



Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Institut für Virologie und Immunbiologie

**Induktion und Aktivierung regulatorischer T-Zellen durch
superagonistische Stimulation des CD28 Moleküls**

**Induction and activation of regulatory T-cells by
superagonistic stimulation of the CD28 molecule**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infection and Immunity

Vorgelegt von

Daniela Monika Langenhorst

aus

Würzburg

Würzburg, 2013



Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Manfred Gessler

1. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Hünig

2. Betreuer: Prof. Dr. Manfred Lutz

3. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Induktion und Aktivierung regulatorischer T-Zellen durch superagonistische Stimulation des CD28 Moleküls“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuerst bei Prof. Dr. Thomas Hünig für die ausgezeichnete Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und die Aufgeschlossenheit gegenüber meiner Familienplanung.

Bei Prof. Dr. Manfred Lutz und Prof. Dr. Thomas Müller bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung als Zweit- und Dritt-Gutachter.

Ein großes Dankeschön geht an meine derzeitigen und ehemaligen Laborkollegen, allen voran Tea Gogishvili, Shin-Young Na, Susanne Berr, Monika Fröhlich, Julia Fischer, Tobias Gulde sowie Christian Linden, Beate Geyer, Karin Elflein, Christian Bauer, Paula Römer, Paula Tabares und Verena Schneider, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch bei den Mitgliedern der AG Lutz (insbesondere Eliana Ribechini and Sarah Sandwich), der AG Herrmann und der AG Kerkau/Beyersdorf, sowie den Tierstallmitarbeitern möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken.

Stefan Klein-Heßling danke ich für seine zahlreichen, geduldigen Versuche, die C-T Konversion zu optimieren.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Mann, meinen Kindern, meinen Eltern und Schwiegereltern bedanken. Ohne eure großartige Unterstützung, Geduld und Motivation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	2
1 EINLEITUNG	4
1.1 REGULATION DES IMMUNSYSTEMS.....	4
1.2 T-ZELLAKTIVIERUNG.....	5
1.2.1 <i>CD28 Kostimulation</i>	6
1.2.2 <i>CD28 Superagonisten (CD28SA)</i>	8
1.2.2.1 <i>CD28SA Effekte in Nagermodellen</i>	10
1.2.2.2 <i>CD28SA Effekte im humanen System</i>	12
1.3 ENTWICKLUNG VON FOXP3 ⁺ REGULATORISCHEN T-ZELLEN	13
1.4 NATÜRLICHE REGULATORISCHE T-ZELLEN (NTREG)	15
1.4.1 <i>Charakterisierende Merkmale</i>	15
1.4.2 <i>TZR-Repertoire</i>	16
1.4.3 <i>CD28 Kostimulation in natürlichen regulatorischen T-Zellen</i>	16
1.4.4 <i>Migrationsverhalten, Homöostase und Überleben</i>	17
1.4.5 <i>Effektormechanismen</i>	18
1.5 INDUZIERTER REGULATORISCHER T-ZELLEN (ITREG).....	19
1.5.1 <i>Charakterisierende Merkmale</i>	19
1.5.2 <i>TZR-Repertoire</i>	20
1.5.3 <i>Generierung induzierter regulatorischer T-Zellen</i>	20
1.6 VERGLEICH NATÜRLICHER MIT INDUZIERTEN REGULATORISCHEN T-ZELLEN	21
1.7 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	22
1.8 ERKLÄRUNG ZUR MITWIRKUNG UND VORAUSGEHENDEN PUBLIKATIONEN	23
2 MATERIAL	24
2.1 GERÄTE	24
2.2 SOFTWARE.....	24
2.3 VERBRAUCHSMATERIAL	25
2.4 CHEMIKALIEN.....	25
2.5 LÖSUNGEN, PUFFER UND NÄHRMEDIEN	26
2.5.1 <i>Lösungen</i>	26
2.5.2 <i>Puffer</i>	26

2.5.3	<i>ELISA Lösungen</i>	26
2.5.4	<i>Nährmedien</i>	27
2.6	MÄUSE.....	27
2.7	ANTIKÖRPER	27
2.8	MAGNETISCHE PARTIKEL	28
2.9	BIOCHEMISCHE REAGENZIEN	28
2.10	REAGENZIEN KITS	29
3	METHODEN	29
3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	29
3.1.1	<i>Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen</i>	29
3.1.2	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	30
3.1.3	<i>Zellaufreinigung</i>	30
3.1.3.1	Negative Selektion von CD4 ⁺ bzw. CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen.....	30
3.1.3.2	Positive Selektion von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen.....	30
3.1.3.3	Anreicherung durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS-Sort).....	31
3.1.4	<i>Kultivierung von T-Zellen</i>	31
3.1.5	<i>In vitro Generierung induzierter regulatorischer T-Zellen</i>	31
3.1.5.1	mittels immobilisierten Antikörpern	32
3.1.5.2	mittels Antikörper-beschichteten Dynabeads.....	32
3.1.6	<i>In vitro Suppressionsassay</i>	32
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
3.2.1	<i>DNA Aufreinigung</i>	33
3.2.2	<i>Nachweis von DNA Methylierung</i>	33
3.3	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN.....	33
3.3.1	<i>In vivo Expansion mit CD28SA D665</i>	33
3.3.2	<i>Depletion regulatorischer T-Zellen in vivo</i>	33
3.3.3	<i>Induktion einer systemischen Zytokinausschüttung mit Corticosteroid Behandlung</i>	34
3.3.4	<i>Implantation eines Polyester-Polyurethan Schwämmchens</i>	34
3.3.5	<i>Adoptiver Zelltransfer</i>	34
3.4	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	34
3.4.1	<i>FACS-Analyse (Durchflusszytometrie)</i>	34
3.4.1.1	Extrazelluläre Färbung.....	34
3.4.1.2	Intrazelluläre Färbung	35

3.4.1.3	Annexin V- und 7AAD-Färbung	35
3.4.2	ELISA.....	36
3.4.3	Cytometric Bead Array.....	36
3.4.4	IL-10 Sekretionsassay	37
4	ERGEBNISSE	38
4.1	EINFLUSS REGULATORISCHER T-ZELLEN AUF DIE ZYTOKINAUSSCHÜTTUNG IN CD28SA BEHANDELTEN MÄUSEN	38
4.1.1	Wirkung von CD28SA auf regulatorische T-Zellen.....	38
4.1.2	IL-2 Abhängigkeit der CD28SA vermittelten CD4 ⁺ T-Zellproliferation	42
4.1.3	Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die systemische Zytokinausschüttung in CD28SA behandelten Mäusen	43
4.1.4	Einfluss von Corticosteroiden auf regulatorische T-Zellen nach CD28SA Behandlung.....	47
4.1.5	Zusammenfassung	50
4.2	URSPRUNG UND SCHICKSAL INTERLEUKIN-10 PRODUZIERENDER REGULATORISCHER T-ZELLEN	51
4.2.1	CD28 Superagonist induzierte IL-10 Produktion in regulatorischen T-Zellen...	52
4.2.2	Phänotyp IL-10 produzierender regulatorischer T-Zellen.....	55
4.2.3	Funktionalität IL-10 produzierender regulatorischer T-Zellen.....	58
4.2.4	Migration CD28SA stimulierter regulatorischer T-Zellen	60
4.2.5	Stabilität der IL-10 Produktion regulatorischer T-Zellen <i>in vitro</i>	63
4.2.6	Induktion der IL-10 Produktion in IL-10 negativen regulatorischen T-Zellen	65
4.2.6.1	Stabilität der IL-10 produzierenden Tregs <i>in vitro</i>	65
4.2.6.2	Akquisition der IL-10 Produktion von Tregs <i>in vivo</i>	67
4.2.7	Apoptosesensitivität IL-10 produzierender regulatorischer T-Zellen	68
4.2.8	Zusammenfassung	72
4.3	DIE ROLLE DER CD28 KOSTIMULATION BEI DER KONVERSION KONVENTIONELLER ZU REGULATORISCHEN CD4 ⁺ T-ZELLEN	74
4.3.1	Konversion zu regulatorischen T-Zellen bei suboptimaler T-Zellrezeptor Stimulation	74
4.3.2	Einfluss von IL-2 und TGFβ auf die Konversion von konventionellen zu regulatorischen CD4 ⁺ T-Zellen.....	80
4.3.3	Phänotyp induzierter regulatorischer T-Zellen	81
4.3.4	Stabilität und Funktionalität induzierter regulatorischer T-Zellen.....	85

	4.3.5 Zusammenfassung	88
5	DISKUSSION.....	90
5.1	KOMBINATION AUS CD28SA UND CORTICOSTEROIDEN ALS ANTI-INFLAMMATORISCHE THERAPIEMÖGLICHKEIT?	90
5.2	IL-10 PRODUZIERENDE REGULATORISCHE T-ZELLEN ALS TERMINALDIFFERENZIERTE ZELLEN.....	95
5.3	VERGLEICH INDUZIERTER MIT BONA FIDE REGULATORISCHEN T-ZELLEN.....	100
5.4	VIELFÄLTIGE EINSATZMÖGLICHKEITEN DER SUPERAGONISTISCHEN STIMULATION DES CD28 MOLEKÜLS	104
6	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	106
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	109
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	113
9	LEBENS LAUF	130

Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (Tregs) spielen eine entscheidende Rolle beim Erhalt der Immunhomöostase und bei der Kontrolle überschießender Immunantworten. Sie können anhand ihres Entstehungsortes in im Thymus generierte natürliche Tregs (nTregs) und in der Peripherie generierte induzierte Tregs (iTregs) unterteilt werden. Ihr Phänotyp wie auch ihre Funktion werden zu einem großen Teil durch den transkriptionellen Masterregulator Foxp3 kontrolliert. Das kostimulatorische Molekül CD28 wird von nTregs für die Differenzierung benötigt und von Tregs und konventionellen T-Zellen (Tkons) für ihre Aktivierung. Superagonistische CD28 spezifische monoklonale Antikörper (CD28SA) aktivieren T-Zellen im Gegensatz zu konventionellen anti-CD28 Antikörpern ohne zusätzliche Ligation des T-Zellrezeptors. Die *in vivo* Applikation des CD28SA bewirkt eine starke Aktivierung der Tregs und eine präferentielle Expansion der Tregs gegenüber Tkons. Dies erklärt die präventive und therapeutische Wirkung der CD28SA Behandlung in verschiedenen Krankheitsmodellen bei Nagern. Die erste Anwendung des humanisierten CD28SA TGN1412 führte in den Testpersonen jedoch zu einem unerwarteten „Cytokine-Release Syndrom“. Daher wurde hier am Mausmodell der Zusammenhang zwischen Treg Aktivierung und systemischer Zytokinausschüttung näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die CD28SA vermittelte Proliferation der T-Zellen abhängig vom CD28 Signal und von parakrinem Interleukin (IL)-2 ist. Durch die *in vivo* Depletion der Tregs vor der CD28SA Injektion wurde deutlich, dass es auch in Mäusen nach CD28SA Stimulation zu einer systemischen Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine kommt, die jedoch, im Gegensatz zum humanen System, von Tregs effektiv kontrolliert werden kann. Um die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine zu verhindern, wäre eine zusätzliche prophylaktische Behandlung mit Corticosteroiden möglich, da diese auch in hohen Dosen die CD28SA vermittelte Aktivierung und Expansion der Tregs nicht beeinflussen.

