (10mM)	0,5 µl
MgCl ₂	1,5 µl (25mM)
H ₂ O	12,9 µl
<i>Primermix</i> (5µM je <i>Primer</i>)	2 µl
<i>GoTaq Polymerase</i>	0,125 µl
Plasmid DNA	3 µl

Tab. 2.20: PCR-Programm für die Generierung der *FOXP3-TSDR* Standardkurve

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schritt	94 °C	10 Minuten
40 Zyklen	94 °C	45 Sekunden
	55 °C	45 Sekunden
	72 °C	1 Minute

Die generierten PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (1 % Agarosegel) ermittelt und anschließen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

aufgereinigt. Für die DNA-Konzentrationsbestimmung wurde ein NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (peqLAB, Erlangen) verwendet.

Je 1 µg DNA wurden mittels *CpG methyltransferase (M. SssI)* (New England Biolabs, Frankfurt) methyliert. Zur DNA-Lösung wurden 4 µl SssI-Puffer, 4µl SAM (3,2 mM) (Kap. 2.5), 2 µL *M. SssI* hinzugefügt und mit H₂O auf 40 µl aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wurde gemischt und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden weitere 4 µl SAM (3,2 mM) hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden definierte DNA-Mischungen hergestellt (100 %, 98 %, 96 %, 94 %, 90 %, 85 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 30 %, 20 %, 10 %, 0 % vol. Methylierung) und diese für 10 Minuten bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurde 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 4,6) und 2,5x Volumen Ethanol (absolut) hinzugegeben, für 30 Minuten bei -20 °C abgekühlt, und 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die gefällte DNA wurde 2x mit Ethanol (70 %) gewaschen und das DNA-Präzipitat bei R.T. getrocknet. Letztlich wurde das Präzipitat in 50 µl H₂O resuspendiert und für die Bisulfit-Konvertierung verwendet.

Die Herstellung der Standardkurven für die murine QAMA-Methode erfolgte analog dazu. Hierfür wurden CD4⁺Foxp3⁻ und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen aus Milzen naiver Foxp3-GFP Mäuse mittels FACS separiert, die DNA extrahiert und eine PCR mit dem mFoxp3Amp2 *Primer*paar durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese (1 % Agarose) aufgereinigt und die Methylierung mittels NGS (engl. *next generation sequencing*) bestimmt. Für die Herstellung der Standardkurve wurde DNA aus murinen Splenozyten gewonnen und die Zielregion mit dem mFOXP3SeqT-*Primer*paar mittels Touchdown-PCR (Tab. 2.23) aus dieser amplifiziert.

2.10.4.3 Methylierungssensitive qRT-PCR

Die generierte Bisulfit-DNA wurde als *template* für die methylierungssensitive qRT-PCR verwendet. Die Quantifizierung von murinen und humanen Proben erfolgte in einer 96-Loch Platte. Das aus Tab. 2.21 eingesetzte Reaktionsgemisch wurde mit dem PCR-Programm aus Tab. 2.22 in einem LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) eingesetzt und mittels LightCycler 480 Software (Roche Diagnostics) ausgewertet. Die Berechnung der Ct-Werte erfolgte mit der Methode „Abs. Quantification/Fit Points“. Nach Bildung der Differenzen der Ct-Werte der beiden TaqMan-Sonden erfolgte die Berechnung des Treg-Anteils in der untersuchten Probe mittels Standardkurve. Für die Bestimmung des Treg-Anteils in weiblichen Personen, wurde aufgrund der Inaktivierung von *FOXP3* durch Methylierung

auf dem zweiten X-Chromosom, der mit Hilfe der Eichreihe ermittelte Wert mit dem Faktor zwei multipliziert.

Tab. 2.21: Reaktionsansatz für die Quantifizierung natürlicher Treg-Zellen

Bezeichnung	Menge
<i>Primemix</i> (10 pMol fw-Primer / 10 pMol rev-Primer)	5 µl
Bisulfit DNA	5 µl
Mastermix	10 µl

Tab. 2.22: PCR-Programm für die Quantifizierung natürlicher Treg-Zellen

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schritt	95 °C	10 Minuten
40 Zyklen	95 °C	15 Sekunden
	60 °C	1 Minute

2.10.5 DNA-Sequenzierung

Die reine DNA-Sequenz von PCR-Produkten wurde mittels Sequenzierung nach Sanger bestimmt. Für Methylierungsuntersuchungen von DNA wurde hingegen die *deep amplicon* Analyse mit *next generation sequencing* (NGS) durchgeführt.

2.10.5.1 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Für die Sequenzierung nach Sanger, wurden 5 µl Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 200 ng/µl oder 5 µl PCR-Produkt mit einer Konzentration von 50 ng/µl zusammen mit 5 pmol/µl *Primer* an den zentralen DNA-Sequenzierservice der Medizinischen Fakultät im Institut für Humangenetik gegeben, wo die Sequenzierung erfolgte.

2.10.5.2 *Deep amplicon* Analyse mittels NGS

Für die Bestimmung der DNA-Methylierung mittels NGS wurde Bisulfit-DNA mittels getaggten *Primern* (bsp. FOXP3_AMP5) mit der in Tab. 2.23 dargestellten Touchdown-PCR amplifiziert:

Tab. 2.23 PCR-Touchdown-Programm für die Vorbereitung von NGS-Proben

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Schritt	95 °C	5 Minuten
14 Zyklen	95 °C	20 Sekunden
	63 °C (-1 °C je Zyklus)	1 Minute

	72 °C	1 Minute
40 Zyklen	95 °C	20 Sekunden
	56 °C	1 Minute
	72 °C	1 Minute
2. Schritt	72 °C	5 Minuten
3. Schritt	4 °C	

Die generierten PCR-Produkte wurden nach Gelelektrophorese (1 % Agarose) mittels QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend wurden Produkt-spezifische Linker an die Tag-Sequenzen mit Hilfe einer zweiten PCR angehängt (Tab. 2.23). Die erstellten PCR-Produkte wurden erneut mittels QIAEX II Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentration mit Hilfe eines Nanodrop ND-1000 bestimmt.

Danach folgte eine Aufreinigung durch Agencort AMPure XP beads (Beckman Coulter, Pasadena, USA) sowie eine erneute Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Nanodrop. Diese Amplicons wurden dann verdünnt, vereinigt, mittels emPCR amplifiziert und durch ein Roche 454 GS junior System (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) nach Herstellerangaben analysiert.

2.10.6 Bestimmung der globalen DNA-Methylierung

Die Bestimmung der globalen DNA-Methylierung wurde mit 100 ng DNA nach Herstellerprotokoll des MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek, Farmingdale, USA) durchgeführt.

2.11 Zellbiologische Methoden

2.11.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen

Für die Durchführung der unterschiedlichen Analysen und Experimente wurden Lymphozyten aus dem Blut, der mesenterischen Lymphknoten, der Milz und der Lunge der Versuchstiere isoliert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zentrifugationsschritte in einer Zellkulturzentrifuge (Multifuge 3SR+, Thermo Scientific) für 10 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C durchgeführt.

2.11.1.1 Milz

Nach der Entnahme wurden die Milzen in einer Petrischale mit 7 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer (ACK-Puffer, Kap. 2.5) gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit 8 ml FACS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 15 ml verdünnt. Um Gewebestücke

zu entfernen und eine Verklumpung der Zellen zu vermeiden, wurde die Suspension durch ein 70 µm Mikrosieb (BD Falcon cell strainer, Heidelberg) gefiltert. Das gewonnene Filtrat wurde zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die isolierten Milzzellen wurden in der benötigten Menge FACS-Puffer (Kap. 2.5) resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.11.1.2 Lymphknoten

Die entnommenen mesenterischen Lymphknoten (mLN) wurden in ein 100 µm Mikrosieb (BD Falcon cell strainer) überführt, welches in einer Petrischale in 5 ml FACS-Puffer gelagert wurde. Um die Lymphozyten zu isolieren, wurden die Lymphknoten durch das Sieb gedrückt. Das gewonnene Filtrat wurde zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die isolierten Zellen wurden in der benötigten Menge FACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.11.1.3 Blut

Das Blut der Versuchstiere wurde umgehend nach der Tötung mit einer mit Heparin (1:100 in PBS) benetzten Einmal-Feindosierungsspritze direkt aus dem Herzen entnommen und in ein mit 200 µl Heparin (1:100 in PBS) befülltes, 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Blut-Heparin-Gemisch wurde mit ACK-Puffer auf 1,5 ml aufgefüllt, 3 Minuten bei R.T. inkubiert und für 10 Minuten bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Es folgten maximal 2 weitere Inkubationsschritte mit 1 ml ACK-Puffer bis zur nahezu vollständigen Entfernung der Erythrozyten. Anschließend wurden die Zellen im benötigten Volumen FACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.11.1.4 Lunge

Für die Isolation von Leukozyten aus der Lunge wurde die Aorta durchtrennt und die Lungen über das Herz mit 10 ml PBS gespült. Anschließend wurden beide Lungen entnommen und in 1 ml Verdaulösung (Kap. 2.5) mechanisch zerkleinert. Danach wurde die Lungensuspension auf 3 ml Verdaulösung aufgefüllt und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert, dabei alle 5 Minuten mittels Pipettieren geschert. Nach der Inkubation wurde die Lungensuspension über ein 70 µm Mikrosieb (BD Falcon cell strainer) filtriert um Organstücke zu entfernen. Es wurde 7 ml PBS nachgespült und zentrifugiert. Um Erythrozyten zu entfernen, wurde der Überstand abgesaugt und es folgte eine Lyse mit 2 ml ACK-Puffer, ein Waschschriff mit FACS-Puffer und das Zellpräzipitat wurde im gewünschten Volumen FACS-Puffer aufgenommen.

2.11.2 Gewinnung von CD4⁺ T-Zellen und CD11c⁺ dendritischen Zellen

2.11.2.1 Isolierung CD4⁺ mittels autoMACS

Die Isolierung von CD4⁺ T-Zellen aus den murinen oder humanen Einzelzellsuspensionen erfolgte mittels magnetischer Separation. Hierfür wurde der autoMACS® Pro Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) mit dem Programm: „deplete“ verwendet. Das CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) für humane oder murine Zellen wurde gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.11.2.2 CD4⁺-Zell Isolierung mittel Dynabeads

Die Isolierung von CD4⁺ Zellen aus humanen Blutproben erfolgte mittels Dynabeads CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA). Es wurden 4 ml Vollblut mit 8 ml Puffer 1 verdünnt und gemäß Herstellerangaben isoliert. Für die Bindung der CD4⁺ Zellen wurden 48 µl „beads-Lösung“ verwendet und für die abschließende Lösung der Zellen von den beads 18 µl „Detach-a-bead-Lösung“.

2.11.2.3 Isolierung von CD11c⁺ dendritischen Zellen

Um CD11c⁺ Zellen aus der Milz zu isolieren, wurde zunächst 1 ml einer *Collagenase/DNase*-Lösung (Kap. 2.5) in die Milz injiziert, die Milz anschließend in kleine Stücke geschnitten und in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml der *Collagenase/DNase*-Lösung für 30 Minuten bei 37 °C verdaut. Danach wurde diese Suspension inklusive aller Gewebestücke in ein 70 µm Mikrosieb (BD Falcon cell strainer) überführt, hindurchgedrückt, mit 10 ml FACS-Puffer gespült und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 400 µl FACS-Puffer resuspendiert, 100 µl „*CD11c MicroBeads, mouse*“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) hinzugefügt und das Gemisch 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Bindung des biotinylierten Antikörpers wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und gemäß Herstellerangaben über positive Selektion (Programm: *posse/d*) am autoMACS® Separationssystem (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) isoliert.

2.11.3 Gewinnung von PBMCs

Um PBMCs (engl. *Peripheral blood mononuclear cells*) aus *Buffy-Coat* mittels Dichtegradientenzentrifugation zu isolieren, wurde dieser 1:1 mit PBS verdünnt und 20 ml davon vorsichtig auf 20 ml Biocoll-Trennlösung (Biochrom, Berlin) überführt. Diese zwei Phasen wurden 25 Minuten bei 1800 rpm und Raumtemperatur mit geringster Beschleunigungs- und Bremswirkung der Zentrifuge zentrifugiert. Danach

wurde vorsichtig die weiße, milchige Leukozyten-Interphase entnommen, diese einmalig mit PBS gewaschen und 10 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die isolierten Leukozyten wurden entweder in FACS-Puffer aufgenommen und direkt für Analysen verwendet oder aber 1×10^8 Zellen in 2 ml Einfriermedium (Kap. 2.5) gelöst und in Cryoröhrchen bei einer Abkühlung von -1 °C/min bei -80 °C weggefroren. Für Langzeitlagerung wurden die Zellen 48 Stunden später in einen Flüssigstickstofftank überführt.

2.11.4 Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS)

Das FACS BD LSR II (BD Bioscience, Heidelberg) ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung verschiedener Zellpopulation mithilfe morphologischer Eigenschaften (Größe im *forward scatter*, Granularität im *side scatter*) und der zellspezifischer Expression selektiver Moleküle (extra- und intrazellulär). Für den Nachweis exprimierter Moleküle wurden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet (Tab. 2.8 & 2.9). Im Durchflusszytometer werden die Zellen in einem sehr dünnen Flüssigkeitsstrom auf Einzelzellniveau an einem Laser vorbeigeführt. Zum einen gibt die Beugung des Vorwärtsstreulichts (*forward scatter*) durch die untersuchte Zelle Aufschluss über ihre Größe und zum anderen die Brechung des Seitwärtsstreulichtes (*side scatter*) über ihre Granularität. Die an die Zellen gebundenen Antikörper werden durch unterschiedliche Laser angeregt und die Emission detektiert und in elektrische Signale konvertiert. Für eine Multifarbenmessung ist auf eine Kompensation zu achten, da die Emissionen verschiedener Fluorochrome überlappen können. Die erzeugten Signale werden von einem Computer aufgezeichnet und mit Hilfe einer Software (FACS Diva, BD Bioscience, Heidelberg) dargestellt. Hierbei wurden Zellzahlen, Größen, Granularitätswerte linear und Fluoreszenzintensitäten logarithmisch aufgetragen.

2.11.4.1 Antikörpermarkierung von extrazellulären Proteinen

Die Färbung der Zellen erfolgte in FACS-Puffer in einer 96-Loch-Platte. Dafür wurden die murinen Zellen für 10 Minuten (humane Zellen 15 Minuten) bei 4 °C im Dunkeln mit den gewünschten Antikörperlösungen inkubiert. Ausschließlich die Nrp1-Färbung erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Inkubationsphase wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen, im gewünschten Volumen FACS-Puffer gelöst und im Durchflusszytometer untersucht.

2.11.4.2 Antikörpermarkierung von intrazellulären Proteine

Die intrazelluläre Färbung erfolgte im Anschluss an die Oberflächenfärbung. Die bereits gefärbten Zellen wurden mit PBS-Puffer anstatt mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit einem verdünnten Fixation/Permeabilization-Mix (eBioscience, San Diego, USA) für mindestens 90 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die fixierten Zellen wurden dann mit 1x Permeabilisierungspuffer (eBioscience) gewaschen und für 30 Minuten mit Antikörperlösung in Permeabilisierungspuffer bei 4 °C im Dunkeln gefärbt, mit FACS-Puffer gewaschen, danach in FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht.

2.11.4.3 Sortieren von Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Um Zellpopulationen voneinander zu separieren, wurden Zellen mit entsprechenden Antikörpern markiert und am FACS Aria II Sorter (BD Bioscience, Heidelberg) unter Verwendung der FACS Diva Software in IMDM-Komplettmedium sortiert.

2.11.5 Markierung von Lymphozyten zur Bestimmung der Proliferation

Lymphozyten wurden mit drei verschiedenen Markern zur Bestimmung der Proliferation inkubiert, um die Variabilität von verschiedenen Fluorochromen bei durchflusszytometrischen Untersuchungen sicherzustellen.

2.11.5.1 CFSE-Markierung von Lymphozyten

Um die Proliferation von Lymphozyten *in vitro* zu bestimmen, wurden diese mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) markiert. Dieser Farbstoff diffundiert passiv in die Zellen und bindet dort irreversibel an Zellproteine. Bei jeder Zellteilung halbiert sich die Fluoreszenzintensität des CFSE-Signals und ermöglicht so die Bestimmung der Proliferationszyklen der markierten Zellen. Die zu markierenden Zellen wurden in 2 ml IMDM aufgenommen und mit 2 ml CFSE-Färbelösung (2 ml IMDM + 1 µl CFSE) durchmischt (CFSE-Endkonzentration von 2,5 µM). Darauf folgten eine Inkubation für 8 Minuten bei 37 °C im Dunkeln, eine Zugabe von 4 ml FCS, um die Aufnahme zu stoppen und ein weiterer Inkubationsschritt von 5 Minuten bei 37 °C im Dunkeln. Letztlich wurde die Zellsuspension mit IMDM-Komplettmedium gewaschen, der Überstand verworfen und die Zellen in der entsprechenden Menge IMDM-Komplettmedium aufgenommen.

2.11.5.2 PKH26-Markierung von Lymphozyten

Alternativ wurde die proliferative Aktivität *in vitro* mittels PKH26 *Red Fluorescent Cell Linker* Markierung bestimmt. Das Prinzip ähnelt dem der CFSE-Markierung. Die zu markierenden Zellen wurden in 350 μ l Diluent c gelöst und mit weiteren 350 μ l Diluent c-Färbelösung (350 μ l Diluent c + 1 μ l PKH) durchmischt. Darauf folgte eine Inkubation für 4 Minuten bei R.T. im Dunkeln und die Zugabe von 1 ml FCS und eine weitere Inkubation für 1 Minute im Dunkeln. Anschließend wurde zweimal mit 4 ml IMDM-Komplettmedium gewaschen, der Überstand abgenommen und die markierten Zellen im erforderlichen Volumen aufgenommen.

2.11.5.3 eFluor670-Markierung von Lymphozyten

Als dritte Alternative wurde die Proliferation mit eFluor670 bestimmt. Zuerst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml resuspendiert. Diese Zellsuspension wurden mit 1 ml Färbelösung (2 ml PBS + 4 μ l eFluor670) vermischt und 10 Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit Zugabe von 2 ml kalten FCS gestoppt und so für 5 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die markierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen, der Überstand verworfen und die Zellen im gewünschten Volumen IMDM-Komplettmedium aufgenommen.

2.11.5.4 Bestimmung der Proliferationsaktivität

Um die Proliferation von CFSE/PKH26/eFluor670-markierten humanen T-Zellen zu bestimmen, wurden 2×10^5 Zellen in jeweils 200 μ l IMDM-Komplettmedium pro Kavität einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät. Die Zellen wurden mittels löslichen anti-CD3 Antikörpern (1 μ g/ml) und isolierten 2×10^5 CD11c⁺ Zellen für 96 Stunden bei 37 °C kultiviert.

Murine markierte Zellen wurden mit löslichen anti-CD3 Antikörpern (1 μ g/ml) und 2×10^5 bestrahlten Milzzellen für 72 Stunden kultiviert. Als Kontrolle dienten unstimulierte, markierte Zellen. Die proliferative Aktivität wurde über die Messung der abnehmenden Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt.

2.11.5.5 Bestimmung suppressiver Eigenschaften von T-Zellen

Für die Bestimmung der suppressiven Aktivität von humanen T-Zellen, wurden diese mit 2×10^5 CFSE/PKH26/eFluor670-markierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (*Responder-Zellen*) aus dem gleichen PBMC-Spender im Verhältnis 1:1 in 200 μ l IMDM-

Komplettmedium kultiviert. Diese Zellen wurden mit löslichen anti-CD3 Antikörpern (1 µg/ml) und 2×10^5 isolierten CD11c⁺ Zellen für 96 Stunden bei 37 °C kultiviert.

Murine T-Zellen wurden mit 2×10^5 CFSE/PKH26/eFluor670-markierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus WT-Mäusen im Verhältnis 1:1 in 96-Loch-Flachbodenplatten in 200 µl IMDM-Komplettmedium für 72 Stunden co-kultiviert. Zur Stimulation der Proliferation wurden lösliche anti-CD3-Antikörper (1 µg/ml) und 2×10^5 bestrahlte Milzzellen hinzugegeben. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes in den *Responder*-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und diente als Maß für ihre Proliferation bzw. Suppression.

2.11.6 Bestimmung von sezernierten Zytokinen

Zur Bestimmung der Zytokin-Konzentration im Serum septischer und gesunder Mäuse, wurde Blut durch Punktion des retroorbitalen Venenkomplexes gewonnen, mindestens 80 µl Serum isoliert (Kap. 2.12.2) und dieses bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Die Quantifizierung von IL-4, IL-6, IL-10 und TNF α erfolgte mit Hilfe des Luminex 200 unter Verwendung des „*Luminex Screening Assays*“ (R&D, Minneapolis, USA) nach Herstellerangaben. Die Konzentration der Zytokine wurde mit der Luminex IS Software (Luminex Corporation, Austin, USA) bestimmt.

2.11.7 Kultivierung von Jurkat- und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit DNMT-Inhibitoren

Jurkat-Zellen oder humane CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden für vier oder sieben Tage mit den DNMT-Inhibitoren 5-Aza-dC (5-Aza-2'-deoxycytidin) und EGCG (Epigallocatechingallat) kultiviert.

$2,5 \times 10^6$ Jurkat-Zellen wurden mit 5 µM oder 1 µM 5-Aza-dC bzw. 50 µM oder 5 µM EGCG in RPMI1640-Medium in einem 5 % CO₂ Inkubator kultiviert.

Je $2,5 \times 10^6$ CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden analog zu den Jurkat-Zellen behandelt, allerdings zusätzlich mit 1 µg/ml löslichem anti-CD3-Antikörper, 1 µg/ml löslichem anti-CD28 Antikörper, 100 U/ml IL-2 und Penicillin/Streptomycin in einem 5 % CO₂ Inkubator kultiviert.

Beide Inhibitoren waren in 1 % DMSO / 99 % IMDM gelöst und wurden jeden zweiten Tag hinzugefügt. Unbehandelte Kontrollzellen wurden nur mit 1 % DMSO stimuliert.

Alle Ansätze wurden nach vier Tagen für 10 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

2.11.8 Identifikation von bakteriellen Erregern mittels MALDI-MS

Für die Identifikation von Erregern in septischen Mäusen wurde 24 Stunden nach Induktion einer Sepsis oder Sekundärinfektion Blut entnommen (Kap. 2.12.2), 10 µl auf CSB-Nährboden ausgestrichen und für 72 Stunden unter anaeroben Bedingungen bei 36 °C kultiviert. Die anaerobe Atmosphäre wurde mit einem GasPak EZ (BD Bioscience, Heidelberg) in einem Anaerobiertopf hergestellt.

Von diesem Nährboden wurde dann ein Teil einer Einzelkolonie mit einer 1 µl Impföse abgenommen und auf einen *Spot* eines MALDI-MS (engl. *matrix assisted laser desorption / ionization – mass spectrometry*)-Targets gestrichen. Anschließend wurden 1 µl Matrix (VITEK MS-CHCA) in die Mitte des Spots aufgetragen und diese Suspension 5 Minuten bei R.T. getrocknet, bis eine Kristallstruktur sichtbar war. Diese vorbereiteten Proben wurden anschließend im VITEK MS (Biomerieux, Marcy l’Etoile, Frankreich) analysiert und mit der VITEK MS Software ausgewertet.

2.12 Tierexperimentelle Methoden

Alle Tierexperimente und Eingriffe wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien und Bestimmungen der staatlichen Behörden und des Institutes durchgeführt.

2.12.1 Induktion einer polymikrobiellen Sepsis



Abb. 2.1: Anwendung der CLP-Methode an einer Maus. Nach Freilegung des *Caecums* wird ein Teil mittels Faden abgebunden (siehe rote Markierung)

Für die Induktion einer Sepsis in Mäusen werden grundsätzlich drei Methoden angewandt: Injektion von LPS (polymikrobiell), Infusion von Bakterien (spezifisches Pathogen) und die CLP (engl. *cecal ligation and puncture*; polymikrobiell) (Doi et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Induktion einer Sepsis die CLP-Methode verwendet.

Hierfür wurden die Mäuse mit einem Ketamin (0,1 mg/g KG) / Xylazin (5 µg/g KG)-Mix (Kap. 2.5) betäubt und ein mittlerer Bauchschnitt durchgeführt. Anschließend wurde das *Caecum* freigelegt, ein Fünftel davon mit einem Faden ligiert und der abgebundene Teil mit einer Kanüle (Foxp3-GFP- und DEREK-Mäusen mit 27 G; WT- und TLR2^{-/-}-Mäusen mit 23 G) punktiert. Das *Caecum* wurde

wieder zurückgeführt und 1 ml sterile, isotonische Kochsalzlösung zum Flüssigkeitsausgleich in die Bauchhöhle injiziert. Letztlich wurde zuerst das Peritoneum vernäht und anschließend das Fell mittels Naht verschlossen.

Sham-operierte Versuchstiere wurden betäubt, erhielten einen mittigen Bauchschnitt und wurden ohne Verletzung des *Caecums* wieder mittels Naht verschlossen.

Der Allgemeinzustand aller Versuchstiere wurde über die gesamte Versuchsdauer mit einem Belastungspunktesystem beurteilt und dokumentiert. Eine erhöhte Punktezahl deutete auf eine Verschlechterung der Vitalität der Tiere hin. In die Beurteilung flossen Faktoren wie das Gewicht, die Erscheinung, die Aktivität, die Atmung, die Wundheilung und die Ausscheidungen des Tieres ein.

2.12.2 Blutentnahme bei Versuchstieren

Die Blutentnahme der Versuchstiere erfolgte retrobulbär mittels 10 µl Glaskapillaren. Hierfür wurden die Tiere mittels Isofluran kurzzeitig betäubt und anschließend einmalig 24 Stunden nach CLP oder Sekundärinfektion ca. 150 µl Blut entnommen.

Ein Teil davon wurde für den Bakteriennachweis mittels MALDI-MS verwendet, der restlichen Teil wurde für 30 Minuten auf Eis geronnen und anschließend 5 Minuten bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert um Serum zu gewinnen welches bei -80 °C gelagert wurde.

2.12.3 Intratracheale Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*

Für die intratracheale Infektion wurde der PAO1-Stamm verwendet. Einen Tag vor Infektion der Versuchstiere wurde der Erreger auf Columbia Blood-Nährboden ausgestrichen und bei 37 °C für 16 Stunden kultiviert.

Nach Kultivierung des *Pseudomonas aeruginosa* Stamms wurden 2-3 Streifen einer 10 µl Impföse in einen Kolben mit 40 ml Raumtemperatur warmen TSB-Medium (Kap. 2.5) überführt und auf eine O.D.₆₀₀ von 0,20 bis 0,25 eingestellt. Diese Kultur wurde für eine Stunde bei 35 °C und 125 rpm geschüttelt, anschließend 10 Minuten bei 2800 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 5 ml Raumtemperatur warmen RPMI + Hepes (Invitrogen, Carlsbad, USA) Medium in Lösung genommen. Davon wurde eine 1:10 Verdünnung (100 µl Zellsuspension + 900 µl RPMI) hergestellt und erneut die O.D.₆₀₀ bestimmt. Anhand einer zuvor generierten Wachstumskurve konnten die *colony forming units* (CFUs) in der Kultur berechnet werden.

Berechnung Bakterienanzahl:

$$77.909 \times \text{O.D.}_{600} - 2,9169 = \text{CFUs} \times 10^7$$

Die Bakteriensuspension wurde erneut 10 Minuten bei 2800 rpm zentrifugiert und im gewünschten Volumen RPMI + Hepes aufgenommen. Davon wurden jeweils 20 µl ($7,5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ CFUs) in Eppendorf-Gefäßen überführt und für die Infektion der Versuchstiere verwendet. Für die intratracheale Infektion wurden die Versuchstiere zunächst mit einem Anästhetikum-Mix (0,05 mg Ketamin / g KG; 2,5 µg Xylazin / g KG) betäubt und 20 µl Bakteriensuspension durch eine Knopfkanüle mithilfe eines Laryngoskops (Penn Century, Glenside, USA) appliziert.

2.12.4 Depletion regulatorischer T-Zellen in DEREK-Mäusen

Regulatorische T-Zellen wurden in DEREK-Mäusen durch die intraperitoneale Injektion einer Diphtherie-Toxin-Lösung (30 ng/g KG; Merck, Darmstadt) mittels Einmal-Feindosierungsspritze depletiert. Die Injektion erfolgte zwei Tage vor gewünschter Treg-Zell Depletion und danach jeden zweiten Tag.

2.13 Statistische Auswertung

Alle Statistiken wurden mit den angegebenen statistischen Tests und der Graph Pad Prism 5.02 Software (Graph Pad Software, La Jolla) analysiert (**p < 0,001; *p < 0,01; *p < 0,05; ns (nicht signifikant) > 0,05)

3.1.2 Generierung der *FOXP3*-TSDR-QAMA Standardkurve

Die Quantifizierung mittels QAMA (engl. *Quantitative analysis of methylated alleles*)-Methode wird mit einer Standardkurve durchgeführt. Für die Herstellung des humanen *FOXP3*-TSDR assays wurden definierte Gemische aus methylierter und unmethylierter Bisulfit-DNA hergestellt, welche die *FOXP3*-TSDR enthalten. Hierfür wurde das RPCIB753C201037Q-Plasmid aus *E. coli* (Kap. 2.10.1) mit einer Plasmidkonzentration von 42 ng/μl und hoher Reinheit ($A_{260}/A_{280} = 1,86$) isoliert. Aus dieser Plasmid-DNA wurde die benötigte *FOXP3*-Zielregion von 486 bp mittels PCR amplifiziert und die erzeugten PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 3.3), daraus ausgeschnitten, vereinigt und aufgereinigt.

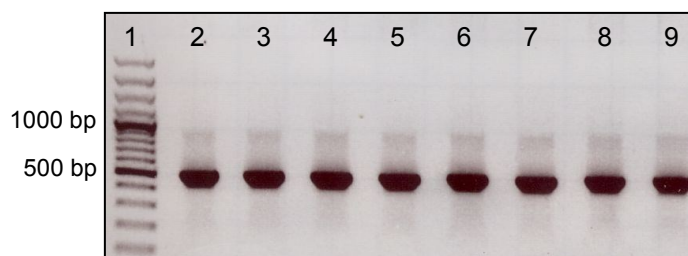


Abb. 3.3: Amplifikation mit dem hFOXP3Seq-Primerpaar aus dem RPCIB753C201037Q Plasmid. Jeweils 25 μl eines PCR-Ansatzes wurden auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen. Spur 1 – Fermentas Ladder Mix, Spur 2 – 9 gewünschte PCR-Produkte (486 bp) nach Amplifikation mit dem hFOXP3Seq-Primerpaar.

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurde ein Teil davon mittels *M. SssI* methyliert und anschließend definierte Gemische aus methylierter und unmethylierter DNA hergestellt, welche schließlich in Bisulfit-DNA konvertiert wurden. Ein weiterer Teil des PCR-Produktes wurde sequenziert (Kap. 2.10.5.1), um Mutationen in den Bindungsstellen der *Primer* und TaqMan-Sonden auszuschließen.

Nach Herstellung der definierten DNA-Gemische wurden diese mehrfach in qRT-PCR Ansätzen eingesetzt und die Differenzen der Ct-Werte der beiden Sonden errechnet (Tab. 3.1). Mittels dieser Standardkurve kann der Anteil unmethylierter DNA in der untersuchten Probe ermittelt werden. Da ausschließlich nTreg-Zellen eine vollständig unmethylierte *FOXP3*-TSDR besitzen, lässt sich der nTreg-Gehalt der quantifizierten Probe berechnen (Abb. 3.4).

Tab. 3.1: Etablierung der QAMA-Standardkurve.

Differenzen der Ct-Werte der beiden TaqMan-Sonden aus drei unabhängigen Quantifizierungen.

% Meth.	1.PCR	2.PCR	3.PCR
100	-14,945	-10,38	-11,055
98	-3,995	-3,775	-3,625
96	-2,8	-2,5	-2,525
94	-2,265	-2,2	-2,155
90	-1,395	-1,305	-1,33
85	-1,09	-0,835	-0,855
80	-0,555	-0,585	-0,595
70	0,17	0,2	0,15
60	0,45	0,695	0,575
50	1,02	1	0,81
30	1,935	2,275	2,225
20	2,5	2,555	2,680
10	4,815	4,6	4,675
5	6,36	5,72	5,990
0	14,17	11,39	11,95

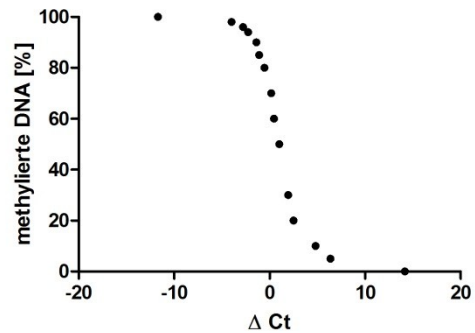


Abb. 3.4: Darstellung der berechneten *FOXP3*-Eichkurve. Dargestellt sind auf der x-Achse die gebildeten Differenzen der Ct-Werte der FAM- und VIC-Sonden und auf der y-Achse die DNA-Gemische mit definierter Methylierung.

Die Validierung des assays wurde mit definierten Zellgemischen aus FACS-sortierten $CD4^+CD25^+CD127^-$ und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen durchgeführt. Die Bisulfit-DNA dieser Zellen wurde in der methylierungssensitiven qRT-PCR eingesetzt.

Des Weiteren wurden definierte Zellgemische aus einer Treg-Zelllinie (Ocklenburg et al., 2006) und einer konventionellen T-Zelllinie mit methylierter und unmethylierter *FOXP3*-TSDR hergestellt, deren DNA in Bisulfit-DNA konvertiert und ebenfalls quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Quantifizierungen sind in Tab. 3.2 aufgelistet.

Tab. 3.2: Validierung der QAMA-Eichreihe mit definierten Zellgemischen.

Treg-Gemische (%)	T-Zellen (Treg/Teff)		Zelllinie (Treg/Tconv)
	Mix 1 (%)	Mix 2 (%)	Mix (%)
1,25 %	1,30	1,39	1,43
2,5 %	2,59	2,81	2,46
5 %	5,88	5,29	6,28
10 %	9,63	10,04	9,66
20 %	19,40	19,54	20,41

Eine zusätzliche Validierung fand mit definierten DNA-Mischungen aus unmethylierten und mittels *M. Sssl*-methylierten PCR-Produkten statt.

Tab.3.3: Validierung der QAMA-Eichreihe mittels definierten DNA-Gemischen

unmethylierte <i>FOXP3</i> -TSDR (%)	DNA-Gemische aus PCR-Produkten	
	Mix 1 (%)	Mix 2 (%)
0 %	0,2	-0,7
2 %	1,39	1,57
4 %	3,19	3,48
6 %	5,16	4,80
10 %	8,55	9,22
15 %	16,17	15,72
20 %	18,67	20,36
30 %	31,13	30,32
50 %	51,60	50,91
100 %	100,4	99,8

3.1.3 Quantifizierung von natürlichen regulatorischen T-Zellen in septischen Patienten und gesunden Probanden

Die validierte methylierungssensitive *FOXP3*-TSDR qRT-PCR wurde angewendet, um in 30 septischen Patienten den Anteil regulatorischer T-Zellen bezogen auf alle CD4⁺ T-Zellen zu ermitteln und mit dem Anteil regulatorischer T-Zellen 30 gesunder Probanden zu vergleichen. Parallel dazu erfolgte die Treg-Quantifizierung jeder Probe zusätzlich mittels Durchflusszytometrie. Treg-Zellen wurden anhand des folgenden Expressionsprofils definiert: CD4⁺, CD25⁺ und CD127⁻. Das verwendete FACS-Gating ist in Abb. 3.5 dargestellt. Die spezifischen Eigenschaften der untersuchten Personen sind in Tab. 3.4 aufgelistet.

Tab. 3.4: Eigenschaften der untersuchten Individuen

Kategorie	Septische Patienten (%)	Gesunde Probanden (%)
Alter		
<25	2 (7)	1 (3)
25 - 60	20 (66)	29 (97)
>60	8 (27)	0 (0)
Geschlecht		

männlich	14 (47)	15 (50)
weiblich	16 (53)	15 (50)
SAPS II (bei Aufnahme)		
<30	3 (10)	
30 - 60	18 (60)	
> 60	9 (30)	
Catecholamine	30 (100)	
Künstlich beatmet	29 (97)	
Extra-renaler Support	22 (73)	
Infektionsort		
Lunge	19 (63)	
Abdomen	7 (23)	
Sonstige	4 (13)	
Art der Infektion		
Ambulant	8 (27)	
Nosocomial	22 (73)	
Nachgewiesener Erreger		
Gram-negative Bakterien	15 (50)	
Gram-positive Kokken	11 (37)	
Pilze	4 (13)	
Sterberate	10 (33)	

Wie in Abb. 3.6 A dargestellt, zeigten die Analysen mittels methylierungssensitiver qRT-PCR einen signifikant höheren Anteil an regulatorischen T-Zellen in septischen Patienten verglichen mit gesunden Probanden (12,1 % zu 9,2 % Treg-Zellen). Die durchflusszytometrische Untersuchung der gleichen Proben ergab ebenfalls ein signifikant erhöhtes Treg-Verhältnis zur Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Zellen in septischen Patienten (7,2 % zu 5,6 % Treg-Zellen) (Abb. 3.6 B).