Neben der Expansion wird durch die Stimulation mit CD28SA auch die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Tregs induziert und so eine genauere Untersuchung des Ursprungs und des Schicksals IL-10 produzierender Tregs ermöglicht. Diese Tregs exprimieren im Vergleich zu IL-10 negativen Tregs ein höheres Niveau an Molekülen, die mit einer supprimierenden Aktivität verbunden sind. Zudem werden IL-10 Produzenten aufgrund der Veränderung im Expressionsmuster der Migrationsrezeptoren nach der Stimulation von einem lymphknotensuchenden $CCR7^+CCR5^-CCR6^-$ zu einem entzündungssuchenden $CCR7^-CCR5^+CCR6^+$ Phänotyp verstärkt in Bereiche mit stattfindender Immunantwort rekrutiert. Schließlich sind IL-10 produzierende Tregs von CD28SA stimu-

lierten Mäusen *in vitro* stärker apoptoseanfällig als die IL-10 negativen Tregs. Die Aktivierung der Tregs scheint somit die terminale Differenzierung zu einem IL-10 produzierenden Effektorphänotyp mit begrenzter Lebensdauer zu induzieren. Dies führt auch zur Beendigung der Immunsuppression.

Die Kombination aus schwachem TZR und starkem CD28 Signal, die die CD28SA Stimulation in naiven T-Zellen auslöst, induziert zumindest *in vitro* abhängig von IL-2 und TGF β effizient die Expression von Foxp3. Die so generierten iTregs haben, ähnlich wie konventionell *in vitro* erzeugte iTregs, in Bezug auf die Expression von Oberflächenmolekülen und den Methylierungsstatus bestimmter Regionen des *Foxp3* Gens einen Phänotyp, der zwischen dem von Tcons und Tregs liegt. Da auch die supprimierende Aktivität der iTregs geringer ist als die der *ex vivo* Tregs bedarf es einer weiteren Optimierung des Stimulationsprotokolls, um diese Zellen für therapeutische Zwecke verwenden zu können.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die superagonistische Stimulation des CD28 Moleküls ein vielseitig einsetzbares Instrument ist. Einerseits können durch die CD28SA Stimulation Tregs polyklonal aktiviert und für therapeutische Zwecke mobilisiert werden und andererseits kann die besondere Art der T-Zellstimulation auch dazu genutzt werden, neue Aspekte von nTregs und iTregs zu untersuchen.

Summary

Regulatory T-cells (Tregs) are important to maintain immune homeostasis and to control overshooting immune responses. Depending on the place where they are generated Tregs can be divided into thymus-derived natural Tregs (nTregs) and peripheral-derived induced Tregs (iTregs). Their phenotype and function is controlled by the transcriptional master-regulator Foxp3. The costimulatory molecule CD28 is required for nTreg differentiation and for the activation of Tregs and conventional T-cells (Tcons). Superagonistic CD28 specific monoclonal antibodies (CD28SA) activate T-cells without additional T-cell receptor ligation in contrast to conventional anti-CD28 antibodies. *In vivo* CD28SA treatment induces strong Treg activation and preferential expansion of Tregs over Tcons. This explains the preventive and therapeutic effects of CD28SA in various rodent disease models. In contrast, a first-in-man trial of the human CD28SA TGN1412 resulted in an unexpected cytokine release syndrome. Thus, using the mouse system the relationship between Treg activation and systemic cytokine release was reinvestigated. It could be shown that CD28SA induced T-cell proliferation is dependent on the CD28 signal and on paracrine interleukin (IL)-2. *In vivo* depletion of Tregs prior CD28SA injection showed that in mice, too, CD28SA stimulation induces a systemic release of pro-inflammatory cytokines, but in contrast to humans,

this can be effectively controlled by Tregs. To prevent the pro-inflammatory cytokine release an additional prophylactic treatment with corticosteroids might be feasible since even high doses of corticosteroids have no effect on CD28SA driven Treg activation and expansion.

Beside expansion, CD28SA stimulation also induces the production of anti-inflammatory IL-10 in Tregs. This allows for examination of the origin and fate of IL-10 producing Tregs. In comparison to IL-10 negative Tregs, these cells express higher levels of molecules associated with suppressive activity. In addition IL-10 producers are preferentially recruited to sites of ongoing immune responses, as they shift their expression pattern of migration receptors after stimulation from a CCR7⁺CCR5⁻CCR6⁻ lymph node-seeking to a CCR7⁻CCR5⁺CCR6⁺ inflammation-seeking phenotype. Finally, IL-10 producing Tregs of CD28SA stimulated mice are more apoptosis-prone *in vitro* than their IL-10 negative counterparts. Thus, activation of Tregs induces terminal differentiation towards an IL-10 producing effector phenotype with a limited life span. This also terminates the immune suppression.

The special combination of weak TCR and strong CD28 signals following CD28SA stimulation of naïve T-cells can, at least *in vitro* and dependent on IL-2 and TGFβ, efficiently induce Foxp3 expression. The phenotype regarding expression of certain surface molecules and the methylation level of particular regulatory regions of the *Foxp3* gene is similar in CD28SA and anti-CD3/ anti-CD28 (+ IL-2/TGFβ) induced iTregs, and shows properties of both Tcons and Tregs. Since the suppressive activity of these iTregs is also lower than that of *ex vivo* Tregs, further improvement of the stimulation protocol is needed before these cells could be used for therapeutic purposes.

In conclusion, this study shows that superagonistic stimulation of CD28 molecules is a versatile tool. On the one hand CD28SA stimulation polyclonally activates Tregs and can be used as a therapeutic, on the other hand the special way of T-cell stimulation can also be utilized to investigate new aspects of nTregs and iTregs.

1 Einleitung

1.1 Regulation des Immunsystems

Das Immunsystem verteidigt den Organismus gegen Pathogene. Dabei bildet das angeborene Immunsystem mit den Epithelien, den Phagozyten und dem Komplementsystem die erste Verteidigungslinie. Wesentlich hierfür sind keimbahnkodierte Rezeptoren, sogenannte PRRs (*pattern recognition receptor*), die häufig vorkommende Merkmale von Pathogenen, sogenannten PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*), erkennen und eine entsprechende Immunantwort auslösen. Das adaptive Immunsystem, das aktiviert wird, wenn infektiöse Organismen diese erste Verteidigungslinie durchbrechen, verwendet dagegen eine große Fülle von Rezeptoren, die von zufällig rekombinierten Genen kodiert werden. Das Erzeugen vielfältiger Immunrezeptoren, die von T- und B-Zellen exprimiert werden, bietet dem Organismus einen guten Schutz vor den sich schnell weiterentwickelnden Pathogenen (Übersicht in Dempsey *et al.*, 2003). Umgekehrt macht dieses sehr anpassungsfähige Verteidigungssystem jedoch auch effektive Mechanismen zur Regulation erforderlich. Wichtig ist, dass das Immunsystem zwischen Eigen und Fremd und zwischen schädlichen (z.B. pathogenen Bakterien) und ungefährlichen (z.B. kommensalen Bakterien im Darm) Eindringlingen unterscheiden kann. Zudem muss nach einer stattgefundenen Immunantwort verhindert werden, dass das eigene Gewebe zerstört wird. Ermöglicht wird dies durch Mechanismen, die unter den Begriffen zentrale und periphere Toleranz zusammengefasst werden. Bei der zentralen Toleranz werden T- und B-Zellen, die einen durch zufällige Rekombination entstandenen selbstreaktiven Antigenrezeptor exprimieren, im Thymus bzw. im Knochenmark deletiert (negative Selektion) bzw. im Fall der B-Zellen der Antigenrezeptor so verändert, dass er Selbstantigene nicht mehr erkennen kann (Rezeptor-Editing) (Sandel *et al.*, 1999; Starr *et al.*, 2003). Trotz dieser Selektion gelangen einige selbstreaktive Lymphozyten in die Peripherie und machen weitere Toleranzmechanismen notwendig. Dazu zählt die Apoptose oder Anergie (fehlende Reaktion auf ein Antigen) von autoreaktiven T-Zellen, die durch das Fehlen bestimmter Signale (z.B. der später beschriebenen kostimulatorischen Signale) induziert wird. Ein weiterer wesentlicher Mechanismus der peripheren Toleranz ist die Suppression selbstreaktiver Lymphozyten durch eine Vielzahl von regulatorischen T-Zellen, wie z.B. Tr1 (*T regulatory type 1*) Zellen, T_H3 (*T helper cell type 3*) Zellen, CD8⁺ regulatorischen T-Zellen oder Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen (Shevach, 2006). Letztere sind Gegenstand dieser Arbeit.

1.2 T-Zellaktivierung

T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle im adaptiven Immunsystem. Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche T-Zellrezeptoren (TZR), mit deren Hilfe sie spezifische Antigene erkennen können. Der T-Zellrezeptor ist ein Heterodimer bestehend aus zwei transmembranen Polypeptidketten, die kovalent über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und bei den $\alpha\beta$ T-Zellen TZR α - und TZR β -Kette bzw. bei den seltener vorkommenden $\gamma\delta$ T-Zellen TZR γ - und TZR δ -Kette genannt werden (Übersicht in Starr *et al.*, 2003). T-Zellen können im Gegensatz zu B-Zellen ihr Antigen nur erkennen, wenn es an ein MHC (*major histocompatibility complex*)-Molekül gebunden ist. MHC-Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wie dendritischen Zellen (DZ) oder B-Zellen, exprimiert. Diese Zellen spalten sowohl Fremd- wie auch Eigenproteine in Peptide, beladen damit ihre MHC-Moleküle und präsentieren diese den T-Zellen (Übersicht in Blum *et al.*, 2013). Der TZR ist zudem nicht-kovalent mit je einem CD (*cluster of differentiation*) $3\gamma\delta$ und einem CD3 $\delta\epsilon$ Heterodimer sowie einem $\zeta\zeta$ Homodimer verbunden. Zusammen mit dem TZR bilden diese für die Signaltransduktion wichtigen Moleküle den TZR-Komplex (Übersicht in Smith-Garvin *et al.*, 2009). Weitere Moleküle, die für die Interaktion zwischen dem Antigen-beladenen MHC-Molekül und dem TZR-Komplex eine wesentliche Rolle spielen, sind die Korezeptoren CD4 bzw. CD8. Reife $\alpha\beta$ T-Zellen exprimieren entweder CD4 oder CD8 und charakterisieren durch ihre Bindung an jeweils MHC II- bzw. MHC I-Moleküle die zwei funktionell unterschiedlichen Klassen der „Helfer“ und „Killer“ T-Zellen (Übersicht in Smith-Garvin *et al.*, 2009).

Wenn der TZR-Komplex ein Peptid-beladenes MHC-Molekül auf einer APZ erkennt, bildet sich zwischen der T-Zelle und der APZ eine immunologische Synapse, die auch als SMAC (*supramolecular activation cluster*) bezeichnet wird. Im Zentrum der Synapse (c-SMAC) werden der TZR-Komplex, der CD4 bzw. CD8 Korezeptor, die Kostimulatoren (z.B. CD28) sowie Enzyme und Adaptorproteine, die wichtig für die Signaltransduktion sind, versammelt. Im äußeren Bereich der Synapse (p-SMAC) stabilisieren Integrine den Kontakt der beiden Zellen (Grakoui *et al.*, 1999). Bei der Signaltransduktion werden zunächst Tyrosinreste in den ITAM (*immune receptor tyrosine-based activating motifs*) Motiven der CD3- und ζ -Ketten von den Src Tyrosinkinasen Fyn und Lck phosphoryliert. Darauf folgt die Rekrutierung von ZAP-70 (*ζ -chain associated protein kinase 70 kDa*), das u.a. das transmembrane Adaptorprotein LAT (*linker for the activation of T cells*) und das cytosolische Adaptorprotein SLP-76 (*Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa*) bindet. Diese Adaptoren bilden das „Rückgrat“ eines Komplexes aus Effektormolekülen, die eine Vielzahl verschiedener Signalwege aktivieren. Schließlich führen diese

zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear factor κ B*), NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) und AP-1 (*activation protein 1*), die wiederum die Transkription verschiedenster Gene und damit deren Proteinexpression induzieren (Übersicht in Smith-Garvin *et al.*, 2009).

1.2.1 CD28 Kostimulation

Neben der Interaktion zwischen dem TZR-Komplex und einem Peptid-beladenen MHC-Molekül (Signal 1) wird für die T-Zellaktivierung ein zweites, das kostimulatorische Signal, benötigt. Fehlt Signal 2, kommt es zu keiner Aktivierung der T-Zellen. Stattdessen werden die Zellen entweder anergisch, d.h. sie reagieren auch bei optimaler Stimulation nicht mehr auf ihr spezifisches Antigen, oder sie sterben durch Apoptose ab (**Abb. 1**) (Übersicht in Sharpe *et al.*, 2002).

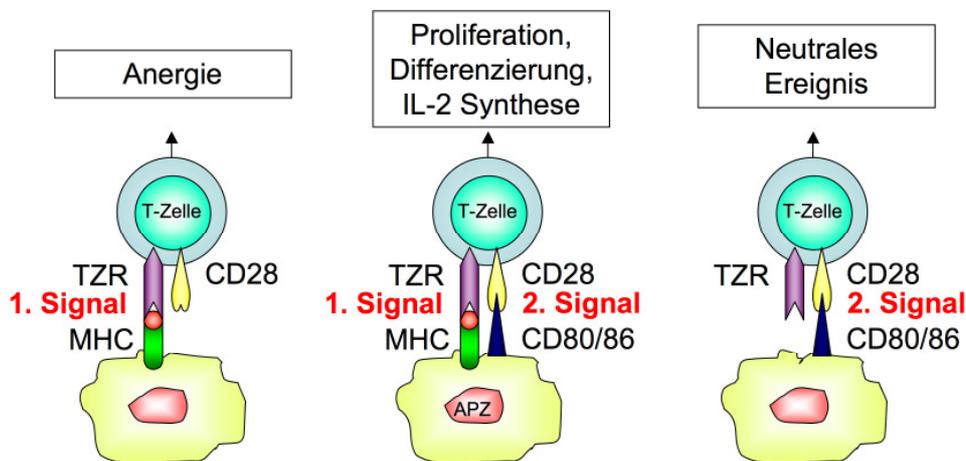


Abb. 1: Funktion der Kostimulation bei der T-Zellaktivierung

Signal 1 entsteht durch die Interaktion zwischen TZR und Peptid-beladenem MHC-Molekül. Das kostimulatorische Signal 2 wird z.B. durch die Bindung von CD28 an CD80/86 vermittelt.

Der wichtigste und inzwischen auch am besten charakterisierte kostimulatorische Rezeptor ist das homodimere Glycoprotein CD28 (Hara *et al.*, 1985). CD28 ist ein Mitglied der Immunglobulin (Ig) Superfamilie und bei Nagern auf allen T-Zellen exprimiert (Gross, J. A. *et al.*, 1990). Seine Liganden, das Homodimer CD80 (B7-1) und das Monomer CD86 (B7-2), die ebenfalls zur Ig Superfamilie gehören, werden von aktivierten APZs exprimiert (Übersicht in Sharpe *et al.*, 2002). Wie bereits erwähnt, findet man CD28 zusammen mit dem TZR-Komplex im Zentrum der immunologischen Synapse (c-SMAC). Dort führt die Integration der TZR und CD28 Signale zu einer Steigerung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener für die T-Zellaktivierung wichtiger Moleküle. Die CD28 Bindung verstärkt dabei nicht nur Signale des TZR-Komplexes, sondern induziert auch TZR unabhängige Signal- und Transkriptionsprogramme, die den Metabolismus steigern und das Überleben (z.B. durch erhöhte Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl- X_L (*B-cell lymphoma-*

extra large)) bzw. die Proliferation (Expression von Cyclinen, Aktivierung von Cdk's (*cycline-dependent kinase*)) der T-Zelle ermöglichen (Bour-Jordan *et al.*, 2011). Einer der wichtigsten Effekte des CD28 Signalweges ist die Aktivierung von NF- κ B, die eine gesteigerte Produktion des T-Zellwachstumsfaktors Interleukin (IL) -2 induziert (Fraser *et al.*, 1991).

Neben CD28 und CD80/86 gibt es weitere Mitglieder der B7:CD28 Familie der Kostimulatoren. Dazu gehört ICOS (*inducible costimulator*) mit ICOS Ligand, PD-1 (*programmed death -1*) mit den Liganden PD-L1 und PD-L2 und CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), das wie CD28 an CD80/86 bindet. Weitere kürzlich entdeckte Mitglieder dieser Familie sind BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) mit dem Liganden HVEM (*herpesvirus entry mediator*), B7-H3 mit dem Rezeptor TLT-2 (*triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2*) und B7-H4 und Btl2 (*butyrophilin-like protein 2*), deren Rezeptoren noch nicht identifiziert werden konnten. Während die Interaktionen CD28:CD80/86 und TLT-2:B7-H4 T-Zellaktivierung stimulieren, bewirken CTLA-4:CD80/86, PD-1:PD-1L bzw. PD-2L, BTLA:HVEM und die Bindung von B7-H4 und Btl2 das Gegenteil. Die ICOS:ICOSL Interaktion indessen kann die T-Zellaktivierung sowohl stimulieren als auch inhibieren (Paterson *et al.*, 2009; Sharpe, 2009). In der großen Familie der Kostimulatoren sticht die CD28 Kostimulation dadurch hervor, dass sie naive T-Zellen aktivieren kann, während die anderen Mitglieder zu späteren Zeitpunkten wichtig sind (Croft *et al.*, 1994). In Konkurrenz mit der CD28 Kostimulation steht die Interaktion von CTLA-4 mit CD80/86. CTLA-4 ist wie CD28 ein Homodimer, das auf Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs) konstitutiv exprimiert und nach Aktivierung auch auf Effektor-T-Zellen hochreguliert wird (Takahashi *et al.*, 2000; Walunas *et al.*, 1996). Unterschiede zwischen CD28 und CTLA-4 bestehen sowohl in ihrer Ligandenaffinität als auch möglicherweise in ihrer Stereometrie. Obwohl beide Rezeptoren die gleichen Liganden binden, übersteigt die Bindungsaffinität von CTLA-4 zu CD80 die von CD28 um das 20-fache und zu CD86 sogar um das 100-fache. Zudem wird diese höhere Affinität durch die bivalente Ligandeninteraktion bei CTLA-4 noch dramatisch gesteigert (Collins *et al.*, 2002). CD28 dagegen bindet seine Liganden aufgrund von sterischen Einschränkungen nur monovalent (Collins *et al.*, 2002). Neuere Daten deuten allerdings daraufhin, dass eine bivalente Bindungsmöglichkeit der CD28 Moleküle für die Rekrutierung in die immunologische Synapse notwendig ist (Sanchez-Lockhart *et al.*, 2011). Aufgrund der höheren Avidität von CTLA-4 kann dieser negative Regulator das stimulierende Signal der CD28 Kostimulation überschreiben und so die Immunantwort effektiv gegenregulieren (Collins *et al.*, 2002).

1.2.2 CD28 Superagonisten (CD28SA)

T-Zellen lassen sich nicht nur durch die „natürlichen“ Liganden des TZR und des CD28 Rezeptors stimulieren, sondern auch mit Hilfe von Antikörpern. Hara *et al.* isolierten 1985 den ersten humanen monoklonalen CD28 Antikörper (mAk) 9.3. Dieser Antikörper wies kostimulatorische Eigenschaften in Anwesenheit des polyklonalen T-Zellaktivators PMA (*phorbol 12-myristat 13-acetat*) auf (Hara *et al.*, 1985). Auch der fünf Jahre später isolierte murine CD28 mAk konnte *in vitro* zusammen mit einem für den TZR-Komplex spezifischen mAk naive T-Zellen aktivieren (Gross, J. A. *et al.*, 1990). Allein konnten diese CD28 Antikörper jedoch keine Stimulation *in vitro* induzieren. Dieser Typ von Antikörper wird im Weiteren als „konventioneller“ CD28 mAk bezeichnet. Bei der Generierung von Ratten-spezifischen CD28 mAKs in der Maus wurden überraschenderweise neben den konventionellen CD28 mAKs auch solche, im Folgenden als superagonistische (SA) mAK bezeichnet, gefunden, die ohne TZR-Bindung naive T-Zellen vollständig aktivieren können (Tacke *et al.*, 1997). Erklären ließ sich der Unterschied weder durch den Antikörperisotyp noch durch unterschiedliche Bindungsaviditäten. Mit Hilfe von chimären Ratte/Maus CD28 Molekülen konnte schließlich gezeigt werden, dass CD28SA an die laterale C'D-Schleife der Ig-ähnlichen Domäne des CD28 Moleküls binden, während der konventionelle CD28 mAk ein Epitop in der Nähe der Bindungsstelle der CD80/86 Liganden erkennt (**Abb. 2**) (Luhder *et al.*, 2003). Dieser Unterschied konnte auch für die später generierten humanen und murinen CD28 mAKs bestätigt werden (Dennehy *et al.*, 2006; Luhder *et al.*, 2003).

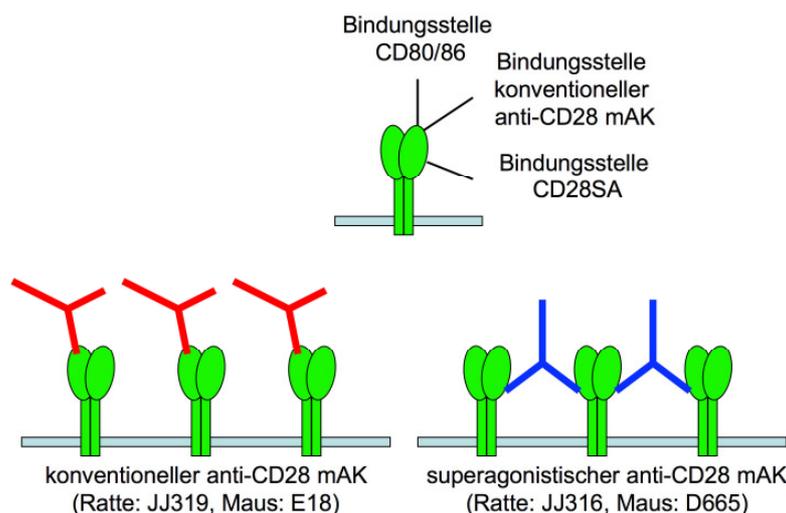


Abb. 2: Schematische Darstellung der Bindung von konventionellen und superagonistischen anti-CD28 mAKs

Der konventionelle CD28 mAk bindet nahe der Bindungsstelle der natürlichen Liganden CD80/86 des CD28 Moleküls. CD28SA bindet dagegen lateral an die C'D-Schleife des CD28 Moleküls. Dies ermöglicht eine bivalente Bindung und die Quervernetzung der CD28 Moleküle. (modifiziert nach Beyersdorf, Hanke, *et al.*, 2005)

Die Kokristallographie von Fab-Fragmenten eines humanen superagonistischen CD28 mAK mit rekombinatem, löslichem CD28 zeigte ebenfalls eine laterale Bindung (Evans *et al.*, 2005). Diese und weitere Hinweise ließen darauf schließen, dass CD28SA die CD28 Moleküle bivalent binden und damit vernetzen kann (**Abb. 2**) (Dennehy *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2005; Luhder *et al.*, 2003).