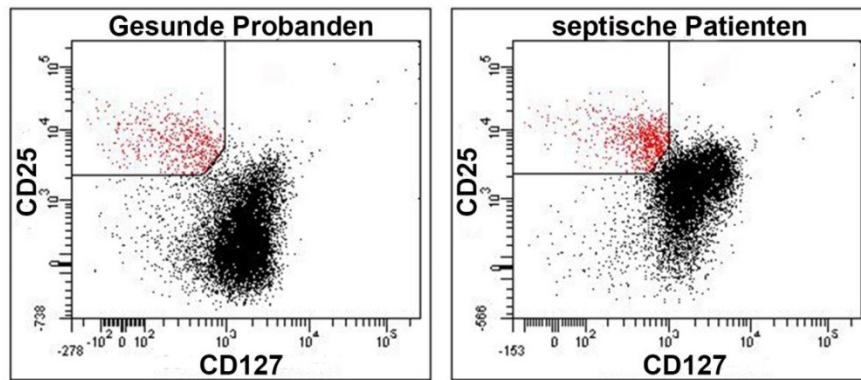


Abb. 3.5: Gating-Strategie zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen mittels FACS. Dargestellt ist die CD127-Expression (x-Achse) gegen die CD25-Expression (y-Achse). publiziert in: Tatura *et al.* 2012

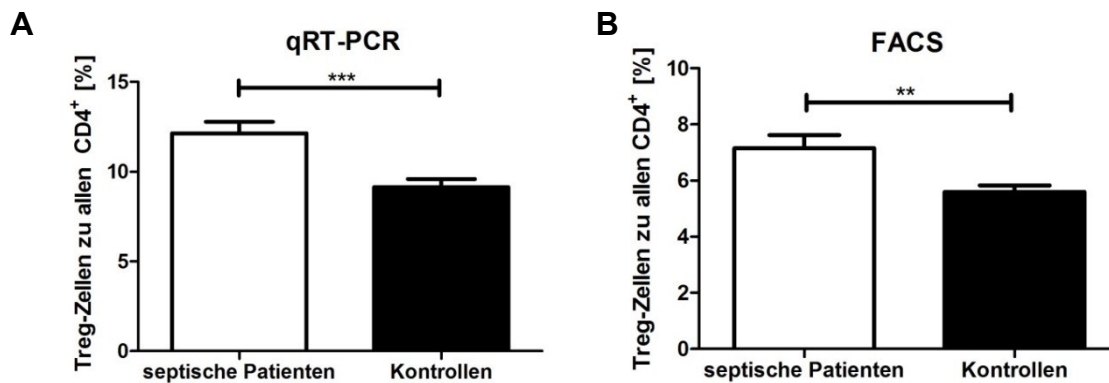


Abb. 3.6: Septische Patienten besitzen einen im Vergleich zu Gesunden erhöhten Anteil an Treg-Zellen. (A) Mittels qRT-PCR ermittelter Anteil an Treg-Zellen bezogen auf alle CD4⁺ T-Zellen in septischen Patienten und gesunden Probanden (n = 30 für jeweils beide Kollektive). (B) Durchflusszytometrisch quantifizierter Anteil an Treg-Zellen bezogen auf alle CD4⁺ T-Zellen (n = 30 für jeweils beide Kollektive). (Student's t-test ***p=0,001; **p < 0,01) publiziert in: Tatura *et al.* 2012

Wie in Abb. 3.7 dargestellt, besteht bei den gesunden Probanden eine klare positive Korrelation ($r = 0.60$) zwischen den Ergebnissen der Durchflusszytometrie und der qRT-PCR. Im Gegensatz korrelieren die Ergebnisse beider Methoden in septischen Patienten wesentlich schwächer ($r = 0.37$).

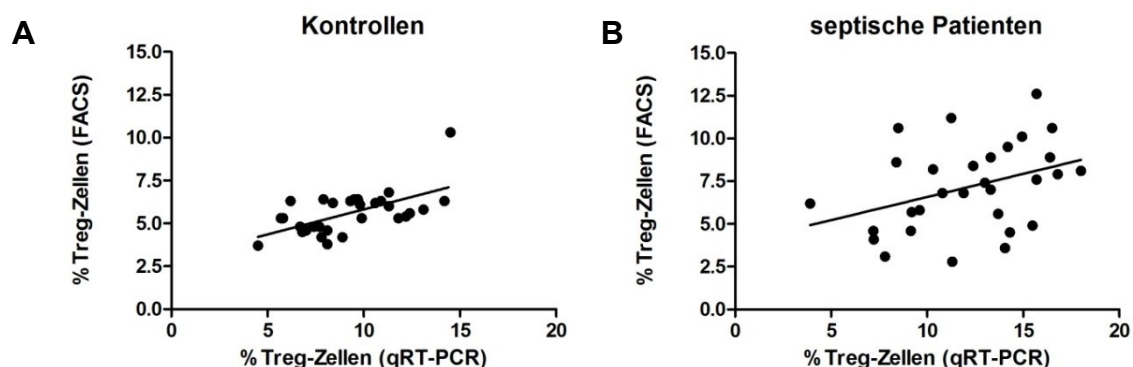


Abb. 3.7: Korrelation der methylierungssensitiven qRT-PCR und der durchflusszytometrischen Analyse bei der Quantifizierung von Treg-Zellen. (A) Korrelation beider Methoden in gesunden Probanden. (B) Korrelation beider Methoden in septischen Patienten. publiziert in: Tatura *et al.* 2012

3.2 Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die murine Sepsis

3.2.1 Charakterisierung einer polymikrobiellen Sepsis

Mittels QAMA- und FACS-Methode wurde ein erhöhter Anteil an Treg-Zellen im Blut septischer Patienten gemessen. Um die Funktion und Eigenschaften regulatorischer T-Zellen in einer Sepsis genauer zu untersuchen wurde das CLP (engl. *cecal ligation and puncture*) Mausmodell etabliert. Hier löst die Ligation und Punktierung des *Caecums* eine polymikrobielle Sepsis in Mäusen aus. In der hier durchgeführten CLP wurde ca. 20 % des *Caecums* abgebunden, wodurch eine leichte bis mittelschwere Sepsis verursacht wurde. Als Kontrollen dienten unbehandelte Versuchstiere sowie sham-Versuchstiere, bei denen ein Bauchschnitt, jedoch keine Punktierung des *Caecums* durchgeführt wurde. Für die Analysen wurden Foxp3-GFP-Mäuse verwendet, die GFP unter der Kontrolle des *foxp3*-Promotors exprimieren und somit eine Detektion regulatorischer T-Zellen anhand des Fluoreszenzsignals ermöglichen.

3.2.1.1 Beurteilung des Schweregrades einer Sepsis nach einem klinischen Punktesystem

Um den genauen Verlauf einer polymikrobiellen Sepsis und die Vitalität der Versuchstiere zu erfassen, wurden alle Tiere über den gesamten Versuchszeitraum anhand eines Belastungspunktesystems bewertet. In die Beurteilung flossen die Faktoren Gewicht, Erscheinungsbild, Aktivität, Atmung, Wundheilung der OP-Wunde sowie die Ausscheidungen der Tiere ein.

In Abbildung 3.8 A ist der Gewichtsverlauf von septischen Mäusen über siebzehn Tage dokumentiert. Man erkennt eine klare, bis zu 15 %-ige, Abnahme des Körpergewichtes in den ersten beiden Tagen nach induzierter Sepsis. In diesem Zeitraum zeigten septische Mäuse eine deutlich veränderte, dünnflüssigere Konsistenz der Fäzes und erhöhte Ausscheidung. Nach drei Tagen zeigte sich eine Stabilisierung des Gewichtsverlaufes und nach vier Tagen war eine erneute Zunahme an Körpergewicht erkennbar. Erst nach 17 Tagen erreichten CLP-Mäuse wieder ihr Ausgangsgewicht. Der sham-Eingriff hatte keinen Einfluss auf das Gewicht, welches bei sham- und Kontrolltieren dauerhaft um etwa 5 % schwankte.

Die Höhe des Gewichtsverlusts korreliert mit dem Schweregrad der Sepsis. Das Belastungsmaximum trat zwei Tage nach CLP auf und ab dem dritten Tag begannen die Tiere wieder mit ihrem typischen Verhalten wie Fellpflege und vermehrter Aktivität. Nach siebzehn Tagen war zwischen gesunden Tieren und CLP-Tieren kein

Unterscheid mehr auszumachen (Abb. 3.8 B). Sham-Tiere zeigten bereits einen Tag nach dem Eingriff keine Unterschiede zu gesunden Kontrolltieren.

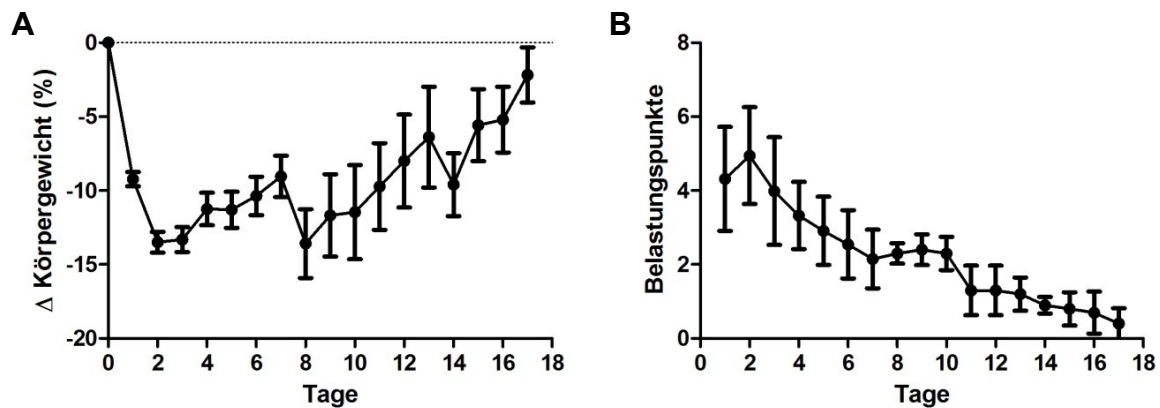


Abb. 3.8: Gewichtsverlauf und Belastungspunkte septischer Mäuse. Nach Induktion einer Sepsis wurden das Körpergewicht und der Allgemeinzustand täglich dokumentiert. Aufgetragen ist (A) die prozentuale Änderung des Körpergewichtes (y-Achse) oder (B) des Allgemeinzustandes (Summe der Belastungspunkte) gegen den entsprechenden Tag nach CLP (x-Achse). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler zusammengefasst aus 9 Versuchen mit insgesamt 35 Mäusen.

In Abb. 3.9 sind die Überlebensraten von CLP- und sham-Tieren dargestellt. Alle sham-Tiere überlebten und erholten sich rasch vollständig. Nach Durchführung der CLP-Operation verstarben etwa ein Viertel der Tiere (77 % Überlebensrate nach siebzehn Tagen), die meisten davon innerhalb der ersten 72 Stunden.

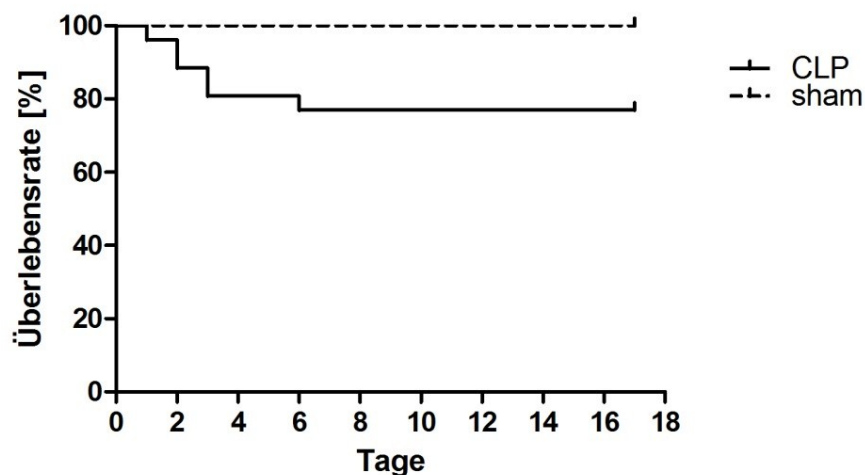


Abb. 3.9: Überlebenskurven von CLP- und sham-Mäusen. Aufgetragen ist die Überlebensrate in Prozent (y-Achse) gegen den entsprechenden Tag nach CLP (n = 26) oder sham- (n = 10) Eingriff (x-Achse). Daten wurden aus 9 unabhängigen Versuchen erhoben.

3.2.1.2 Anstieg des Anteils regulatorischer T-Zellen an allen CD4⁺ T-Zellen während einer Sepsis

Mittels durchflusszytometrischen Analysen auf Einzelzellebene wurde der Anteil an Treg-Zellen quantifiziert um festzustellen, ob im CLP-Mausmodell der Anteil an Foxp3⁺ Treg-Zellen ansteigt, so wie es auch in septischen Patienten beobachtet wird. Dafür wurde der Anteil an Foxp3⁺ Zellen in der CD4⁺ T-Zellpopulation in den mesenterischen Lymphknoten (mLN), der Milz und dem Blut nach zwei, vier und sieben Tagen untersucht (Abb. 3.10).

Bereits zwei Tage und auch vier Tage nach CLP war in den mLN ein signifikanter Anstieg des Anteils an Foxp3⁺ T-Zellen in der CD4⁺ T-Zellpopulation von 9 % auf 12 % zu beobachten. Nach sieben Tagen war der Anteil an Treg-Zellen um 5 % auf insgesamt 14 % Foxp3⁺ T-Zellen angestiegen (Abb. 3.10 A).

In der Milz verdoppelte sich der Anteil an Foxp3⁺ T-Zellen signifikant nach zwei Tagen von 11 % auf 23 % Foxp3⁺ T-Zellen in septischen Mäusen. Dieser Anstieg blieb auch am vierten (24 % Foxp3⁺ T-Zellen) und am siebten (25 % Foxp3⁺ T-Zellen) Tag nach CLP bestehen (Abb. 3.10 B).

Im Blut septischer Mäuse war ebenfalls ein signifikanter Anstieg des Anteils an Foxp3⁺ T-Zellen bezogen auf alle CD4⁺ Zellen sichtbar. Der Anteil an zirkulierenden Foxp3⁺ T-Zellen stieg nach zwei Tagen um 4 %, nach vier Tagen um 3 % und nach sieben Tagen um 5 % an (Abb. 3.10 C).

In sham-Tieren war in allen untersuchten Organen bis zu vier Tage nach Eingriff eine tendenzielle Erhöhung an Foxp3⁺ T-Zellen zu erkennen, welche sich spätestens sieben Tage nach dem Eingriff normalisierte.

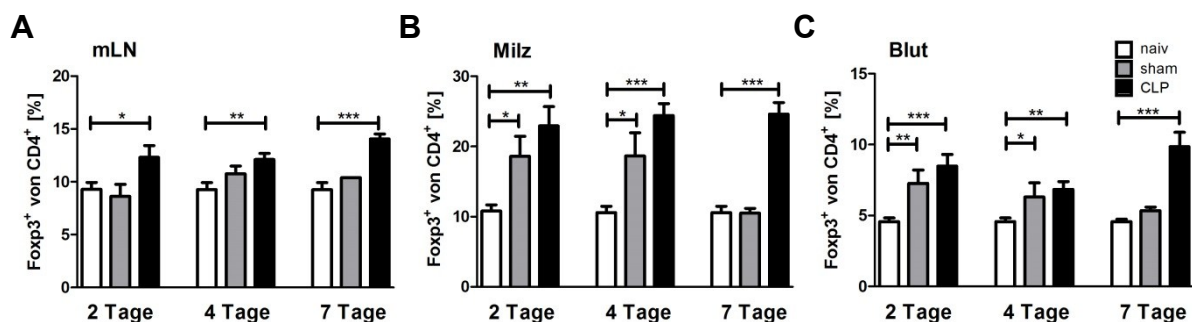


Abb. 3.10: Anstieg des Anteils an Treg-Zellen in der CD4⁺ T-Zellpopulation während einer polymikrobiellen Sepsis. Foxp3-GFP-Mäuse wurden nach sham- (grau) oder CLP- (schwarz) Operation untersucht und mit naiven (weiß) Mäusen verglichen. Zwei, vier und sieben Tagen nach Eingriff wurde in (A) mLN, (B) Milz und (C) Blut der Anteil an Foxp3⁺ T-Zellen in der CD4⁺ T-Zellpopulation durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler aus 3 - 9 Tieren. (Student's t-test ***p=0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; ns p > 0,05)

3.2.1.3 Differenzierung zwischen stabilen und instabilen Treg-Zellen mit Hilfe der Untersuchung des Methylierungsmusters der *foxp3*-TSDR

Durch Bestimmung des Methylierungsmusters der *foxp3*-TSDR sollten nun Aussagen über die Stabilität von Treg-Zellen getroffen werden, allerdings kann in Mäusen, anders als beim Menschen, nicht zwischen iTreg- und nTreg-Zellen unterschieden werden, da mittels TGF- β oder DEC-205 induzierte Treg-Zellen ebenfalls eine partielle Demethylierung in der *foxp3*-TSDR aufweisen können (Floess et al., 2007; Miyao et al., 2012; Polansky et al., 2008). Hingegen kann die Methylierung der *foxp3*-TSDR Hinweise darauf liefern, ob sich das Verhältnis zwischen sogenannten stabilen „committed“ Treg-Zellen (unmethylierte *foxp3*-TSDR) und instabilen Treg-Zellen (methylierte *foxp3*-TSDR) während einer Sepsis verschiebt. Des Weiteren erfolgten funktionelle Untersuchungen hinsichtlich der Proliferations- und Inhibitionskapazitäten beider Treg-Populationen.

3.2.1.3.1 Etablierung der QAMA-Methode zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen in Mäusen

Für die Differenzierung zwischen stabilen und instabilen Treg-Zellen auf Ebene der DNA-Methylierung, wurde der QAMA-assay für das murine *foxp3* etabliert. Genutzt wurde die bereits im Jahr 2007 beschriebene differenzielle Methylierung zwischen Treg-Zellen und T-Effektorzellen in der *foxp3*-TSDR (Floess et al., 2007) (Abb. 3.11).

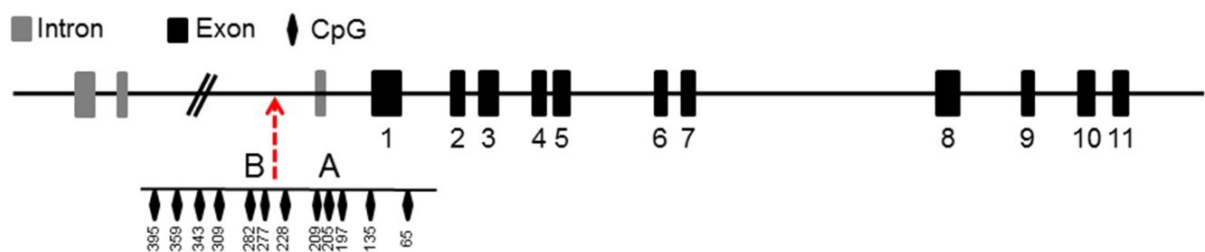


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des murinen *foxp3*. Abgebildet sind die 11 codierenden Exons und 3 Introns. In der abgebildeten Region befinden sich die CpGs, die hinsichtlich differenzieller Methylierung zwischen Treg- und Effektor-T-Zellen untersucht wurden.

Um diese differenzielle Methylierung zu bestätigen wurden $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ und $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen aus $Foxp3-GFP^+$ Mäusen mittels FACS separiert, deren DNA extrahiert und Bisulfit-DNA hergestellt. Anschließend wurde die in Abb. 3.11 dargestellte Region, die zwölf CpG-Dinukleotide enthält, hochauflösend mittels NGS hinsichtlich ihres Methylierungsstatus untersucht (Kap. 2.10.5.2). In $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ T-Zellen sind 10 der 12 untersuchten CpGs nahezu vollständig methyliert.

Hingegen sind in $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen alle untersuchten CpGs fast vollständig unmethyliert (Abb. 3.12).



Abb. 3.12: Untersuchung des DNA-Methylierungsgrades von CpGs der *foxp3*-TSDR in $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ T-Effektorzellen und $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-Zellen. Dargestellt ist die Methylierung des entsprechenden CpG in T-Effektorzellen (rot) und in Treg-Zellen (blau). Die Zahlen unterhalb geben die Position (bp) der jeweiligen CpGs an. Position A und B markieren die durch TaqMan-Sonden abgedeckten CpGs.

Für einen hochspezifischen assay, sollten die verwendeten TaqMan-Sonden möglichst viele CpGs überlappen und aufgrund der benötigten spezifischen Annealing-Temperatur und ökonomischen Gründen eine Länge von ca. 20 bp besitzen. Aufgrund der differentiellen Methylierung und des Basenabstandes zwischen den CpGs eigneten sich die beiden Positionen A und B am besten für die Generierung neuer spezifischer TaqMan-Sonden mit einer maximalen Länge von 22 bp (Abb. 3.12).

Deshalb wurden für die Etablierung des murinen *foxp3*-QAMA-assays zwei spezifische TaqMan-Sondenpaare und *Primer* für die beiden Positionen A und B generiert und deren Sensitivität verglichen.

Für die exakte Quantifizierung von unmethylierter DNA wurde für *foxp3* eine passende Standardkurve hergestellt. Hierfür wurde DNA aus Milzzellen isoliert und die gewünschte *foxp3*-Region mittels PCR amplifiziert, auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 3.13) und aufgereinigt (Konzentration: 37,2 ng/μl; Reinheit: A_{260}/A_{280} : 1,83).

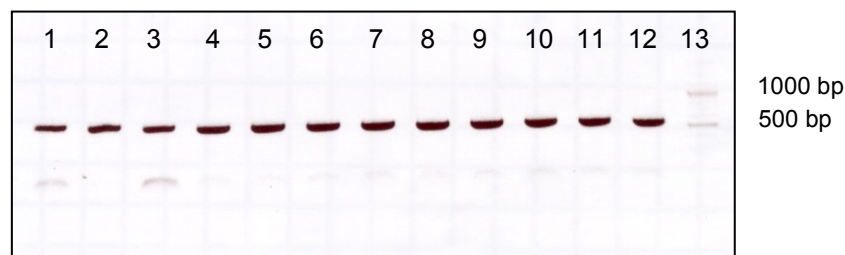


Abb. 3.13: Amplifikation mit den mFOXp3Seq-Primerpaar aus genomischer DNA von Milzzellen. Jeweils 25 μl eines PCR-Ansatzes wurden auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen. Spur 1 – 12 gewünschtes PCR Produkt nach Amplifikation mit dem mFOXp3Seq-Primerpaar (530 bp), Spur 13 Fermentas Ladder Mix.

Aus diesen PCR-Produkten wurde eine Standardkurve mit Gemischen definierter Mengen an methylierter DNA generiert. Anschließend wurde Bisulfit-DNA definierter Zellgemische unter der Verwendung der TaqMan-Sonden für die oben genannten Genregionen A und B in dieser qRT-PCR quantifiziert (Tab. 3.5) Dabei stellte sich heraus, dass das Sondenpaar B mit einer Überlappung von nur zwei CpG-Dinukleotiden nicht ausreichend spezifisch bindet und somit keine exakte Quantifizierung zulässt. Hingegen ergab das Sondenpaar A zufriedenstellende Ergebnisse und wurde in dieser Arbeit für die Quantifizierung muriner Treg-Zellen verwendet.

Tab. 3.5: Quantifizierung verschiedener Zellgemische aus murinen Treg-Zellen und T-Effektorzellen

Zellgemische (Treg-Anteil %)	Position A (%)	Position B (%)
0 (CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen)	98,0	98,1
1,25	1,7	2,6
2,5	2,1	3
5	5,98	6,91
10	11,5	8
15	14,1	13,1
20	21,8	24,2
25	20,6	28,3
Treg-Zellen	2,8	4,5

3.2.1.3.2 Bestimmung des Anteils stabiler und natürlicher Treg-Zellen in septischen Mäusen

Die Differenzierung zwischen stabilen und instabilen Treg-Zellen erfolgte über den Methylierungsstatus der *foxp3*-TSDR und die Unterscheidung zwischen iTreg- und nTreg-Zellen über die Expression des Membranproteins Nrp1.

Bei dem über die Nrp1-Expression bestimmten Anteil natürlicher Treg-Zellen zeigte sich in den mLN und der Milz zwischen septischen und naiven Mäusen kein signifikanter Unterschied. Hingegen kam es im Blut und der Lunge septischer Mäuse zu einem Anstieg des Anteils an induzierten Treg-Zellen und es fand sich eine signifikant reduzierte Nrp1-Expression auf Foxp3⁺ T-Zellen. Im Blut naiver Tieren waren 82 % nTreg-Zellen vorhanden, während in septischen Mäusen nur 72 % nTreg-Zellen zu finden waren. In der Lunge war eine Differenz von 13 % zwischen naiven und septischen Mäusen hinsichtlich der Nrp1-Expression auf Foxp3⁺ T-Zellen detektierbar (Abb. 3.14 A).

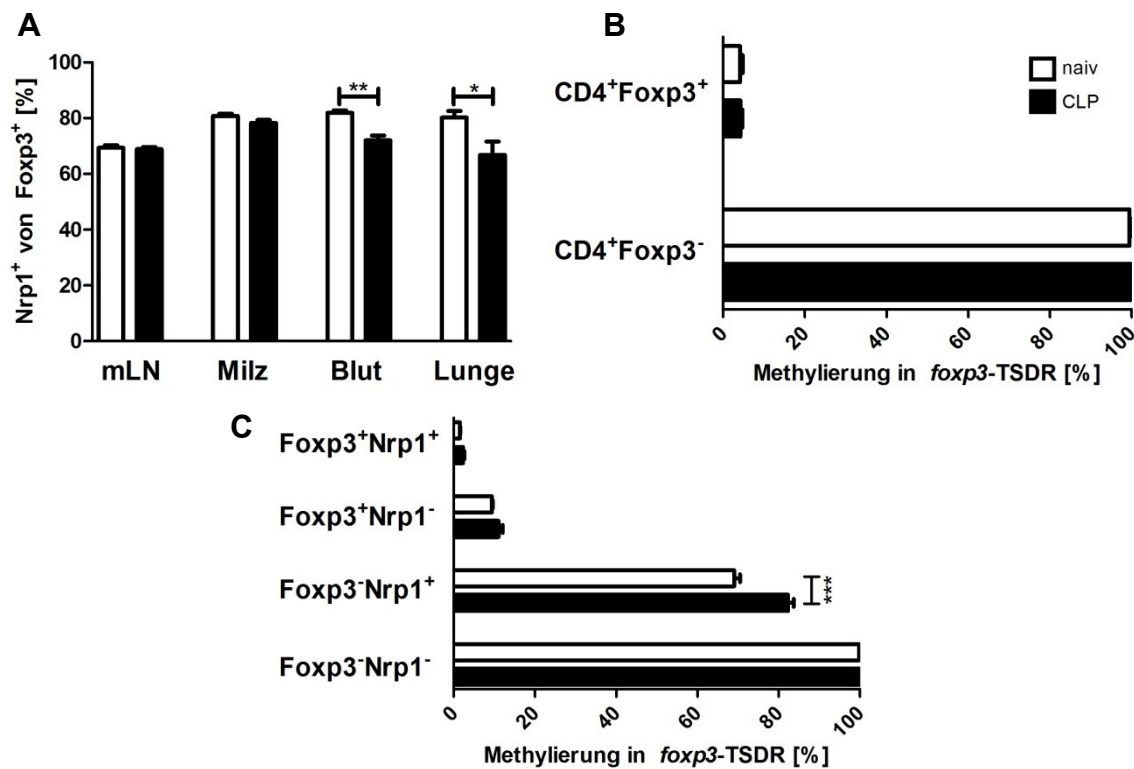


Abb. 3.14: Methylierungs- und Expressionsanalysen verschiedener Foxp3 und Nrp1 exprimierender T-Zellen. (A) Anteil der Nrp1-exprimierender Foxp3⁺ Treg-Zellen aus mLN, Milz, Blut und Lunge naiver (weiß, n = 4) und CLP- (schwarz, n = 7) Mäuse. (B & C) Methylierungsanalysen erfolgten in Splenozyten aus naiven (weiß, n = 3 - 7) und CLP- (schwarz, n = 6) Mäusen. FACS-isolierte CD4⁺Foxp3⁺ und CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen und zusätzlich Foxp3⁺Nrp1⁺, Foxp3⁺Nrp1⁻, Foxp3⁻Nrp1⁺, Foxp3⁻Nrp1⁻ T-Zellen wurden auf ihre Methylierung in der *foxp3*-TSDR mittels QAMA-Methode analysiert. (Student's t-test ***p=0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; ns p > 0,05)

Anschließend wurde die Methylierung in der *foxp3*-TSDR von zuvor durchflusszytometrisch sortierten CD4⁺Foxp3⁺ und CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen aus naiven und septischen Foxp3-GFP-Mäusen mittels QAMA-Methode untersucht. Hierbei konnte keine Differenz in der *foxp3*-TSDR Methylierung zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Foxp3⁺ T-Zellen aus naiven Mäusen waren in der *foxp3*-TSDR zu 4.3 % methyliert während Foxp3⁺ T-Zellen aus CLP-Tieren mit 4.1 % eine ähnlich ausgeprägte Methylierung aufwiesen (Abb. 3.14 B). Nicht regulatorische CD4⁺CD25⁻ T-Zellen waren in beiden Versuchsgruppen in der *foxp3*-TSDR vollständig methyliert. Zusätzlich wurden aus naiven und septischen Mäusen mit Hilfe der Foxp3- und Nrp1-Expression nTreg- und iTreg-Zellen, sowie Nrp1 exprimierende und nicht exprimierende Foxp3⁻ T-Zellen mittels FACS separiert und auf ihren Methylierungsstatus in der *foxp3*-TSDR hin untersucht (Abb. 3.14 C). Natürliche Treg-Zellen (Foxp3⁺Nrp1⁺) waren sowohl in gesunden als auch in septischen Mäusen vollständig unmethyliert (1,5 - 2,3 % Methylierung) und konventionelle T-Zellen (Foxp3⁻Nrp1⁻) in beiden Versuchsgruppen vollständig methyliert. Induzierte Treg-Zellen (Foxp3⁺Nrp1⁻) waren

in beiden Versuchsgruppen größtenteils unmethyliert (9,4 - 11 % Methylierung). In allen drei Zellpopulationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Methylierung zwischen naiven und septischen Tieren. Einzig $\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^+}$ T-Zellen unterschieden sich signifikant hinsichtlich ihrer Methylierung in der *foxp3*-TSDR zwischen naiven und septischen Mäusen (69 % zu 82,3 % Methylierung).

3.2.1.4 Funktionelle Analysen regulatorischer T-Zellen in der Sepsis

Im Anschluss an die Methylierungsuntersuchungen der *foxp3*-TSDR erfolgte die funktionelle Charakterisierung von verschiedenen *Foxp3*- und/oder *Nrp1*-exprimierenden Zellpopulationen, um Hinweise zu erhalten, ob diese Zellen während einer Sepsis eine veränderte Funktionalität annehmen.

Hierfür wurden die Proliferation und die suppressive Kapazität gegenüber *Responder*-Zellen *in vitro* bestimmt. Lediglich 3 – 4 % der natürlichen ($\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^+}$) und induzierten ($\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^-}$) Treg-Zellen sowohl aus naiven als auch aus CLP-Mäusen proliferierten nach 72-stündiger Stimulation (Abb. 3.15 A). $\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^+}$ T-Zellen aus gesunden Tieren proliferierten nach drei Tagen zu 19 %, hingegen zeigten $\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^+}$ Zellen aus CLP-Tieren mit 25 % eine tendenziell erhöhte Proliferation. Die $\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^-}$ T-Zellpopulation proliferierte nach drei Tagen am stärksten, hier waren aber keine Unterschiede in der Proliferation zwischen Zellen aus naiven und septischen Mäusen (77 % zu 80 % Proliferation) auszumachen.

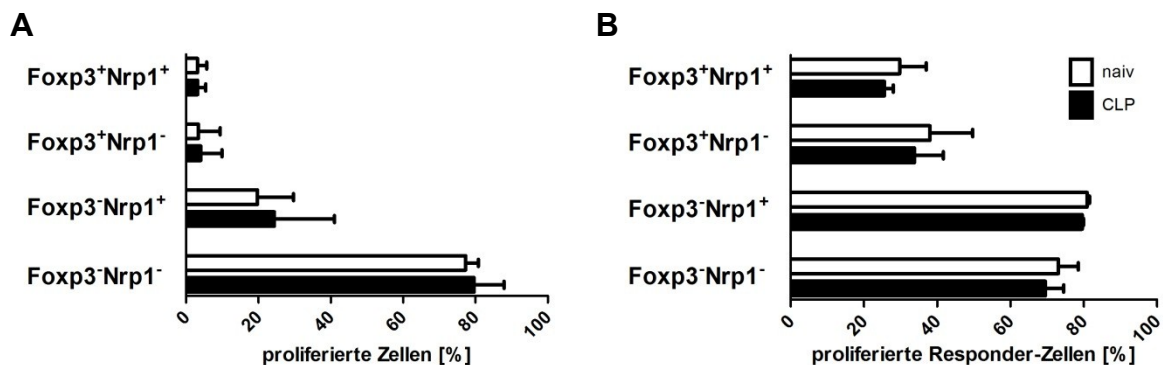


Abb. 3.15: Funktionelle Analysen verschiedener *Foxp3*- und *Nrp1*-exprimierender T-Zellen. (A) Aus Milzen naiver und septischer Mäuse (vier Tage nach CLP) wurden $\text{CD4}^{\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^+}}$, $\text{CD4}^{\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^-}}$, $\text{CD4}^{\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^+}}$ und $\text{CD4}^{\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^-}}$ T-Zellen mittels FACS isoliert, mit anti-CD3 Antikörpern und APCs *in vitro* stimuliert und ihre Proliferation nach drei Tagen bestimmt. (B) Diese Zellpopulationen wurden analog zu (A) stimuliert und mit PKH26-markierten *Responder*-Zellen co-kultiviert und ihre suppressive Aktivität gegenüber *Responder*-Zellen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern aus zwei unabhängigen Versuchen.

Diese *Foxp3*/*Nrp1*-Zellpopulationen wurden auch hinsichtlich ihrer suppressiven Kapazität untersucht (Abb. 3.15 B). Sowohl $\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^+}$ T-Zellen als auch $\text{Foxp3}^{\text{Nrp1}^-}$ T-Zellen waren aus septischen Mäusen tendenziell stärker in der Lage,

die Proliferation von *Responder*-Zellen zu unterdrücken als Zellen aus naiven Tieren. $\text{Foxp3}^+\text{Nrp1}^+$ T-Zellen aus naiven und septischen Mäusen besaßen ähnlich starke suppressive Eigenschaften, indem sie nach 72 Stunden eine Proliferation der *Responder*-Zellen von 30 % (naiv) bzw. 26 % (CLP) ermöglichten. *Responder*-Zellen proliferierten in Anwesenheit von $\text{Foxp3}^+\text{Nrp1}^-$ Zellen aus naiven Mäusen zu 38 % hingegen in Kultur mit $\text{Foxp3}^+\text{Nrp1}^-$ aus septischen Mäusen nur zu 34 %. Außerdem besaßen Nrp1^+ nTreg-Zellen eine tendenziell stärkere suppressive Wirkung auf *Responder*-Zellen als induzierte, Nrp1^- Treg-Zellen. Die beiden Foxp3^- T-Zellpopulationen zeigten keine suppressiven Eigenschaften gegenüber *Responder*-Zellen und ermöglichten nach 72 Stunden eine Proliferation von über 70 %.

3.2.1.5. Einfluss einer polymikrobiellen Sepsis auf CD4^+ T-Zellen

Diverse Studien konnten in septischen Patienten eine Apoptose und auch eine Reduzierung von CD4^+ T-Zellen demonstrieren (Inoue et al., 2011; Lin et al., 2014). Um dies zu überprüfen wurden nach zwei, vier und sieben Tagen Zellen aus den mLN, der Milz und dem Blut durchflusszytometrisch auf ihre CD4 -Expression untersucht. Nach CLP reduzierte sich in den mLN der Anteil an CD4^+ T-Zellen bezogen auf alle Lymphozyten signifikant. Bereits zwei Tage nach CLP waren in septischen Tieren nur noch 50 % CD4^+ T-Zellen vorhanden, nach vier Tagen 43 % und nach sieben Tagen 35 % während naive Mäuse zwischen 60 – 68 % CD4^+ T-Zellen besaßen (Abb. 3.16 A).

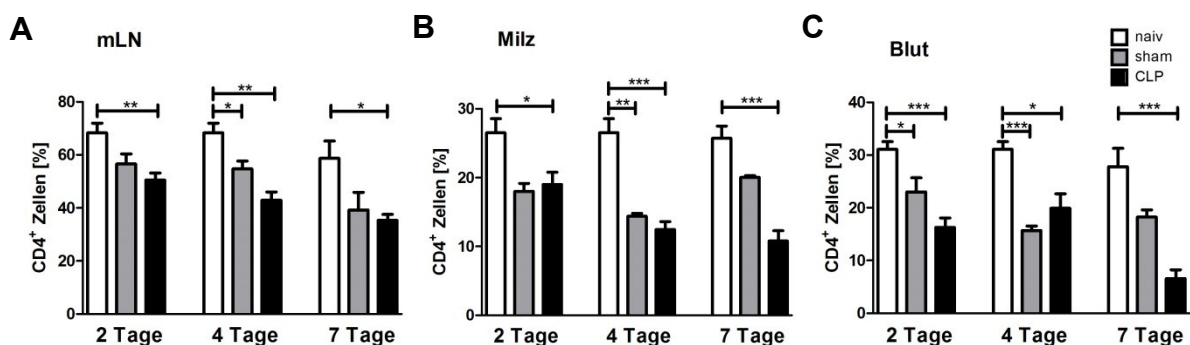


Abb. 3.16: Reduzierter Anteil an CD4^+ T-Zellen während einer Sepsis. Zwei, vier und sieben Tage nach sham- (grau) oder CLP- (schwarz) Eingriff wurden Zellen aus (A) mLN, (B) Milz und (C) Blut isoliert und der Anteil CD4^+ T-Zellen in der Lymphozytenpopulation, welche anhand ihrer Größe und Granularität bestimmt wurde, ermittelt und mit naiven Mäusen (weiß) verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus $n = 4 - 7$. (Student's t-test *** $p=0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns $p > 0,05$)

In der Milz war, ähnlich der mLN, eine signifikante Senkung des Anteils an CD4^+ T-Zellen im Verlauf einer Sepsis zu erkennen (Abb. 3.16 B). Zwei Tage nach Induktion

einer Sepsis reduzierte sich der Anteil an CD4⁺ T-Zellen um 7 %, nach vier Tagen um 14 % und nach sieben Tagen um 15 % verglichen mit naiven Kontrolltieren.

Im Blut halbierte sich der Anteil an CD4⁺ T-Zellen bezogen auf alle Lymphozyten zwei Tage nach CLP von 31 % auf 16 % (Abb. 3.16 C). Eine signifikante Minderung des CD4⁺ T-Zellanteil in CLP-Mäusen war ebenfalls nach vier (31 % zu 19 % CD4⁺ T-Zellen) und sieben Tage (28 % zu 7 % CD4⁺ T-Zellen) nachweisbar.

3.2.2 Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Frühphase einer Sepsis

Um die Rolle von Treg-Zellen während der pro-inflammatorischen Phase einer Sepsis zu untersuchen, wurden Foxp3⁺ Treg-Zellen in den transgenen DEREГ-Mäusen vor Induktion einer Sepsis mittels DT spezifisch depletiert.

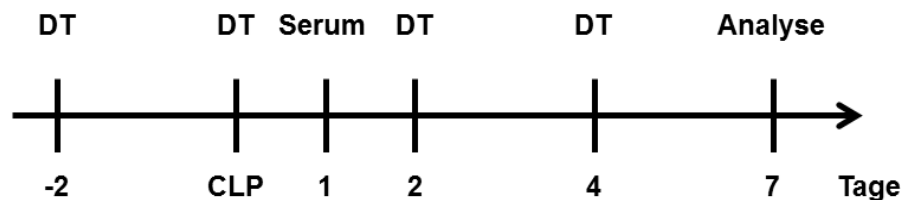


Abb. 3.17: Versuchsablauf zur Untersuchung der Rolle von Treg-Zellen für die pro-inflammatorische Phase. Zwei Tage vor CLP wurden Treg-Zellen mittels Applikation von DT (30 ng/g Körpergewicht) depletiert. Für eine dauerhafte Treg-Depletierung wurde danach alle zwei Tage DT appliziert. Kontrolltiere erhielten ein identisches Volumen PBS.

3.2.2.1 Die Depletion regulatorischer T-Zellen während der pro-inflammatorischen Phase verschlechtert die Prognose einer Sepsis

Anhand der Untersuchungen des klinischen Verlaufs einer Sepsis in Anwesenheit oder Abwesenheit von Treg-Zellen wurde untersucht, ob Treg-Zellen die Regeneration positiv oder negativ beeinflussen.

Zur Beurteilung des Zustandes ist das Körpergewicht der Tiere ein wichtiges Kriterium. Die Punktierung des *Caecums* zieht häufig starke Durchfälle und eine verringerte Nahrungsaufnahme nach sich. Wie in Abb. 3.18 A dargestellt, führte die Depletion der Treg-Zellen in DEREГ-Mäusen im Verlauf der initialen Phase der Sepsis zu einem Gewichtsverlust von bis zu 17 %, während nicht-depletierte CLP-Mäuse nur maximal 10 % ihres Körpergewichts verloren. Zudem waren DT-behandelte Tiere nicht in der Lage innerhalb von sieben Tagen erneut an Gewicht zuzunehmen, während nicht-depletierte septische DEREГ-Mäuse bereits drei Tage nach Induktion einer Sepsis wieder an Gewicht zunahmten und den Gewichtsverlust nach sieben Tagen auf nur 7 % minimieren konnten. Hingegen betrug bei DT-behandelten Mäusen der Gewichtsverlust nach diesem Zeitraum noch 17 %.

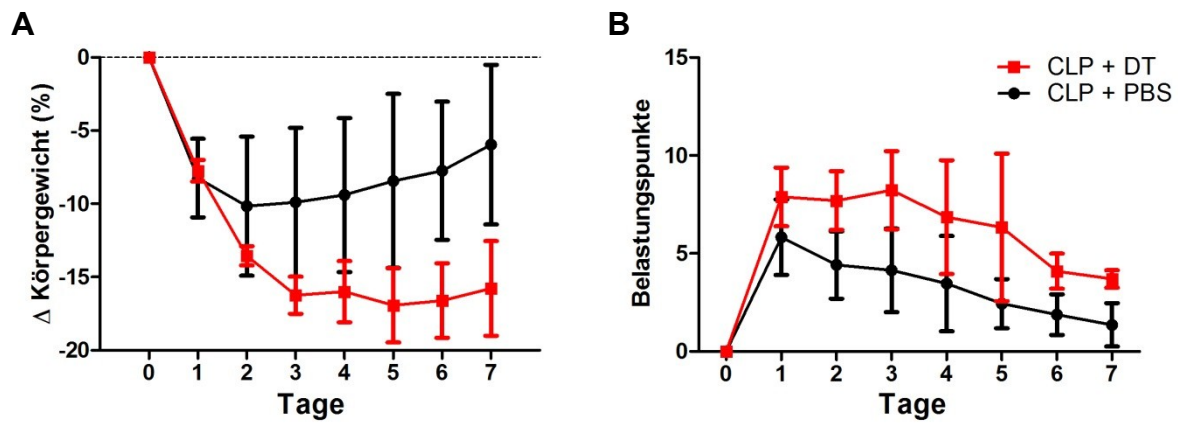


Abb. 3.18: Eine Treg-Depletion in der frühen Phase einer Sepsis bewirkt einen schwereren Verlauf. (A) Zwei Tage nach PBS- (schwarz) oder DT- (rot) Applikation wurde in DEREK-Mäusen eine CLP durchgeführt und das Gewicht täglich bestimmt. Aufgetragen ist die prozentuale Änderung des Körpergewichtes (y-Achse) gegen den entsprechenden Tag nach CLP (x-Achse). (B) Tägliche Dokumentation des Allgemeinzustandes der Versuchstiere. Aufgetragen ist die Summe der ermittelten Belastungspunkte (y-Achse) gegen den entsprechenden Tag nach CLP (x-Achse). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler zusammengefasst aus 52 PBS-behandelten und 12 DT-behandelten Mäusen.

Der gesundheitliche Allgemeinzustand und Schweregrad der Sepsis wurden auch anhand der in Kap. 3.2.1.1 beschriebenen Belastungspunkte dokumentiert (Abb. 3.18 B). DT-behandelte septische Mäuse zeigten über den gesamten Versuchszeitraum eine deutlich schwerere Sepsis und einen schlechteren Allgemeinzustand mit durchschnittlich 8 Belastungspunkten bis zum dritten Tag und nach sieben Tagen immer noch einen Belastungswert von knapp 4 Belastungspunkten. Hingegen zeigten nicht-depletierte DEREK-Mäuse eine leichtere Sepsis mit durchschnittlich 2.5 Belastungspunkten weniger. Sie erholten sich nach sieben Tagen fast vollständig, was sich in einem Belastungswert von 1 äußerte.

Diese deutlichen Unterschiede im Schweregrad einer Sepsis zwischen beiden Versuchstiergruppen spiegelten sich ebenfalls in der Überlebensrate septischer DEREK-Mäuse nach Applikation von DT oder PBS wider.

In Abb. 3.19 ist erkennbar, dass 77 % der Tiere, die PBS erhielten, sieben Tage nach dem CLP-Eingriff überlebten. Der Anteil der überlebenden Tiere ähnelte der Überlebensrate von CLP-behandelten Foxp3-GFP-Mäusen. Hingegen starben besonders in den ersten 48 Stunden nach CLP deutlich mehr Treg-depletierte Mäuse welche außerdem nach sieben Tagen eine erheblich geringere Überlebensrate von nur 33 % aufwiesen.

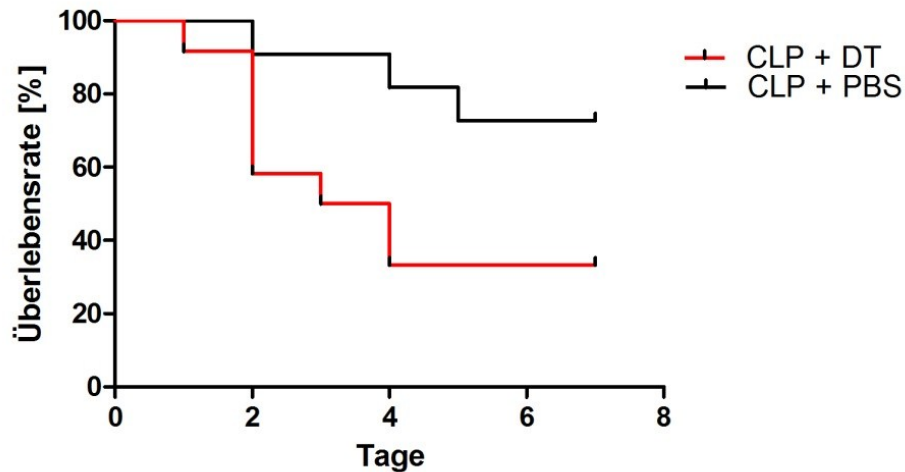


Abb. 3.19: Eine Treg-Depletion während der frühen Phase einer Sepsis reduziert die Überlebensrate. Aufgetragen ist die prozentuale Überlebensrate (y-Achse) gegen den entsprechenden Tag nach CLP (x-Achse) von PBS (schwarz, n = 52) und DT (rot, n = 12) behandelten DEREK-Mäusen.

3.2.2.2 Effektivität der Treg-Depletion in DT-behandelten DEREK-Mäusen in der frühen Phase einer Sepsis

Die Effektivität der DT-Applikation hinsichtlich der Treg-Depletion wurde durchflusszytometrisch untersucht. Ähnlich wie in den Foxp3-GFP-Mäusen war sieben Tage nach Induktion einer Sepsis ein signifikanter Anstieg der Treg-Zellen in der Milz (von 17 % auf 30 % Foxp3⁺ von CD4⁺ T-Zellen), den mLN (von 9 % auf 16 % Foxp3⁺ von CD4⁺ T-Zellen) und im Blut (von 8 % auf 14 % Foxp3⁺ von CD4⁺ T-Zellen) zu erkennen (Abb. 3.20). Der Anteil an Treg-Zellen wurde durch die Applikation von DT in allen Organen um 90 – 95 % reduziert (mLN um 94 %, Milz 90 %, Blut um 92 % Foxp3⁺).

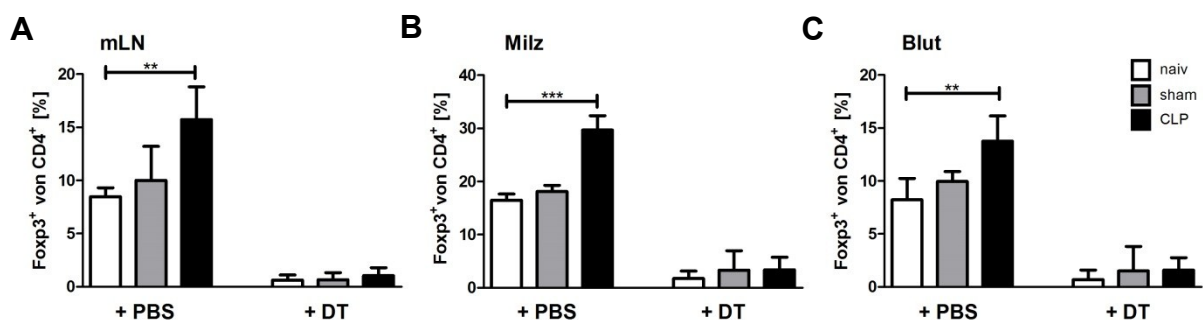


Abb. 3.20: Anstieg an Foxp3⁺ T-Zellen während einer Sepsis und Effektivität der Depletion durch DT. Nach Applikation von PBS oder DT wurde der Anteil an Foxp3⁺ T-Zellen bezogen auf alle CD4⁺ T-Zellen mittels Antikörpermarkierung in (A) mLN, (B) Milz und (C) Blut aus naiven (weiß), sham- (grau) und septischen (schwarz) DEREK-Mäusen ermittelt. Die Daten wurden aus n = 5 - 8 Tieren je Gruppe generiert und sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. (Student's t-test ***p=0,001; **p < 0,01; ns p > 0,05)

3.2.2.4 Bedeutung der Treg-Depletion für das Zytokinprofil in der frühen Phase einer Sepsis

Um zu klären, ob die Depletion von Treg-Zellen die Sezernierung von Zytokinen im Serum beeinflusst, wurden die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 sowie der anti-inflammatorische Zytokine IL-4 und IL-10 bestimmt. Dafür wurde aus PBS- und DT-behandelten naiven, sham- und CLP-Mäusen 24 Stunden nach dem Eingriff Blut entnommen und Serum gewonnen.

Unabhängig von der Applikation von DT oder PBS war in naiven und sham-Mäusen nur geringe Mengen an TNF α (2 - 3 pg/ml) und IL-6 (10 - 20 pg/ml) im Serum nachweisbar. Nach CLP stiegen die TNF α und IL-6 Serumspiegel deutlich an, allerdings besaßen DT-behandelte Mäuse einen signifikant höheren IL-6 Serumspiegel (3917 pg/ml zu 691 pg/ml) und einen tendenziell höheren TNF α Serumspiegel (13 pg/ml zu 8 pg/ml) als PBS-behandelte Mäuse (Abb. 3.21 A & B).

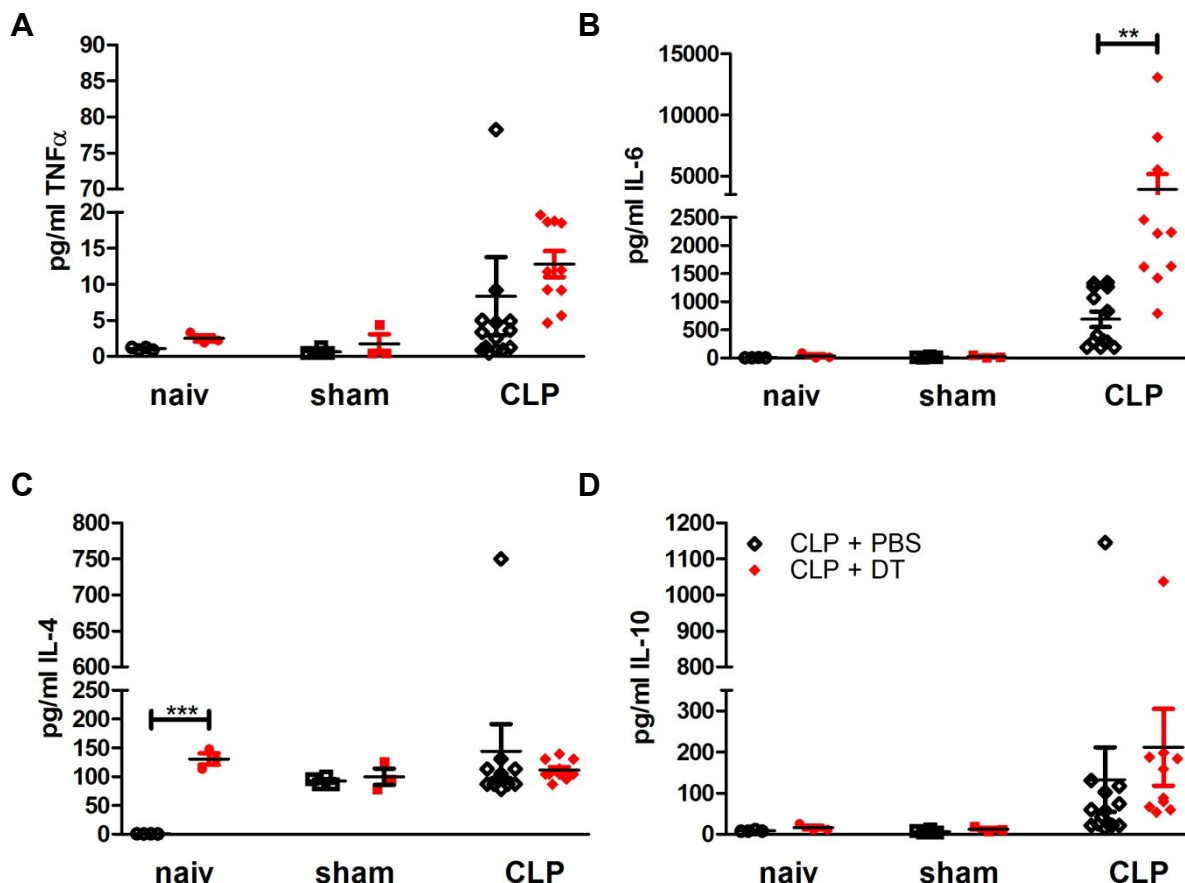


Abb. 3.21: Serumspiegelkonzentrationen von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in der frühen Phase einer Sepsis. 24 Stunden nach CLP wurde Blut aus PBS- (schwarz) und DT- (rot) behandelten naiven, sham- und CLP-Mäusen entnommen und der Zytokinspiegel von (A) TNF α , (B) IL-6, (C) IL-4 und (D) IL-10 mittels Luminex bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Proben mit Mittelwerten und Standardfehlern (n = 3 - 14). (Student's t-test ***p=0,001; **p < 0,01; ns p > 0,05)

Der IL-4 Spiegel im Blut war nach CLP und sham-Eingriff erhöht, allerdings in beiden Versuchsgruppen ähnlich. In naiven Mäusen bewirkte die Applikation von DT einen Anstieg des IL-4 Spiegels um 130 pg/ml (Abb. 3.21 C).

Hingegen führte eine CLP zu einem erhöhten IL-10 Serumspiegel sowohl in PBS- als auch in DT-behandelten Mäusen. Trotz spezifischer Treg-Depletion besaßen DT-behandelte Mäuse einen tendenziell höheren IL-10 Spiegel als PBS-behandelte Mäuse (212 pg/ml zu 133 pg/ml) (Abb. 3.21 D).

3.2.3 Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Spätphase einer Sepsis

Auf die frühe pro-inflammatorische Phase einer Sepsis folgt eine anti-inflammatorische Phase, in der Patienten besonders anfällig für eine Zweitinfektion sind.

Für Untersuchungen der Rolle regulatorischer T-Zellen nach der Hyperinflammation einer Sepsis wurden Treg-Zellen fünf Tage nach CLP-Eingriff in DEREK-Mäusen depletiert und zwei Tage später eine Lungenentzündung mit *P. aeruginosa* induziert.

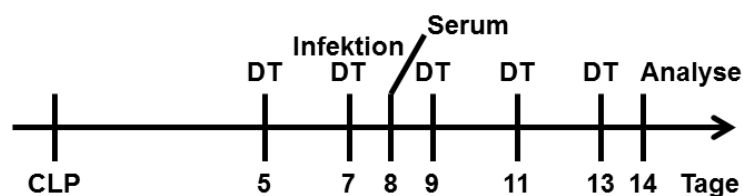


Abb. 3.22: Versuchsablauf zur Untersuchung der Rolle von Treg-Zellen während der anti-inflammatorischen Phase. Zur Analyse der Rolle regulatorischer T-Zellen in der Spätphase einer Sepsis wurde eine Woche nach CLP eine Sekundärinfektion mit *P.aeruginosa* durchgeführt. Zwei Tage vor Sekundärinfektion wurden Treg-Zellen mittels DT depletiert und anschließend alle zwei Tage DT appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt ein identisches Volumen PBS.

3.2.3.1 Die Depletion von Treg-Zellen beeinflusst den Schweregrad einer Sekundärinfektion nicht

Der Gewichtsverlauf nach CLP und nach Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa*, welcher bei beiden Versuchsgruppen über den gesamten Zeitraum nahezu identisch verlief, ist in Abb. 3.23 A dargestellt. Nach CLP erfolgte in den ersten beiden Tagen ein deutlicher Gewichtsverlust, der bis zur Sekundärinfektion auf 5 % kompensiert werden konnte. Sieben Tage nach CLP erfolgte die intratracheale Sekundärinfektion und beide Versuchsgruppen verloren über einen Zeitraum von 48 Stunden bis zu 13 % ihres Körpergewichts, begannen jedoch drei Tage nach der Sekundärinfektion wieder an Gewicht zuzunehmen. Auch nach 14 Tagen waren keine Unterschiede im Körpergewicht zwischen DT- oder PBS-behandelten Mäusen auszumachen.

Der Belastungsverlauf korreliert mit dem Gewichtsverlauf der Tiere. Zwischen beiden Versuchsgruppen war keine Differenz im Krankheitsverlauf zu erkennen. Im Belas-

tungsverlauf deuteten sich zwei Höhepunkte an: Das erste Maximum wurde 24 Stunden nach CLP mit einem Belastungswert von etwa 6 erreicht und das zweite Maximum 24 Stunden nach der Sekundärinfektion mit einem ähnlich hohen Wert. Nach beiden Infektionen benötigten die Tiere aus beiden Versuchstiergruppen mindestens sieben Tage zur Regeneration (Abb. 3.23 B).

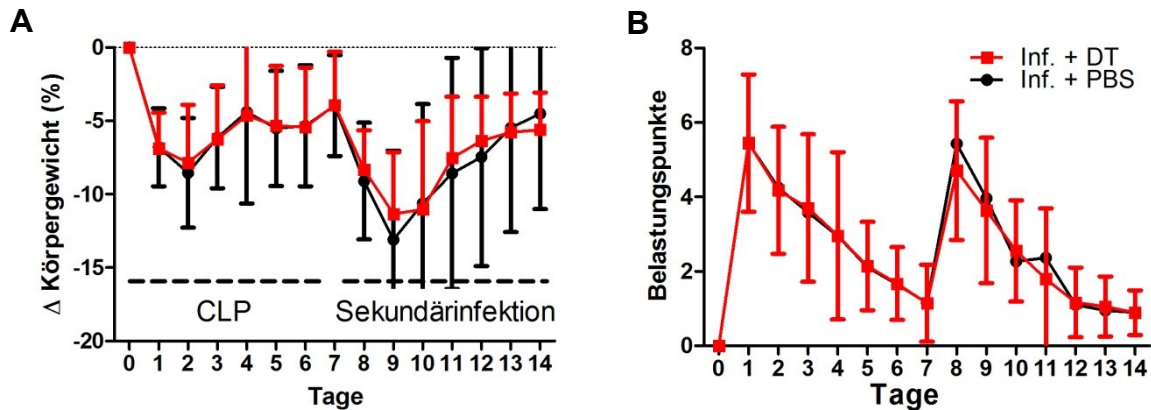


Abb. 3.23: Die Depletion von Treg-Zellen während einer Sekundärinfektion beeinflusst nicht den Schweregrad und Gewichtsverlauf einer Sepsis. Dargestellt ist der Verlauf einer Sepsis in CLP-Mäusen mit DT- (rot, n = 18) oder PBS- (schwarz, n = 16) Applikation vor Sekundärinfektion. Aufgetragen ist (A) die prozentuale Änderung des Körpergewichtes (y-Achse) oder (B) die Summe der ermittelten Belastungspunkte (y-Achse) gegen den entsprechenden Tag nach CLP (x-Achse). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler zusammengefasst aus 4 Versuchen.

In der Überlebensrate sowie auch in den Gewichts- und Belastungsverläufen beider Versuchgruppen waren keine wesentlichen Unterschiede nach Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa* auszumachen (Abb. 3.24).

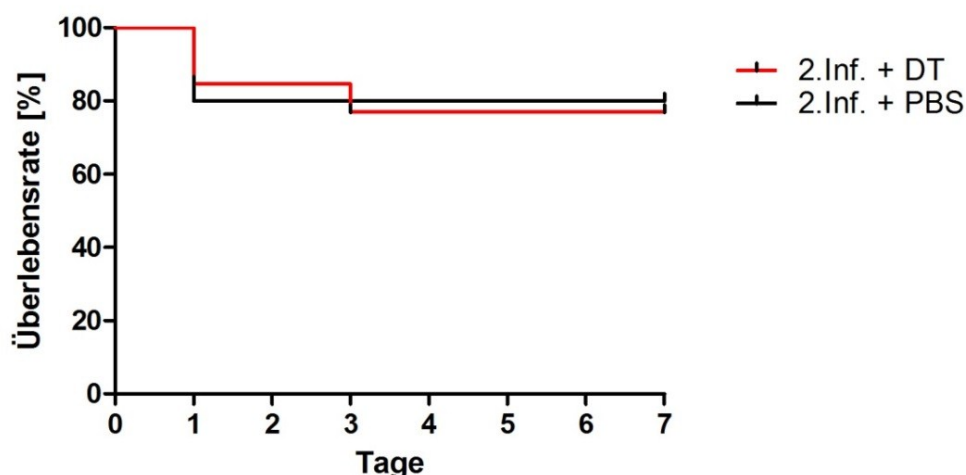


Abb. 3.24: Die Treg-Depletion während einer Sekundärinfektion beeinflusst nicht die Überlebensrate. Septische DEREK-Mäuse wurden mit PBS (schwarz, n = 16) oder DT (rot, n = 21) behandelt bevor eine Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa* erfolgte. Dargestellt ist die Überlebensrate in Form von Mittelwerten zusammengefasst aus 4 Versuchen.

Knapp ein Fünftel aller Tiere verstarb innerhalb von 24 Stunden nach Sekundärinfektion. Nach sieben Tagen zeigten DT-behandelte Tiere eine Überlebensrate von 77 % und PBS-behandelte Tiere eine Überlebensrate von 80 %.

3.2.3.2 Analyse des Treg-Anteils sowie der Effektivität der Treg-Depletion durch DT nach Sekundärinfektion

In Abb. 3.25 sind die Anteile an Foxp3^+ Zellen während der Primär- und Sekundärinfektion dargestellt. In den mLN stieg der Anteil an Treg-Zellen sieben Tage nach CLP auf 15 % an und blieb während einer Sekundärinfektion auf diesem Niveau. In der Milz reduzierte sich während der Sekundärinfektion der Anteil an Foxp3^+ T-Zellen verglichen mit dem Anteil nach einer CLP. Einzig im Blut stieg der Anteil an Foxp3^+ Zellen kontinuierlich während der Sekundärinfektion nochmals von 14 % nach einer CLP auf 17 % Foxp3^+ T-Zellen an. Am Infektionsort, der Lunge, stieg der Anteil an Foxp3^+ T-Zellen 2 Tage nach Sekundärinfektion im Vergleich zu naiven Mäusen um 15 % an und reduzierte sich nach sieben Tagen auf ein Normalmaß.

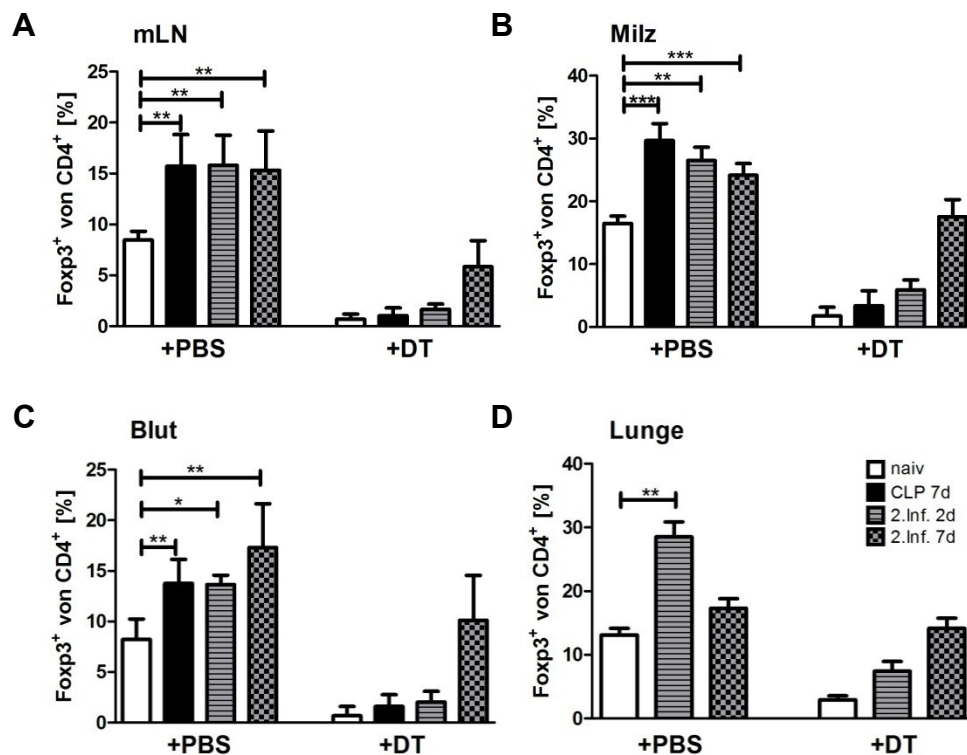


Abb. 3.25: Anteil an Foxp3^+ T-Zellen während einer Sepsis und Sekundärinfektion in DT- und PBS-behandelten DEREK-Mäusen. Dargestellt sind die mittels Antikörpermarkierung ermittelten Anteile an Foxp3^+ T-Zellen bezogen auf alle CD4^+ T-Zellen in (A) mLN, (B) Milz, (C) Blut und (D) Lunge. Untersucht wurden naive Mäuse (weiß), sieben Tage nach CLP (schwarz), sowie Mäuse zwei (grau gestreift) und sieben (grau kariert) Tage nach Sekundärinfektion (keine Analyse der Lunge sieben Tage nach CLP). Die Daten wurden aus 4 - 10 Tieren je Gruppe generiert (2. Infektion nach zwei Tagen nur n = 2) und sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. (Student's t-test ***p=0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; ns p > 0,05)

DEREG-Mäuse, denen DT-appliziert wurde, besaßen im Gegensatz zur Primärinfektion sieben Tage nach der Sekundärinfektion zwischen 6 – 16 % Foxp3⁺ T-Zellen (Abb. 3.25). Dieser Anstieg deutete sich bereits zwei Tage nach der Sekundärinfektion an, da DT-behandelte Tiere in den mLN 1,7 %, in der Milz 5,9 %, im Blut 2,0 % und in der Lunge 7,4 % Foxp3⁺ T-Zellen besaßen. Nach sieben Tagen waren in den mLN 6,1 %, in der Milz 16,0 % im Blut 10,3 % und in der Lunge 14,0 % dieser Foxp3⁺ T-Zellen, die jedoch GFP-negativ waren, detektierbar (Abb. 3.25).

3.2.3.4 Bedeutung einer Treg-Depletion für das Zytokinprofil nach Sekundärinfektion

Um zu untersuchen, ob die Treg-Depletion während einer Sekundärinfektion in der späten Phase einer Sepsis die Konzentration pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im Blut beeinflusst, wurde 24 Stunden nach Sekundärinfektion Blut entnommen, Serum gewonnen und die darin enthaltenen Zytokinkonzentrationen bestimmt.

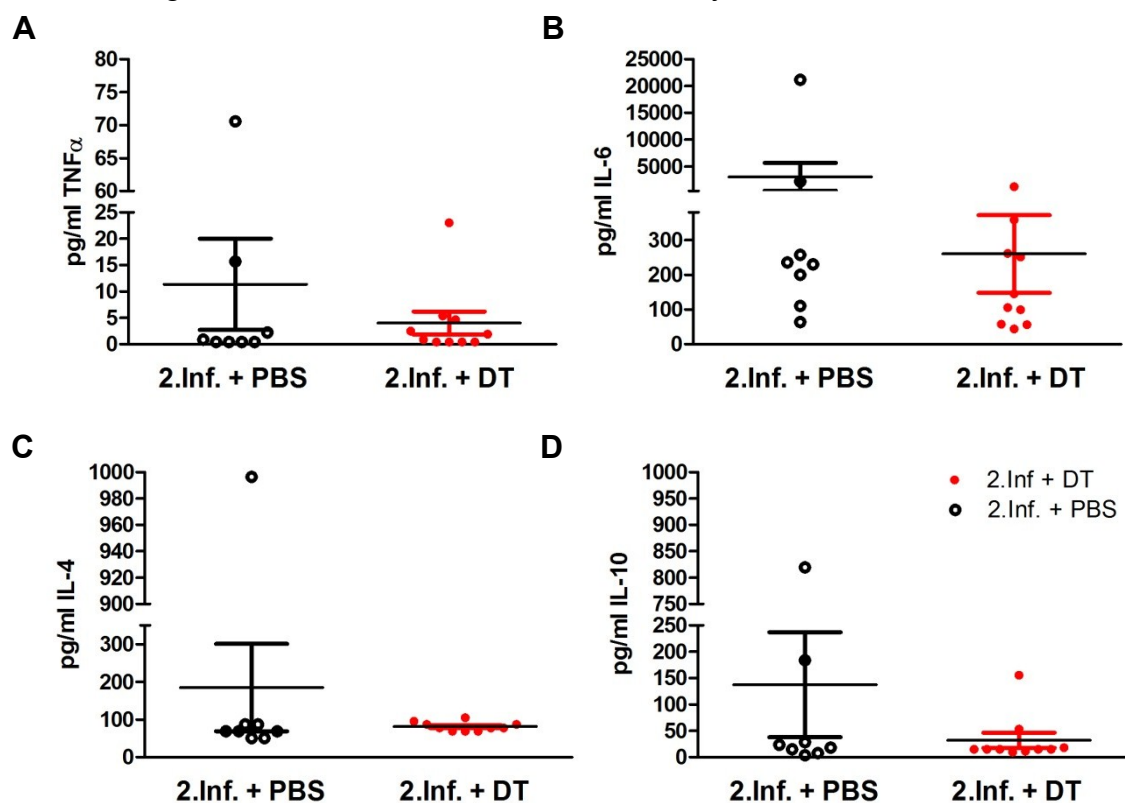


Abb. 3.26: Einfluss der DT-Applikation auf das Zytokinprofil während einer Sekundärinfektion in der Spätphase einer Sepsis. 24 Stunden nach Sekundärinfektion wurde Blut aus PBS- (schwarz, n = 8) und DT- (rot, n = 10) behandelten Mäusen entnommen und der Zytokinspiegel von (A) TNF α , (B) IL-6, (C) IL-4 und (D) IL-10 mittels Luminex bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Proben mit Mittelwerten und Standardfehlern.

Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen an TNF α , IL-6, IL-4 und IL-10 zwischen PBS- und DT-behandelten Mäusen festgestellt werden (Abb. 3.26).

3.2.4 Die Rolle des TLR2 für den Verlauf einer Sepsis

Eine TLR2-vermittelte Aktivierung regulatorischer T-Zellen kann eine Proliferation und Expansion induzieren und die *foxp3*-Expression regulieren (Liu et al., 2006a; Nyirenda et al., 2011; Oberg et al., 2010). Deshalb wurde untersucht, ob TLR2-defiziente Mäuse einen veränderten Krankheitsverlauf einer Sepsis besitzen und ob ein Anstieg an Treg-Zellen ausbleibt, der während einer Sepsis in WT-Mäusen beobachtet wird.