Obwohl die Aktivierung der T-Zellen über CD28SA unabhängig von einer TZR-Bindung erfolgt (keine verstärkte Phosphorylierung der ζ -Kette, von ZAP-70 oder LAT im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen), ist der stimulatorische Effekt nicht unabhängig von der TZR Signalmaschinerie (Dennehy *et al.*, 2003; Dennehy *et al.*, 2007; Luhder *et al.*, 2003). Schwache oder „tonische“ Signale des TZR, die T-Zellen durch den Kontakt mit Selbstantigen-beladenen MHC-Molekülen erlangen (Stefanova *et al.*, 2002), werden bei der Bindung von CD28SA an CD28 amplifiziert. Dabei wird der Austauschfaktor Vav1 benötigt, um das TZR Signal über das SLP-76-Vav-Itk Signalosom zu verstärken (**Abb. 3**) (Dennehy *et al.*, 2007; Levin *et al.*, 2008).

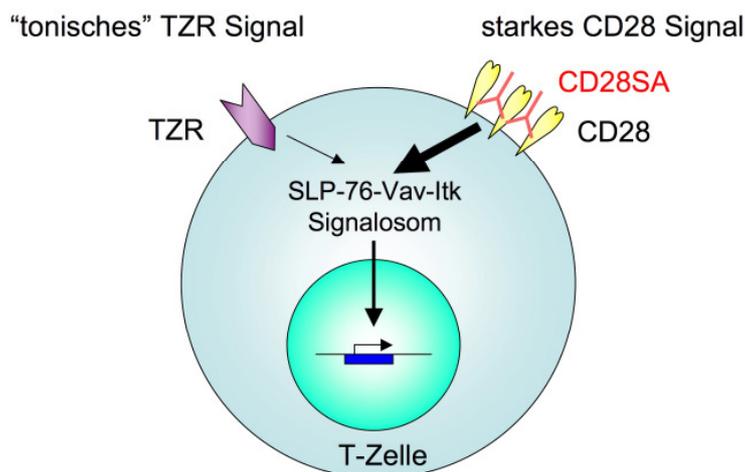


Abb. 3: Abhängigkeit der CD28SA vermittelten T-Zellaktivierung von proximalen TZR Signalen

Das starke CD28 Signal, das durch die bivalente Bindung des CD28SA induziert wird, amplifiziert die tonischen Signale des ungebundenen TZR auf dem Level des SLP-76-Vav-Itk Signalosoms und induziert so eine vollständige T-Zellaktivierung. (modifiziert nach Hünig *et al.*, 2005)

Im Vergleich zur Kostimulation ergeben sich bei der *in vitro* Stimulation mit CD28SA einige Unterschiede in den aktivierten Zellen. Zum einen wird die Differenzierung der naiven T-Zellen durch CD28SA Stimulation zugunsten des T_H2 (*T helper type 2*) Phänotyps verschoben (Rodriguez-Palmero *et al.*, 1999), zum anderen erlangen die Zellen unter anderem durch die Hochregulation des anti-apoptotischen Moleküls Bcl- X_L eine höhere Apoptoseresistenz (Kerstan *et al.*, 2004). In Bezug auf die Induktion der Proliferation und der IL-2 Produktion sind die beiden Stimulationsarten jedoch vergleichbar.

1.2.2.1 CD28SA Effekte in Nagermodellen

Nach der Entdeckung des CD28SA JJ316 im Rattensystem wurde dieser auf seine Effekte *in vivo* untersucht. Der Injektion des Superagonisten in Ratten folgte ein dosisabhängiger, transients Anstieg der Lymphozytenanzahl, der bei einer Behandlung mit konventionellem CD28 mAK JJ319 nicht beobachtet werden konnte. Dabei induzierte der CD28SA vor allem innerhalb der CD4⁺ T-Zellen eine starke Proliferation (Tacke *et al.*, 1997). Die mit CD28SA behandelten Ratten zeigten, abgesehen von der Vergrößerung der lymphoiden Organe, keine pathogenen Symptome. Eine Analyse der Zytokine zeigte, dass hauptsächlich das anti-inflammatorische IL-10 und in geringen Mengen IL-4, aber kaum pro-inflammatorische Zytokine, produziert wurden (Rodriguez-Palmero *et al.*, 1999). Später konnte gezeigt werden, dass das Zytokin IL-10 hauptsächlich von CD4⁺CD25⁺ bzw. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (Treg) produziert wird und die Treg Frequenz innerhalb der CD4⁺ T-Zellen nach CD28SA Injektion vorübergehend von 5% auf bis zu 20% ansteigt (Beyersdorf, Gaupp, *et al.*, 2005; Lin, C. H. *et al.*, 2003). Tregs, die in *Abchnitt 1.3* näher behandelt werden, spielen eine entscheidende Rolle beim Erhalt der Immunhomöostase und der Regulation überschießender Immunantworten. Sie besitzen eine Vielzahl von Mechanismen, wie z.B. die Produktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGFβ (*transforming growth factor β*), mit denen sie ihre inhibierende Funktion ausüben (Tang *et al.*, 2008). Diese Zellen zeigten insbesondere am Maximum der CD28SA Stimulation einen aktivierten CD25^{hoch}, CTLA-4^{hoch} Phänotyp und in *in vitro* Suppressionsassays eine verstärkt supprimierende Wirkung im Vergleich zu unstimulierten Tregs (Beyersdorf, Gaupp, *et al.*, 2005; Lin, C. H. *et al.*, 2003). Ähnliche Ergebnisse erhielt man auch für den Maus-spezifischen CD28SA D665 (Dennehy *et al.*, 2006; Hünig, 2007).

Positive Effekte durch eine präventive bzw. therapeutische *in vivo* Behandlung mit CD28SA konnten auch bei verschiedenen Krankheitsmodellen beobachtet werden (**Tabelle 1**). In den meisten Modellen konnte neben der präferenziellen Expansion der Tregs gegenüber konventioneller T-Zellen (Tkons) auch eine Zunahme in der Anzahl oder der Frequenz der Tregs beobachtet werden. Durch adoptive Transferexperimente mit CD28SA stimulierten CD4⁺CD25⁺ bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen und durch Depletion CD25⁺ bzw. Foxp3⁺ Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Tregs die Ursache der CD28SA vermittelten präventiven bzw. therapeutischen Effekte sind (Beyersdorf, Gaupp, *et al.*, 2005; Beyersdorf *et al.*, 2009; Gogishvili *et al.*, 2009; van den Brandt *et al.*, 2010).

Spezies	Krankheitsmodell	Behandlung	präventiv	therapeutisch	Referenz
Ratte	Experimentelle-Autoimmun-Neuritis	<i>in vivo</i>	+	+	Schmidt, J. <i>et al.</i> , 2003
Ratte	Experimentelle-Autoimmun-Enzephalomyelitis	<i>in vivo</i> stim. CD4 ⁺ CD25 ⁺	+	- n.d.	Beyersdorf, Gaupp, <i>et al.</i> , 2005
Ratte	Adjuvant-induzierte Arthritis	<i>in vivo</i>	n.d.	+	Rodriguez-Palmero <i>et al.</i> , 2006
Ratte	allogene Lebertransplantation	<i>in vivo</i>	- (+)*	n.d.	Urakami <i>et al.</i> , 2006
Ratte	spontane Autoimmundiabetes	<i>in vivo</i> stim. CD4 ⁺ CD25 ⁺	+	n.d. n.d.	Beaudette-Zlatanova <i>et al.</i> , 2006; van den Brandt <i>et al.</i> , 2010
Ratte	allogene heterotope Herztransplantation	<i>in vivo</i>	+	n.d.	Kitazawa <i>et al.</i> , 2008
Ratte	Graft-versus-Host Krankheit	stim. Milzzellen <i>in vivo</i>	+	n.d. -	Kitazawa <i>et al.</i> , 2009; Kitazawa <i>et al.</i> , 2010
Ratte	experimentelle Glomerulonephritis	<i>in vivo</i>	+	n.d.	Miyasato <i>et al.</i> , 2011
Maus	experimentelle afrikanische Trypanosomiasis	<i>in vivo</i>	+	n.d.	Guilliams <i>et al.</i> , 2008
Maus	Graft-versus-Host Krankheit	stim. CD4 ⁺ T-Zellen stim. CD4 ⁺ CD25 ⁻	+	n.d. n.d.	Beyersdorf <i>et al.</i> , 2009
Maus	Experimentelle-Autoimmun-Enzephalomyelitis	<i>in vivo</i>	+**	+	Gogishvili <i>et al.</i> , 2009
Maus	TNF-induzierte inflammatorische Arthritis	<i>in vivo</i>	n.d.	+	Zaiss <i>et al.</i> , 2010
Maus	DSS-induzierte Colitis	<i>in vivo</i>	+	n.d.	Chen, J., Xie, <i>et al.</i> , 2011

Tabelle 1: Effekte von CD28SA in verschiedenen Nagermodellen für Autoimmunität und Transplantation

Behandelt wurden die Tiere präventiv oder therapeutisch durch eine CD28SA Injektion *in vivo* oder durch die Transplantation von zuvor *in vivo* mit CD28SA aktivierten Zellen.

+ positiver Effekt, - kein Effekt, n.d.: nicht durchgeführt, DSS: Dextran-Sulfat-Natrium

* positiver Effekt nur in Kombination mit Donor-spezifischer Bluttransfusion

** kein Effekt nach *in vivo* Depletion mit anti-CD25 mAK

Die vorklinischen Daten aus Tiermodellen mit Autoimmunerkrankungen deuteten darauf hin, dass CD28SA effektiv Tregs beeinflussen und so Autoimmunität *in vivo* abmildern bzw. verhindern kann. Da auch bei Verwendung hoher Dosen an CD28SA keine negativen Nebeneffekte nachgewiesen wurden und durch die polyklonale Expansion der Tregs

das krankheits-verursachende Autoantigen nicht bekannt sein musste, schien ein Einsatz von CD28SA als Therapeutikum bei verschiedenen humanen Autoimmun- oder entzündlichen Erkrankungen vielversprechend.

1.2.2.2 CD28SA Effekte im humanen System

Um einen Nutzen aus den in verschiedenen Nagern modellen beobachteten therapeutischen Effekten des CD28SA auch für den Menschen ziehen zu können, wurden äquivalente superagonistische Maus anti-human CD28 mAKs generiert (Luhder *et al.*, 2003). Diese wurden mit Hilfe von Genmanipulation in einen vollständig humanisierten IgG4 mAk, genannt TGN1412, umgewandelt. Der Isotyp IgG4 wurde gewählt, da IgG4 im Vergleich zu anderen IgGs eine geringe Affinität zu Fc-Rezeptoren hat (Übersicht in Nirula *et al.*, 2011) und damit zytotoxische Effektormechanismen unwahrscheinlicher werden (Duff, 2006).