3.2.4.1 Verlauf einer Sepsis und Sekundärinfektion in TLR2-defizienten Mäusen

Nach CLP zeigten die Gewichtverläufe von TLR2^{-/-}- und WT-Mäusen keine Unterschiede (Abb. 3.27 A). Tiere aus beiden Gruppen verloren in den ersten drei Tagen nach CLP bis zu 16 % ihres Körpergewichts, bevor sie erneut an Gewicht zunahmen. Nach der Sekundärinfektion durch *P.aeruginosa* reduzierte sich das Körpergewicht der Versuchstiere erneut um bis zu 19 % und nur die TLR2^{-/-}-Mäuse nahmen vier Tage nach Sekundärinfektion wieder konstant an Gewicht zu. WT-Mäuse waren nicht in der Lage, sich von der Sekundärinfektion zu erholen und wiesen sieben Tage danach immer noch einen Gewichtsverlust von 18 % auf.

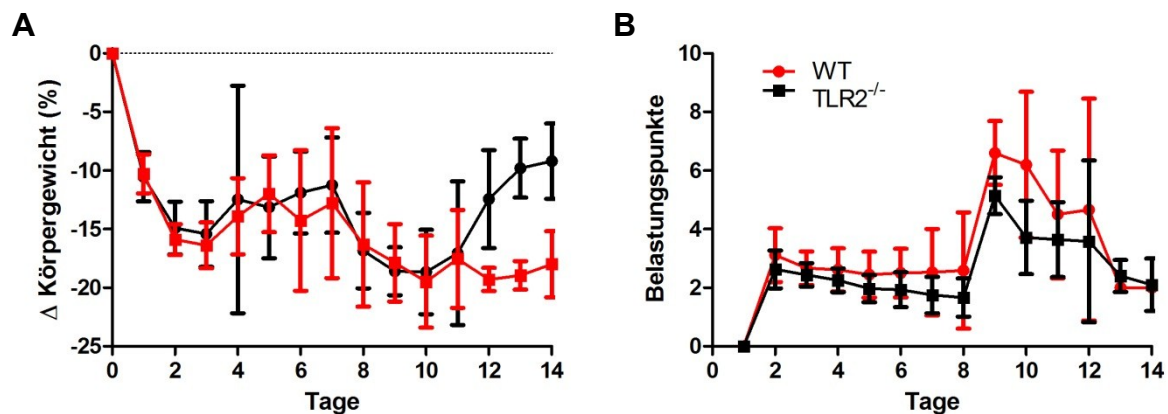


Abb. 3.27: Einfluss eines TLR2-Knockouts auf den Gewichtsverlauf und Schweregrad einer CLP und Sekundärinfektion. In TLR2^{-/-}- (schwarz, n = 15) und WT- (rot, n = 19) Mäusen wurde eine CLP durchgeführt und sieben Tage später folgte eine Sekundärinfektion mit *P.aeruginosa*. Aufgetragen auf die y-Achse ist (A) die prozentuale Änderung des Körpergewichtes oder (B) die Summe der ermittelten Belastungspunkte gegen den entsprechenden Tag nach CLP (x-Achse). Die generierten Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler aus 3 Versuchen zusammengefasst.

Die Beurteilung mittels Belastungspunkte spiegelt die Differenz weniger deutlich wider. Einen Tag nach CLP erreichten beide Gruppen einen Belastungswert von 3 und erholten sich anschließend wieder. Nach der Sekundärinfektion hingegen zeigten die WT-Mäuse einen deutlich höheren Belastungswert von 7 im Vergleich zu den TLR2^{-/-}-Mäusen mit einem Belastungswert von nur 5. Von diesem Maximum er-

holten sich TLR2^{-/-}-Mäuse schneller als WT-Mäuse. Fünf Tage nach Sekundärinfektion verlief die Regeneration beider Gruppen wieder sehr ähnlich (Abb. 3.27 B). In Abb. 3.28 sind die Überlebensraten der TLR2^{-/-}- und der WT-Mäuse aufgezeichnet. Nach Primärinfektion war nur ein geringer Unterschied in der Überlebensrate zwischen den beiden Versuchsgruppen erkennbar. Nach sieben Tagen überlebten 75 % der WT- und 83 % der Knockout-Mäuse. Nach der Sekundärinfektion verstarben jedoch erheblich mehr WT-Mäuse im Vergleich zu TLR2^{-/-}-Mäusen (27 % zu 72 % Überlebensrate sieben Tage nach Infektion).

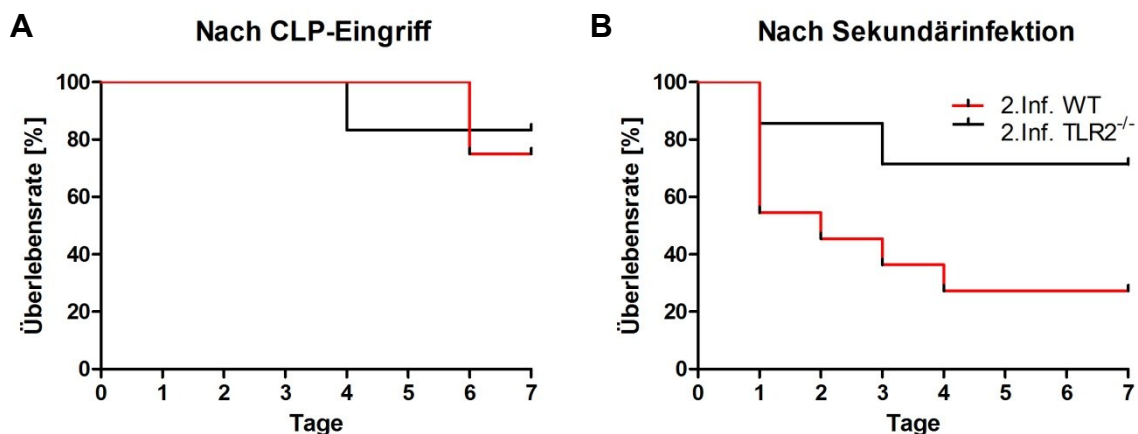


Abb. 3.28: Eine TLR2-Defizienz beeinflusst nicht die Überlebensrate nach CLP, verbessert aber die Überlebensrate nach einer Sekundärinfektion. (A) In TLR2^{-/-}- (schwarz) und WT- (rot) Mäusen wurde eine Sepsis induziert und die Überlebensrate nach sieben Tagen bestimmt. (B) Nach CLP folgte eine Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa* und die Bestimmung der Überlebensrate nach sieben Tagen. Die Überlebensraten sind aus 3 Versuchen mit 15 - 19 Mäusen je Versuchsgruppe zusammengefasst.

3.2.4.2 Unterschiedliche Kinetiken im Anstieg regulatorischer T-Zellen während einer Sepsis in TLR2^{-/-}- und WT-Mäusen

Um zu untersuchen, ob die Resistenz gegenüber einer Sekundärinfektion in TLR2-defizienten Mäusen auf einen fehlenden Anstieg an Treg-Zellen während der Sepsis zurückzuführen ist, wurde der Anteil an Foxp3⁺ T-Zellen in naiven, in CLP-Mäusen und sekundärinfizierten Tieren untersucht (Abb. 3.29).

In den mLN, der Milz, im Blut und in der Lunge stieg der Anteil an Foxp3⁺ T-Zellen während der Primärinfektion sowohl in WT- als auch in TLR2^{-/-}-Mäusen signifikant an. Allerdings wies die Kinetik des Anstiegs zwischen den Versuchsgruppen Unterschiede auf. Nach CLP wurde das Maximum des Foxp3⁺ T-Zellanteils in WT-Mäusen nach 7 Tagen bestimmt und nahm in der Sekundärinfektion ab. In TLR2^{-/-}-Mäusen wurde das Maximum an Foxp3⁺ T-Zellen bereits vier Tage nach CLP erreicht, sank sieben Tage danach wieder und stieg während der Sekundärinfektion nochmals

leicht an. Die transgenen Tiere besaßen zum Zeitpunkt der Sekundärinfektion in den mLN und im Blut einen signifikant geringeren Anteil an Foxp3⁺ T-Zellen (Abb. 3.29).

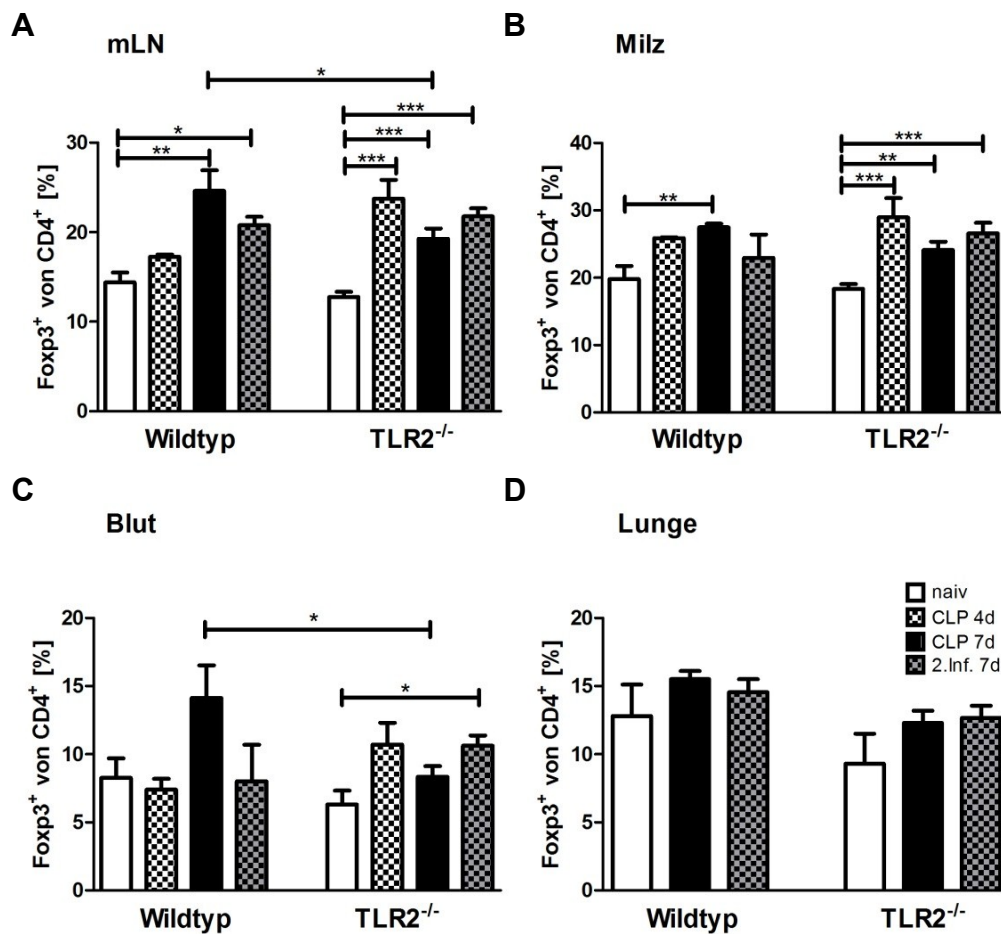


Abb. 3.29: Verlauf des Treg-Zellanteils in TLR2^{-/-} und WT-Mäusen nach CLP und Sekundärinfektion. Der Anteil an Foxp3⁺ T-Zellen wurde vier Tage nach CLP (weiß kariert), sieben Tage nach CLP (schwarz) und sieben Tage nach Sekundärinfektion (grau kariert) in (A) mLN, (B) Milz, (C) Blut und (D) Lunge untersucht (ausgenommen der Lunge, welche nicht vier Tage nach CLP untersucht wurde) und mit naiven Mäusen (weiß) verglichen. Die Daten wurden aus 4 - 8 Tieren je Gruppe generiert (einzige Ausnahme 4 Tage nach CLP n = 2) und sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. (Student's t-test ***p=0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; ns p > 0,05)

3.2.4.3 Weniger Nrp1⁺ Treg-Zellen in septischen TLR2^{-/-}-Mäusen

Um zu untersuchen, ob eine Induktion von Treg-Zellen für die Resistenz gegenüber einer Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa* von TLR2^{-/-}-Mäusen verantwortlich ist, wurde die Nrp1-Expression auf Treg-Zellen untersucht.

In den transgenen Mäusen fanden sich in den mLN vier Tage nach CLP (74 % Nrp1⁺ zu 80 % Nrp1⁺) und sieben Tage nach Sekundärinfektion (76 % Nrp1⁺ zu 82 % Nrp1⁺) weniger natürliche Treg-Zellen als in WT-Mäusen (Abb. 3.30 A).

In der Milz konnte ebenfalls ein signifikant reduzierter Anteil an nTreg-Zellen bestimmt werden. Vier und sieben Tage nach CLP besaßen WT-Mäuse 87 % und 86

% natürliche Treg-Zellen während TLR2^{-/-}-Mäusen nur 79 % und 82 % nTreg-Zellen besaßen (Abb. 3.30 B).

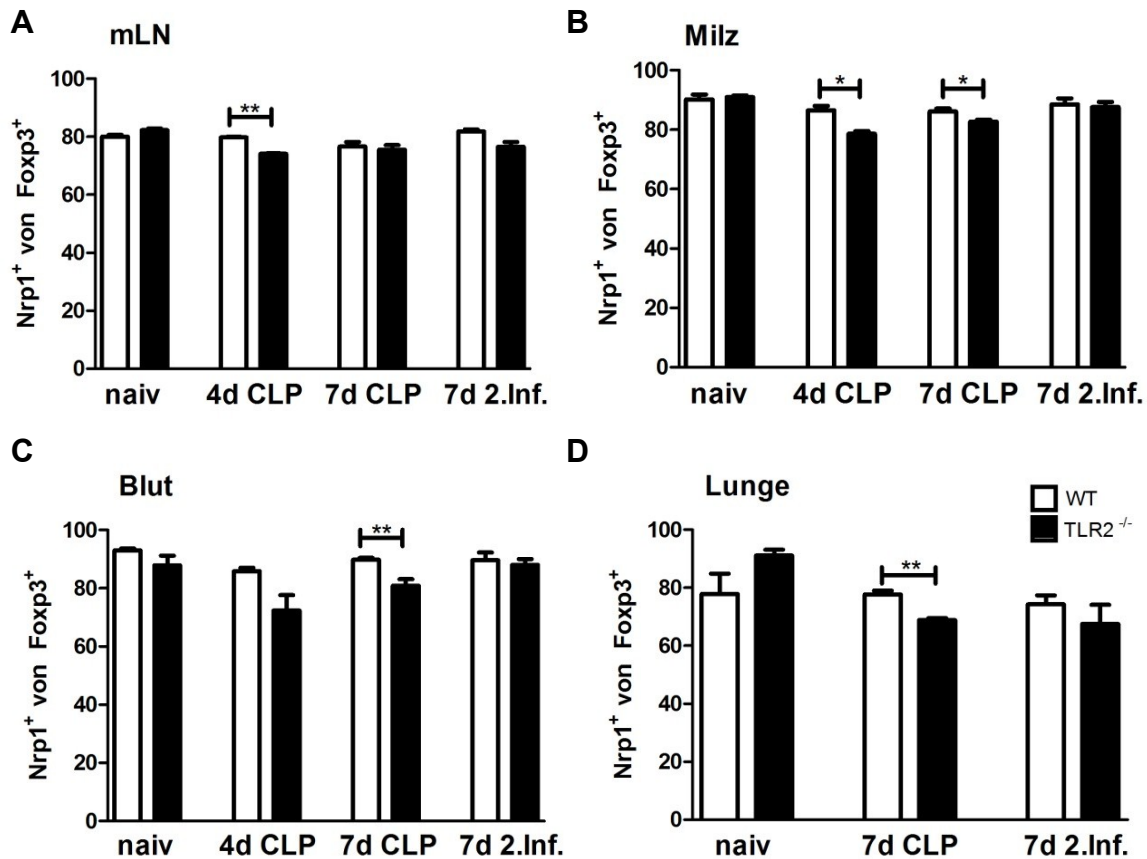


Abb. 3.30: TLR2^{-/-}-Mäuse besitzen während einer Sepsis mehr induzierte Treg-Zellen. In TLR2^{-/-}- (schwarz) und WT- (weiß) Mäusen wurde eine Sepsis induziert und sieben Tage später folgte eine Sekundärinfektion mit *P.aeruginosa*. Der Anteil an Nrp1⁺ Treg-Zellen wurde in (A) mLN, (B) Milz, (C) Blut und (D) Lunge bestimmt. Hierfür wurden die Organe aus naiven Mäusen, vier und sieben Tage nach CLP und sieben Tage nach Sekundärinfektion entnommen. Einzig die Lunge wurde nicht vier Tage nach CLP untersucht. Die Daten wurden aus 4 – 8 Tieren je Gruppe generiert (Ausnahme vier Tage nach CLP, n = 2) und sind als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. (Student's t-test **p < 0,01; *p < 0,05; ns p > 0,05)

Im Blut waren ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen TLR2^{-/-}- und WT-Mäusen hinsichtlich der Nrp1-Expression auf Treg-Zellen erkennbar. Transgene Mäuse besaßen vier (72 % zu 86 % nTreg-Zellen) und sieben (81 % zu 90 % nTreg-Zellen) Tage nach CLP einen geringeren Anteil an nTreg-Zellen als WT-Mäuse. Nach Sekundärinfektion zeigten beide Mausstämme einen ähnlichen Anteil an natürlichen Treg-Zellen im Blut (Abb. 3.30 C).

In Lungen aus TLR2^{-/-}-Mäusen fanden sich signifikant weniger nTreg-Zellen sieben Tage nach CLP (78 % zu 69 % nTreg-Zellen) und Sekundärinfektion (74 % zu 68 % nTreg-Zellen) verglichen mit Lungen aus WT-Mäusen, obwohl naive WT-Mäuse weniger nTreg-Zellen besaßen als naive TLR2^{-/-}-Mäuse (Abb. 3.30 D).

3.2.4.4 Reduzierter TNF α Serumspiegel während einer Sepsis in TLR2 $^{-/-}$ -Mäusen

Um einen Einfluss der TLR2-Defizienz auf die Zytokinsekretion während einer Sepsis zu untersuchen, wurde 24 Stunden nach CLP Blut entnommen, Serum gewonnen und der Zytokinspiegel von TNF α , IL-6, IL4 und IL-10 bestimmt.

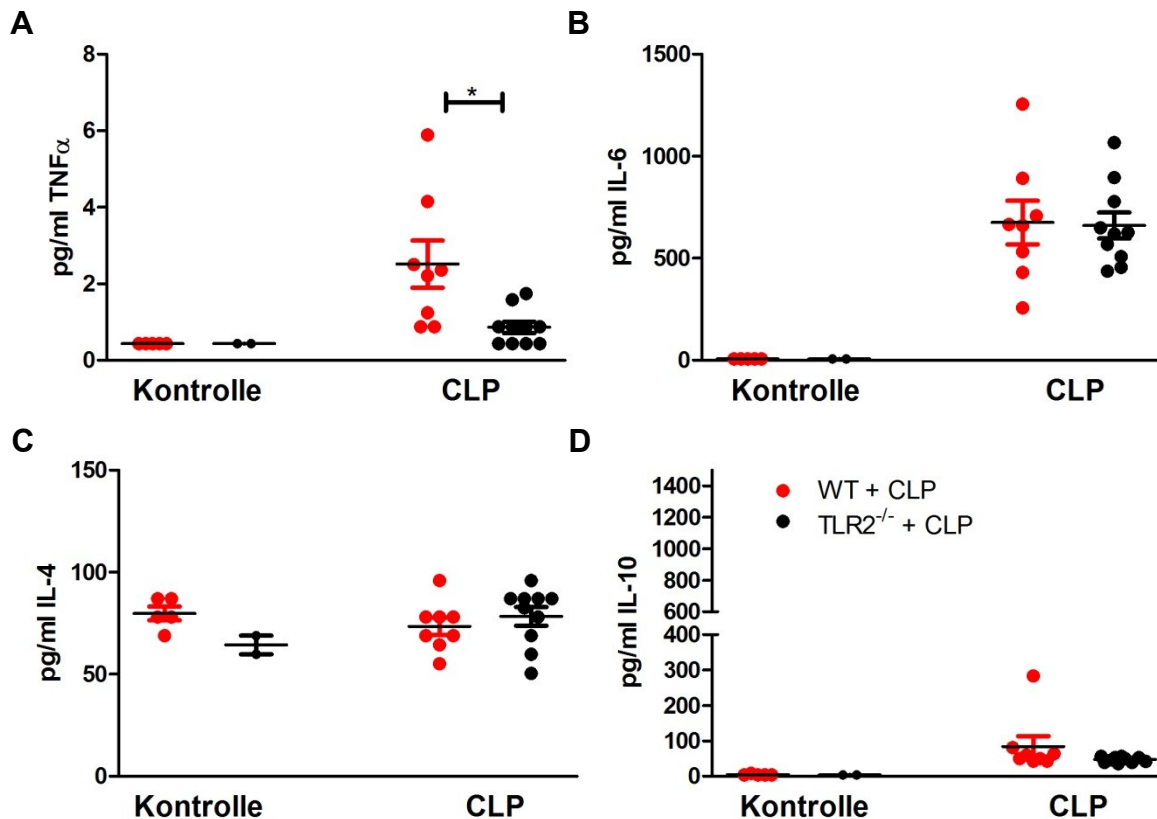


Abb. 3.31: Mengen an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen nach CLP im Blut von WT- und TLR2 $^{-/-}$ -Mäusen. 24 Stunden nach CLP wurde Blut aus WT- (schwarz) und TLR2 $^{-/-}$ - (rot) Mäusen entnommen und der Zytokinspiegel von (A) TNF α , (B) IL-6, (C) IL-4 und (D) IL-10 mittels Luminex bestimmt. Dargestellt sind die einzelnen Proben mit Mittelwerten und Standardfehlern (n = 5-10 je Gruppe; außer TLR2 $^{-/-}$ -Kontrolle n = 2).

Nach Induktion einer Sepsis war der TNF α Spiegel in beiden Versuchsgruppen im Blut erhöht, allerdings besaßen WT-Mäuse nach CLP einen 3-fach höheren TNF α -Spiegel (2,5 pg/ml zu 0,86 pg/ml) als TLR2-defiziente Mäuse (Abb. 3.31 A).

Der IL-6 Spiegel stieg ebenfalls sowohl in WT- als auch TLR2 $^{-/-}$ -Mäusen nach CLP gleichermaßen von etwa 6 pg/ml auf etwa 660 pg/ml an und unterschied sich kaum zwischen beiden Mausstämmen (Abb. 3.31 B).

Die Induktion einer Sepsis zeigte weder in WT- noch in TLR2 $^{-/-}$ -Mäusen einen Einfluss auf den IL-4 Spiegel (78 pg/ml zu 64 /pg/ml) (Abb. 3.31 C), hingegen führte eine CLP zu einer erhöhten Freisetzung von IL-10 im Blut beider Versuchsgruppen, jedoch in WT-Mäusen tendenziell stärker als in den transgenen Tieren (4 pg/ml zu 84 pg/ml in WT- und 47 pg/ml in TLR2 $^{-/-}$ -Mäusen) (Abb. 3.31 D).

3.2.5 Identifizierung von Bakterien im Blut septischer Mäuse

Bei einer Sepsis handelt es sich um eine systemische Hyperreaktion des Immunsystems, wobei jedoch nicht in allen Fällen auch Bakterien im Blut nachgewiesen werden können. Um bei CLP-behandelten Tieren das Blut auf Bakterien zu untersuchen, erfolgte 24 Stunden nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis ein Ausstrich der Blutproben auf Nährböden und falls diese bakterielles Wachstum aufwiesen wurden die Kolonien mittels MALDI-MS identifiziert. Insgesamt erfolgte bei 29 % (15 von 51) aller untersuchten septischen Tieren ein Nachweis von Bakterien im Blut. Eine Auflistung der nachgewiesenen Mikroorganismen ist in Tab. 3.6 zu sehen.

Tab. 3.6: Mittels MALDI-MS im Blut septischer Mäuse identifizierte Bakterien. Der Score-Wert entspricht der Wahrscheinlichkeit einer korrekten Identifizierung.

Bakterium	Anzahl	Score
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1	96,8
<i>Bacteroides caccae</i>	1	95,3
<i>Bacteroides uniformis</i>	1	50,0
<i>Corynebacterium mastitidis</i>	1	99,9
<i>Enterobacter asburiae</i>	1	50
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	50
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	99,9
<i>Escherichia coli</i>	2	99,9
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1	99,9
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	99,9
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	99,9

3.3 *In vitro*-Induktion von Treg-Zellen aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mittels DNMT-Inhibitoren 5-Aza-dC und EGCG

Ein Treg-Transfer könnte eine Therapiemöglichkeit für Krankheiten sein, bei denen Treg-Zellen eine wesentliche Rolle für die Entstehung und den Verlauf der Krankheit spielen. Wie zuvor gezeigt, besitzen Treg-Zellen während der pro-inflammatorischen Phase einer Sepsis eine protektive Funktion und die Vermehrung dieser Zellen könnte in Patienten mit geringem Treg-Anteil möglicherweise den Krankheitsverlauf verbessern.

Essentiell für einen stabilen Treg-Phänotyp mit suppressiven Eigenschaften ist eine unmethylierte *FOXP3*-TSDR. Eine Demethylierung dieser Region könnte eine *FOXP3*-Expression und einen suppressiven Phänotyp induzieren. Deshalb wurden $CD4^+CD25^-$ T-Zellen mit den beiden DNA-Methyltransferase (DNMT)-Inhibitoren 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC) und Epigallocatechingallat (EGCG) *in vitro* stimuliert und eine Differenzierung in Treg-Zellen mit einer demethylierten *FOXP3*-TSDR untersucht.

3.3.1 Induktion Treg-spezifischer Gene in Jurkat-Zellen durch DNMT-Inhibitoren

Wong *et al.* konnten zeigen, dass EGCG-stimulierte Jurkat-Zellen eine *FOXP3*-Expression aufweisen (Wong et al., 2011). In dieser Arbeit wurde die Wirkung von EGCG und dem bereits in Therapie verwendeten DNMT-Inhibitor, 5-Aza-dC hinsichtlich der *FOXP3*-TSDR Methylierung und der Induktion von Treg-typischen Genen zunächst auf Jurkat-Zellen untersucht.

3.3.1.1 5-Aza-dC und EGCG reduzieren die DNA-Methylierung in Jurkat-Zellen

Um den Effekt beider DNMT-Inhibitoren auf die globale DNA-Methylierung zu untersuchen, wurden Jurkat-Zellen für vier Tage mit verschiedenen Konzentrationen 5-Aza-dC oder EGCG kultiviert.

Nach diesem Zeitraum reduzierte 5-Aza-dC die globale DNA-Methylierung um ca. 35 bis 40 % im Vergleich zu unbehandelten Jurkat-Zellen (Abb. 3.32). Die Wirkung von EGCG auf die DNA-Methylierung war mit einer Reduktion von 50 % noch ausgeprägter.

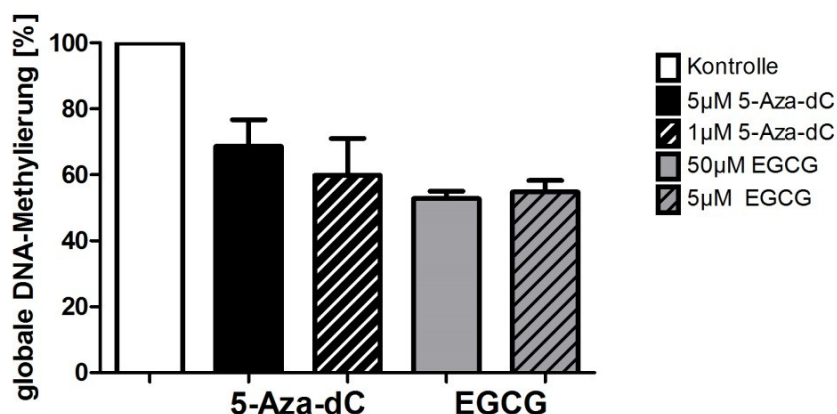


Abb. 3.32: 5-Aza-dC und EGCG reduzieren die globale DNA-Methylierung in Jurkat-Zellen. Jurkat-Zellen wurden vier Tage in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen 5-Aza-dC und EGCG kultiviert. Die Methylierung der unbehandelten Kontrolle wurde mit 100 % definiert und die anderen Proben in Relation dazu gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus $n = 2$ Ansätzen.

3.3.1.2 DNMT-Inhibitoren induzieren in Jurkat-Zellen Treg-spezifische Gene

Nachdem eine deutliche Reduktion der globalen DNA-Methylierung mittels DNMT-Inhibitoren nachgewiesen wurde, erfolgte eine Genexpressionsanalyse der beiden Treg-spezifischen Gene *FOXP3* und *LRRC32* (codiert GARP). Insbesondere die Expression von *FOXP3* wird über die DNA-Methylierung reguliert, weshalb nTreg-Zellen mit einer unmethylierten *FOXP3*-TSDR eine stabile *FOXP3*-Expression besitzen.

Die Kultivierung mit 5-Aza-dc induzierte nach vier Tagen eine signifikant 11-fach (5 μ M) bzw. 8-fach (1 μ M) und nach sieben Tagen eine 8-fach (5 μ M) bzw. 3-fach (1 μ M) erhöhte *FOXP3*-Expression. Die Kultivierung mit EGCG bewirkte nach vier Tagen eine doppelt so hohe *FOXP3*-Expression, die nach sieben Tagen wieder auf dem Niveau der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen war (Abb. 3.33).

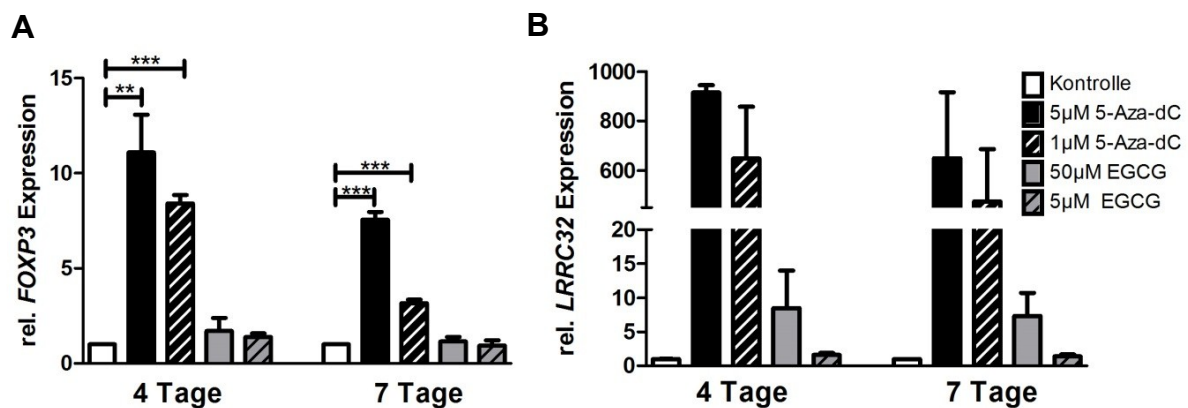


Abb. 3.33: 5-Aza-dC und EGCG induzieren eine erhöhte *FOXP3*- und *LRRC32*-Expression in Jurkat-Zellen. Mittels qRT-PCR bestimmte (A) *FOXP3*- und (B) *LRRC32*-Expression nach viertägiger und siebentägiger Kultivierung sind im Diagramm aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus $n = 3$. (Student's t-test *** $p=0,001$; ** $p < 0,01$; ns $p > 0,05$)

Die *LRRC32* (GARP)-Expression wurde durch die viertägige Kultivierung mit 5 μ M 5-Aza-dC signifikant um das 900-fache erhöht und blieb nach sieben Tage noch immer 650-fach erhöht im Vergleich zu naiven Zellen. Die Kultivierung mit 1 μ M 5-Aza-dC hatte dementsprechend einen geringeren Effekt, induzierte dennoch im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine 650 mal höhere Expression nach vier und eine 475 mal höhere Expression nach sieben Tagen. EGCG (50 μ M) induzierte nach vier Tagen eine 9-fach erhöhte Expression und nach sieben Tagen eine 7-fach erhöhte Expression von *LRRC32* verglichen mit naiven Jurkat-Zellen.

3.3.2 Einfluss von 5-Aza-dC und EGCG auf die Treg-Differenzierung aus $CD4^+CD25^-$ T-Zellen

Um zu überprüfen, ob sich die Induktion von Treg-spezifischen Genen durch die beiden DNMT-Inhibitoren von der Jurkat-Zelllinie auf primäre T-Lymphozyten über-

tragen lässt, wurden durchflusszytometrisch isolierte humane $CD4^+CD25^-$ T-Zellen analysiert.

3.3.2.1 DNMT-Inhibitoren reduzieren die DNA-Methylierung in T-Zellen

Nach Kultivierung mit 5 μ M und 1 μ M 5-Aza-dC war die globale DNA-Methylierung in T-Zellen signifikant um ca. 40 % reduziert. EGCG (50 μ M) reduzierte die globale DNA-Methylierung signifikant um 30 %, hingegen zeigte EGCG in einer geringeren Konzentration von 5 μ M keinen Einfluss auf die DNA-Methylierung (Abb. 3.34).

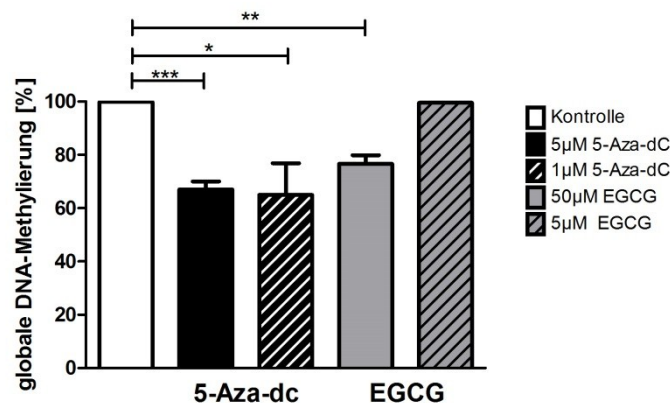


Abb. 3.34: Reduktion der globalen DNA-Methylierung durch 5-Aza-dC und EGCG in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen. Zellen wurden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern aktiviert und vier Tage in Anwesenheit von zwei unterschiedlichen Konzentrationen 5-Aza-dC (5 μ M und 1 μ M) und EGCG (50 μ M und 5 μ M) kultiviert. Die Methylierung von unbehandelten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (Kontrolle) wurde mit 100 % definiert und die anderen Proben darauf bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus $n = 3$. (Student's t-test *** $p = 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns $p > 0,05$) publiziert in: Kehrman *et al.* 2014

3.3.2.2 5-Aza-dC reduziert die FOXP3-TSDR Methylierung

Stabile Treg-Zellen zeichnen sich durch eine unmethylierte *FOXP3*-TSDR aus. Es wurde im Folgenden untersucht, in welchem Ausmaß die beiden verwendeten Substanzen eine *FOXP3*-TSDR Demethylierung hervorrufen. Nach Stimulation wurde die DNA-Methylierung in dieser Genregion mittels QAMA-Methode und *next generation sequencing* (NGS) untersucht. Unbehandelte $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wiesen eine vollständige Methylierung in der *FOXP3*-TSDR auf, natürliche Treg-Zellen zeigten hingegen eine annähernd vollständig unmethylierte *FOXP3*-TSDR. Die Kultivierung von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen mit 5-Aza-dC führte zu einer signifikanten Reduktion der Methylierung nach vier (5 μ M & 1 μ M – ca. 90 %) und sieben Tagen (5 μ M – ca. 85 %; 1 μ M – ca. 80 %). Hingegen reduzierten die beiden eingesetzten Konzentrationen von EGCG weder nach vier noch nach sieben Tagen die DNA-Methylierung in der *FOXP3*-TSDR von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (Abb. 3.35 A). Die

Überprüfung mittels NGS zeigte nach siebentägiger Stimulation mit 5 μM 5-Aza-dC eine Reduktion der DNA-Methylierung in der *FOXP3*-TSDR von ca. 50 % und 1 μM 5-Aza-dC von ca. 25 %. Zudem konnte bestätigt werden, dass die Kultivierung mit 5 μM EGCG keinen Einfluss auf die Methylierung der *FOXP3*-TSDR hat (Abb. 3.35 B).

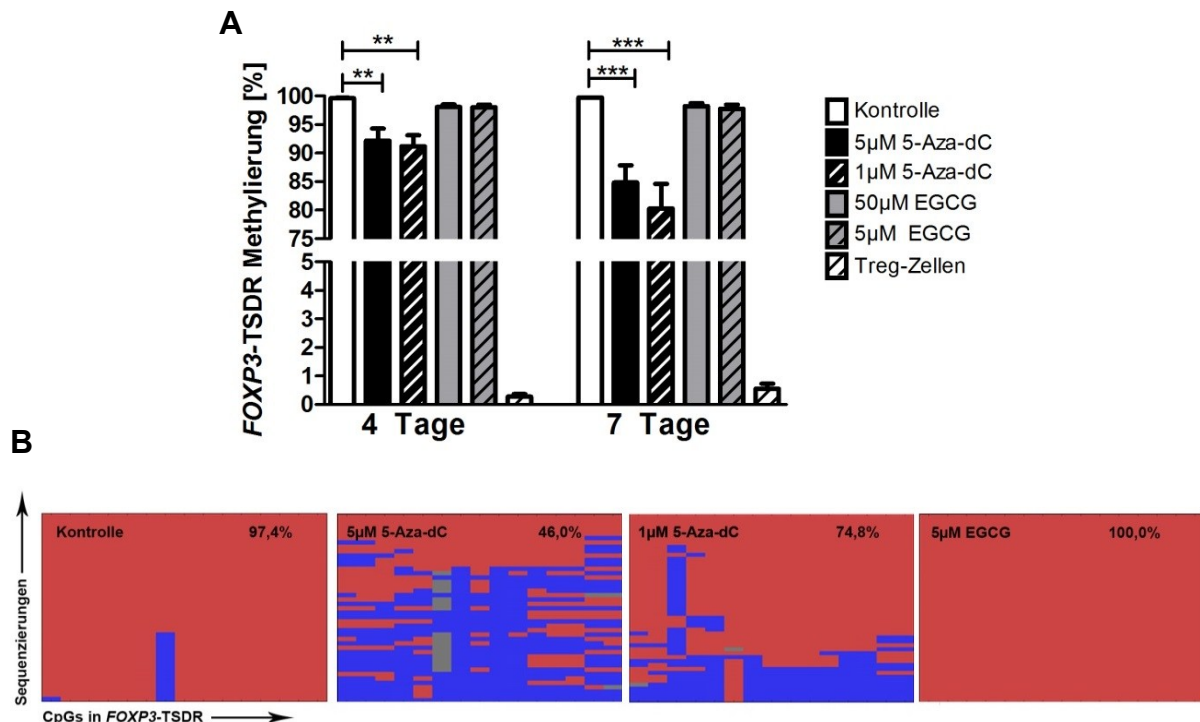


Abb. 3.35: Reduktion der *FOXP3*-TSDR Methylierung durch 5-Aza-dC in $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen. Zellen wurden mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper aktiviert und vier Tage mit zwei Konzentrationen 5-Aza-dC (5 μM und 1 μM) und EGCG (50 μM und 5 μM) kultiviert. Bestimmung der DNA-Methylierung erfolgte mittels (A) QAMA-assay und (B) NGS (nur nach sieben Tagen). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus $n = 3 - 7$. Student's t-test *** $p=0,001$; ** $p < 0,01$; ns $p > 0,05$) publiziert in: Kehrmann *et al.* 2014

3.3.2.4 5-Aza-dC und EGCG wirken in hohen Konzentrationen toxisch auf T-Zellen

Um zu untersuchen, inwiefern die verwendeten Konzentrationen der beiden DNMT-Inhibitoren toxisch auf humane T-Lymphozyten wirken, wurden die behandelten Zellen mit 7-AAD markiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.36 A). Beide Substanzen zeigten einen negativen Effekt auf die Vitalität der Zellen. Während durch die Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von 5-Aza-dC sowohl in einer Konzentration von 5 μM als auch von 1 μM schon nach vier Tagen nur noch 70 % der Zellen und nach sieben Tagen nur noch 50 % vital waren, zeigte EGCG sogar eine noch stärkere Toxizität. Hier bewirkte die Stimulation mit 50 μM EGCG ein Absterben von 80 % der Zellen in den ersten vier Tagen und weiterer 17 % im weiteren Versuchsverlauf, so dass nach sieben Tagen noch knapp 3 % vitale Zellen

in der Kultur verblieben. Eine 5 μM EGCG-Konzentration reduzierte die Zellvitalität nach vier Tagen auf 48 % und nach sieben Tagen auf 34 % (Abb. 3.36 B).

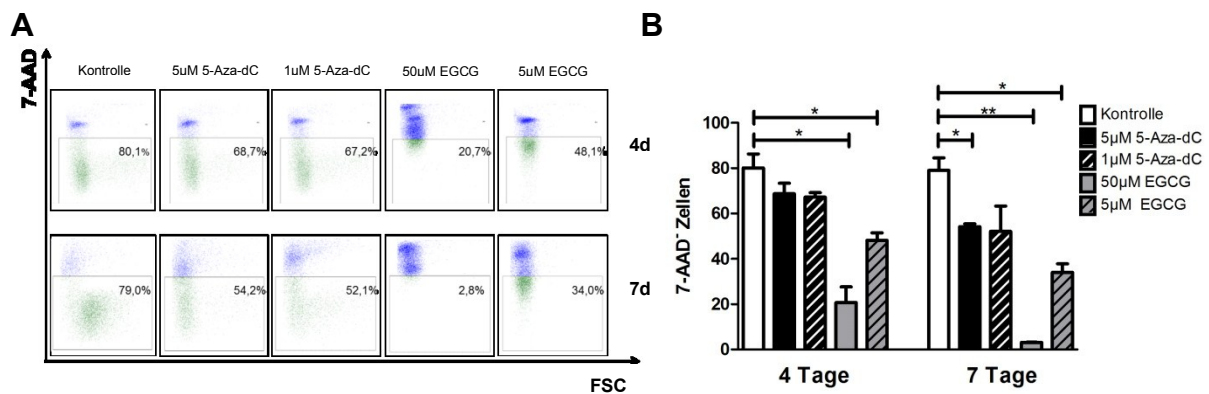


Abb. 3.36: 5-Aza-dC und EGCG wirken in hohen Konzentrationen toxisch auf $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen. Nach vier- und siebentägiger Kultivierung mit 5-Aza-dC und EGCG wurden die Zellen mit 7-AAD markiert und die Zellvitalität durchflusszytometrisch ermittelt. (A) Exemplarische FACS-Auswertung (B) Zellvitalität nach vier und sieben Tagen Kultivierung mit 5-Aza-dC und EGCG. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 3$). (Student's t-test ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns $p > 0,05$) publiziert in: Kehrmann *et al.* 2014

3.3.2.5 Expression von Treg spezifischen Genen in $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen nach Stimulation mit DNMT-Inhibitoren

Mittels qRT-PCR und *gene array* Analysen wurde überprüft, ob aus der Demethylierung der *FOXP3*-TSDR eine erhöhte Expression der Treg-spezifischen Gene *FOXP3*, *LRRC32*, *IL-10* und *TGF- β* resultiert (Abb. 3.37). Nach viertägiger Kultivierung mit 5 μM und 1 μM 5-Aza-dC wurde die *FOXP3*-Expression signifikant um das 3- bis 4-fache und nach sieben Tagen signifikant um das 7- bis 10-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht, jedoch lag das Genexpressionslevel immer noch deutlich unter der *FOXP3*-Expression naiver Treg-Zellen. Nachdem EGCG bereits keine Wirkung auf die Methylierung in der *FOXP3*-TSDR zeigte, wurde ebenfalls keine *FOXP3*-Expression in $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen induziert. Die erhobenen qRT-PCR Daten stimmten mit Untersuchungen durch die *gene array* Methode überein (Abb. 3.37 A). Aufgrund der hohen Toxizität von 50 μM EGCG wurden keine weiteren Untersuchungen mit dieser Konzentration durchgeführt.

Ebenfalls wurde die mRNA-Expression des Membranproteins GARP (*LRRC32*) untersucht, welches nach Aktivierung exklusiv auf Treg-Zellen exprimiert wird. Durch 1 μM und 5 μM 5-Aza-dC wurde das 7-fache an *LRRC32* exprimiert, allerdings erreichte diese signifikante Steigerung nicht das Expressionslevel von Treg-Zellen. Eine vier- und siebentägige Kultivierung mit EGCG zeigte keinen Einfluss auf die *LRRC32*-Expression. Die Untersuchung mittels *gene array* Methode erbrachte ähnliche Resultate (Abb. 3.37 B).

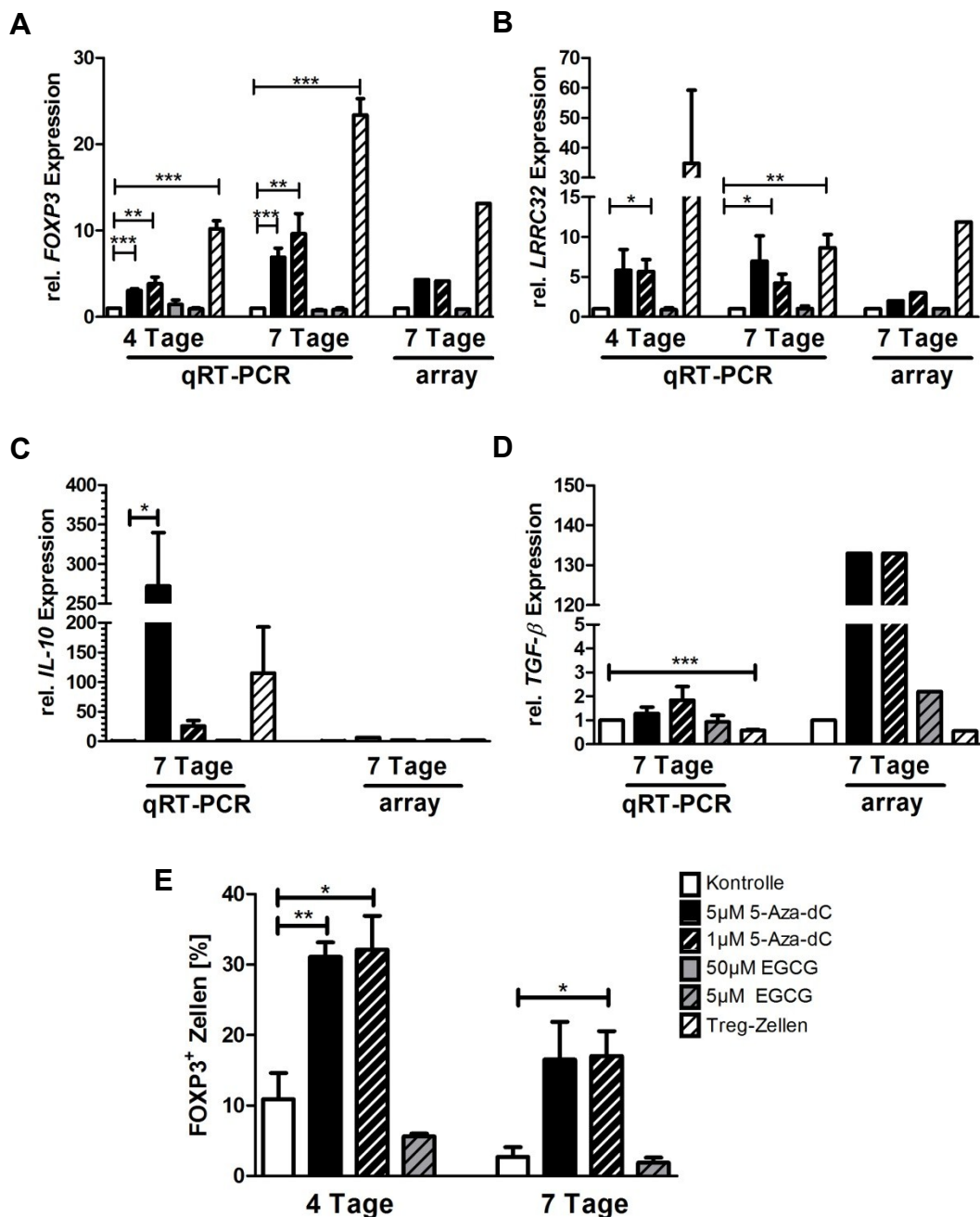


Abb. 3.37: Kultivierung von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen mit DNMT-Inhibitoren induziert die Expression Treg-spezifischer Moleküle. Abgebildet ist die mRNA-Expression von *FOXP3*, *LRRC32*, *IL-10*, *TGF-β* und die FOXP3-Bildung nach Stimulation mit DNMT-Inhibitoren. Nach Kultivierung der Zellen wurde RNA isoliert und die Expression mittels qRT-PCR (n = 3 - 6) und *gene array* Analysen (n = 2) bestimmt. (A & B) *FOXP3*- und *LRRC32*-Expression nach vier und sieben Tage Kultivierung. (C & D) Nach siebentägiger DNMT-Inhibitor Kultivierung bestimmte *IL-10*- und *TGF-β*-Expression (E) Nach vier- und siebentägiger Kultivierung wurde die Bildung von FOXP3 nach Antikörpermarkierung mittels Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler (Student's t-test ***p=0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; ns p > 0,05) publiziert in: Kehrmann *et al.* 2014

Darüber hinaus wurde die mRNA-Expression der Treg-spezifischen Zytokine IL-10 und TGF-β bestimmt (Abb. 3.37 C & D). Nach siebentägiger Kultivierung in Anwesenheit von 5 µM 5-Aza-dC zeigten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen eine signifikante 270-fache Steigerung der *IL-10* Expression und mit 1 µM 5-Aza-dC konnte die *IL-10*-

Expression um das 25-fache gesteigert werden. Die Inkubation mit EGCG hatte keine erhöhte *IL-10*-Expression zur Folge. Naive Treg-Zellen exprimierten weniger *IL-10* als 5 μM 5-Aza-dC behandelte $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Zellen, dennoch 115-mal so viel wie unbehandelte $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T Zellen. Mittels *gene array* Methode konnte nur eine 7-fach erhöhte *IL-10*-Expression in 5 μM 5-Aza-dC stimulierten Zellen nachgewiesen werden. In 1 μM 5-Aza-dC stimulierten Zellen und Treg-Zellen kam es zu einer doppelt so hohen *IL-10*-Expression verglichen mit unbehandelten T-Zellen.

Mittels *gene array* Methode war eine 130-fache Steigerung der *TGF- β* -Expression nach Stimulation mit 5-Aza-dC nachweisbar. Diese ließ sich mittels qRT-PCR ebenso wie eine Expression nach Inkubation mit EGCG nur tendenziell nachweisen. Zusätzlich konnte mittels Durchflusszytometrie auf Proteinebene gezeigt werden, dass nach Kultivierung mit 5-Aza-dC tatsächlich FOXP3 gebildet wird (Abb. 3.37 E).

3.3.2.6 Funktionelle Analysen von DNMT-Inhibitor-stimulierten Zellen

Nach viertägiger Kultivierung mit 5-Aza-dC proliferierten die Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen deutlich weniger. In diesem Zeitraum proliferierten un-behandelte $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Zellen zu 70 %, während 5 μM 5-Aza-dC behandelte Zellen nur zu 40 % und 1 μM 5-Aza-dC behandelte Zellen nur zu 47 % proliferierten. Hingegen proliferieren EGCG stimulierte Zellen zu 62 % (Abb. 3.38 A).

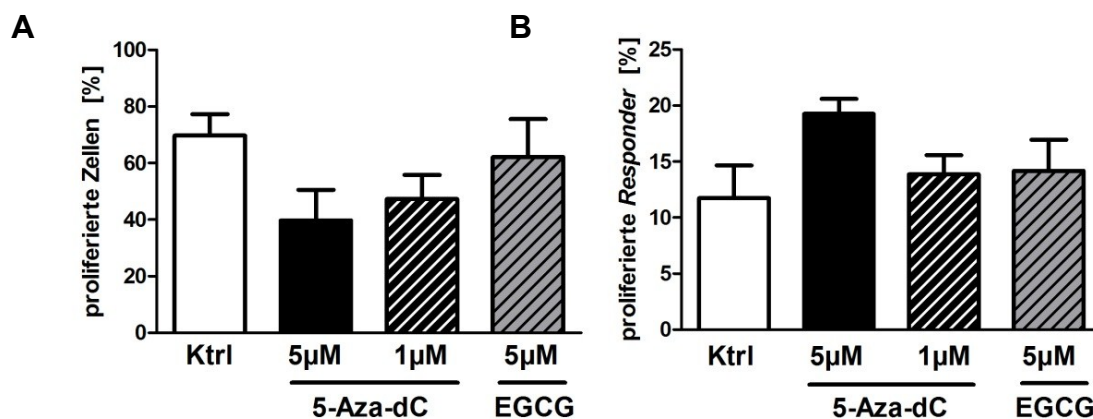


Abb. 3.38: DNMT-Inhibitoren senken die proliferative Aktivität, induzieren aber keinen suppressiven Phänotyp in $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen. Nach viertägiger Kultivierung mit beiden DNMT-Inhibitoren wurden mittels Durchflusszytometer funktionelle Analysen durchgeführt. (A) Messung der proliferativen Aktivität nach vier Tagen mittels eFluor670 Markierung. (B) Bestimmung der suppressiven Fähigkeiten gegenüber eFluor670 markierter $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Responder-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchen zusammengefasst. publiziert in: Kehrmann *et al.* 2014

Jedoch konnten keine der stimulierten Zellen die Proliferation von $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Responder-Zellen inhibieren. Nach vier Tagen proliferierten Responder-Zellen in Co-

Kultur mit DNMT-Inhibitor behandelten Zellen ebenso stark oder sogar stärker als in Co-Kultur mit unbehandelten $CD4^+CD25^-$ Kontrollzellen (Abb. 3.38 B).

3.3.2.7 Gene array Expressionanalyse von DNMT-Inhibitor stimulierten T-Zellen

Um zu überprüfen, welche Gene durch die Kultivierung mit DNMT-Inhibitoren in Ihrer Expression noch verändert werden, erfolgte eine *gene array* Analyse, in der die Genexpression mit der von Treg-Zellen und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen verglichen wurde.

Abb. 3.39 zeigt eine Induktion vieler Treg-spezifischer Gene nach Hemmung der DNA-Methyltransferase durch 5-Aza-dC, jedoch auch viele Treg-Gene, die ihr Expressionslevel nicht veränderten (Abb. 3.39 A & B). Anhand der *gene array* Analyse war außerdem deutlich erkennbar, dass EGCG kaum Einfluss auf die Induktion Treg-spezifischer Gene in $CD4^+CD25^-$ T-Zellen hat (Abb. 3.39 C).

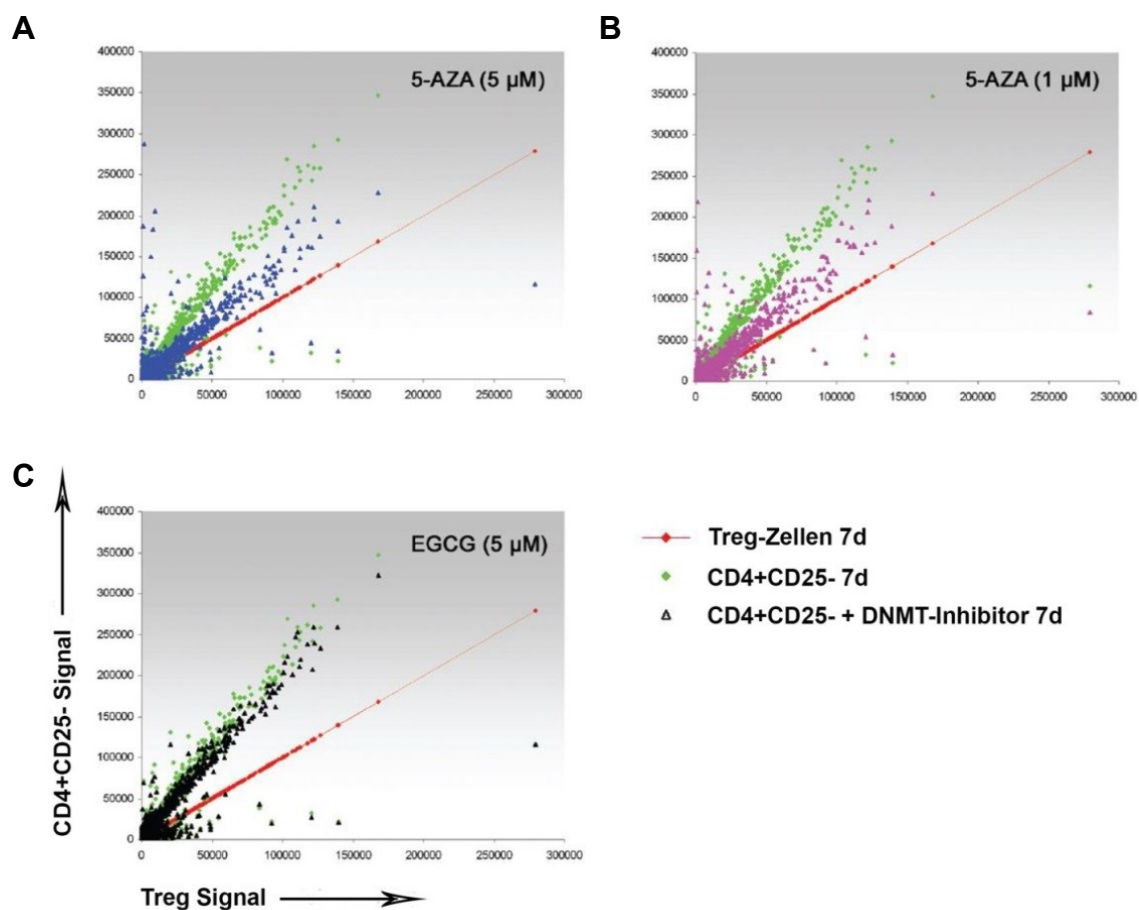


Abb. 3.39: Gene array Analyse Treg- und $CD4^+CD25^-$ T-Zell-typischer Gene. Treg-Zellen wurden sieben Tage *in vitro* aktiviert und die Genexpression gemessen (rote Vierecke). Als Kontrolle dienten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (grüne Kreise), die ebenfalls sieben Tage kultiviert wurden. Zusätzlich zu diesen beiden Genexpressionsprofilen sind die Expressionsprofile von sieben Tage DNMT-Inhibitoren stimulierten T-Zellen aufgetragen ((A) blaue Dreiecke - 5 μ M 5-Aza-dC; (B) lila Dreiecke - 1 μ M 5-Aza-dC; (C) schwarze Dreiecke - 5 μ M EGCG). Dargestellt sind Gene mit mindestens 2-facher differentieller Expression zwischen Treg (y-Achse) und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (x-Achse). publiziert in: Kehrmann *et al.* 2014

3.3.2.8 Untersuchung der Expression Th1-, Th2- und Th17-spezifischer Gene

Nachdem die vorherigen Ergebnisse offenbarten, dass auch 5-Aza-dC keinen vollständigen Treg-Phänotyp induziert, wurde untersucht, ob spezifische Gene der Th1-, Th2- und Th17- T-Zellpopulationen exprimiert werden.

Nach siebentägiger Kultivierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit 5 µM 5-Aza-dC wurde die Expression des Th1-spezifischen Transkriptionsfaktors *TBX21* um das 6-fache und die *INF-γ*-Expression um das 10-fache gesteigert (Abb. 3.40). Die niedrigere 5-Aza-dC Konzentration zeigte einen abgeschwächten, jedoch tendenziell ähnlichen Effekt, während die Stimulation mit EGCG nicht zur Induktion von Th1-typischen Genen führte. Die mittels qRT-PCR erhobenen Daten fanden sich tendenziell so auch im *gene array*.

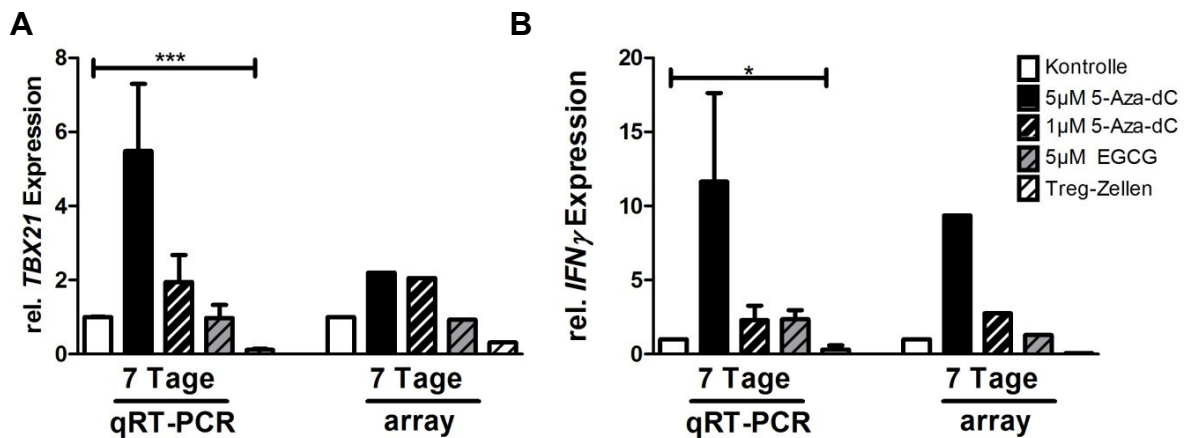


Abb. 3.40: CD4⁺CD25⁻ T-Zellen exprimieren nach Stimulation mit 5-Aza-dC Th1-Zell-spezifische Gene. Nach siebentägiger Kultivierung wurde die mittels qRT-PCR (n = 3 - 5) und *gene array* Methode (n = 2) bestimmte (A) *TBX21*- und (B) *IFN γ* -Expression aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. (Student's t-test ***p=0,001; *p < 0,05; ns p > 0,05) publiziert in: Kehrmann *et al.* 2014

Außerdem wurden die *GATA3*- und *IL-4*-Expression untersucht, welche typisch für Th2-Zellen ist. Die beiden DNMT-Inhibitoren 5-Aza-dC und EGCG beeinflussten die *GATA3*-Expression nach siebentägiger Kultivierung nicht wesentlich. Jedoch wurde nach Stimulation mit 5 µM 5-Aza-dC signifikant 4 Mal mehr *IL-4* exprimiert. Mittels *gene array* Technologie war kein Anstieg der *IL-4*-Expression in behandelten Zellen erkennbar (Abb. 3.41).

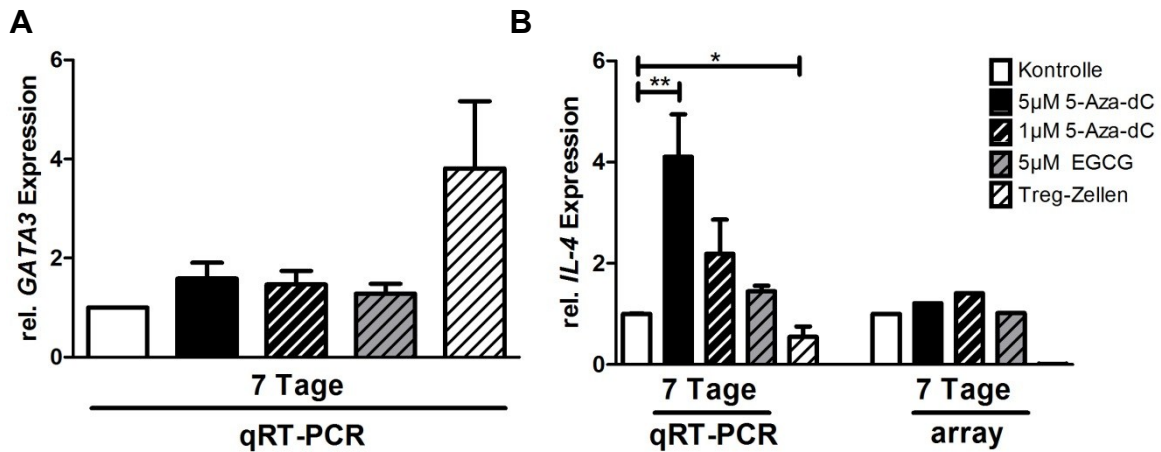


Abb. 3.41: Einfluss von 5-Aza-dC und EGCG auf die Expression Th2-spezifischer Gene in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen. Nach siebentägiger Kultivierung wurde die mittels qRT-PCR (n = 3 - 5) und *gene array* Methode (grau, n = 2) bestimmte (A) *GATA3*- und (B) *IL-4*-Expression aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. (Student's t-test **p < 0,01; *p < 0,05; ns p > 0,05) publiziert in: Kehrmann *et al.* 2014

Zuletzt wurde die Expression der für Th17-Zellen typischen Gene *ROR γ T* und *IL-17* bestimmt (Abb. 3.42). Die Kultivierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit 5 µM 5-Aza-dC steigerte die *ROR γ T*-Expression um ein 5-faches und 1 µM 5-Aza-dC sogar um ein 10-faches. EGCG hingegen induzierte keine *ROR γ T*-Expression. Diese mittels qRT-PCR generierten Daten deckten sich mit den Daten der *gene array* Methode.

Die Stimulation mit 5-Aza-dC (5 µM) führte zu einem 7-fachen und 5-Aza-dC (1 µM) zu einem 3-fachen Anstieg der *IL-17* Expression während EGCG die *IL-17* Expression verdoppelte. Die Untersuchung dieser Zellen mittels *gene array* Methode führte zu ähnlichen Resultaten.

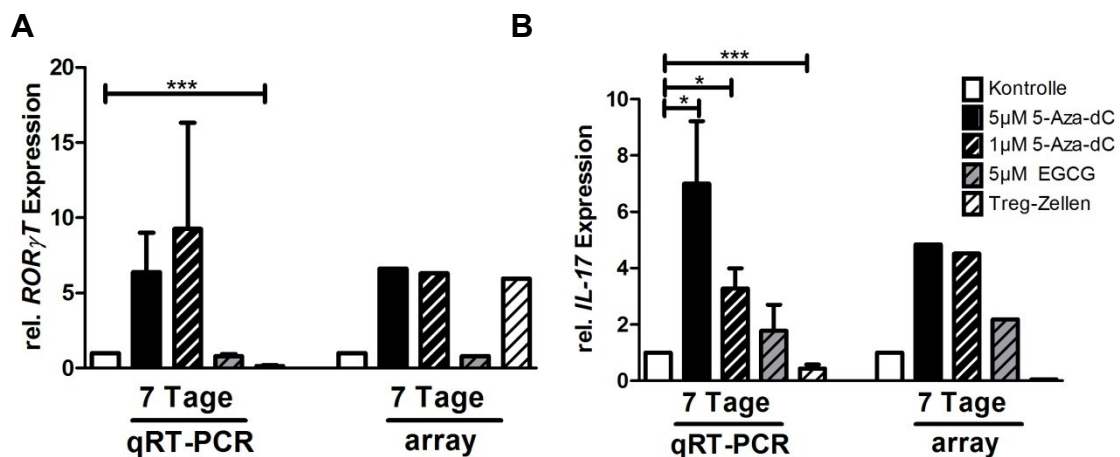


Abb. 3.42: CD4⁺CD25⁻ T-Zellen exprimieren nach Stimulation mit DNMT-Inhibitoren Th17-Zell-spezifische Gene. Nach siebentägiger Kultivierung wurde die mittels qRT-PCR (n = 3 - 5) und *gene array* Methode (n = 2) bestimmte (A) *ROR γ T*- und (B) *IL-17*-Expression aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. (Student's t-test ***p=0,001; *p < 0,05; ns p > 0,05) publiziert in: Kehrmann *et al.* 2014

4 Diskussion

Die Fehlfunktion oder aber auch ein gestörtes Verhältnis zwischen Treg-Zellen und Effektor-T-Zellen wird mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematodes oder multipler Sklerose in Verbindung gebracht (Buckner, 2010; Cao et al., 2004; Lyssuk et al., 2007; Nadkarni et al., 2007). Es besteht die Hoffnung, dass künftige Treg-Zelltherapien die Krankheitsverläufe verbessern können. In dieser Arbeit wurde insbesondere die Bedeutung regulatorischer T-Zellen für den Verlauf einer Sepsis untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Anteil regulatorischer T-Zellen an allen CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht ist. Dies gilt sowohl für die bislang meist angewendete durchflusszytometrische Quantifizierung mittels Proteinexpression, als auch mit Hilfe einer im Rahmen dieser Arbeit etablierten methylierungssensitiven *real-time* PCR, die epigenetische Unterschiede innerhalb der *FOXP3*-TSDR zur Quantifizierung nutzt (Abb. 3.6 A & B)

In früheren Studien wurde bereits eine relative Zunahme des Anteils an regulatorischen T-Zellen beschrieben (Monneret et al., 2003; Venet et al., 2009). Es wurde postuliert, dass dieser erhöhte Anteil an Treg-Zellen während einer Sepsis mit einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert ist. Dies wurde mit einer entstehenden Immunparalyse und einer damit verbundenen Anfälligkeit für eine nosokomiale Sekundärinfektionen begründet (Monneret et al., 2003; Nascimento et al., 2010; Venet et al., 2008). Die Studien identifizierten Treg-Zellen anhand ihrer typischen Proteinexpression (Scumpia et al., 2006; Venet et al., 2004). Oftmals wurden hierfür die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) und die α -Kette des IL-7 Rezeptors (CD127) verwendet, jedoch stellen nicht alle dieser Zellen Treg-Zellen dar (Sakaguchi et al., 2010). Humane konventionelle T-Zellen exprimieren transient nach Aktivierung ebenfalls Treg-typische Moleküle, insbesondere den Transkriptionsfaktor FOXP3, obwohl sie keinen suppressiven Phänotyp aufweisen (Allan et al., 2007; Ziegler, 2007). Insbesondere bei Krankheiten wie der Sepsis, bei denen eine starke Aktivierung von Immunzellen auftritt, ist die Charakterisierung von Treg-Zellen mittels Proteinexpression ungenau. Zudem wurde kürzlich eine latente Treg-Zellpopulation identifiziert, in der die *foxp3*-TSDR unmethyliert ist, allerdings kein *foxp3* exprimiert wird, die jedoch starke suppressive Eigenschaften besitzt und nach TCR-Stimulation erneut *foxp3* exprimieren kann (Miyao et al., 2012).

Bei der Quantifizierung anhand der CD25-Expression mittels FACS gibt es keine klar trennbaren CD25-exprimierenden Zellpopulationen, sondern einen fließenden Übergang zwischen Treg-Zellen und aktivierten konventionellen T-Zellen. Mangels Standardisierung im Definieren der „Gates“ während der Auswertung ist es besonders schwierig in aktiviertem Milieu, wie es während einer Sepsis vorzufinden ist, reproduzierbare Daten zu generieren (Sakaguchi et al., 2010).

Die Methode zur Quantifizierung von Treg-Zellen auf Basis Treg-spezifischer DNA-Methylierung liefert exakte und reproduzierbare Ergebnisse. Besonders für die Analyse von Blutproben septischer Patienten ist eine solche Methode deutlich präziser, da davon ausgegangen wird, dass die DNA-Methylierung unabhängig vom Aktivierungsstatus der Zellen stabil ist (Reik et al., 2001). Die Tatsache, dass diese Region ausschließlich in nTreg-Zellen und nicht in aktivierten T-Zellen oder anderen Leukozyten zu finden ist, macht die unmethylierte *FOXP3*-TSDR aktuell zum spezifischsten Merkmal von Treg-Zellen (Baron et al., 2007). Im Jahr 2009 konnten Wieczorek *et al.* erstmals eine qRT-PCR Methode entwickeln, welche auf dieser differenziellen Methylierung basiert. Sie quantifizierten damit Treg-Zellen in Melanoma- und Transplantationspatienten (Wieczorek et al., 2009). Eine weitere Quantifizierung mittels *FOXP3*-TSDR erfolgte in Nabelschnurblut (Liu et al., 2010). Die Vorteile der hier etablierten QAMA-Methode gegenüber zuvor verwendeten Methoden sind zum einen eine Quantifizierung unabhängig von der Menge des eingesetzten DNA-*template* und zum anderen die Möglichkeit die Reaktion in einem einzelnen Reaktionsansatz durchzuführen. Dadurch ist diese Methode sehr robust und standardisiert.

Die Untersuchung von septischen Patienten und gesunden Probanden mit dem QAMA-assay bestätigte ebenfalls einen signifikant erhöhten Anteil an Treg-Zellen bezogen auf die CD4-Gesamtzellpopulation in den untersuchten Patientenproben. Übereinstimmende Resultate konnten mittels Durchflusszytometrie generiert werden (Abb. 3.5 A & B).

Wie in Tab. 3.4 dargestellt, unterscheiden sich die beiden untersuchten Gruppen deutlich in der Altersverteilung, da septische Patienten im Durchschnitt älter waren als gesunde Kontrollen. Ob das Alter einen Einfluss auf den Anteil an Treg-Zellen hat wird kontrovers betrachtet, da einige Studien einen steigenden Anteil an Treg-Zellen mit zunehmenden Alter zeigten, während in anderen Arbeiten kein Alterseinfluss

beobachtet werden konnte (Hwang et al., 2009; Lages et al., 2008; Rosenkranz et al., 2007; Santner-Nanan et al., 2008). Angemerkt sei, dass alle diese Studien mittels Durchflusszytometrie durchgeführt wurden. Daten der hier mittels QAMA-Methode durchgeführten Studie deuteten nicht auf einen Einfluss des Alters auf den Anteil an Treg-Zellen hin. Sowohl mittels FACS als auch mittels QAMA-Methode quantifizierte Proben von gesunden über 60 Jährigen und unter 60 Jährigen zeigten ähnliche Anteile an Treg-Zellen.