Vorklinische Studien zur Sicherheit und Toxizität von TGN1412 wurden mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Langschwanzmakaken durchgeführt. Diese Primaten wurden verwendet, da TGN1412 eine ähnliche Affinität zu deren CD28 Molekülen zeigte wie zu humanen CD28 Molekülen und die Fc-Rezeptoren zwischen beiden Spezies als hoch konserviert beschrieben wurde (Hanke, 2006). Trotz der sehr hohen Dosis TGN1412 von 50 mg/kg Körpergewicht, die wöchentlich für vier Wochen verabreicht wurde, konnten in den Primaten keine Anzeichen für eine Toxizität oder andere unerwünschte Nebeneffekte beobachtet werden. Auch die *in vitro* Stimulation der PBMCs mit TGN1412 zeigte keine toxischen Effekte des TGN1412 an (Duff, 2006).

Umso erstaunlicher war es, dass es 2006 während der Erstanwendung beim Menschen (Phase-I-Studie) zu einer lebensbedrohlichen, systemischen Zytokinausschüttung bei den sechs Freiwilligen kam. Im Gegensatz zu den Langschwanzmakaken, bei denen die CD28SA Injektion die Produktion geringer Mengen an IL-2, IL-4 und IL-5 induzierte, wurden in den Freiwilligen innerhalb weniger Stunden nach der Infusion sehr hohe Mengen an pro-inflammatorischem TNF α (*tumor necrosis factor α*) und IFN γ (*interferon γ*) nachgewiesen (Duff, 2006; Suntharalingam *et al.*, 2006). Inzwischen sind die Gründe bekannt, weshalb weder die Studien mit Langschwanzmakaken noch die Stimulation der humanen PBMCs das „Cytokine-Release Syndrom“ ankündigten. Diese werden in der Diskussion *Abschnitt 5.1* näher erläutert. Die Besonderheiten, die im Mausmodell einen Zytokinsturm verhindern, sind Gegenstand dieser Arbeit und werden in *Abschnitt 4.1* behandelt.

1.3 Entwicklung von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen

1995 wurde eine T-Zellpopulation, die die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) exprimiert und immunsupprimierend wirkt, wiederentdeckt und funktionell charakterisiert (Sakaguchi *et al.*, 1995). Seitdem waren regulatorische T-Zellen Gegenstand unzähliger Forschungsprojekte. Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass neben einer Vielzahl von Zellen mit regulatorischen Eigenschaften wie Tr1 Zellen, T_H3 oder CD8⁺ Treg Zellen (Shevach, 2006) eine bestimmte Population CD4⁺ T-Zellen nicht nur CD25, sondern auch den linien-spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimiert (Hori *et al.*, 2003). Der Einfluss des Transkriptionsfaktors auf die Funktion der Tregs selbst und auf den Erhalt der peripheren Toleranz wird anhand von Mutationen im *Foxp3* (*forkhead box P3*) Gen deutlich. Foxp3 defiziente Menschen wie auch Tiere leiden an einer tödlich verlaufenden Autoimmunität, die beim Menschen als IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*) Syndrom bekannt ist (Bennett *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007). Weitere Untersuchungen der Foxp3 exprimierenden Tregs zeigten, dass es zwei Subpopulationen gibt, die sich anhand ihrer Spezifität, der Funktion, aber auch ihrer Entstehungsgeschichte unterscheiden lassen.

Beide Treg Subpopulationen stammen wie auch Tkons von Vorläufer-T-Zellen ab, die aus dem Knochenmark in den Thymus einwandern und dort ihren TZR zufällig rekombinieren. Thymozyten mit erfolgreich rekombiniertem TZR erhalten im Thymuskortex durch das Erkennen von Selbst-MHC-Molekülen Signale, die das Überleben sichern (positive Selektion) (Kaye *et al.*, 1989). In der Thymusmedulla bekommen diese unreifen T-Zellen eine große Vielfalt an Selbstantigenen von verschiedenen APZs, wie mTECs (*medullary thymic epithelial cell*) und dendritischen Zellen (DZs), präsentiert. Die dabei aus der Interaktion zwischen TZR und mit Selbstantigen-beladenem MHC-Molekül resultierende Signalstärke und Bindungsdauer entscheiden über das weitere Schicksal der Zellen (Übersicht in Takahama, 2006). Thymozyten mit einem TZR mit hoher Affinität zu Selbstantigenen werden, um Autoreaktivität in der Peripherie zu verhindern, durch Apoptose deletiert (negative Selektion) (Übersicht in Starr *et al.*, 2003) (**Abb. 4**). Thymozyten, die einen TZR mit einer intermediären Affinität haben, differenzieren zu Foxp3⁻CD25^{hoch} Treg Vorläuferzellen, die in Anwesenheit von IL-2 und eventuell IL-7 und IL-15 anfangen, Foxp3 zu exprimieren (Burchill *et al.*, 2008; Lio *et al.*, 2008). Die so entstehenden Foxp3⁺ T-Zellen werden als natürliche Tregs (nTregs) bezeichnet und bilden die erste Subpopulation der Tregs. Ein weiteres wesentliches Signal, das die nTregs für ihre Entstehung im Thymus benötigen, ist das kostimulatorische CD28 Signal, das in *Abschnitt 1.4.3* näher behandelt wird. Die restlichen Thymozyten, deren TZRs eine niedrige, jedoch über dem Niveau der positiven Se-

lektion liegende Selbstreaktivität besitzen, wandern als Tkons aus dem Thymus in die Peripherie (**Abb. 4**).

Die zweite Subpopulation an Foxp3⁺ Tregs, die induzierten Tregs (iTreg), entwickeln sich unter bestimmten Voraussetzungen aus diesen Tkons in der Peripherie (Chen, W. *et al.*, 2003). Zu den Bedingungen, durch die Tkons bevorzugt zu iTregs konvertieren, zählen eine suboptimale DZ Aktivierung, sub-immunogene Dosen eines agonistischen Peptides oder über die Schleimhäute eindringende Peptide jeweils in Anwesenheit der Zytokine IL-2 und TGFβ (Povoleri *et al.*, 2013). Unter ähnlichen Bedingungen können auch *in vitro* aus Tkons iTregs entstehen (Übersicht in Curotto de Lafaille *et al.*, 2009).

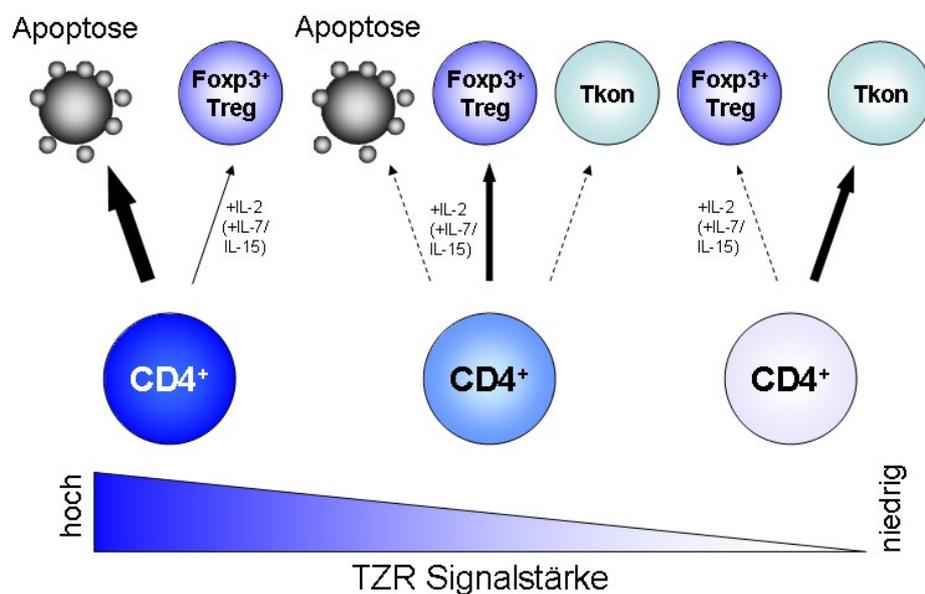


Abb. 4: T-Zellentwicklung im Thymus in Abhängigkeit von der TZR Signalstärke

Die Stärke des TZR Signals, vermittelt durch die Interaktion des TZR mit Selbstantigen-beladenem MHC II, bestimmt in Kombination mit den Zytokinen IL-2, IL-7 und IL-15 das Schicksal der CD4⁺ Thymozyten und die Differenzierung der Foxp3⁺ Tregs. Die Stärke der Pfeile spiegelt die Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Ereignisses wider (modifiziert nach Josefowicz, Lu, *et al.*, 2012).

Im Folgenden sollen die zwei Treg Subpopulationen, nTregs und iTregs, näher beschrieben und abschließend miteinander verglichen werden. Ein Problem stellt allerdings die Tatsache dar, dass die in der Literatur oft als „nTreg“ beschriebenen Tregs in der Peripherie eigentlich eine Mischung aus nTregs und iTregs sind und Marker zur Unterscheidung der Subpopulationen nicht mituntersucht wurden. Diese Daten werden aufgrund der Tatsache, dass ein Großteil der Foxp3⁺ T-Zellen in der Peripherie im ruhenden Immunsystem wahrscheinlich nTregs sind, im *Abschnitt 1.4* der nTregs behandelt. Trotzdem wurde soweit möglich eine Differenzierung der Eigenschaften der beiden Populationen vorgenommen.

1.4 Natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg)

In der Peripherie machen die Foxp3⁺ Zellen zwischen 5 und 10% der CD4⁺ T-Zellen aus. Anhand der Expression von Neuropilin und Helios (siehe *Abschnitt 1.4.1*) wird ein nTreg-Anteil innerhalb der Foxp3⁺ T-Zellen in den Lymphknoten und der Milz von Mäusen von über 70% angenommen (Thornton *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2012). In bestimmten Körperregionen, wie dem Darm, ist dieser Anteil aber zugunsten der iTregs verschoben (Yadav *et al.*, 2012). Die Hauptfunktion der nTregs ist es, Immunantworten gegen Selbstantigene zu kontrollieren und die Höhe des Schwellenwertes, ab dem eine Immunantwort ausgelöst werden kann, zu regulieren.

1.4.1 Charakterisierende Merkmale

Bezeichnend für nTregs ist neben der Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 eine konstitutiv hohe Expression von CD25, einer Komponente des hochaffinen IL-2R, wie auch des Co-inhibitorischen Rezeptors CTLA-4. Dabei ist jedoch weder CD25 noch CTLA-4 ein linienspezifischer Marker, da beide durch Aktivierung auch auf Tkons hochreguliert werden (Kelly *et al.*, 1988). Die starke, konstitutive CD25 Expression spiegelt die entscheidende Rolle von IL-2 bei der Entwicklung, dem Überleben und der Aktivierung der Tregs in der Peripherie wider. Dabei sind Tregs abhängig von parakrinem IL-2. Aufgrund des Transkriptionsfaktors Foxp3, der die Genexpression von IL-2 und anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IFN γ , TNF und IL-17 unterdrückt, können sie IL-2 selbst nicht produzieren (Williams *et al.*, 2007). Der Verbrauch des von aktivierten Tkons produzierten IL-2 durch Tregs stellt zudem einen der zahlreichen Regulationsmechanismen der Tregs dar (Barthlott *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu IL-2 ist CTLA-4 nicht für die Entwicklung der Tregs entscheidend (Read *et al.*, 2006), wird aber für die supprimierende Funktion und die Regulation der Treg Homöostase benötigt (Schmidt, E. M. *et al.*, 2009; Wing *et al.*, 2008).