Die meisten untersuchten Blutproben (93 %) zeigten in der methylierungssensitiven qRT-PCR einen höheren Anteil an Treg-Zellen verglichen mit der durchflusszytometrischen Bestimmung. Dies kann sowohl durch den Mangel an spezifischen Treg-Proteinen und nicht standardisierten FACS-Auswertungen, als auch durch die Erfassung der zuvor beschriebenen latenten Treg-Zellen begründet sein (Miyao et al., 2012). Die Untersuchung der intermediären CD25-Zellpopulation mittels qRT-PCR in gesunden Probanden unterstützt das Vorhandensein von stabilen Treg-Zellen in dieser Zellpopulation, da 4,4 % unmethylierte Zellen in der CD25-intermediären T-Zellpopulation detektiert wurden.

Die Untersuchung einer Korrelation zwischen der QAMA-Methode und der Durchflusszytometrie zeigte bei der Quantifizierung von Treg-Zellen in gesunden Probanden eine klare positive Korrelation ($r = 0,61$) (Abb. 3.7 A). Ähnliche Korrelationen ($r = 0,49$; $r = 0,74$) konnten auch andere Forscher zwischen methylierungssensitiven qRT-PCR und FACS-Untersuchungen zeigen (Liu et al., 2010; Sehouli et al., 2011). Hingegen zeigten beide verwendeten Methoden bei der Quantifizierung von Treg-Zellen in septischen Patienten nur eine schwache Korrelation ($r = 0,39$) (Abb. 3.7 B). Dies kann mit dem stark aktivierten Milieu während einer Sepsis und der damit verbundenen Erfassung von nicht-regulatorischen, aktivierten CD25-exprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie erklärt werden. Im Gegensatz zu regulatorischen T-Zellen besitzen diese Effektorzellen eine methylierte *FOXP3*-TSDR und können somit in der QAMA-Methode von Treg-Zellen unterschieden werden (Baron et al., 2007). Zusätzlich könnte der unterschiedliche Zeitpunkt der Blutentnahme nach Beginn einer Sepsis ebenfalls zur schlechteren Korrelation beitragen.

Für die Untersuchung einer Sepsis existieren verschiedene Mausmodelle, die in drei Kategorien eingeteilt werden können. Dabei wird zwischen der Injektion von LPS, der Infusion von Bakterien und der CLP bzw. CASP (engl. *Colon Ascendens Stent*

Peritonitis) unterschieden. In dieser Arbeit wurde die CLP-Methode verwendet, welche momentan die meist verwendete Methode zur Erforschung einer Sepsis darstellt (Rittirsch et al., 2007), da der Krankheitsverlauf dem einer humanen Sepsis sehr ähnlich ist (Dejager et al., 2011; Hubbard et al., 2005) und beispielsweise die Sepsis-typische Zytokinsezernierung und Lymphozytenapoptose in Mäusen induziert (Ayala and Chaudry, 1996; Remick et al., 2000). Durch den Bauchschnitt kommt es zu einem Gewebeschaden, das abgebundene *Caecum* führt zu einer Nekrose und die Punktion des *Caecums* verursacht eine Freisetzung von Bakterien in einen sterilen Raum und letztlich eine Peritonitis (Dejager et al., 2011; Wichterman et al., 1980).

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien (Hein et al., 2010; Scumpia et al., 2006) konnte im Rahmen dieser Arbeit ein früher Anstieg des Anteils an Treg-Zellen nach CLP-induzierter polymikrobieller Sepsis ermittelt werden (Abb. 3.10). Dieser erhöhte Anteil an Treg-Zellen während einer Sepsis kann auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein:

Zum einen wurde in einigen Publikationen eine ausgeprägte Apoptose von Lymphozyten mit Ausnahme von Treg-Zellen beschrieben. (Boomer et al., 2011; Brahmamdam et al., 2010; Hiraki et al., 2012). Diese Apoptoseresistenz in Treg-Zellen könnte durch die Expression des anti-apoptotischen Proteins BCL2 aber auch durch die Aktivierung von Treg-Zellen durch PAMPs oder DAMPs vermittelt werden (Iwata et al., 2011; Venet et al., 2004; Zanin-Zhorov et al., 2006). Möglicherweise könnte auch eine geringere PD1-Expression auf Treg-Zellen im Vergleich zu anderen T-Zellen die Apoptoserate reduzieren. Eine Blockade dieser Signalkaskade mittels PD1-Antikörpern kann eine Lymphozyten-Apoptose während einer Sepsis minimieren und die Überlebensrate septischer Mäuse steigern (Boomer et al., 2011; Guignant et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte CLP-induzierte Sepsis verursachte ebenfalls in allen untersuchten Organen eine Reduktion des Anteils an CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.16) mit gleichzeitigem Anstieg des Anteils an Treg-Zellen (Abb. 3.10). Unterstützt wird diese Erklärung zur Verschiebung des Treg-Verhältnisses durch die Beobachtung einer nicht veränderten absoluten Foxp3⁺ T-Zellzahl 24 Stunden nach Induktion einer Sepsis (Scumpia et al., 2006).

Andererseits könnte der erhöhte Anteil an Treg-Zellen auf eine Induktion von Treg-Zellen mittels TCR-Stimulation in Anwesenheit von IL-2 und TGF- β zurückzuführen

sein (Horwitz et al., 2008; Josefowicz and Rudensky, 2009). Andere Studien zeigten bereits eine Treg-Induktion nach oraler Applikation von Antigenen, durch Antigenkontakt in der *Lamina propria* im Darm, in chronisch entzündetem Gewebe oder durch Tumorerkrankungen (Curotto de Lafaille et al., 2004; Liu et al., 2007; Mucida et al., 2005; Sun et al., 2007), weshalb eine Induktion von Treg-Zellen nach Antigenkontakt im Blut septischer Mäuse möglich erscheint. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die PD1-Expression auf konventionellen T-Zellen benötigt wird um in iTreg-Zellen zu differenzieren und die Induktion von Treg-Zellen dadurch reguliert werden kann (Chen et al., 2014). Da sich während einer Sepsis eine T-Zell-Erschöpfung entwickeln kann, wodurch vermehrt PD-1 auf T-Zellen exprimiert wird (Chang et al., 2013), könnten dadurch vermehrt Treg-Zellen induziert werden. Um den Ursprung dieser Treg-Zellen zu identifizieren, wurde die Nrp1-Expression von Treg-Zellen aus septischen und gesunden Foxp3-GFP-Mäusen untersucht (Abb. 3.14). Im Blut, dem Organ, in dem Pathogene während einer Sepsis primär vorliegen und in der Lunge, wurde ein Anstieg an induzierten Treg-Zellen gefunden, im Gegensatz zu den mesenterischen Lymphknoten und der Milz, in denen keine Veränderungen beobachtet wurden. Diese Beobachtung stimmte mit einer durchgeführten Methylierungsuntersuchung überein, in der Foxp3⁺ T-Zellen aus Milzen naiver und septischer Mäuse keine signifikanten Differenzen in der Methylierung der *foxp3*-TSDR aufwiesen (Abb. 3.14).

Denkbar wäre aber auch eine aktive Proliferation der sonst anergen Treg-Zellen. In zuvor durchgeführten Studien wurde gezeigt, dass eine TLR2-vermittelte *in vitro* Aktivierung von Treg-Zellen zu einer verstärkten Proliferation mit gleichzeitigem Verlust ihrer suppressiven Eigenschaften führen kann (Nyirenda et al., 2011; Oberg et al., 2010). Während einer CLP wird das *Caecum* punktiert, wodurch eine Vielzahl an Bakterien freigesetzt wird, wovon speziell grampositive Bakterien eine TLR2-vermittelte Proliferation von Treg-Zellen induzieren und somit das Treg-Verhältnis zu anderen T-Zellen verschieben könnten. Gegen eine solche Proliferation sprechen allerdings Beobachtungen von nicht erhöhten absoluten Treg-Zellzahlen nach Induktion einer Sepsis mittels CLP (Scumpia et al., 2006). Zudem konnte in der hier durchgeführten Arbeit in TLR2-defizienten Mäusen ebenfalls ein Anstieg an regulatorischen T-Zellen nach CLP beobachtet werden (Abb. 3.29).

Unabhängig von ihrem Ursprung fand sich nach Induktion einer Sepsis nur eine tendenziell leicht erhöhte *in vitro* Proliferation und suppressive Aktivität regulatorischer T-Zellen gegenüber CD4⁺CD25⁻ *Responder*-Zellen verglichen mit gesunden Mäusen (Abb. 3.15 B & C) insbesondere von nTreg-Zellen verglichen mit iTreg-Zellen. Eine verstärkte suppressive Aktivität von Treg-Zellen konnten Scumpia *et al.* in CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und Kühlhorn *et al.* in CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen ebenfalls während einer Sepsis demonstrieren (Kühlhorn *et al.*, 2013; Scumpia *et al.*, 2006), diese könnte auf eine TLR2-abhängige Aktivierung von Treg-Zellen zurückzuführen sein (Zanin-Zhorov *et al.*, 2006).

In der hier durchgeführten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Treg-Zellen notwendig sind, um den Schaden während der hyperinflammatorischen Phase der Sepsis zu begrenzen. Eine Depletion von regulatorischen T-Zellen erhöht die Schwere des Krankheitsverlaufs und die Sterblichkeit septischer Mäuse.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der Anteil an Treg-Zellen in der CD4 T-Zellpopulation in septischen Mäusen ansteigt und dieser Anstieg mit einer Zunahme von IL-10 und TGFβ im Serum korreliert. Durch die Applikation von anti-IL-10 Antikörpern oder anti-TGFβ Antikörper konnte der Anteil an CD4⁺CD25⁺ T-Zellen gesenkt, der Anteil an CD4⁺ Zellen wieder gesteigert und auch die Überlebensrate septischer Mäuse verbessert werden (Hiraki *et al.*, 2012). In einer anderen Veröffentlichung wurde nach Depletion von CD25⁺ T-Zellen mittels anti-CD25 Antikörpern ebenfalls eine erhöhte Überlebensrate von septischen Mäusen postuliert (Chen *et al.*, 2007). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass nicht ausschließlich Treg-Zellen CD25 exprimieren, sondern ebenfalls aktivierte T-Effektorzellen eine transiente Expression zeigen. Zudem gibt es Foxp3⁺ T-Zellen, die nicht CD25-exprimieren und somit von diesem Antikörper unbeeinflusst bleiben (Lehmann *et al.*, 2002; Miyao *et al.*, 2012). Einen weiteren Nachteil dieser Methode konnten Kohm *et al.* aufzeigen, indem sie postulierten, dass anti-CD25 Antikörper nicht zur Depletion von Treg-Zellen, sondern zur Veränderung ihrer Funktion führen (Kohm *et al.*, 2006). Kontrovers dazu wurden unveränderte Überlebensraten nach Depletion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mittels Antikörpern oder Induktion einer Sepsis in CD25-defizienten Mäusen beobachtet (Scumpia *et al.*, 2006). Andere postulierten sogar eine gesteigerte Überlebensrate nach Transfer von Treg-Zellen während einer Sepsis (Heuer *et al.*, 2005). Gründe für diese kontroversen Ergebnisse können die

mangelnde Spezifität der durchgeführten Treg-Depletionen sein, aber auch Abweichungen in den Versuchsdurchführungen. Insbesondere die verschiedenen Zeitpunkte der Depletionen könnten unterschiedliche Ergebnisse liefern. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit eine spezifische Depletion durch Verwendung von DEREK-Mäusen durchgeführt. In diesen Mäusen exprimieren Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen einen Rezeptor für Diphtherietoxin und können somit durch die Applikation des Toxins spezifisch depletiert werden (Lahl and Sparwasser, 2011).

Die spezifische Depletion von Treg-Zellen vor CLP hatte einen deutlichen, negativen Einfluss auf den Verlauf und die Überlebensrate einer Sepsis (Abb. 3.18 & 3.19). Ähnliche Daten konnten kürzlich in ersten Versuchen mit einer Treg-spezifischen Depletion in septischen DEREK-Mäusen von Kühnhorn *et al.* demonstriert werden, in denen eine DT-Applikation vor CLP die Sterblichkeitsrate um 20 % erhöhte (Kühnhorn *et al.*, 2013). Auch hier zeigte sich ein vermehrtes Versterben in den ersten 48 Stunden nach CLP, allerdings kam es im Verlauf der Versuche zu einer deutlich erhöhten Gesamtsterblichkeit verglichen mit den hier durchgeführten Versuchen. Ein Grund dafür kann die Verwendung einer größeren Kanüle (18 G anstatt 27 G) bei der Punktion des *Caecums* sein (Ebong *et al.*, 1999). Ein anderer Grund können die verschiedenen genetischen Hintergründe der Versuchstiere sein, da in anderen Arbeiten bereits Unterschiede in Infektionen zwischen C57BL/6- und BALB/c-Mäusen beschrieben wurden (De Maio *et al.*, 2005; Shibui *et al.*, 2009).

In den hier durchgeführten Versuchen veränderte die Abwesenheit von Treg-Zellen während der frühen Phase einer Sepsis auch die Zytokinkonzentration im Blut der Mäuse. So zeigten die Versuchstiere im Zuge einer Immunantwort auf die Pathogene einer Sepsis eine verstärkte Sezernierung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 (Abb. 3.21 A & B). Dieser Anstieg wurde durch die Depletion der Treg-Zellen in DT-behandelten septischen Mäusen im Vergleich zu septischen Mäusen, die über Treg-Zellen verfügten noch einmal deutlich verstärkt (Abb. 3.21 A & B). Kühnhorn *et al.* konnten ebenfalls einen erhöhten TNF α und IL-6 Spiegel nach CLP beobachten, jedoch keine Differenzen zwischen DT- und PBS-behandelten DEREK-Mäusen feststellen (Kühnhorn *et al.*, 2013). Aufgrund der Abwesenheit von Treg-Zellen werden möglicherweise Makrophagen weniger stark inhibiert und es kommt zu einer verstärkten Sezernierung von TNF α , wodurch verstärkt weitere Makrophagen und neutrophile Granulozyten aktiviert werden und die Möglichkeit einer letalen

Gewebeschädigung besteht. Die erhöhte $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Blut könnte zusätzlich die suppressive Aktivität der noch vorhandenen Treg-Zellen inhibieren (Nie et al., 2013). Eine Depletion von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T-Zellen vor Infektion bewirkte auch in anderen systemischen Infektionsmodellen eine erhöhte $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 Sezernierung und eine erhöhte Mortalität (Okeke et al., 2013). Eine erhöhte IL-6 Konzentration ist häufig mit einer erhöhten $\text{TNF}\alpha$ Konzentration assoziiert und auch in Traumata oder Verbrennungen vorzufinden (Hoch et al., 1993; Nijsten et al., 1991). Unabhängig von der DT-Applikation verstarben die Tiere mit massiver Freisetzung dieser Zytokine frühzeitig. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Versuchstiere aufgrund einer exzessiven pro-inflammatorischen Immunantwort und den daraus folgenden Gewebeschäden an einem septischen Schock verstorben sind (Parameswaran and Patial, 2010; Webster and Galley, 2009). Ein wichtiger Suppressionsmechanismus von Treg-Zellen ist die Sezernierung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10. Sowohl PBS- als auch DT-behandelte DEREK-Mäuse zeigten 24 Stunden nach Induktion einer Sepsis einen erhöhten IL-10 Spiegel im Blut. Diese frühe Sezernierung von IL-10 und $\text{TNF}\alpha$ deutet auf eine gleichzeitige Induktion der pro- (SIRS) und anti- (CARS) inflammatorischen Phase hin. IL-10 ist wichtig für die Regulation pro-inflammatorischer Immunantworten, jedoch kann ein lang anhaltender, erhöhter IL-10 Spiegel eine effektive Immunantwort durch Makrophagen während einer Sepsis durch die Unterbindung der $\text{TNF}\alpha$ -Sezernierung inhibieren und dadurch die Überlebensrate negativ beeinflussen (Chuang et al., 2014; Inoue et al., 2014; Moore et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit zeigten Mäuse nach Treg-Depletion während einer Sepsis einen tendenziell höheren IL-10 Spiegel im Blut als PBS-behandelte Mäuse (Abb. 3.21 D), während in der einzigen weiteren Arbeit mit spezifischer Treg-Depletion in DEREK-Mäusen keine Unterschiede im IL-10 Spiegel beschrieben sind (Kuhlhorn et al., 2013). Diese Differenzen können durch die Verwendung verschiedener Mausstämmen entstehen, in der vorliegenden Arbeit wurden BALB/c-Mäuse verwendet, während Kuhlhorn et al. C57BL/6-Mäuse verwendeten. Andere Arbeiten berichten ebenfalls von einer geringeren $\text{TNF}\alpha$ - oder IL-10 Sezernierung in C57BL/6-Mäusen nach Influenza- oder Malariainfektionen (Shibui et al., 2009; Zhao et al., 2014). Auch in der hier durchgeführten Arbeit konnten Differenzen im $\text{TNF}\alpha$ Serumspiegel zwischen verschiedenen Mausstämmen nach CLP beobachtet werden (vgl. Abb. 3.21 und Abb. 3.31) Treg-Zellen scheinen für die IL-10 Produktion während einer Sepsis

demnach eine untergeordnete Rolle zu spielen, da nach Applikation von Diphtherietoxin kaum Foxp3⁺ T-Zellen vorhanden waren. Als möglicher Ursprung während einer Sepsis ist eine IL10-sezernierende, suppressive neutrophile Granulozyten-Population beschrieben, zum anderen sezernieren auch DCs vermehrt IL-10 nach CLP (Pastille et al., 2011; Pillay et al., 2012; Zigmond et al., 2014), ebenso Makrophagen nach TLR-Aktivierung (Chang et al., 2007). Jedoch bleibt die Rolle von IL-10 während einer Sepsis unklar, da eine IL-10 Neutralisation 12 Stunden nach CLP die Überlebensrate steigerte während eine Neutralisation zum Zeitpunkt der CLP die Überlebensrate reduzierte (Song et al., 1999; van der Poll et al., 1995). In anderen Arbeiten hingegen verlief eine mittels CLP induzierte Sepsis in IL-10-defizienten Mäusen ähnlich wie in WT-Kontrollen (Scumpia et al., 2006).

Die hier gezeigte verstärkte Sezernierung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen direkt nach CLP bestärkt die Hypothese eines biphasischen Verlaufs einer Sepsis. Das Immunsystem reagiert gleichzeitig mit einer pro- und anti-inflammatorischen Immunantwort, wobei zu Beginn die pro-inflammatorische Phase überwiegt, welche aber im Laufe einer Sepsis abklingt und eine Immunsuppressive Phase entsteht. Häufig überleben septische Patienten diese frühe Phase einer Sepsis und es bildet sich eine Immunparalyse aus. In dieser Phase kann die primäre Infektion entweder wieder akut werden oder aber auch eine lebensbedrohliche sekundäre Infektion erworben werden (Boomer et al., 2011; Hotchkiss et al., 2013; Otto et al., 2011; Ward, 2011). Etwa 10 bis 30 % aller künstlich beatmeten septischen Patienten erwerben eine Pneumonie und versterben an dieser (Chastre and Fagon, 2002). Diese Gefahr einer Immunparalyse konnte auch im Mausmodell gezeigt werden, in dem eine durch *P. aeruginosa* verursachte Pneumonie während einer Sepsis deutlich häufiger tödlich verläuft als eine reine Pneumonie (Muenzer et al., 2006). Ähnliche Resultate lieferte die Induktion einer Pneumonie nach CLP durch den grampositiven Erreger *Staphylococcus aureus* (Jung et al., 2012). Therapien mit IFN γ wurden bereits erfolgreich angewandt und bewirkten eine verstärkte Aktivierung von Monozyten und Makrophagen, wodurch eine erhöhte Antigenpräsentation und Sezernierung von TNF α stattfindet (Docke et al., 1997; Nalos et al., 2012). Es wird vermutet, dass der erhöhte Anteil an Treg-Zellen während einer Sepsis zur Ausbildung dieser Immunparalyse beiträgt und somit eine nosokomiale Sekundärinfektion fördern kann (Venet et al., 2009). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Auswirkung einer Depletion dieser Zellen während einer Sekundärinfektion

untersucht. Hierfür wurde septischen DEREK-Mäusen vor intratrachealer Infektion mit *P. aeruginosa* DT appliziert. Zwar stieg im Blut der Kontrolltiere der Anteil an Treg-Zellen nach Sekundärinfektion weiter an (Abb. 3.25 C), allerdings konnten nach Sekundärinfektion keine signifikanten Unterschiede im Überleben (Abb. 3.24), Krankheitsverlauf (Abb. 3.23) und Zytokinspiegel (Abb. 3.26) beider Versuchsgruppen gefunden werden. Dies deutet prinzipiell auf eine geringere Bedeutung der Treg-Zellen für den Verlauf einer Sekundärinfektion während der hypo-inflammatorischen Phase hin.

Limitierend an diesem Versuch ist jedoch ein relativ rascher Anstieg an Treg-Zellen in DEREK-Mäusen trotz Applikation von DT. Zwei Tage nach Sekundärinfektion waren Foxp3⁺ T-Zellen detektierbar, nach sieben Tagen war ein erheblicher Anteil dieser Zellen vorhanden, insbesondere in der Lunge, dem Ort der Infektion (Abb. 3.25 D). Diese Zellen sind GFP-negativ, was bedeutet, dass sie auch den DT-Rezeptor nicht tragen und somit durch die Applikation von DT nicht depletiert werden können. Die erneute Entstehung von Foxp3⁺ T-Zellen in DEREK-Mäusen trotz Applikation von DT konnten auch andere Forscher während Infektionen bereits nach wenigen Tagen beobachten (Berod et al., 2014; Christiaansen et al., 2014; Schmitz et al., 2013). Eine Erklärung für die Expansion von Foxp3⁺GFP⁻ Treg-Zellen könnte eine verzögerte Expression der BAC-Transgene in den neu generierten Treg-Zellen sein (Lahl and Sparwasser, 2011). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in DEREK-Mäusen auch noch wenige Treg-Zellen nach DT-Applikation ausreichen, um vor Autoimmunerkrankungen zu schützen (Mayer et al., 2014). Die Depletion von Treg-Zellen verlief jedoch deutlich ineffektiver, so dass sich die Frage stellt, ob eine effektivere Treg-Depletion nicht doch einen deutlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf gezeigt hätte. Somit scheint die Verwendung von DEREK-Mäusen in Langzeit-Infektionsversuchen keine optimale Option zu sein. Kürzlich wurde eine transgene DEREK x FoxP3^{GFP} Maus beschrieben, die auch eine langfristige Depletion von Foxp3⁺ T-Zellen ermöglicht, allerdings induziert die Depletion regulatorischer T-Zellen mittels DT in diesen Mäusen Autoimmunerkrankungen (Berod et al., 2014). Des Weiteren könnte eine frühere Sekundärinfektion den Krankheitsverlauf verändern, denn bereits nach vier Tagen zeigen septische Mäuse ein immunsuppressives Zytokinprofil in der Lunge (Pastille et al., 2011), da eine Sepsis im murinen CLP-Mausmodell deutlich schneller verläuft als im Menschen (Nemzek et al., 2008).

Nachdem andere Studien zeigen konnten, dass eine Aktivierung von Treg-Zellen mittels TLR2 ihre Funktion und Expansion beeinflusst (Nyirenda et al., 2011; Oberg et al., 2010; Suttmüller et al., 2006), wurde untersucht, ob sich der Verlauf einer Sepsis und der Anteil an regulatorischen Zellen während der Sepsis in TLR2-Knockout-Mäusen von dem naiver Mäuse unterscheidet

Nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis mittels CLP zeigten beide Mausstämme einen vergleichbaren Krankheitsverlauf und eine ähnliche Überlebensrate (Abb. 3.27 & 3.28 A). Jedoch besitzen TLR2-defiziente Mäuse eine deutliche Resistenz gegenüber einer intratrachealen Sekundärinfektion mit dem gramnegativen Bakterium *P. aeruginosa*. Sieben Tage nach Sekundärinfektion überlebten 70 % aller TLR2^{-/-}-Mäuse und nur 25 % aller WT-Mäuse (Abb. 3.28 B).

Sowohl in TLR2^{-/-}- als auch in WT-Mäusen steigt der Anteil an Treg-Zellen nach CLP-induzierter Sepsis an, jedoch erfolgt er in transgenen Tieren schneller, wobei in TLR2^{-/-}-Mäusen das Maximum an Treg-Zellen nach vier Tagen und WT-Mäusen erst nach sieben Tage erreicht wurde (Abb. 3.29). Der Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen besteht damit im Wesentlichen in einer Verzögerung des Anstiegs an Treg-Zellen. Aufgrund eines ebenfalls erhöhten Anteils an Treg-Zellen in TLR2^{-/-}-Mäusen scheint die durch TLR2 induzierte Proliferation von Treg-Zellen als einzige Ursache für ein verschobenes Treg-Verhältnis während einer Sepsis unwahrscheinlich.

Die Untersuchung der Nrp1-Expression auf Treg-Zellen der septischen Mäuse zeigte eine geringere Nrp1-Expression auf Foxp3⁺ T-Zellen in TLR2^{-/-}-Mäusen verglichen mit WT-Mäusen (Abb. 3.30), weshalb eine verstärkte Induktion von Treg-Zellen angenommen werden kann (Yadav et al., 2012).

Der in dieser Arbeit festgestellte geringere Anteil an Treg-Zellen in TLR2^{-/-}-Mäusen zum Zeitpunkt der Sekundärinfektion könnte auch einen Einfluss auf die höhere Überlebensrate von TLR2^{-/-}-Mäusen haben. Eine Vermutung wäre, dass in WT-Mäusen Treg-Zellen durch Bakterien, die nach CLP freigesetzt werden, mittels TLR2 aktiviert werden und proliferieren (Liu et al., 2006a). In TLR2-defizienten Mäusen finden sich 6 – 12 % mehr Nrp1⁺Foxp3⁺ T-Zellen als in WT-Mäusen was ein Hinweis auf eine verstärkte Induktion von Treg-Zellen sein könnte, welche so die fehlende TLR2-vermittelten Aktivierung und Proliferation von Treg-Zellen kompensieren

könnten. Der geringere Anteil an Treg-Zellen in TLR2^{-/-}-Mäusen sieben Tage nach CLP könnte durch eine Instabilität der iTreg-Zellen begründet sein, die nach Eliminierung der durch CLP freigesetzten Pathogene nicht mehr stimuliert werden. Möglicherweise könnte dieser geringere Anteil an Treg-Zellen für eine effektivere Immunantwort gegen die *P. aeruginosa* Infektion verantwortlich sein und somit die Sterblichkeitsrate der Versuchstiere senken. Dagegen sprechen könnte die ähnlich starke Sezernierung von IL-6 in beiden Versuchsgruppen, da geringere Mengen IL-6 die Differenzierung in Treg-Zellen fördert sollten und ein erhöhtes IL-6 Level eine Differenzierung von Treg-Zellen verhindert (Bettelli et al., 2006; Doganci et al., 2005).

Ergebnisse von Pene *et al.* zeigten ähnliche Resultate hinsichtlich der Resistenz gegenüber einer Sekundärinfektion. Sie zeigten in sekundärinfizierten TLR2^{-/-}-Mäusen nach 24 Stunden einen reduzierten IL-10 Spiegel und eine geringere bakterielle Belastung in der Lunge und postulierten eine erhöhte Überlebensrate aufgrund einer geringeren Anzahl an neutrophilen Granulozyten und einer damit verbundenen reduzierten Gewebeschädigung während der Immunantwort (Pene et al., 2012). Möglich wäre auch eine erhöhte Überlebensrate aufgrund einer weniger starken Aktivierung von Makrophagen durch den fehlenden TLR2 oder aufgrund einer Kombination mehrere Mechanismen, da der TLR2-Knockout nicht auf bestimmte Zellen limitiert ist. Bislang ist unklar, ob Treg-Zellen aus septischen TLR2^{-/-} defizienten Mäusen eine veränderte suppressive Aktivität aufweisen, da eine TLR2-vermittelte Aktivierung auch die *foxp3*-Expression regulieren kann (Liu et al., 2006a). Des Weiteren wäre ergänzend zur untersuchten Nrp1-Expression der Treg-Zellen eine Analyse der *foxp3*-TSDR hinsichtlich ihrer Methylierung sinnvoll, um zusätzliche Informationen hinsichtlich der Expansion von Treg-Zellen zu erhalten. Limitierend an diesen Versuchen ist die Tatsache, dass es sich um einen globalen TLR2-Knockout handelt. In anderen T-Zellen induziert TLR2 eine Th2-vermittelte Immunantwort mit der Ausschüttung von IL-10, welche in den Knockout-Tieren möglicherweise ausbleibt und somit den Zytokinspiegel beeinträchtigt (Dillon et al., 2004). In Makrophagen und DCs reduziert ein selektiver TLR2-Knockout ebenfalls deren IL-10 Sezernierung (Jang et al., 2004; Saraiva and O'Garra, 2010).

Durch die durchgeführten Versuche konnte übereinstimmend mit anderen Forschern gezeigt werden, dass der Anteil an Treg-Zellen während einer Sepsis signifikant ansteigt. Schlussfolgernd aus den Analysen führte eine Depletion dieser Zellen

während der frühen Phase einer Sepsis zu einem schwerwiegenderem Krankheitsverlauf mit einer stärkeren Inflammation und höherer Letalität. Hingegen bewirkte eine Depletion von Treg-Zellen nach Induktion einer Sepsis jedoch vor einer Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa* in den hier durchgeführten Versuchen keine Veränderungen im Krankheitsverlauf. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass eine vollständige Depletion von Treg-Zellen nach Sekundärinfektion nicht möglich war und somit weitere Versuche für eine vollständige Klärung notwendig sind.

Eine Sepsis besitzt einen dynamischen Verlauf, während dem die initiale hyperinflammatorische Phase von einer hypoinflammatorischen Phase gefolgt wird. Eine effektive Immuntherapie muss zum richtigen Zeitpunkt erfolgen. Während Treg-Zellen in der pro-inflammatorischen Phase einer Sepsis eine protektive Funktion aufweisen könnten, wäre möglicherweise in der darauffolgenden Immunparalyse ein therapeutischer Schwerpunkt die Reaktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Dies könnte neben der klassischen Antibiotikatherapie auch durch die Stimulation des angeborenen Immunsystems mittels PD1-Liganden Antikörpern, $IFN\gamma$ oder aber auch G-CSF oder GM-CSF erfolgen. Während einer Sepsis sezernieren Monozyten weniger $IFN\gamma$, wodurch es zu einer verminderten Aktivierung von Makrophagen kommt. Erste Studien mit $IFN\gamma$ zeigten eine erhöhte HLA-DR Expression mit verbesserter bakterieller Eliminierung und gesteigerter Überlebensrate (Docke et al., 1997; Nalos et al., 2012). Ähnliche Resultate konnten mit G-CSF oder GM-CSF gezeigt werden, wodurch verstärkt neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet wurden und auch eine geringere Anfälligkeit für nosokomiale Infektionen erzielt werden konnte (Hall et al., 2011; Meisel et al., 2009). Diskutiert wird auch eine IL-15 Therapie, welches zum einen NK-Zellen und neutrophile Granulozyten aktiviert, wodurch eine verstärkte Eliminierung von Pathogenen stattfindet und zum anderen die Expression des anti-apoptotischen Mediators BCL-2 induziert wodurch die Überlebensrate septischer Mäuse verbessert wird (Inoue et al., 2010; Lu et al., 2002; Pelletier et al., 2002). Während einer Sepsis wird verstärkt PD1L und PD1 auf T-Zellen exprimiert (Boomer et al., 2011; Chang et al., 2014). Eine Therapie mit einem PD1L- oder PD1-Antikörper verhindert eine Apoptose von T-Zellen indem die Bindung von PD1L der Monozyten oder Makrophagen zu PD1 der T-Zellen blockiert wird. In diversen *in vivo* Tiermodellen bewirkte die Blockade der PD1-Signalkaskade ein erhöhtes Überleben einer Sepsis und Sekundärinfektion

(Brahmamdam et al., 2010; Chang et al., 2013; Zhang et al., 2010). Vielversprechend ist auch eine IL-7 Therapie, da es nach Bindung an CD127 der T-Zellen eine vielseitige Wirkung besitzt. Es induziert die Bildung von BCL-2 und Reduktion der PD1-Expression, aber auch eine Proliferation von Treg-Zellen und konventionellen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Chetoui et al., 2010; Dupont et al., 2014; Perales et al., 2012; Unsinger et al., 2010; Vang et al., 2008; Venet et al., 2012). Zusätzlich wirkt IL-7 gegen die Sepsis-induzierte Abnahme der TCR-Vielfalt, welche in Verdacht steht nosokomiale Infektionen zu fördern (Perales et al., 2012; Venet et al., 2013). In CLP-Mäusen bewirkte IL-7 eine verstärkte IFN γ Sezernierung und eine erhöhte Überlebensrate (Unsinger et al., 2010).

Diese Therapieansätze zeigen die Komplexität einer Sepsis, in der regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle spielen, allerdings auch diverse andere T-Zellen, DCs, Makrophagen und neutrophile Granulozyten entscheidend sind (Hotchkiss et al., 2001; Kovach and Standiford, 2012; Monneret et al., 2004; Pastille et al., 2011).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine zu geringe Anzahl an Treg-Zellen während der frühen Phase einer Sepsis die Prognose verschlechtert, aber auch eine verringerte suppressive Aktivität von Treg-Zellen kann die Entstehung vieler Erkrankungen begünstigen (Bennett et al., 2001; Lyssuk et al., 2007; Nadkarni et al., 2007). Beispielsweise könnte der Transfer von stabilen *in vitro* generierten Treg-Zellen den Krankheitsverlauf von SLE, IBD oder aber auch multipler Sklerose positiv modulieren. Besonders aber auch in knochenmarktransplantierten Patienten wird diese Therapieoption bereits erfolgsversprechend angewandt (Hoffmann et al., 2002). Häufig erkennen nach Transplantation die Spender (engl. *Graft*) T-Zellen die Zellen des Empfängers (engl. *Host*) als fremd und induzieren eine lebensgefährliche, systemische Inflammation namens *Graft-versus-Host-Disease* (Abk. GvHD) (June and Blazar, 2006). Hier konnte der Transfer von *in vitro* generierten Treg-Zellen in Phase I-Versuchen die Abstoßungsrate der Spenderorgane deutlich reduzieren (Brunstein et al., 2011; Di Ianni et al., 2011; Edinger and Hoffmann, 2011).

Für die konstitutive Expression von *FOXP3* und einen stabilen suppressiven Phänotyp ist eine unmethylierte *FOXP3*-TSDR in Treg-Zellen notwendig (Huehn et al., 2009; Polansky et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine Differenzierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu Treg-Zellen durch die DNA-Methyltransferase-Inhibitoren 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC) und Epigallocatechingalat (EGCG) zu induzieren.

5-Aza-dC ist ein Derivat von 5-Azacytidin (5-Aza) und beide Substanzen werden bereits für die Behandlung von Myelodysplasie verwendet. Während 5-Aza-dC nur die DNA-Methylierung beeinflusst, beeinträchtigt 5-Aza zusätzlich die Methylierung von tRNA (Christman, 2002). 5-Aza-dC ist ein starker DNMT-Inhibitor und wird außerdem bereits zur Behandlung akuter myeloischer Leukämie eingesetzt (Karahoca and Momparler, 2013). In der hier durchgeführten Arbeit konnte übereinstimmend mit anderen Arbeiten eine Demethylierung in der *FOXP3*-TSDR humaner CD4⁺CD25⁻ T-Zellen und zugleich die Expression von FOXP3 auf mRNA- und Proteinebene induziert werden (Abb. 3.35 + 3.37) (Polansky et al., 2008). Im Menschen kann FOXP3 auch von aktivierten, nicht suppressiven T-Zellen exprimiert werden (Ziegler, 2007). Deshalb wurde zusätzlich die Expression des Transmembranproteins GARP untersucht, welches ausschließlich in aktivierten Treg-Zellen zu finden ist (Wang et al., 2009) und eine 5-Aza-dC induzierte Expression festgestellt (Abb. 3.37). Des Weiteren konnte dieser DNMT-Inhibitor eine Treg-typische verringerte Proliferation und die Expression von IL-10 induzieren (Abb. 3.38). Die reduzierte Proliferation kann jedoch auch aus zytotoxischen Effekten von 5-Aza-dC resultieren, da nach siebentägiger Stimulation ein erhöhter Anteil der T-Zellen verstarb (Abb. 3.36). In funktionellen Analysen konnte übereinstimmend mit anderen Publikationen keine Suppression der Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Responder T-Zellen durch 5-Aza-dC stimulierte Zellen gefunden werden (Abb. 3.38) (Costantini et al., 2013). Für die Bestimmung der suppressiven Kapazität wurden alle 5-Aza-dC behandelten Zellen verwendet, allerdings wird in der Analyse der *FOXP3*-TSDR deutlich, dass der größte Teil weiterhin eine methylierte *FOXP3*-TSDR besitzt. Idealerweise wäre hier eine Separation der Zellen mit unmethylierter *FOXP3*-TSDR und eine anschließende Bestimmung der suppressiven Eigenschaften.

Die Stimulation mit 5-Aza-dC induziert neben Treg-spezifischen Genen auch die Expression von Th1- und Th17-spezifischen Molekülen, welche vermutlich ebenfalls mittels DNA-Methylierung reguliert werden (Cohen et al., 2011) (Abb. 3.40 & 3.42). Somit zeigen 5-Aza-dC stimulierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren *TBX21* und *ROR γ T* und der Zytokine *IFN γ* und *IL-17*. In der *gene array* Analyse wird deutlich, dass sehr viele Treg-Gene induziert werden, jedoch auch ein großer Teil der Treg-Gene unbeeinflusst bleibt und somit kein vollständiger Treg-Pänotyp generiert wird (Abb. 3.39).

Der zweite verwendete DNMT-Inhibitor war EGCG, welches etwa ein Drittel der Trockenmasse von grünem Tee ausmacht. Wong *et al.* konnten mittels EGCG die Expression von *FOXP3* in Jurkat-Zellen induzieren (Wong *et al.*, 2011). Diese Resultate konnten in dieser Arbeit reproduziert werden, jedoch war keine Induktion von *FOXP3* in humanen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen nach Stimulation mit EGCG detektierbar (Abb. 3.37). EGCG reduziert die globale DNA-Methylierung, bewirkt allerdings keine wesentliche Demethylierung der *FOXP3*-TSDR (Abb. 3.34 + 3.35). Dementsprechend wurden keine Treg-spezifischen Moleküle wie FOXP3, GARP oder IL-10 induziert (Abb. 3.37). Interessanterweise zeigt EGCG in hohen Dosen einen toxischeren Effekt als die verwendeten Dosierungen von 5-Aza-dC (Abb. 3.36).

Keine der beiden untersuchten DNMT-Inhibitoren generierte einen stabilen, vollständigen Treg-Phänotyp aus $CD4^+CD25^-$ T-Zellen, wodurch die Verwendung dieser Zellen für einen therapeutischen Transfer nicht erfolgversprechend erscheint. Eine Ursache für eine nicht vollständige Treg-Differenzierung ist die unspezifische Wirkungsweise beider DNMT-Inhibitoren, wodurch auch eine Expression von nicht Treg-spezifischen Genen induziert wird. Möglicherweise ist eine spezifische Demethylierung in wichtigen Treg-spezifischen Genen eine vielversprechendere Methode, beispielsweise die gezielte Demethylierung der *FOXP3*-TSDR. Kürzlich konnte außerdem eine spezifische Demethylierung von CpGs in humanen Zellen mittels TALE-TET1-Konstrukten demonstriert werden (Maeder *et al.*, 2013). Eine Anwendung dieser Methode könnte hinsichtlich einer Treg-Induktion erfolgsversprechender sein.

5 Zusammenfassung

Regulatorische T Zellen sind an der Entstehung verschiedener Autoimmun- und Infektionskrankheiten beteiligt. Die Bedeutung dieser Zellen für die Sepsis ist jedoch noch unklar und sollte im Rahmen dieser Arbeit weitergehend analysiert werden. Hierfür wurde ein *assay* etabliert, der spezifische Unterschiede in der DNA-Methylierung nutzt, um stabile Treg-Zellen im Menschen und der Maus zuverlässig mit Hilfe einer methylierungsempfindlichen *real-time* PCR zu quantifizieren. Der Vorteil dieses *assays* liegt in der Unabhängigkeit vom Aktivierungsstatus der Zellen, der gerade bei Erkrankungen wie der Sepsis eine bedeutende Rolle spielt. Durch Anwendung des *assays* bei septischen Patienten konnte der durchflusszytometrisch bestimmte relative Anstieg von Treg-Zellen bestätigt werden. Im Mausmodell wurde die Bedeutung von Treg-Zellen differenziell für die Früh- und Spätphase der Sepsis untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass Treg-Zellen in der Frühphase die Hyperinflammation begrenzen und dass ein Mangel an Treg-Zellen mit einem schwereren Krankheitsverlauf und einer erhöhten Letalität einhergeht. Andererseits konnte während der Spätphase der Sepsis kein Einfluss dieser Zellen auf eine Sekundärinfektion mit *P. aeruginosa* festgestellt werden. Die Möglichkeit einer Depletion von Treg-Zellen während der Spätphase war jedoch in den verwendeten Mäusen nur partiell möglich, was die Aussagekraft der Versuche für die Bedeutung dieser Zellen in der Spätphase der Sepsis einschränkt.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit T-Zellen mit den beiden demethylierenden Substanzen 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-dC), das in der Therapie hämatonkologischer Erkrankungen zur Anwendung kommt und Epigallocatechingallat aus dem grünen Tee kultiviert, um über eine Demethylierung der *FOXP3*-TSDR Treg-Zellen zu induzieren. Beide Substanzen induzierten eine globale DNA-Hypomethylierung, jedoch nur 5-Aza-dC war in der Lage, eine relevante Demethylierung der *FOXP3*-TSDR in humanen CD4⁺CD25⁻ T-Lymphozyten herbeizuführen. Ebenso wurde nur durch 5-Aza-dC eine gesteigerte Genexpression von Treg-spezifischen Genen erreicht. Jedoch konnte auch 5-Aza-dC keine voll funktionstüchtigen Treg-Zellen induzieren, da die Zellen keine suppressiven Eigenschaften aufwiesen und neben *FOXP3* auch verstärkt für Th1- und Th17-Zellen typische Master-Transkriptionsfaktoren und Zytokine exprimierten, was ihre therapeutische Anwendungen im Sinne zukünftiger T-Zell-Therapien ausschließt.

6 Literatur

- Adib-Conquy, M., and J.M. Cavaillon. 2009. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thrombosis and haemostasis*. 101:36-47.
- Akimova, T., U.H. Beier, L. Wang, M.H. Levine, and W.W. Hancock. 2011. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PloS one*. 6:e24226.
- Allan, R.S., E. Zueva, F. Cammas, H.A. Schreiber, V. Masson, G.T. Belz, D. Roche, C. Maison, J.P. Quivy, G. Almouzni, and S. Amigorena. 2012. An epigenetic silencing pathway controlling T helper 2 cell lineage commitment. *Nature*. 487:249-253.
- Allan, S.E., S.Q. Crome, N.K. Crellin, L. Passerini, T.S. Steiner, R. Bacchetta, M.G. Roncarolo, and M.K. Levings. 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International immunology*. 19:345-354.
- Amador-Molina, A., J.F. Hernandez-Valencia, E. Lamoyi, A. Contreras-Paredes, and M. Lizano. 2013. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. *Viruses*. 5:2624-2642.
- Angus, D.C., W.T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M.R. Pinsky. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*. 29:1303-1310.
- Ansel, K.M., D.U. Lee, and A. Rao. 2003. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nature immunology*. 4:616-623.
- Antequera, F., and A. Bird. 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:11995-11999.
- Apostolou, I., and H. von Boehmer. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal of experimental medicine*. 199:1401-1408.
- Aschenbrenner, K., L.M. D'Cruz, E.H. Vollmann, M. Hinterberger, J. Emmerich, L.K. Swee, A. Rolink, and L. Klein. 2007. Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nature immunology*. 8:351-358.
- Ayala, A., and I.H. Chaudry. 1996. Immune dysfunction in murine polymicrobial sepsis: mediators, macrophages, lymphocytes and apoptosis. *Shock*. 6 Suppl 1:S27-38.
- Ayyoub, M., F. Deknuydt, I. Raimbaud, C. Dousset, L. Leveque, G. Bioley, and D. Valmori. 2009. Human memory FOXP3⁺ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:8635-8640.
- Baron, U., S. Floess, G. Wieczorek, K. Baumann, A. Grutzkau, J. Dong, A. Thiel, T.J. Boeld, P. Hoffmann, M. Edinger, I. Turbachova, A. Hamann, S. Olek, and J. Huehn. 2007. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *European journal of immunology*. 37:2378-2389.
- Baron, U., I. Turbachova, A. Hellwag, F. Eckhardt, K. Berlin, U. Hoffmuller, P. Gardina, and S. Olek. 2006. DNA methylation analysis as a tool for cell typing. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 1:55-60.
- Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, and H.D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics*. 27:20-21.
- Berod, L., P. Stuve, F. Varela, J. Behrends, M. Swallow, F. Kruse, F. Krull, P. Ghorbani, C.T. Mayer, C. Holscher, and T. Sparwasser. 2014. Rapid rebound of the Treg compartment in

- DEREG mice limits the impact of Treg depletion on mycobacterial burden, but prevents autoimmunity. *PLoS one*. 9:e102804.
- Bestor, T.H., and A. Coxon. 1993. Cytosine methylation The pros and cons of DNA methylation. *Current Biology*. 3:384-386.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441:235-238.
- Bianchi, M.E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*. 81:1-5.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*. 16:6-21.
- Biswas, S.K., and E. Lopez-Collazo. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology*. 30:475-487.
- Bjornsson, H.T., M.D. Fallin, and A.P. Feinberg. 2004. An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends in genetics : TIG*. 20:350-358.
- Bogdan, C., and C. Nathan. 1993. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 685:713-739.
- Bone, R.C., R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, and W.J. Sibbald. 1992a. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 101:1644-1655.
- Bone, R.C., C.J. Fisher, Jr., T.P. Clemmer, G.J. Slotman, C.A. Metz, and R.A. Balk. 1987. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*. 317:653-658.
- Bone, R.C., W.J. Sibbald, and C.L. Sprung. 1992b. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*. 101:1481-1483.
- Boomer, J.S., K. To, K.C. Chang, O. Takasu, D.F. Osborne, A.H. Walton, T.L. Bricker, S.D. Jarman, 2nd, D. Kreisel, A.S. Krupnick, A. Srivastava, P.E. Swanson, J.M. Green, and R.S. Hotchkiss. 2011. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 306:2594-2605.
- Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmeshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M.S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine*. 204:1303-1310.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M.L. Dell'Acqua, P.M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 110:1225-1232.
- Brahmamdham, P., S. Inoue, J. Unsinger, K.C. Chang, J.E. McDunn, and R.S. Hotchkiss. 2010. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *Journal of leukocyte biology*. 88:233-240.
- Bruder, D., M. Probst-Kepper, A.M. Westendorf, R. Geffers, S. Beissert, K. Loser, H. von Boehmer, J. Buer, and W. Hansen. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *European journal of immunology*. 34:623-630.
- Brunkhorst, F.M. 2006. [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS*. 41:43-44.

- Brunckow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paeper, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf1, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics*. 27:68-73.
- Brunstein, C.G., J.S. Miller, Q. Cao, D.H. McKenna, K.L. Hippen, J. Curtsinger, T. Defor, B.L. Levine, C.H. June, P. Rubinstein, P.B. McGlave, B.R. Blazar, and J.E. Wagner. 2011. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 117:1061-1070.
- Buckner, J.H. 2010. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature reviews. Immunology*. 10:849-859.
- Cao, D., R. van Vollenhoven, L. Klareskog, C. Trollmo, and V. Malmstrom. 2004. CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis research & therapy*. 6:R335-346.
- Cedar, H., and Y. Bergman. 2011. Epigenetics of haematopoietic cell development. *Nature reviews. Immunology*. 11:478-488.
- Chang, E.Y., B. Guo, S.E. Doyle, and G. Cheng. 2007. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *Journal of immunology*. 178:6705-6709.
- Chang, K., C. Svabek, C. Vazquez-Guillamet, B. Sato, D. Rasche, S. Wilson, P. Robbins, N. Ulbrandt, J. Suzich, J. Green, A.C. Patera, W. Blair, S. Krishnan, and R. Hotchkiss. 2014. Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Critical care*. 18:R3.
- Chang, K.C., C.A. Burnham, S.M. Compton, D.P. Rasche, R. Mazuski, S.M. J, J. Unsinger, A.J. Korman, J.M. Green, and R.S. Hotchkiss. 2013. Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Critical care*. 17:R85.
- Chastre, J., and J.Y. Fagon. 2002. Ventilator-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 165:867-903.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine*. 198:1875-1886.
- Chen, X., M. Baumel, D.N. Mannel, O.M. Howard, and J.J. Oppenheim. 2007. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *Journal of immunology*. 179:154-161.
- Chen, X., D. Fosco, D.E. Kline, L. Meng, S. Nishi, P.A. Savage, and J. Kline. 2014. PD-1 regulates extrathymic regulatory T-cell differentiation. *European journal of immunology*. 44:2603-2616.
- Chetoui, N., M. Boisvert, S. Gendron, and F. Aoudjit. 2010. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology*. 130:418-426.
- Christiaansen, A.F., P.M. Boggiatto, and S.M. Varga. 2014. Limitations of Foxp3(+) Treg depletion following viral infection in DREG mice. *Journal of immunological methods*. 406:58-65.
- Christman, J.K. 2002. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 21:5483-5495.
- Chuang, T.Y., H.T. Chang, K.P. Chung, H.S. Cheng, C.Y. Liu, Y.C. Liu, H.H. Huang, T.C. Chou, B.L. Chang, M.R. Lee, C.J. Lin, S.W. Lee, C.J. Yu, and P.R. Hsueh. 2014. High levels

- of serum macrophage migration inhibitory factor and interleukin 10 are associated with a rapidly fatal outcome in patients with severe sepsis. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 20:13-17.
- Chung, C.S., G.Y. Song, J. Lomas, H.H. Simms, I.H. Chaudry, and A. Ayala. 2003. Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. *Journal of leukocyte biology*. 74:344-351.
- Cohen, C.J., S.Q. Crome, K.G. MacDonald, E.L. Dai, D.L. Mager, and M.K. Levings. 2011. Human Th1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci. *Journal of immunology*. 187:5615-5626.
- Collier, S.P., M.A. Henderson, J.T. Tossberg, and T.M. Aune. 2014. Regulation of the Th1 Genomic Locus from Ifng through Tmevpg1 by T-bet. *Journal of immunology*. 193:3959-3965.
- Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R.S. Blumberg, and D.A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 450:566-569.
- Corbel, C., V. Lemarchandel, V. Thomas-Vaslin, A.S. Pelus, C. Agboton, and P.H. Romeo. 2007. Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. *Developmental and comparative immunology*. 31:1082-1094.
- Costantini, B., S.Y. Kordasti, A.G. Kulasekararaj, J. Jiang, T. Seidl, P.P. Abellan, A. Mohamedali, N.S. Thomas, F. Farzaneh, and G.J. Mufti. 2013. The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 98:1196-1205.
- Curotto de Lafaille, M.A., A.C. Lino, N. Kutchukhidze, and J.J. Lafaille. 2004. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *Journal of immunology*. 173:7259-7268.
- D'Alise, A.M., A. Ergun, J.A. Hill, D. Mathis, and C. Benoist. 2011. A cluster of coregulated genes determines TGF-beta-induced regulatory T-cell (Treg) dysfunction in NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:8737-8742.
- de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *European journal of immunology*. 34:2480-2488.
- De Maio, A., M.B. Torres, and R.H. Reeves. 2005. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. *Shock*. 23:11-17.
- Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine*. 204:1257-1265.
- Dejager, L., I. Pinheiro, E. Dejonckheere, and C. Libert. 2011. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in microbiology*. 19:198-208.
- Delano, M.J., T. Thayer, S. Gabilovich, K.M. Kelly-Scumpia, R.D. Winfield, P.O. Scumpia, A.G. Cuenca, E. Warner, S.M. Wallet, M.A. Wallet, K.A. O'Malley, R. Ramphal, M. Clare-Salzer, P.A. Efron, C.E. Mathews, and L.L. Moldawer. 2011. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *Journal of immunology*. 186:195-202.
- Denk, S., M. Perl, and M. Huber-Lang. 2012. Damage- and pathogen-associated molecular patterns and alarmins: keys to sepsis? *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*. 48:171-179.

- Di Ianni, M., F. Falzetti, A. Carotti, A. Terenzi, F. Castellino, E. Bonifacio, B. Del Papa, T. Zei, R.I. Ostini, D. Cecchini, T. Aloisi, K. Perruccio, L. Ruggeri, C. Balucani, A. Pierini, P. Sportoletti, C. Aristei, B. Falini, Y. Reisner, A. Velardi, F. Aversa, and M.F. Martelli. 2011. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*. 117:3921-3928.
- Dillon, S., A. Agrawal, T. Van Dyke, G. Landreth, L. McCauley, A. Koh, C. Maliszewski, S. Akira, and B. Pulendran. 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *Journal of immunology*. 172:4733-4743.
- Docke, W.D., F. Randow, U. Syrbe, D. Krausch, K. Asadullah, P. Reinke, H.D. Volk, and W. Kox. 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nature medicine*. 3:678-681.
- Doganci, A., T. Eigenbrod, N. Krug, G.T. De Sanctis, M. Hausding, V.J. Erpenbeck, B. Haddad el, H.A. Lehr, E. Schmitt, T. Bopp, K.J. Kallen, U. Herz, S. Schmitt, C. Luft, O. Hecht, J.M. Hohlfeld, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, S. Rose-John, H. Renz, M.F. Neurath, P.R. Galle, and S. Finotto. 2005. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 115:313-325.
- Doi, K., A. Leelahavanichkul, P.S. Yuen, and R.A. Star. 2009. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *The Journal of clinical investigation*. 119:2868-2878.
- Dupont, G., J. Demaret, F. Venet, F. Malergue, C. Malcus, F. Poitevin-Later, J. Morel, and G. Monneret. 2014. Comparative dose-responses of recombinant human IL-2 and IL-7 on STAT5 phosphorylation in CD4+FOXP3- cells versus regulatory T cells: a whole blood perspective. *Cytokine*. 69:146-149.
- Ebong, S., D. Call, J. Nemzek, G. Bolgos, D. Newcomb, and D. Remick. 1999. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infection and immunity*. 67:6603-6610.
- Edinger, M., and P. Hoffmann. 2011. Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Current opinion in immunology*. 23:679-684.
- Edwards, J.P., H. Fujii, A.X. Zhou, J. Creemers, D. Unutmaz, and E.M. Shevach. 2013. Regulation of the expression of GARP/latent TGF-beta1 complexes on mouse T cells and their role in regulatory T cell and Th17 differentiation. *Journal of immunology*. 190:5506-5515.
- Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S.D. Hurst, R.L. Coffman, R.A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 201:737-746.
- Fallarino, F., U. Grohmann, S. You, B.C. McGrath, D.R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M.L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *Journal of immunology*. 176:6752-6761.
- Faria, A.M., and H.L. Weiner. 2005. Oral tolerance. *Immunological reviews*. 206:232-259.
- Fayyad-Kazan, H., R. Rouas, M. Merimi, N. El Zein, P. Lewalle, F. Jebbawi, M. Mourtada, H. Badran, M. Ezzeddine, B. Salaun, P. Romero, A. Burny, P. Martiat, and B. Badran. 2010. Valproate treatment of human cord blood CD4-positive effector T cells confers on them the molecular profile (microRNA signature and FOXP3 expression) of natural regulatory CD4-positive cells through inhibition of histone deacetylase. *The Journal of biological chemistry*. 285:20481-20491.

- Felmet, K.A., M.W. Hall, R.S. Clark, R. Jaffe, and J.A. Carcillo. 2005. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *Journal of immunology*. 174:3765-3772.
- Feuerer, M., J.A. Hill, K. Kretschmer, H. von Boehmer, D. Mathis, and C. Benoist. 2010. Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:5919-5924.
- Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, T.R. Mosmann, M. Howard, and A. O'Garra. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of immunology*. 147:3815-3822.
- Fisher, C.J., Jr., J.M. Agosti, S.M. Opal, S.F. Lowry, R.A. Balk, J.C. Sadoff, E. Abraham, R.M. Schein, and E. Benjamin. 1996. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *The New England journal of medicine*. 334:1697-1702.
- Fisher, C.J., Jr., G.J. Slotman, S.M. Opal, J.P. Pribble, R.C. Bone, G. Emmanuel, D. Ng, D.C. Bloedow, M.A. Catalano, and I.-R.S.S.S. Group. 1994. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Critical care medicine*. 22:12-21.
- Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H.D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS biology*. 5:e38.
- Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 22:329-341.
- Forel, J.M., L. Chiche, G. Thomas, J. Mancini, C. Farnarier, C. Cognet, C. Guervilly, A. Dumas, F. Vely, F. Xeridat, E. Vivier, and L. Papazian. 2012. Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PloS one*. 7:e50446.
- Gagliani, N., C.F. Magnani, S. Huber, M.E. Gianolini, M. Pala, P. Licona-Limon, B. Guo, D.R. Herbert, A. Bulfone, F. Trentini, C. Di Serio, R. Bacchetta, M. Andreani, L. Brockmann, S. Gregori, R.A. Flavell, and M.G. Roncarolo. 2013. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature medicine*. 19:739-746.
- Gandhi, R., M.F. Farez, Y. Wang, D. Kozoriz, F.J. Quintana, and H.L. Weiner. 2010. Cutting edge: human latency-associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset. *Journal of immunology*. 184:4620-4624.
- Garin, M.I., C.C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait, and R.I. Lechler. 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*. 109:2058-2065.
- Gavin, M.A., T.R. Torgerson, E. Houston, P. DeRoos, W.Y. Ho, A. Stray-Pedersen, E.L. Ocheltree, P.D. Greenberg, H.D. Ochs, and A.Y. Rudensky. 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:6659-6664.
- Gibney, E.R., and C.M. Nolan. 2010. Epigenetics and gene expression. *Heredity*. 105:4-13.
- Gilbert, K.M., M. Thoman, K. Bauche, T. Pham, and W.O. Weigle. 1997. Transforming growth factor-beta 1 induces antigen-specific unresponsiveness in naive T cells. *Immunological investigations*. 26:459-472.
- Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, and R.J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of immunology*. 174:1783-1786.
- Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison. 2012. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of immunology*. 188:976-980.

- Grossman, W.J., J.W. Verbsky, B.L. Tollefsen, C. Kemper, J.P. Atkinson, and T.J. Ley. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*. 104:2840-2848.
- Guignant, C., A. Lepape, X. Huang, H. Kherouf, L. Denis, F. Poitevin, C. Malcus, A. Cheron, B. Allaouchiche, F. Gueyffier, A. Ayala, G. Monneret, and F. Venet. 2011. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Critical care*. 15:R99.
- Haas, J., A. Hug, A. Viehover, B. Fritzsching, C.S. Falk, A. Filser, T. Vetter, L. Milkova, M. Korporal, B. Fritz, B. Storch-Hagenlocher, P.H. Krammer, E. Suri-Payer, and B. Wildemann. 2005. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *European journal of immunology*. 35:3343-3352.
- Hall, M.W., N.L. Knatz, C. Vetterly, S. Tomarello, M.D. Wewers, H.D. Volk, and J.A. Carcillo. 2011. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive care medicine*. 37:525-532.
- Han, Y., Q. Guo, M. Zhang, Z. Chen, and X. Cao. 2009. CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *Journal of immunology*. 182:111-120.
- Hansen, W., M. Hutzler, S. Abel, C. Alter, C. Stockmann, S. Kliche, J. Albert, T. Sparwasser, S. Sakaguchi, A.M. Westendorf, D. Schadendorf, J. Buer, and I. Helfrich. 2012. Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *The Journal of experimental medicine*. 209:2001-2016.
- Hein, F., F. Massin, A. Cravoisy-Popovic, D. Barraud, B. Levy, P.E. Bollaert, and S. Gibot. 2010. The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Critical care*. 14:R19.
- Heuer, J.G., T. Zhang, J. Zhao, C. Ding, M. Cramer, K.L. Justen, S.L. Vonderfecht, and S. Na. 2005. Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4+CD25+ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis. *Journal of immunology*. 174:7141-7146.
- Hinterberger, M., M. Aichinger, O. Prazeres da Costa, D. Voehringer, R. Hoffmann, and L. Klein. 2010. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nature immunology*. 11:512-519.
- Hiraki, S., S. Ono, H. Tsujimoto, M. Kinoshita, R. Takahata, H. Miyazaki, D. Saitoh, and K. Hase. 2012. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor-beta decreases the percentages of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *Surgery*. 151:313-322.
- Hoch, R.C., R. Rodriguez, T. Manning, M. Bishop, P. Mead, W.C. Shoemaker, and E. Abraham. 1993. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Critical care medicine*. 21:839-845.
- Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology*. 5:971-974.
- Hoffmann, P., J. Ermann, M. Edinger, C.G. Fathman, and S. Strober. 2002. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *The Journal of experimental medicine*. 196:389-399.
- Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray. 2008. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends in immunology*. 29:429-435.
- Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*. 13:862-874.

- Hotchkiss, R.S., and S. Opal. 2010. Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe. *The New England journal of medicine*. 363:87-89.
- Hotchkiss, R.S., R.E. Schmiege, Jr., P.E. Swanson, B.D. Freeman, K.W. Tinsley, J.P. Cobb, I.E. Karl, and T.G. Buchman. 2000. Rapid onset of intestinal epithelial and lymphocyte apoptotic cell death in patients with trauma and shock. *Critical care medicine*. 28:3207-3217.
- Hotchkiss, R.S., P.E. Swanson, B.D. Freeman, K.W. Tinsley, J.P. Cobb, G.M. Matuschak, T.G. Buchman, and I.E. Karl. 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Critical care medicine*. 27:1230-1251.
- Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, P.E. Swanson, M.H. Grayson, D.F. Osborne, T.H. Wagner, J.P. Cobb, C. Coopersmith, and I.E. Karl. 2002. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *Journal of immunology*. 168:2493-2500.
- Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, P.E. Swanson, R.E. Schmiege, Jr., J.J. Hui, K.C. Chang, D.F. Osborne, B.D. Freeman, J.P. Cobb, T.G. Buchman, and I.E. Karl. 2001. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *Journal of immunology*. 166:6952-6963.
- Huang, C.T., C.J. Workman, D. Flies, X. Pan, A.L. Marson, G. Zhou, E.L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H.I. Levitsky, J.D. Powell, D.M. Pardoll, C.G. Drake, and D.A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 21:503-513.
- Hubbard, W.J., M. Choudhry, M.G. Schwacha, J.D. Kerby, L.W. Rue, 3rd, K.I. Bland, and I.H. Chaudry. 2005. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 24 Suppl 1:52-57.
- Huber-Lang, M., J.V. Sarma, F.S. Zetoune, D. Rittirsch, T.A. Neff, S.R. McGuire, J.D. Lambris, R.L. Warner, M.A. Flierl, L.M. Hoesel, F. Gebhard, J.G. Younger, S.M. Drouin, R.A. Wetsel, and P.A. Ward. 2006. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature medicine*. 12:682-687.
- Huehn, J., J.K. Polansky, and A. Hamann. 2009. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature reviews. Immunology*. 9:83-89.
- Hwang, K.A., H.R. Kim, and I. Kang. 2009. Aging and human CD4(+) regulatory T cells. *Mechanisms of ageing and development*. 130:509-517.
- Inoue, M., T. Arikawa, Y.H. Chen, Y. Moriwaki, M. Price, M. Brown, J.R. Perfect, and M.L. Shinohara. 2014. T cells down-regulate macrophage TNF production by IRAK1-mediated IL-10 expression and control innate hyperinflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:5295-5300.
- Inoue, S., L. Bo, J. Bian, J. Unsinger, K. Chang, and R.S. Hotchkiss. 2011. Dose-dependent effect of anti-CTLA-4 on survival in sepsis. *Shock*. 36:38-44.
- Inoue, S., J. Unsinger, C.G. Davis, J.T. Muenzer, T.A. Ferguson, K. Chang, D.F. Osborne, A.T. Clark, C.M. Coopersmith, J.E. McDunn, and R.S. Hotchkiss. 2010. IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *Journal of immunology*. 184:1401-1409.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 327:291-295.
- Iwata, A., R.A. de Claro, V.L. Morgan-Stevenson, J.C. Tupper, B.R. Schwartz, L. Liu, X. Zhu, K.C. Jordan, R.K. Winn, and J.M. Harlan. 2011. Extracellular administration of BCL2 protein reduces apoptosis and improves survival in a murine model of sepsis. *PloS one*. 6:e14729.
- Jameson, S.C., and M.J. Bevan. 1998. T-cell selection. *Current opinion in immunology*. 10:214-219.
- Janeway, C.A.e.a., T. Jr., W. P., and M. M. und Shlomchik. 2009. Immunologie.

- Jang, S., S. Uematsu, S. Akira, and P. Salgame. 2004. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *Journal of immunology*. 173:3392-3397.
- Janson, P.C., M.E. Winerdal, P. Marits, M. Thorn, R. Ohlsson, and O. Winqvist. 2008. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS one*. 3:e1612.
- Jin, B., T. Sun, X.H. Yu, Y.X. Yang, and A.E. Yeo. 2012. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clinical & developmental immunology*. 2012:836485.
- Josefowicz, S.Z., and A. Rudensky. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*. 30:616-625.
- June, C.H., and B.R. Blazar. 2006. Clinical application of expanded CD4+25+ cells. *Seminars in immunology*. 18:78-88.
- Jung, E., E.E. Perrone, Z. Liang, E.R. Breed, J.A. Dominguez, A.T. Clark, A.C. Fox, W.M. Dunne, E.M. Burd, A.B. Farris, R.S. Hotchkiss, and C.M. Coopersmith. 2012. Cecal ligation and puncture followed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia increases mortality in mice and blunts production of local and systemic cytokines. *Shock*. 37:85-94.
- Kapsenberg, M.L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews. Immunology*. 3:984-993.
- Karahoca, M., and R.L. Momparler. 2013. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. *Clinical epigenetics*. 5:3.
- Kataoka, H., S. Takahashi, K. Takase, S. Yamasaki, T. Yokosuka, T. Koike, and T. Saito. 2005. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *International immunology*. 17:421-427.
- Kim, H.P., and W.J. Leonard. 2007. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *The Journal of experimental medicine*. 204:1543-1551.
- Kim, Y.C., R. Bhairavabhotla, J. Yoon, A. Golding, A.M. Thornton, D.Q. Tran, and E.M. Shevach. 2012. Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion. *Blood*. 119:2810-2818.
- Klein, L., and K. Jovanovic. 2011. Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Seminars in immunology*. 23:401-409.
- Kohm, A.P., P.A. Carpentier, H.A. Anger, and S.D. Miller. 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*. 169:4712-4716.
- Kohm, A.P., J.S. McMahan, J.R. Podajil, W.S. Begolka, M. DeGutes, D.J. Kasprovicz, S.F. Ziegler, and S.D. Miller. 2006. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Journal of immunology*. 176:3301-3305.
- Komatsu, N., M.E. Mariotti-Ferrandiz, Y. Wang, B. Malissen, H. Waldmann, and S. Hori. 2009. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:1903-1908.
- Kovach, M.A., and T.J. Standiford. 2012. The function of neutrophils in sepsis. *Current opinion in infectious diseases*. 25:321-327.
- Kuhlhorn, F., M. Rath, K. Schmoeckel, K. Cziupka, H.H. Nguyen, P. Hildebrandt, T. Hunig, T. Sparwasser, J. Huehn, C. Potschke, and B.M. Broker. 2013. Foxp3+ regulatory T cells are required for recovery from severe sepsis. *PLoS one*. 8:e65109.

- Lages, C.S., I. Suffia, P.A. Velilla, B. Huang, G. Warshaw, D.A. Hildeman, Y. Belkaid, and C. Chouhnet. 2008. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *Journal of immunology*. 181:1835-1848.
- Lahl, K., and T. Sparwasser. 2011. In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods in molecular biology*. 707:157-172.
- Lankford, S., C. Petty, A. LaVoy, S. Reckling, W. Tompkins, and G.A. Dean. 2008. Cloning of feline FOXP3 and detection of expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *Veterinary immunology and immunopathology*. 122:159-166.
- Lau, L.L., B.D. Jamieson, T. Somasundaram, and R. Ahmed. 1994. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature*. 369:648-652.
- Lee, D.U., S. Agarwal, and A. Rao. 2002. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity*. 16:649-660.
- Lee, H.M., J.L. Bautista, J. Scott-Browne, J.F. Mohan, and C.S. Hsieh. 2012. A broad range of self-reactivity drives thymic regulatory T cell selection to limit responses to self. *Immunity*. 37:475-486.
- Lehmann, J., J. Huehn, M. de la Rosa, F. Maszyra, U. Kretschmer, V. Krenn, M. Brunner, A. Scheffold, and A. Hamann. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:13031-13036.
- Levings, M.K., R. Sangregorio, C. Sartirana, A.L. Moschin, M. Battaglia, P.C. Orban, and M.G. Roncarolo. 2002. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *The Journal of experimental medicine*. 196:1335-1346.
- Levy, M.M., M.P. Fink, J.C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S.M. Opal, J.L. Vincent, G. Ramsay, and C. International Sepsis Definitions. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive care medicine*. 29:530-538.
- Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B.M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali, and R. Clynes. 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *Journal of immunology*. 180:5916-5926.
- Lin, C.W., S. Lo, C. Hsu, C.H. Hsieh, Y.F. Chang, B.S. Hou, Y.H. Kao, C.C. Lin, M.L. Yu, S.S. Yuan, and Y.C. Hsieh. 2014. T-cell autophagy deficiency increases mortality and suppresses immune responses after sepsis. *PloS one*. 9:e102066.
- Lin, X., M. Chen, Y. Liu, Z. Guo, X. He, D. Brand, and S.G. Zheng. 2013. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *International journal of clinical and experimental pathology*. 6:116-123.
- Liu, H., M. Komai-Koma, D. Xu, and F.Y. Liew. 2006a. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:7048-7053.
- Liu, J., A. Lluís, S. Illi, L. Layland, S. Olek, E. von Mutius, and B. Schaub. 2010. T regulatory cells in cord blood--FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. *PloS one*. 5:e13267.
- Liu, V.C., L.Y. Wong, T. Jang, A.H. Shah, I. Park, X. Yang, Q. Zhang, S. Lonning, B.A. Teicher, and C. Lee. 2007. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *Journal of immunology*. 178:2883-2892.
- Liu, W., A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, and J.A.

- Bluestone. 2006b. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine*. 203:1701-1711.
- Lotze, M.T., and K.J. Tracey. 2005. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature reviews. Immunology*. 5:331-342.
- Lu, J., R.L. Giuntoli, 2nd, R. Omiya, H. Kobayashi, R. Kennedy, and E. Celis. 2002. Interleukin 15 promotes antigen-independent in vitro expansion and long-term survival of antitumor cytotoxic T lymphocytes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 8:3877-3884.
- Lyssuk, E.Y., A.V. Torgashina, S.K. Soloviev, E.L. Nassonov, and S.N. Bykovskaia. 2007. Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Advances in experimental medicine and biology*. 601:113-119.
- Maeder, M.L., J.F. Angstman, M.E. Richardson, S.J. Linder, V.M. Cascio, S.Q. Tsai, Q.H. Ho, J.D. Sander, D. Reyon, B.E. Bernstein, J.F. Costello, M.F. Wilkinson, and J.K. Joung. 2013. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nature biotechnology*. 31:1137-1142.
- Makarenkova, V.P., V. Bansal, B.M. Matta, L.A. Perez, and J.B. Ochoa. 2006. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *Journal of immunology*. 176:2085-2094.
- Mantel, P.Y., N. Ouaked, B. Ruckert, C. Karagiannidis, R. Welz, K. Blaser, and C.B. Schmidt-Weber. 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *Journal of immunology*. 176:3593-3602.
- Marie, C., J.M. Cavaillon, and M.R. Losser. 1996. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome. *Annals of internal medicine*. 125:520-521.
- Marie, J.C., D. Liggitt, and A.Y. Rudensky. 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity*. 25:441-454.
- Martin, G., F.M. Brunkhorst, J.M. Janes, K. Reinhart, D.P. Sundin, K. Garnett, and R. Beale. 2009. The international PROGRESS registry of patients with severe sepsis: drotrecogin alfa (activated) use and patient outcomes. *Critical care*. 13:R103.
- Mayer, C.T., P. Ghorbani, A.A. Kuhl, P. Stuve, M. Hegemann, L. Berod, M.E. Gershwin, and T. Sparwasser. 2014. Few Foxp3 regulatory T cells are sufficient to protect adult mice from lethal autoimmunity. *European journal of immunology*.
- Meisel, C., J.C. Schefold, R. Pschowski, T. Baumann, K. Hetzger, J. Gregor, S. Weber-Carstens, D. Hasper, D. Keh, H. Zuckermann, P. Reinke, and H.D. Volk. 2009. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 180:640-648.
- Mellor, A.L., and D.H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews. Immunology*. 4:762-774.
- Milpied, P., A. Renand, J. Bruneau, D.A. Mendes-da-Cruz, S. Jacquelin, V. Asnafi, M.T. Rubio, E. MacIntyre, Y. Lepelletier, and O. Hermine. 2009. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *European journal of immunology*. 39:1466-1471.
- Miyao, T., S. Floess, R. Setoguchi, H. Luche, H.J. Fehling, H. Waldmann, J. Huehn, and S. Hori. 2012. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity*. 36:262-275.