Bis heute ist kein spezifischer Marker bekannt, der eine eindeutige Unterscheidung der nTregs von den ebenfalls Foxp3 exprimierenden iTregs möglich macht. Zur Diskussion stehen zum Beispiel der Transkriptionsfaktor Helios (Thornton *et al.*, 2010) oder das Oberflächenprotein Neuropilin-1 (Nrp-1) (Yadav *et al.*, 2012). Beide Moleküle sollen speziell von nTregs, nicht aber von iTregs exprimiert werden. Allerdings erwies sich insbesondere Helios als Marker nicht unter allen Bedingungen als geeignet, da es nach Aktivierung auch von Tkons exprimiert werden kann. Die genaue Funktion beider Faktoren in den Tregs ist derzeit nicht bekannt, es gibt jedoch Hinweise, dass sie an der supprimierenden Aktivität der Tregs beteiligt sind (Übersicht in Lin, X. *et al.*, 2013).

Eine weitere diskutierte Möglichkeit, nTregs von iTregs zu unterscheiden, ist der Methylierungsstatus der TSDR (*Treg specific demethylation region*) Region im *Foxp3* Gen. Während in nTregs diese Region vollständig demethyliert ist, beobachtet man in Tkons eine vollständige Methylierung (Polansky *et al.*, 2008). In *in vitro* mit TGF β induzierten Tregs ist die TSDR interessanterweise nur teilweise demethyliert. Funktionell ist die Demethylierung der TSDR mitverantwortlich für eine stabile Foxp3 Expression. Im Einklang damit verlieren *in vitro* generierte iTregs bei Restimulation ihre Foxp3 Expression (Floess *et al.*, 2007; Polansky *et al.*, 2008). Weiterführende funktionelle Studien mit aufgereinigten nTregs und iTregs anhand dieser Methode sind aufgrund der notwendigen Präparation der DNA (*deoxyribonucleic acid*) allerdings nicht möglich.

1.4.2 TZR-Repertoire

Bedingt durch den Differenzierungsmechanismus im Thymus exprimieren nTregs ein hochdiverses TZR-Repertoire und zeigen eine erhöhte Reaktivität auf Selbstantigene. Sie erkennen jedoch zudem auch eine Vielzahl an Fremdanitigenen (Übersicht in Pacholczyk *et al.*, 2008). Vergleichende Studien der TZR-Repertoires von Tkons und Tregs zeigten, dass der Großteil des TZR-Repertoires sich deutlich unterscheidet und je nach Studie ein Anteil zwischen 10% und 40% der TZR-Spezifität überlappt (Hsieh *et al.*, 2004; Pacholczyk *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007). Zudem scheinen in Mäusen natürliche Tregs einen hohen Anteil der Tregs auszumachen, da das TZR-Repertoire der Tregs im Thymus dem der Tregs in der Peripherie stark ähnelt (Hsieh *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2007).

1.4.3 CD28 Kostimulation in natürlichen regulatorischen T-Zellen

Die CD28 Kostimulation ist nicht nur für T-Zellen von besonderer Bedeutung, sondern auch für nTregs. Mäuse mit einer Defizienz in CD28 oder B7 haben eine normale Anzahl an konventionellen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, aber eine stark reduzierte Anzahl an Foxp3⁺ Tregs sowohl im Thymus als auch in der Peripherie (Bour-Jordan *et al.*, 2002; Lohr *et al.*, 2003; Salomon *et al.*, 2000). Versuche mit gemischten Knochenmark-Chimären aus wildtypischen, CD28 und IL-2 defizienten Mäusen konnten zeigen, dass für die nTreg Entwicklung im Thymus CD28 in Tkons für die IL-2 Produktion wichtig ist. Zusätzlich benötigen Tregs allerdings auch selbst CD28. (Tai *et al.*, 2005). Mit Hilfe von Mäusen mit einer induzierbaren CD28 Defizienz konnte auch für die Peripherie die Abhängigkeit der Tregs von CD28 Signalen in *cis* und *trans* bestätigt werden (Gogishvili *et al.*, 2013).

1.4.4 Migrationsverhalten, Homöostase und Überleben

Um lokal unerwünschte Immunantworten zu regulieren, müssen Tregs in lymphoide Organe und in entzündliche Gewebe einwandern können (Siegmond *et al.*, 2005). Die Wanderung von einem Gewebe in ein anderes wird den Zellen des Immunsystems durch die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren (CCR) ermöglicht (Huehn *et al.*, 2005). Die Expression von CD62L und CCR7 ermöglicht zum Beispiel unstimulierten Tregs in den lymphoiden Geweben die Rezirkulation. Nach einer Aktivierung ändert sich das Muster und anstatt von CD62L und CCR7 werden Chemokinrezeptoren (wie CCR2, CCR5, CCR6 oder CXCR3), Selektin Liganden (wie E- und P-Selektin) und Integrine (wie CD103) hochreguliert. Entlang der entsprechenden Chemokingradienten gelangen die Tregs in entzündliche Gewebe, wo sie die entsprechende Immunantwort regulieren (Huehn *et al.*, 2004; Zhang, N. *et al.*, 2009).

Neben aktivierten T-Zellen muss auch die Homöostase der Tregs stark kontrolliert werden. Ein Ungleichgewicht in der Anzahl oder der Aktivität der Tregs kann zu Autoimmunität (zu wenig Treg Aktivität) oder zu Krebs bzw. zu unkontrollierten Infektionen (zu viel Treg Aktivität) führen (Übersicht in von Boehmer *et al.*, 2013). Entgegen anfänglicher Beschreibungen der Tregs als anergische Zellen (Takahashi *et al.*, 1998) konnte inzwischen gezeigt werden, dass *in vivo* Tregs sogar stärker als Tkons proliferieren. Diese vermehrte Zellteilung soll zumindest zum Teil mit der Expression selbstreaktiver TZR in Zusammenhang stehen (Fisson *et al.*, 2003). Ein Mechanismus, durch den die Klongröße der sich schnell teilenden Tregs und der Tkons kontrolliert wird, ist die Menge an überlebenswichtigem IL-2 (Pandiyan *et al.*, 2007). Im ruhenden Immunsystem wird durch den effektiven Verbrauch von IL-2, das von selbstreaktiven Tkons produziert wird, eine lokale Aktivierung der T-Zellen verhindert und zugleich die Funktion und das Überleben der Tregs gestärkt (Übersicht in Boyman *et al.*, 2012). Während einer Immunantwort produzieren aktivierte Tkons große Mengen an IL-2 und expandieren. Zeitlich etwas versetzt proliferieren durch Selbst- oder Fremdantigene aktivierte Tregs mit Hilfe dieses IL-2. Dieser Expansionsphase folgt die Effektorphase, in der die aktivierten Tkons die Pathogene bekämpfen und zugleich die Anzahl und die supprimierende Aktivität der Tregs zunehmen. Die Homöostase des Immunsystems wird schließlich während der Kontraktionsphase wieder erreicht. Durch die Treg vermittelte Suppression sinkt die Anzahl an Tkons und damit auch die Menge an IL-2. Das reduziert letztlich auch die Anzahl an Tregs, deren Überleben von IL-2 abhängt (Übersicht in Hünig, 2007).

1.4.5 Effektormechanismen

Neben der Beteiligung des TZR an der Treg Entwicklung im Thymus induziert die antigenspezifische Stimulation des TZR die supprimierende Aktivität der Tregs in der Peripherie. Einmal aktivierte Tregs können anschließend auf eine antigenunabhängige Weise supprimieren (Bystander-Suppression) (Karim *et al.*, 2005). In Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie der Art der Immunantwort bzw. des auslösenden Agens, dem Immunstatus des Wirtes oder dem Ort der Immunantwort, verwenden Tregs unterschiedliche Mechanismen, um die Immunantwort zu regulieren (Übersicht in Tang *et al.*, 2008). Einige Beispiele dieser Mechanismen werden im Folgenden aufgezeigt (**Abb. 5**).

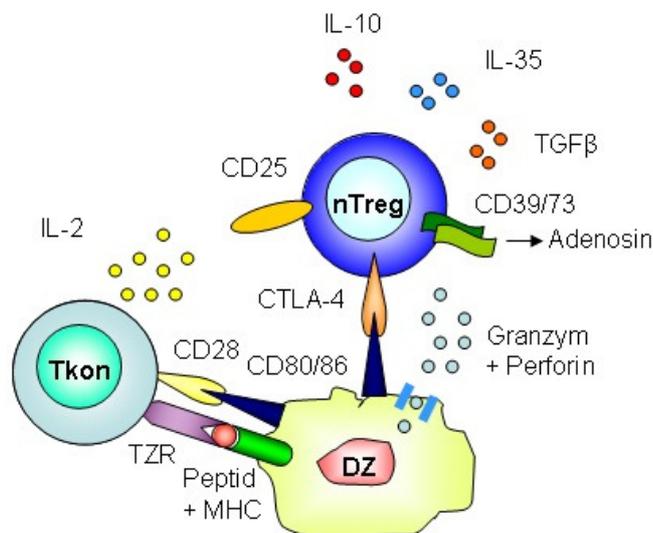


Abb. 5: Beispiele für Regulationsmechanismen der nTregs

nTregs können zum einen durch verschiedene inhibierende Moleküle und Zytokine, zum anderen aber auch über Zell-Zell-Kontakt Tkons und/oder APZs beeinflussen.

In vitro Suppressionsversuche, bei denen eine semipermeable Membran die Effektor-T-Zellen von den Tregs trennte, zeigten, dass zellkontaktabhängige Mechanismen zur inhibierenden Aktivität der Tregs beitragen (Thornton *et al.*, 1998). Zu diesen kontaktabhängigen Mechanismen zählen u.a. die Ausschüttung von Granzym B und Perforin, die zur Induktion von Apoptose in Tkons führt (Cao *et al.*, 2007; Gondek *et al.*, 2005), und die Suppression durch CTLA-4. Der co-inhibitorische Rezeptor CTLA-4 kann dabei auf viele Arten supprimierend wirken. Zum Beispiel konkurriert er mit CD28 um die Bindung der Liganden CD80/86, zu denen CTLA-4 eine deutlich höhere Affinität besitzt (siehe *Abschnitt 1.2.1*). Zudem führt Trans-Endozytose, bei der über CTLA-4 CD80/86 Moleküle aus der APZ Membran entfernt werden, zu einer verminderten Expression der Liganden (Qureshi *et al.*, 2011). In APZs induziert CTLA-4 die Produktion des immunsupprimierenden Enzyms IDO (*indolamin 2,3-dioxygenase*), das durch den Einfluss auf die Tryptophandegradation Tkons inhibiert (Grohmann *et al.*, 2002).