- Monneret, G., A.L. Debard, F. Venet, J. Bohe, O. Hequet, J. Bienvenu, and A. Lepape. 2003. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Critical care medicine*. 31:2068-2071.
- Monneret, G., M.E. Finck, F. Venet, A.L. Debard, J. Bohe, J. Bienvenu, and A. Lepape. 2004. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunology letters*. 95:193-198.
- Moon, C., S.H. Kim, K.S. Park, B.K. Choi, H.S. Lee, J.B. Park, G.S. Choi, J.H. Kwan, J.W. Joh, and S.J. Kim. 2009. Use of epigenetic modification to induce FOXP3 expression in naive T cells. *Transplantation proceedings*. 41:1848-1854.
- Moore, K.W., R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 19:683-765.
- Mucida, D., N. Kutchukhidze, A. Erazo, M. Russo, J.J. Lafaille, and M.A. Curotto de Lafaille. 2005. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *The Journal of clinical investigation*. 115:1923-1933.
- Muenzer, J.T., C.G. Davis, B.S. Dunne, J. Unsinger, W.M. Dunne, and R.S. Hotchkiss. 2006. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. *Shock*. 26:565-570.
- Nadkarni, S., C. Mauri, and M.R. Ehrenstein. 2007. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *The Journal of experimental medicine*. 204:33-39.
- Nalos, M., B. Santner-Nanan, G. Parnell, B. Tang, A.S. McLean, and R. Nanan. 2012. Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 185:110-112.
- Nascimento, D.C., J.C. Alves-Filho, F. Sonego, S.Y. Fukada, M.S. Pereira, C. Benjamim, D.S. Zamboni, J.S. Silva, and F.Q. Cunha. 2010. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. *Critical care medicine*. 38:1718-1725.
- Nemzek, J.A., K.M. Hugunin, and M.R. Opp. 2008. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comparative medicine*. 58:120-128.
- Newell-Price, J., A.J. Clark, and P. King. 2000. DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 11:142-148.
- Nie, H., Y. Zheng, R. Li, T.B. Guo, D. He, L. Fang, X. Liu, L. Xiao, X. Chen, B. Wan, Y.E. Chin, and J.Z. Zhang. 2013. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. *Nature medicine*. 19:322-328.
- Nijsten, M.W., C.E. Hack, M. Helle, H.J. ten Duis, H.J. Klasen, and L.A. Aarden. 1991. Interleukin-6 and its relation to the humoral immune response and clinical parameters in burned patients. *Surgery*. 109:761-767.
- Nyirenda, M.H., L. Sanvito, P.J. Darlington, K. O'Brien, G.X. Zhang, C.S. Constantinescu, A. Bar-Or, and B. Gran. 2011. TLR2 stimulation drives human naive and effector regulatory T cells into a Th17-like phenotype with reduced suppressive function. *Journal of immunology*. 187:2278-2290.
- Oberg, H.H., T.T. Ly, S. Ussat, T. Meyer, D. Kabelitz, and D. Wesch. 2010. Differential but direct abolishment of human regulatory T cell suppressive capacity by various TLR2 ligands. *Journal of immunology*. 184:4733-4740.
- Ocklenburg, F., D. Moharregg-Khiabani, R. Geffers, V. Janke, S. Pfoertner, H. Garritsen, L. Groebe, J. Klemptner, K.E. Dittmar, S. Weiss, J. Buer, and M. Probst-Kepper. 2006. UBD, a downstream element of FOXP3, allows the identification of LGALS3, a new marker of human regulatory T cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 86:724-737.

- Ohkura, N., M. Hamaguchi, H. Morikawa, K. Sugimura, A. Tanaka, Y. Ito, M. Osaki, Y. Tanaka, R. Yamashita, N. Nakano, J. Huehn, H.J. Fehling, T. Sparwasser, K. Nakai, and S. Sakaguchi. 2012. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity*. 37:785-799.
- Okeke, E.B., I. Okwor, Z. Mou, P. Jia, and J.E. Uzonna. 2013. CD4+CD25+ regulatory T cells attenuate lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory responses and promotes survival in murine Escherichia coli infection. *Shock*. 40:65-73.
- Ono, S., A. Kimura, S. Hiraki, R. Takahata, H. Tsujimoto, M. Kinoshita, H. Miyazaki, J. Yamamoto, K. Hase, and D. Saitoh. 2013. Removal of increased circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers. *Surgery*. 153:262-271.
- Otto, G.P., M. Sossdorf, R.A. Claus, J. Rodel, K. Menge, K. Reinhart, M. Bauer, and N.C. Riedemann. 2011. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Critical care*. 15:R183.
- Oukka, M. 2007. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Annals of the rheumatic diseases*. 66 Suppl 3:iii87-90.
- Pachot, A., G. Monneret, N. Voirin, P. Leissner, F. Venet, J. Bohe, D. Payen, J. Bienvenu, B. Mouglin, and A. Lepape. 2005. Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clinical immunology*. 114:61-69.
- Palm, N.W., and R. Medzhitov. 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological reviews*. 227:221-233.
- Pandiyani, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M.J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology*. 8:1353-1362.
- Parameswaran, N., and S. Patial. 2010. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 20:87-103.
- Pastille, E., S. Didovic, D. Brauckmann, M. Rani, H. Agrawal, F.U. Schade, Y. Zhang, and S.B. Flohe. 2011. Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *Journal of immunology*. 186:977-986.
- Pelletier, M., C. Ratthe, and D. Girard. 2002. Mechanisms involved in interleukin-15-induced suppression of human neutrophil apoptosis: role of the anti-apoptotic Mcl-1 protein and several kinases including Janus kinase-2, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases-1/2. *FEBS letters*. 532:164-170.
- Pene, F., D. Grimaldi, B. Zuber, B. Sauneuf, C. Rousseau, C. El Hachem, C. Martin, N. Belaidouni, V. Balloy, J.P. Mira, and J.D. Chiche. 2012. Toll-like receptor 2 deficiency increases resistance to Pseudomonas aeruginosa pneumonia in the setting of sepsis-induced immune dysfunction. *The Journal of infectious diseases*. 206:932-942.
- Perales, M.A., J.D. Goldberg, J. Yuan, G. Koehne, L. Lechner, E.B. Papadopoulos, J.W. Young, A.A. Jakubowski, B. Zaidi, H. Gallardo, C. Liu, T. Rasalan, J.D. Wolchok, T. Croughs, M. Morre, S.M. Devlin, and M.R. van den Brink. 2012. Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 120:4882-4891.
- Pillay, J., V.M. Kamp, E. van Hoffen, T. Visser, T. Tak, J.W. Lammers, L.H. Ulfman, L.P. Leenen, P. Pickkers, and L. Koenderman. 2012. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *The Journal of clinical investigation*. 122:327-336.

- Poehlmann, H., J.C. Schefold, H. Zuckermann-Becker, H.D. Volk, and C. Meisel. 2009. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Critical care*. 13:R119.
- Polansky, J.K., K. Kretschmer, J. Freyer, S. Floess, A. Garbe, U. Baron, S. Olek, A. Hamann, H. von Boehmer, and J. Huehn. 2008. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *European journal of immunology*. 38:1654-1663.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 282:2085-2088.
- Probst-Kepper, M., R. Geffers, A. Kroger, N. Viegas, C. Erck, H.J. Hecht, H. Lunsdorf, R. Roubin, D. Moharreggh-Khiabani, K. Wagner, F. Ocklenburg, A. Jeron, H. Garritsen, T.P. Arstila, E. Kekalainen, R. Balling, H. Hauser, J. Buer, and S. Weiss. 2009. GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 13:3343-3357.
- Reik, W., W. Dean, and J. Walter. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 293:1089-1093.
- Remick, D.G., D.E. Newcomb, G.L. Bolgos, and D.R. Call. 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*. 13:110-116.
- Ren, X., F. Ye, Z. Jiang, Y. Chu, S. Xiong, and Y. Wang. 2007. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell death and differentiation*. 14:2076-2084.
- Rittirsch, D., L.M. Hoesel, and P.A. Ward. 2007. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of leukocyte biology*. 81:137-143.
- Rivers, E., B. Nguyen, S. Havstad, J. Ressler, A. Muzzin, B. Knoblich, E. Peterson, M. Tomlanovich, and G. Early Goal-Directed Therapy Collaborative. 2001. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*. 345:1368-1377.
- Rosenkranz, D., S. Weyer, E. Tolosa, A. Gaenslen, D. Berg, T. Leyhe, T. Gasser, and L. Stoltze. 2007. Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *Journal of neuroimmunology*. 188:117-127.
- Russell, J.H., and T.J. Ley. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*. 20:323-370.
- Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*. 22:531-562.
- Sakaguchi, S., M. Miyara, C.M. Costantino, and D.A. Hafler. 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology*. 10:490-500.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 155:1151-1164.
- Samstein, R.M., A. Arvey, S.Z. Josefowicz, X. Peng, A. Reynolds, R. Sandstrom, S. Neph, P. Sabo, J.M. Kim, W. Liao, M.O. Li, C. Leslie, J.A. Stamatoyannopoulos, and A.Y. Rudensky. 2012. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell*. 151:153-166.
- Santner-Nanan, B., N. Seddiki, E. Zhu, V. Quent, A. Kelleher, B. Fazekas de St Groth, and R. Nanan. 2008. Accelerated age-dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype. *International immunology*. 20:375-383.

- Saraiva, M., and A. O'Garra. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology*. 10:170-181.
- Sarris, M., K.G. Andersen, F. Randow, L. Mayr, and A.G. Betz. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity*. 28:402-413.
- Scalapino, K.J., Q. Tang, J.A. Bluestone, M.L. Bonyhadi, and D.I. Daikh. 2006. Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *Journal of immunology*. 177:1451-1459.
- Schmetterer, K.G., A. Neunkirchner, and W.F. Pickl. 2012. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 26:2253-2276.
- Schmidl, C., M. Klug, T.J. Boeld, R. Andreesen, P. Hoffmann, M. Edinger, and M. Rehli. 2009. Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. *Genome research*. 19:1165-1174.
- Schmitz, I., C. Schneider, A. Frohlich, H. Frebel, D. Christ, W.J. Leonard, T. Sparwasser, A. Oxenius, S. Freigang, and M. Kopf. 2013. IL-21 restricts virus-driven Treg cell expansion in chronic LCMV infection. *PLoS pathogens*. 9:e1003362.
- Schneider, U., H.U. Schwenk, and G. Bornkamm. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 19:621-626.
- Scumpia, P.O., M.J. Delano, K.M. Kelly-Scumpia, J.S. Weinstein, J.L. Wynn, R.D. Winfield, C. Xia, C.S. Chung, A. Ayala, M.A. Atkinson, W.H. Reeves, M.J. Clare-Salzler, and L.L. Moldawer. 2007. Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. *Blood*. 110:3673-3681.
- Scumpia, P.O., M.J. Delano, K.M. Kelly, K.A. O'Malley, P.A. Efron, P.F. McAuliffe, T. Brusko, R. Ungaro, T. Barker, J.L. Wynn, M.A. Atkinson, W.H. Reeves, M.J. Salzler, and L.L. Moldawer. 2006. Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *Journal of immunology*. 177:7943-7949.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S.I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St Groth. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of experimental medicine*. 203:1693-1700.
- Seder, R.A., W.E. Paul, M.M. Davis, and B. Fazekas de St Groth. 1992. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *The Journal of experimental medicine*. 176:1091-1098.
- Sehouli, J., C. Loddenkemper, T. Cornu, T. Schwachula, U. Hoffmuller, A. Grutzkau, P. Lohneis, T. Dickhaus, J. Grone, M. Kruschewski, A. Mustea, I. Turbachova, U. Baron, and S. Olek. 2011. Epigenetic quantification of tumor-infiltrating T-lymphocytes. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 6:236-246.
- Seitz, M., P. Loetscher, B. Dewald, H. Towbin, H. Gallati, and M. Baggiolini. 1995. Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts. *European journal of immunology*. 25:1129-1132.
- Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of experimental medicine*. 201:723-735.

- Sha, Y., J. Zmijewski, Z. Xu, and E. Abraham. 2008. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *Journal of immunology*. 180:2531-2537.
- Shah, D.K., and J.C. Zuniga-Pflucker. 2014. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *Journal of immunology*. 192:4017-4023.
- Shibui, A., N. Hozumi, C. Shiraishi, Y. Sato, H. Iida, S. Sugano, and J. Watanabe. 2009. CD4(+) T cell response in early erythrocytic stage malaria: Plasmodium berghei infection in BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasitology research*. 105:281-286.
- Solomon, B.D., C. Mueller, W.J. Chae, L.M. Alabanza, and M.S. Bynoe. 2011. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:2040-2045.
- Song, G.Y., C.S. Chung, I.H. Chaudry, and A. Ayala. 1999. What is the role of interleukin 10 in polymicrobial sepsis: anti-inflammatory agent or immunosuppressant? *Surgery*. 126:378-383.
- Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology*. 21:139-176.
- Stephan, F., K. Yang, J. Tankovic, C.J. Soussy, G. Dhonneur, P. Duvaldestin, L. Brochard, C. Brun-Buisson, A. Harf, and C. Delclaux. 2002. Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients. *Critical care medicine*. 30:315-322.
- Sun, C.M., J.A. Hall, R.B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J.R. Mora, and Y. Belkaid. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine*. 204:1775-1785.
- Sutmoller, R.P., M.H. den Brok, M. Kramer, E.J. Bennink, L.W. Toonen, B.J. Kullberg, L.A. Joosten, S. Akira, M.G. Netea, and G.J. Adema. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation*. 116:485-494.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine*. 192:303-310.
- Takeuchi, T., K. Amano, H. Sekine, J. Koide, and T. Abe. 1993. Upregulated expression and function of integrin adhesive receptors in systemic lupus erythematosus patients with vasculitis. *The Journal of clinical investigation*. 92:3008-3016.
- Thornton, A.M., P.E. Kory, D.Q. Tran, E.A. Wohlfert, P.E. Murray, Y. Belkaid, and E.M. Shevach. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology*. 184:3433-3441.
- Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine*. 188:287-296.
- Toker, A., D. Engelbert, G. Garg, J.K. Polansky, S. Floess, T. Miyao, U. Baron, S. Duber, R. Geffers, P. Giehr, S. Schallenberg, K. Kretschmer, S. Olek, J. Walter, S. Weiss, S. Hori, A. Hamann, and J. Huehn. 2013. Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *Journal of immunology*. 190:3180-3188.
- Tone, Y., K. Furuuchi, Y. Kojima, M.L. Tykocinski, M.I. Greene, and M. Tone. 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature immunology*. 9:194-202.
- Tost, J. 2010. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Molecular biotechnology*. 44:71-81.

- Toti, P., C. De Felice, R. Occhini, K. Schuerfeld, M. Stumpo, M.C. Epistolato, R. Vatti, and G. Buonocore. 2004. Spleen depletion in neonatal sepsis and chorioamnionitis. *American journal of clinical pathology*. 122:765-771.
- Tran, D.Q., J. Andersson, R. Wang, H. Ramsey, D. Unutmaz, and E.M. Shevach. 2009. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:13445-13450.
- Unsinger, J., M. McGlynn, K.R. Kasten, A.S. Hoekzema, E. Watanabe, J.T. Muenzer, J.S. McDonough, J. Tschoep, T.A. Ferguson, J.E. McDunn, M. Morre, D.A. Hildeman, C.C. Caldwell, and R.S. Hotchkiss. 2010. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *Journal of immunology*. 184:3768-3779.
- Valencia, X., and P.E. Lipsky. 2007. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in autoimmune diseases. *Nature clinical practice. Rheumatology*. 3:619-626.
- Valencia, X., C. Yarboro, G. Illei, and P.E. Lipsky. 2007. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology*. 178:2579-2588.
- van der Poll, T., A. Marchant, W.A. Buurman, L. Berman, C.V. Keogh, D.D. Lazarus, L. Nguyen, M. Goldman, L.L. Moldawer, and S.F. Lowry. 1995. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *Journal of immunology*. 155:5397-5401.
- van der Poll, T., and S.M. Opal. 2008. Host-pathogen interactions in sepsis. *The Lancet infectious diseases*. 8:32-43.
- Vang, K.B., J. Yang, S.A. Mahmud, M.A. Burchill, A.L. Vegoe, and M.A. Farrar. 2008. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *Journal of immunology*. 181:3285-3290.
- Venet, F., C.S. Chung, H. Kherouf, A. Geeraert, C. Malcus, F. Poitevin, J. Bohe, A. Lepape, A. Ayala, and G. Monneret. 2009. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive care medicine*. 35:678-686.
- Venet, F., C.S. Chung, G. Monneret, X. Huang, B. Horner, M. Garber, and A. Ayala. 2008. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *Journal of leukocyte biology*. 83:523-535.
- Venet, F., O. Filipe-Santos, A. Lepape, C. Malcus, F. Poitevin-Later, A. Grives, N. Plantier, N. Pasqual, and G. Monneret. 2013. Decreased T-cell repertoire diversity in sepsis: a preliminary study. *Critical care medicine*. 41:111-119.
- Venet, F., A.P. Foray, A. Villars-Mechin, C. Malcus, F. Poitevin-Later, A. Lepape, and G. Monneret. 2012. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *Journal of immunology*. 189:5073-5081.
- Venet, F., A. Pachot, A.L. Debard, J. Bohe, J. Bienvenu, A. Lepape, and G. Monneret. 2004. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Critical care medicine*. 32:2329-2331.
- Walley, K.R., N.W. Lukacs, T.J. Standiford, R.M. Strieter, and S.L. Kunkel. 1997. Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. *Infection and immunity*. 65:3847-3851.
- Wang, R., L. Kozhaya, F. Mercer, A. Khaitan, H. Fujii, and D. Unutmaz. 2009. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:13439-13444.
- Ward, P.A. 2004. The dark side of C5a in sepsis. *Nature reviews. Immunology*. 4:133-142.
- Ward, P.A. 2011. Immunosuppression in sepsis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 306:2618-2619.

- Weaver, C.T., R.D. Hatton, P.R. Mangan, and L.E. Harrington. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual review of immunology*. 25:821-852.
- Weber, M., and D. Schubeler. 2007. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Current opinion in cell biology*. 19:273-280.
- Webster, N.R., and H.F. Galley. 2009. Immunomodulation in the critically ill. *British journal of anaesthesia*. 103:70-81.
- Weiss, J.M., A.M. Bilate, M. Gobert, Y. Ding, M.A. Curotto de Lafaille, C.N. Parkhurst, H. Xiong, J. Dolpady, A.B. Frey, M.G. Ruocco, Y. Yang, S. Floess, J. Huehn, S. Oh, M.O. Li, R.E. Niec, A.Y. Rudensky, M.L. Dustin, D.R. Littman, and J.J. Lafaille. 2012. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine*. 209:1723-1742, S1721.
- Wherry, E.J. 2011. T cell exhaustion. *Nature immunology*. 12:492-499.
- Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry. 1980. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *The Journal of surgical research*. 29:189-201.
- Wieczorek, G., A. Asemisen, F. Model, I. Turbachova, S. Floess, V. Liebenberg, U. Baron, D. Stauch, K. Kotsch, J. Pratschke, A. Hamann, C. Loddenkemper, H. Stein, H.D. Volk, U. Hoffmuller, A. Grutzkau, A. Mustea, J. Huehn, C. Scheibenbogen, and S. Olek. 2009. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer research*. 69:599-608.
- Wilson, C.B., E. Rowell, and M. Sekimata. 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nature reviews. Immunology*. 9:91-105.
- Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 322:271-275.
- Wong, C.P., L.P. Nguyen, S.K. Noh, T.M. Bray, R.S. Bruno, and E. Ho. 2011. Induction of regulatory T cells by green tea polyphenol EGCG. *Immunology letters*. 139:7-13.
- Workman, C.J., A.L. Szymczak-Workman, L.W. Collison, M.R. Pillai, and D.A. Vignali. 2009. The development and function of regulatory T cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 66:2603-2622.
- Workman, C.J., and D.A. Vignali. 2005. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *Journal of immunology*. 174:688-695.
- Yadav, M., C. Louvet, D. Davini, J.M. Gardner, M. Martinez-Llordella, S. Bailey-Bucktrout, B.A. Anthony, F.M. Sverdrup, R. Head, D.J. Kuster, P. Ruminski, D. Weiss, D. Von Schack, and J.A. Bluestone. 2012. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 209:1713-1722, S1711-1719.
- Zanin-Zhorov, A., L. Cahalon, G. Tal, R. Margalit, O. Lider, and I.R. Cohen. 2006. Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *The Journal of clinical investigation*. 116:2022-2032.
- Zarek, P.E., C.T. Huang, E.R. Lutz, J. Kowalski, M.R. Horton, J. Linden, C.G. Drake, and J.D. Powell. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*. 111:251-259.
- Zeschnigk, M., S. Bohringer, E.A. Price, Z. Onadim, L. Masshofer, and D.R. Lohmann. 2004. A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic acids research*. 32:e125.
- Zeschnigk, M., D. Lohmann, and B. Horsthemke. 1999. A PCR test for the detection of hypermethylated alleles at the retinoblastoma locus. *Journal of medical genetics*. 36:793-794.

- Zhang, Y., Y. Zhou, J. Lou, J. Li, L. Bo, K. Zhu, X. Wan, X. Deng, and Z. Cai. 2010. PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Critical care*. 14:R220.
- Zhao, G., C. Liu, Z. Kou, T. Gao, T. Pan, X. Wu, H. Yu, Y. Guo, Y. Zeng, L. Du, S. Jiang, S. Sun, and Y. Zhou. 2014. Differences in the pathogenicity and inflammatory responses induced by avian influenza A/H7N9 virus infection in BALB/c and C57BL/6 mouse models. *PloS one*. 9:e92987.
- Zheng, S.G., J. Wang, P. Wang, J.D. Gray, and D.A. Horwitz. 2007. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *Journal of immunology*. 178:2018-2027.
- Zheng, Y., S. Josefowicz, A. Chaudhry, X.P. Peng, K. Forbush, and A.Y. Rudensky. 2010. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature*. 463:808-812.
- Zhou, A.X., L. Kozhaya, H. Fujii, and D. Unutmaz. 2013. GARP-TGF-beta complexes negatively regulate regulatory T cell development and maintenance of peripheral CD4+ T cells in vivo. *Journal of immunology*. 190:5057-5064.
- Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone. 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature immunology*. 10:1000-1007.
- Zhou, X., J. Wang, W. Shi, D.D. Brand, Z. Liu, H. Fan, and S.G. Zheng. 2010. Isolation of purified and live Foxp3+ regulatory T cells using FACS sorting on scatter plot. *Journal of molecular cell biology*. 2:164-169.
- Ziegler, E.J., C.J. Fisher, Jr., C.L. Sprung, R.C. Straube, J.C. Sadoff, G.E. Foulke, C.H. Wortel, M.P. Fink, R.P. Dellinger, N.N. Teng, and et al. 1991. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *The New England journal of medicine*. 324:429-436.
- Ziegler, S.F. 2007. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *European journal of immunology*. 37:21-23.
- Zigmond, E., B. Bernshtein, G. Friedlander, C.R. Walker, S. Yona, K.W. Kim, O. Brenner, R. Krauthgamer, C. Varol, W. Muller, and S. Jung. 2014. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity*. 40:720-733.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
5-Aza	5-Azacytidin
5-Aza-dC	5-Aza-2'-desoxycytidin
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	Absorption bei 260 nm / Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
ACCM	engl. <i>American College of Critical Care Medicine</i>
ACCP	engl. <i>American College of Chest Physicians</i>
ACK-Puffer	engl. <i>Ammonium-Chloride-Potassium-buffer</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	engl. <i>antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
Apc	Allophycocyanin
AT	Annealing-Temperatur
BAC	engl. <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BCL-2	engl. <i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	Basenpaare
CARS	engl. <i>Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester
CFU	engl. <i>colony forming unit</i> , koloniebildende Einheit
CLP	engl. <i>cecal ligation and puncture</i>
CNS	engl. <i>conserved non-coding DNA sequence</i>
CpG	Cytosin-phosphat-Guanin
cRNA	engl. <i>Coding RNA</i>
Ct	engl. <i>cycle threshold</i> , Fluoreszenzschwellenwert
CTL	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte</i> , Zytotoxische T-Lymphozyte
CTLA4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DAMP	engl. <i>danger-associated molecular patterns</i>
DC	engl. <i>dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
DEPC	Diethyldicarbonat

DEREG	engl. <i>Depletion of Regulatory T-cells</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphate
DT	Diphtherie-Toxin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGCG	Epigallocatechingallat
ELP	engl. <i>early lymphoid progenitor</i>
emPCR	engl. <i>emulsion-based PCR</i>
engl.	englisch
ENTPD1	engl. <i>ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1</i>
et al.	lat. <i>et altera</i> , und andere
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FAM	6-FAM-phosphoramidit
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> , Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	engl. <i>forkhead box protein P3</i>
GARP	engl. <i>glycoprotein-A repetitions predominant</i>
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
GITR	engl. <i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i>
GvHD	engl. <i>Graft-versus-Host-Disease</i>
H ₂ O	Wasser
HLA-DR	engl. <i>Human Leukocyte Antigen receptor</i> , humaner Leukozytenantigenrezeptor
HMGB1	engl. <i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
IBD	engl. <i>inflammatory bowel disease</i>
IDO	Indoleamin 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium

IPEX	engl. <i>Immundysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrom</i>
iTreg	induzierte Treg-Zellen
IVC	engl. <i>individual ventilated cage</i> , Individuell ventilierter Käfig
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
LAG3	engl. <i>lymphocyte activation gene 3</i>
lat.	lateinisch
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MALDI	engl. <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MBD	engl. <i>Methyl-CpG-binding domain</i>
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MIF	engl. <i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
mLN	mesenterischen Lymphknoten
mRNA	engl. <i>Messenger RNA</i>
n	Stichprobenumfang
NaOH	Natriumhydroxid
NFAT	engl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NGS	engl. <i>Next generation sequencing</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nrp1	Neuropilin-1
ns	nicht signifikant
nTreg	natürliche Treg-Zellen
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PB	Pacific Blue
PBS	engl. <i>phosphate buffer solution</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PD1	engl. <i>Programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	R-Phycoerythrin-Cyanin7
PMXF	engl. <i>polymyxin-B immobilized fibre</i>

PRR	engl. <i>Pattern-Recognition Receptor</i>
QAMA	engl. <i>quantitative analysis of methylated alleles</i>
qRT-PCR	engl. <i>quantitative real-time PCR</i>
R.T.	Raumtemperatur
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RORyT	engl. <i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
ROS	engl. <i>Reactive oxygen species</i>
rpm	engl. <i>revolutions per minut</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPS9	Ribosomales Protein 9
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAPS	engl. <i>Simplified Acute Physiology Score</i>
SAM	S-Adenosyl-Methionin
siRNA	engl. <i>Small interfering RNA</i>
SIRS	engl. <i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SPF	spezifisch-pathogen-frei
STAT	engl. <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tab.	Tabelle
Tale-TET	engl. <i>transcription activator-like effector - Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCR	engl. <i>T-cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TE	Tris/EDTA
Teff	Effektor T-Zelle
Th	T-Helfer Zelle
TLR	engl. <i>toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TSB	engl. <i>Tryptic Soy Broth</i>
TSDR	engl. <i>Treg-specific demethylated region</i> , Treg-spezifische demethylierte Region
U	engl. <i>Unit</i> , Einheit
UV	Ultraviolett

Vgl.	Vergleich
VIC	4,7,2'-trichloro-7'-phenyl-6-carboxyfluorescein
WT	Wildtyp

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1, S.12:	Inhibitionsmechanismen regulatorischer T-Zellen.
Abb. 1.2, S.17:	Enzymatische Reaktion von Cytosin zu 5-Methylcytosin
Abb. 1.3, S.19:	Darstellung epigenetischen Regulationsmechanismen der <i>FOXP3</i> -Expression.
Abb. 1.4, S.23:	Darstellung der Inflammationskinetik einer Sepsis.
Abb. 1.5, S.24:	Reaktionskaskade des angeborenen und adaptiven Immunsystems während einer Sepsis.
Abb. 2.1, S.54:	Anwendung der CLP-Methode an einer Maus.
Abb. 3.1, S.57:	Schematische Darstellung von <i>FOXP3</i> .
Abb. 3.2, S.57:	DNA-Teilsequenz von <i>FOXP3</i> mit den drei von den Sonden überdeckten CpGs.
Abb. 3.3, S.58:	Amplifikation mit dem hFOXP3Seq- <i>Primer</i> paar aus dem RPCIB753C201037Q Plasmid.
Abb. 3.4, S.59:	Darstellung der berechneten <i>FOXP3</i> -Eichkurve
Abb. 3.5, S.62:	<i>Gating</i> -Strategie zur Quantifizierung regulatorischer T-Zellen mittels FACS.
Abb. 3.6, S.62:	Septische Patienten besitzen einen im Vergleich zu Gesunden erhöhten Anteil an Treg Zellen.
Abb. 3.7, S.62:	Korrelation der methylierungssensitiven qRT-PCR und der durchflusszytometrischen Analyse bei der Quantifizierung von Treg-Zellen.
Abb. 3.8, S.64:	Gewichtsverlauf und Belastungspunkte septischer Mäuse.
Abb. 3.9, S.64:	Überlebenskurven von CLP- und sham-Mäusen.
Abb. 3.10, S.65:	Anstieg des Anteils an Treg-Zellen in der CD4 ⁺ T-Zell-population während einer polymikrobiellen Sepsis.
Abb. 3.11, S.66:	Schematische Darstellung des murinen <i>foxp3</i>
Abb. 3.12, S.67:	Untersuchung des DNA-Methylierungsgrades von CpGs der <i>foxp3</i> -TSDR in CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ T-Effektorzellen und CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg-Zellen

- Abb. 3.13, S.67: Amplifikation mit den mFoxp3Seq-*Primer*paar aus genomischer DNA von Milzzellen.
- Abb. 3.14, S.69: Methylierungs- und Expressionsanalysen verschiedener Foxp3 und Nrp1 exprimierender T-Zellen
- Abb. 3.15, S.70: Funktionelle Analysen verschiedener Foxp3 und Nrp1 exprimierender T-Zellen.
- Abb. 3.16, S.71: Reduzierter Anteil an CD4⁺ T-Zellen während einer Sepsis
- Abb. 3.17, S.72: Versuchsablauf zur Untersuchung der Rolle von Treg-Zellen für die pro-inflammatorischen Phase.
- Abb. 3.18, S.73: Eine Treg-Depletion in der frühen Phase einer Sepsis bewirkt einen schwereren Verlauf.
- Abb. 3.19, S.74: Eine Treg-Depletion während der frühen Phase einer Sepsis reduziert die Überlebensrate.
- Abb. 3.20, S.74: Anstieg an Foxp3⁺ T-Zellen während einer Sepsis und Effektivität der Depletion durch DT.
- Abb. 3.21, S.75: Serumspiegelkonzentrationen von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in der frühen Phase einer Sepsis.
- Abb. 3.22, S.76: Versuchsablauf zur Untersuchung der Rolle von Treg-Zellen für die anti-inflammatorischen Phase
- Abb. 3.23, S.77: Die Depletion von Treg-Zellen während einer Sekundärinfektion beeinflusst nicht den Schweregrad und Gewichtsverlauf einer Sepsis
- Abb. 3.24, S.77: Die Treg-Depletion während einer Sekundärinfektion beeinflusst nicht die Überlebensrate.
- Abb. 3.25, S.78: Anstieg an Foxp3⁺ T-Zellen während einer Sepsis in DT- und PBS-behandelten DEREK-Mäusen
- Abb. 3.26, S.79: Einfluss der DT-Applikation auf das Zytokinprofil während einer Sekundärinfektion in der Spätphase einer Sepsis.
- Abb. 3.27, S.80: Einfluss eines TLR2-Knockouts auf den Gewichtsverlauf und Schweregrad einer CLP und Sekundärinfektion.
- Abb. 3.28, S.81: Eine TLR2-Defizienz beeinflusst nicht die Überlebensrate nach CLP, verbessert aber die Überlebensrate nach Sekundärinfektion.

- Abb. 3.29, S.82: Verlauf des Treg-Zell-Anteils in TLR2^{-/-}- und WT-Mäusen nach CLP und Sekundärinfektion.
- Abb. 3.30, S.83: TLR2^{-/-}-Mäuse besitzen während einer Sepsis mehr induzierte Treg-Zellen
- Abb. 3.31, S.84: Menge an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen nach CLP und Sekundärinfektion im Blut von WT- und TLR2^{-/-}-Mäusen.
- Abb. 3.32, S.86: 5-Aza-dC und EGCG reduzieren die globale DNA-Methylierung in Jurkat-Zellen.
- Abb. 3.33, S.87: 5-Aza-dC und EGCG induzieren eine erhöhte *FOXP3*- und *LRRC32*-Expression in Jurkat-Zellen.
- Abb. 3.34, S.88: Reduktion der globalen DNA-Methylierung durch 5-Aza-dC und EGCG in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen.
- Abb. 3.35, S.89: Reduktion der *FOXP3*-TSDR Methylierung durch 5-Aza-dC in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen.
- Abb. 3.36, S.90: 5-Aza-dC und EGCG wirken in hohen Konzentrationen toxisch auf CD4⁺CD25⁻ T-Zellen
- Abb. 3.37, S.91: Kultivierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit DNMT-Inhibitoren induziert die Expression Treg-spezifischer Moleküle.
- Abb. 3.38, S.92: DNMT-Inhibitoren senken die proliferative Aktivität, induzieren aber keinen suppressiven Phänotyp in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen
- Abb. 3.39, S.93: *Gene array* Analyse Treg- und CD4⁺CD25⁻ T-Zell-typischer Gene
- Abb. 3.40, S.94: CD4⁺CD25⁻ T-Zellen exprimieren nach Stimulation mit 5-Aza-dC Th1-Zell-spezifische Gene.
- Abb. 3.41, S.95: Einfluss von 5-Aza-dC und EGCG auf die Expression Th2-spezifischer Gene in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen.
- Abb. 3.42, S.95: CD4⁺CD25⁻ T-Zellen exprimieren nach Stimulation mit DNMT-Inhibitoren Th17-Zell-spezifische Gene

7. 3 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1.1, S.21: Klinische Anzeichen einer SIRS
- Tab. 2.1, S.30: Verwendete Chemikalien

Tab. 2.2, S.31:	Verwendete Puffer, Medien und Lösungen
Tab. 2.3, S.34:	Verwendete <i>Primer</i> für die Bestimmung der mRNA-Expression
Tab. 2.4, S.35:	Verwendete <i>Primer</i> zur Typisierung von Mäusen
Tab. 2.5, S.35:	Verwendete <i>Primer</i> in der methylierungs-sensitiven qRT-PCR
Tab. 2.6, S.36:	Verwendete Taqman Sonden in methylierungs-sensitiven qRT-PCR
Tab. 2.7, S.36:	Verwendete Enzyme
Tab. 2.8, S.36:	Murine Antikörper
Tab. 2.9, S.37:	Humane Antikörper
Tab. 2.10, S.37:	Verwendete Fluorochrome
Tab. 2.11, S.38:	Verwendete <i>Kits</i>
Tab. 2.12, S.38:	Verwendete Geräte
Tab. 2.13, S.39:	Reaktionsansatz für die Genotypisierung transgener Mäuse
Tab. 2.14, S.40:	PCR-Programm zur Genotypisierung transgener Mäuse
Tab. 2.15, S.41:	Reaktionsansatz für die <i>Primer</i> hybridisierung
Tab. 2.16, S.41:	Enzymmix für cDNA-Synthese
Tab. 2.17, S.41:	Reaktionsansatz für eine SYBR-green qRT-PCR
Tab. 2.18, S.42:	PCR-Programm zur Bestimmung der mRNA-Expression
Tab. 2.19, S.44:	PCR-Reaktionsansatz
Tab. 2.20, S.44:	PCR-Programm für die Generierung der <i>FOXP3</i> -TSDR Standardkurve
Tab. 2.21, S.46:	Reaktionsansatz für die Quantifizierung natürlicher Treg-Zellen
Tab. 2.22, S.46:	PCR-Programm für die Quantifizierung natürlicher Treg-Zellen
Tab. 2.23, S.46:	PCR-Touchdown-Programm für die Vorbereitung von <i>NGS</i> -Proben
Tab. 3.1, S.59:	Etablierung der QAMA-Standardkurve
Tab. 3.2, S.59:	Validierung der QAMA-Eichreihe mit definierten Zellgemischen.
Tab. 3.3, S.60:	Validierung der QAMA-Eichreihe mittels definierten DNA-Gemischen
Tab. 3.4, S.60:	Eigenschaften der untersuchten Individuen
Tab. 3.5, S.68:	Quantifizierung verschiedener Zellgemische aus murinen Treg-Zellen und T-Effektorzellen
Tab. 3.6, S.85:	Mittels MALDI-MS im Blut septischer Mäuse identifizierte Bakterien

8 Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

10 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen für den Verlauf einer Sepsis“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Roman Tatura befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. Jan Buer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Roman Tatura

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Roman Tatura