Zusätzlich zu den zellkontaktabhängigen Mechanismen ist neben dem bereits beschriebenen Verbrauch von IL-2 (siehe *Abschnitt 1.4.4*) auch die Sekretion suppressiver Faktoren wie IL-10, TGF β , IL-35 oder Adenosin an der Treg vermittelten Regulation beteiligt. Obwohl die inhibierende Wirkung der Tregs bei *in vitro* Versuchen unabhängig von IL-10 und TGF β schien, ist deren Bedeutung in verschiedenen *in vivo* Modellen inzwischen unumstritten (Übersicht in Tang *et al.*, 2008). Mit Hilfe von Mäusen, die eine Treg spezifische IL-10 Defizienz haben, konnte dargestellt werden, dass von Tregs produziertes IL-10 besonders wichtig für den Erhalt der Toleranz an Oberflächen mit Umweltkontakt, wie Darm oder Lunge, ist (Rubtsov *et al.*, 2008). TGF β , das die Zellproliferation und die Funktion aktivierter Zellen inhibiert, kann zudem auch die Differenzierung weiterer Tregs und deren Funktion fördern (Übersicht in Wan *et al.*, 2007). Zudem gibt es Hinweise, dass TGF β auch zellkontaktabhängig über die membrangebundene Form des TGF β , die auf nTreg vermehrt exprimiert wird, Tkon inhibieren kann (Nakamura *et al.*, 2001). IL-35, ein Heterodimer aus IL-12p35 Kette und Ebi3 (*Epstein Barr Virus induced 3*), scheint eine besondere Rolle beim Erhalt der Toleranz im Darm zu spielen, da Tregs, die defizient für eine Komponente von IL-35 sind, *in vitro* schwächer supprimierend wirken und entzündliche Darmerkrankungen nicht kontrollieren können (Collison *et al.*, 2007). Das zuletzt erwähnte Adenosin inhibiert durch die Bindung an den Rezeptor A2A die Tkon Aktivierung und Expansion. Katalysiert wird die Bildung von Adenosin aus extrazellulärem ATP (*adenosine triphosphate*) bzw. ADP (*adenosine diphosphate*) durch die auf Tregs stark exprimierten Ektonukleotidasen CD39 und CD73 (Deaglio *et al.*, 2007).

1.5 Induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg)

Obwohl inzwischen sicher ist, dass *in vivo* generierte iTregs einen wesentlichen Beitrag zum Erhalt der peripheren Toleranz beitragen, ist es aufgrund der fehlenden Marker zur Unterscheidung zwischen nTregs und iTregs immer noch schwierig, diese Zellen klar voneinander abzugrenzen. Induzierte Tregs entwickeln sich außerhalb des Thymus bei subimmunogener Antigenpräsentation während einer chronischen Entzündung oder im Zuge der normalen Homöostase des Darms. Ihre Hauptfunktion besteht darin, die Immuntoleranz der Mukosa zu erhalten und schwere, chronische allergische Entzündungen zu vermeiden (Übersicht in Curotto de Lafaille *et al.*, 2009).

1.5.1 Charakterisierende Merkmale

Ihre Funktion scheinen iTregs zumindest teilweise mit den gleichen Effektormechanismen auszuüben wie nTregs (Übersicht in Schmitt *et al.*, 2013). Während *in vivo* generierte iTregs auch in vielen weiteren Eigenschaften mit nTregs übereinstimmen, gibt es bei *in*

in vitro generierten iTregs abhängig vom Stimulationsprotokoll große Unterschiede. So wirken *in vivo* generierte iTregs ähnlich supprimierend wie nTregs, während es für *in vitro* generierte iTregs widersprüchliche Resultate gibt (Aricha *et al.*, 2008; Chen, W. *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2007). Ähnliche Beobachtungen gibt es auch für den Methylierungsgrad der bereits beschriebenen TSDR. *In vivo* generierte iTregs zeigen auch hier wie nTregs einen hohen Anteil an demethylierten CpGs, während *in vitro* generierte iTregs nur partiell demethyliert sind. Dadurch ist auch die Stabilität der Foxp3 Expression in *in vitro* iTregs nach Restimulation gering (Floess *et al.*, 2007; Polansky *et al.*, 2008).

Unterschiede zwischen nTregs und den unterschiedlich generierten iTregs gibt es jedoch hinsichtlich der Treg Gensignatur. Vergleichende Genexpressionsanalysen von *ex vivo* Tregs mit unter unterschiedlichen Bedingungen generierten *in vivo* und *in vitro* iTregs zeigten, dass iTregs abhängig von ihrer Stimulation nur Teile der Treg Signatur exprimieren. Generell bestand aber trotzdem eine größere Ähnlichkeit mit Tregs als mit Tkons (Feuerer *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2007). Zu diesen Unterschieden zählt auch die bereits beschriebene niedrige Expression von Helios und Nrp-1 in den verschiedenen generierten iTregs (Gottschalk *et al.*, 2012; Weiss *et al.*, 2012).

1.5.2 TZR-Repertoire

Ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen nTregs und iTregs ist das TZR-Repertoire. Wie schon erwähnt, überlappt das Repertoire zwischen Tkons und Foxp3⁺ Tregs in der Peripherie zu einem gewissen Anteil (10-40%). Da iTregs sich aus Tkons entwickeln, liegt die Vermutung nahe, dass iTregs in diesem Anteil der peripheren Tregs enthalten sind. Ein direkter Vergleich des TZR-Repertoires von iTregs und Foxp3⁺ Tregs zeigte zudem nur eine geringe Überlappung (Haribhai *et al.*, 2011). Weiter lässt sich daraus schließen, dass nTregs und iTregs unterschiedliche Funktionen haben. Dies steht im Einklang damit, dass nTregs vermehrt Selbstantigene und iTregs präferentiell Fremdantigene, wie Allergene, Umgebungs- und Nahrungsantigene oder Antigene kommensaler Bakterien, erkennen. Induzierte Tregs tragen somit zu einer Erweiterung der peripheren Toleranz bei (Übersicht in Curotto de Lafaille *et al.*, 2009).

1.5.3 Generierung induzierter regulatorischer T-Zellen

Für die Differenzierung der iTregs *in vivo* wird eine antigen-spezifische TZR Stimulation in einer anti-inflammatorischen Umgebung benötigt. Verschiedene DZ Subpopulationen wie plasmazytoide DZs oder CD103⁺ DZs im Darm können die Entstehung von iTregs positiv beeinflussen (Coombes *et al.*, 2007; Ochando *et al.*, 2006). Zudem ist die Induktion der Foxp3 Expression *in vitro* und *in vivo* abhängig von TGFβ (Chen, W. *et al.*, 2003;

Coombes *et al.*, 2007). IL-2 ist essentiell für die Differenzierung, Suppressivität, Proliferation und Stabilität der iTregs, obwohl es von iTregs selbst nicht generiert werden kann (Chen, Q., Kim, *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2007). Neben den Zytokinen sind für die Konversion die Stimulation des TZR und ein kostimulatorisches Signal notwendig. Hohe Antigen Dosen sowie eine starke CD28 Ligation in Kombination mit einem starken TZR Signal inhibieren dabei die Foxp3 Expression, wohingegen CTLA-4 Ligation diese fördert (Semple *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2006).

Letztendlich ist die Foxp3 Induktion in Tkons abhängig von den integrierten TZR- und kostimulatorischen Signalen und der Menge an TGF β und IL-2. Je höher das TZR- und das kostimulatorische Signal ist, umso mehr Zytokine werden für die iTreg Induktion benötigt (Gabrysova *et al.*, 2011).

1.6 Vergleich natürlicher mit induzierten regulatorischen T-Zellen

Die in den *Abschnitten 1.3 bis 1.5* beschriebenen Eigenschaften und Merkmale der nTregs und iTregs werden zusammenfassend in **Tabelle 2** miteinander verglichen.

	nTreg	iTreg generiert	
		<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Ort der Foxp3 Induktion	Thymus	sekundäre lymphoide Organe/ entzündliches Gewebe	-
TZR-Repertoire Spezifität	vermehrt Selbstantigene	vermehrt Fremdartigene	-
Funktion	Kontrolle von Autoimmunreaktionen, Festsetzen des Immunantwort-auslösenden Schwellenwertes	Toleranz gegenüber Umgebungsantigenen	-
Markerexpression	Foxp3, CD25, CTLA-4	Foxp3, CD25, CTLA-4	
essentielle Faktoren für die Generierung	TZR und CD28 Signal, IL-2 evtl. IL-7/15	TZR und kostimulatorisches Signal, TGF β und IL-2	
TSDR	demethyliert	demethyliert	partiell demethyliert
Stabilität	sehr stabil	stabil	instabil
spezifische Marker	Helios	Helios niedrig (durch Aktivierung induzierbar)	
	Nrp-1	Nrp-1 niedrig	Nrp-1 intermediär
supprimierende Aktivität	+	+	+ (-)

Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften und Merkmale von nTregs und iTregs

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Der in unserer Arbeitsgruppe generierte superagonistische anti-CD28 Antikörper D665 ist ein hoch potenter Treg Aktivator und konnte sowohl präventiv als auch therapeutisch bei verschiedenen Krankheitsmodellen der Maus eingesetzt werden. Da es bei der Erprobung des humanisierten CD28SA TGN1412 im Menschen zu einem unerwarteten „Cytokine-Release Syndrom“ kam, der durch die vorangegangenen Experimente mit Nagern nicht vorhersehbar war, sollte im ersten Teil dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Tregs und der systemischen Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine im Mausmodell genauer untersucht werden. Eine weitere Folge der CD28SA Behandlung ist die Induktion der IL-10 Produktion in Tregs. Im ruhenden Immunsystem gibt es lediglich im Darm größere Mengen an IL-10 produzierenden Tregs, was eine genauere Charakterisierung dieser Zellen schwierig macht. Mit Hilfe der CD28SA Behandlung wurde daher im zweiten Teil dieser Arbeit der Ursprung und das Schicksal der IL-10 produzierenden Tregs analysiert. Angeknüpft wurde damit an Ergebnisse meiner Diplomarbeit, in der ein Färbeprotokoll für IL-10 und Foxp3 etabliert wurde und mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf mRNA (*messenger ribonucleic acid*) Ebene zwischen IL-10 produzierenden und nicht-produzierenden CD4⁺CD25⁺ Tregs dargestellt werden konnten. *In vitro* wurde beobachtet, dass in naiven T-Zellen durch eine suboptimale TZR Stimulation in Anwesenheit von Kostimulation Foxp3 Expression induziert werden kann. Da der CD28SA auf eine ähnliche Weise wirkt, sollte im letzten Abschnitt dieser Arbeit getestet werden, ob auch die superagonistische Stimulation des CD28 Moleküls zusammen mit den tonischen Signalen, die T-Zellen durch das Scannen von MHC-Molekülen erhalten, Foxp3⁺ iTregs induzieren kann und welche Eigenschaften diese Zellen besitzen.

1.8 Erklärung zur Mitwirkung und vorausgehende Publikationen

Diese Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Hünig am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg angefertigt. Die Versuche wurden, soweit nicht anders vermerkt, von mir selbst durchgeführt. Die verschiedenen Zellpopulationen wurden am FACS-Sorter von Christian Linden aufgereinigt. K. McPherson (damalige Doktorandin der Arbeitsgruppe Hünig) isolierte den Klon 10-7A und führte erste Charakterisierungen durch. In der Arbeitsgruppe von M. Herrmann (Institut für Klinische Immunologie und Rheumatologie an der Medizinischen Klinik III, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) wurde mit Hilfe eines ELISA (Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay) die Spezifität des Klons 10-7A auf Phospholipide analysiert. Eliana Ribechini (Postdoc der Arbeitsgruppe Manfred Lutz) leitete die Durchführung der Schwamm-Implantationsexperimente an. Verena Schneider half im Rahmen ihres Bachelor-Studiums während eines Praktikums bei der Durchführung verschiedener Konversionsexperimente mit. Stefan Klein-Heßling (Postdoc der Arbeitsgruppe Edgar Serfling, Pathologisches Institut, Würzburg) untersuchte den Methylierungsstatus der TSDR Region verschiedener aufgereinigter T-Zellpopulationen. Die Analyse des Ursprungs und des Schicksals IL-10 produzierender Tregs (*Abschnitt 4.2*) baute zum Teil auf Ergebnisse auf, die während meiner Diplomarbeit (Charakterisierung und Identifizierung von Subpopulationen regulatorischer T-Zellen der Maus) in der Arbeitsgruppe Hünig entstanden. Veröffentlicht wurden Teile dieser Dissertation in den nachfolgenden zwei Publikationen:

Daten aus *Abschnitt 4.1* in: Gogishvili T*, Langenhorst D*, Lühder F*, Elias F, Elflein K, Dennehy KM, Gold R, Hünig T., Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28 superagonist treated mice. PLoS One. 2009;4(2):e4643. (* gleichwertiger Beitrag)

Daten aus *Abschnitt 4.2* in: Langenhorst D, Gogishvili T, Ribechini E, Kneitz S, McPherson K, Lutz MB, Hünig T. Sequential induction of effector function, tissue migration and cell death during polyclonal activation of mouse regulatory T-cells. PLoS One. 2012;7(11):e50080.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Autoklav		Melag
Bestrahlungsgerät	Faxitron CP160	
Cell Sorter	FACS Vantage FACS Aria III	BD Biosciences
Computer		eMAC PC
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences
Durchflusszytometer	LSR II	BD Biosciences
Eismaschine		Scotsmann
ELISA Reader	Bep [®] 2000	Siemens
Magnetseparator	MagneSphere [®] Technology	Promega
Gefrierschrank	-20 °C -80 °C	Bosch Forma Scientific
Inkubator		Heraeus Kottermann
Kühlschrank	4 °C	Bosch
Magnetseparator	MidiMACS QuadroMACS	Miltenyi
Mikroskop	Labovert FS Biomed	Leitz Leitz
pH-Meter	HI 1280	Hanna Instruments
Pipetten		Eppendorf
Pipettierhilfe	accu-jet	Brand
Schüttler		IKA-Labortechnik
Sterilbank		Gelaire
Vortex	Genie 2	Scientific Industrie
Waage		Scaltec
Wasserbad		Lauda
Zählkammer		Neubauer
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R Centrifuge 5415 C	Eppendorf Eppendorf

2.2 Software

Software	Verwendung	Firma
EndNote X6	Verwaltung der Referenzen	Thomson Reuters
FACSDiva Software v6.1.3	FACS-Datenaufnahme (LSR II Durchflusszytometer)	BD Biosciences
FCAP Array Software v2.0	CBA Ergebnisanalyse	SoftFlow Inc, www.fcarray.com
FlowJo v9.5.2	FACS-Datenanalyse	TreeStar, Inc
Graphpad Prism v4 für Macintosh	Graphiken und statistische Analyse	www.graphpad.com

2.3 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
Einmalspritzen	1 ml BD Plastikpak 2 ml Braun
Eppendorftubes	1,5 ml Sarstedt 2,0 ml Greiner Labortechnik
FACS-Röhrchen	Greiner Labortechnik BD Biosciences
Glaspipetten	Brand
LD-Säulen	Miltenyi Biotec
LS-Säulen	Miltenyi Biotec
Mikrotiterplatte (96-Napf)	Greiner Labortechnik
F-Boden	
Mikrotiterplatte (96-Napf)	Greiner Labortechnik
U-Boden	
MS-Säulen	Miltenyi Biotec
Nylonsieb 70 µm	BD Falcon
Pasteurpipetten (Glas)	
Petrischalen	Greiner Labortechnik
Pipettenspitzen (10 µl)	Roth
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Greiner Labortechnik
Polyester-Polyurethan Schwamm (5x5 mm ²)	Vitaform Ltd
Zellkulturplatte (24-Napf)	Greiner Labortechnik
Zellkulturplatte (48-Napf)	Greiner Labortechnik
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Labortechnik

2.4 Chemikalien

Stoff	Firma
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Ferak
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂)	Merk
Ethanol, vergällt, <99,8%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
HEPES	Roth
Forene (Wirkstoff Isofluran)	Abbott
Isopropanol	AppliChem
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumbikarbonat (NaHCO ₃)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	biomol
Tween®20	Roth

2.5 Lösungen, Puffer und Nährmedien

2.5.1 Lösungen

BSS (Balanced Salt Solution I, II)

BSS I: 50 g Glucose, 3 g KH_2PO_4 , 11,9 g Na_2HPO_4 , 0,5 g Phenolrot ad 5 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

BSS II: 9,25 g CaCl_2 , 20 g KCl, 320 g NaCl, 10 g MgCl_2 , 10 g MgSO_4 ad 5 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

125 ml BSS I mit 125 ml BSS II mischen ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

BSS/BSA: BSS Lösung mit 0,2% BSA

Trypanblau: 0,04% Trypanblau mit 0,05% Natriumazid in PBS

2.5.2 Puffer

PBS (Phosphat-gepufferte Saline)

80,0 g NaCl, 11,6 g Na_2HPO_4 , 2,0 g KH_2PO_4 , 2,0 g KCl ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$,

pH auf 7,0 einstellen

FACS-Puffer

1 l PBS mit 0,1% BSA, 0,25 g Natriumazid

TAC-Puffer

20 mM Tris, 0,83% NH_4Cl , pH 7,2 → autoklavieren

Bikarbonat-Puffer

1,59 g Na_2CO_3 , 2,93 g NaHCO_3 ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, pH auf 9,6 einstellen

2.5.3 ELISA Lösungen

Coating-Puffer

0,2 M Natriumphosphat, pH 6,5

11,8 g Na_2HPO_4 , 16,1 g NaH_2PO_4 ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, pH auf 6,5 einstellen

Frisch verwenden oder innerhalb von sieben Tagen, Lagerung bei 2-8 °C

Assay Diluent

PBS mit 10% FCS, pH 7,0

90 ml PBS, 10 ml FCS, pH auf 7,0 einstellen

Frisch verwenden oder innerhalb von drei Tagen, Lagerung bei 2-8 °C

Wasch-Puffer

PBS mit 0,05% Tween20

1 l PBS, 500 µl Tween20

Frisch verwenden oder innerhalb von drei Tagen, Lagerung bei 2-8 °C

Substratlösung

Tetramethylbenzidin (TMB) und Hydrogen Peroxid im Verhältnis 1:1

Immer frisch, kurz vor Gebrauch ansetzen

Stopplösung

1 M H₃PO₄

2.5.4 Nährmedien

RPMI 1640 Medium (Gibco) mit 10% fetales Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 50 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin

2.6 Mäuse

C57BL/6 (Harlan Winkelmann), kongene Thy1.1 C57BL/6, C57BL/6.Foxp3^{tm1Flv} (Foxp3.RFP) (Jackson Laboratories), OT-II Rag1^{-/-} (von Manfred Lutz zur Verfügung gestellt) und DREG Mäuse (von Tim Sparwasser zur Verfügung gestellt (Lahl *et al.*, 2007)) wurden am Institut für Virologie und Immunbiologie gezüchtet. Es wurden 7-15 Wochen alte Mäuse verwendet.

2.7 Antikörper

Antikörper	Firma	Format
Ratte anti-Maus CCR6	BD Biosciences	Alexa Flour 647
Ratte anti-Maus CD4	BD Biosciences	Alexa Flour 700, APC, FITC, PE, PerCP, APC
Ratte IgG	eBioscience	APC
Ratte anti-Maus Foxp3	eBioscience	APC, eFlour 450, PE
Ratte anti-Maus IL-10	BD Biosciences	APC, FITC, PE
Ratte IgG2b	BD Biosciences	APC, FITC, PE
Maus anti-Ratte 10-7A	isoliert von Kirsty McPherson	aufgereinigt
Hamster anti-Maus CD3e	BD Biosciences	aufgereinigt
Kaninchen anti-Maus aktive Caspase 3	Cell Signaling	aufgereinigt
Maus anti-Maus CD28 (D665)	Exbio, Serotec	aufgereinigt
Maus anti-Maus CD28 (E18)	Exbio	aufgereinigt
Maus anti-Maus TGFβ 1,2,3 (1D11)	R&D Systems	aufgereinigt
Maus IgG1 (PPV-06)	Exbio	aufgereinigt
Ratte anti-Maus CD16/CD32 (F _c -Block)	BD Biosciences	aufgereinigt
Ratte anti-Maus CD3e	BD Biosciences	aufgereinigt
Ratte anti-Maus IL-10R (1B1.2)	Exbio	aufgereinigt
Ratte anti-Maus IL-2 (S4B6.1)	Exbio	aufgereinigt
Maus anti-Ratte IgG	Jackson ImmunoResearch	Biotin
Ratte anti-Maus CCR5	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus CD11b	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus CD25 (7D4)	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus CD45R/B220	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus CD45RB	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus CD49b (Dx5)	BD Biosciences	Biotin
NK pan		

Antikörper	Firma	Format
Ratte anti-Maus CD8a (Ly-2)	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus ICOS	BD Biosciences	Biotin
Ratte anti-Maus Ter 119/erythroid cells (Ly-76)	BD Biosciences	Biotin
Ziege anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch	Biotin
Ratte anti-Maus CCR7	eBioscience	Biotin, eFlour450
Hamster anti-Maus CTLA-4	BD Biosciences	Biotin, PE
Hamster anti-Maus Bcl-2	BD Biosciences	FITC
Hamster anti-Maus Helios	Biolegend	FITC
Hamster IgG	BD Biosciences	FITC
Ratte anti-Maus CD25	BD Biosciences	FITC
Ratte anti-Maus GITR	BD Biosciences	FITC
Ratte anti-Maus CD103	BD Biosciences	FITC, PE
Ratte anti-Maus CD25	BD Biosciences	FITC, PE
Ratte anti-Maus CD44	BD Biosciences	FITC, PE
Ratte anti-Maus CD62L	Biolegend	FITC, PE
Ratte anti-Maus CD90.2	Biolegend	Pacific Blue
Ratte anti-Maus CD8	BD Biosciences	Pacific Blue
Maus anti-Maus LAP	Biolegend	PE
Ratte anti-Maus IgM	PharMingen	PE
Ratte anti-Maus IL-10R (1B1.3a)	Biolegend	PE
Ratte anti-Maus IL-2	BD Biosciences	PE
Ratte anti-Maus IL-4	BD Biosciences	PE
Ratte anti-Maus PD-1	eBioscience	PE
Ratte anti-Maus TNF	BD Biosciences	PE
Ratte anti-Maus CD39	eBioscience	PE-Cy7
Maus anti-Maus CD90.1	BD Biosciences	PerCP

2.8 Magnetische Partikel

Antikörper	Firma
CD90.2 MicroBeads, Maus	Miltenyi Biotec
Pan Maus IgG Dynabeads	Invitrogen
Schaf anti-Maus IgG Dynabeads	Invitrogen
Streptavidin MicroBeads	Miltenyi Biotec

2.9 Biochemische Reagenzien

Reagenz	Firma
7-AAD	BD Biosciences
Annexin V FITC	BD Biosciences
Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Invitrogen
Dexamethason	Sigma
Diphtherietoxin	Calbiochem/Merck
DMSO	AppliChem
GolgiStop (Monensin)	BD Biosciences
humanes rekombinantes IL-2	Novartis
humanes rekombinantes TGFβ	eBioscience
Ionomycin	Sigma
PMA	Sigma
SB431542 (TGFβR Inhibitor)	Sigma
Staphylokokken Enterotoxin B	Sigma

2.10 Reagenzien Kits

Maus IL-10 Sekretionsassay

Cell Enrichment and Detection Kit (PE) (Miltenyi Biotec, Cat. 130-090-490)

Detection Kit (PE) (Miltenyi Biotec, Cat. 130-090-489)

Detection Kit (APC) (Miltenyi Biotec, Cat. 130-090-939)

Foxp3 Staining Kit (eBioscience, Cat. 00-5523-00)

IL-10 ELISA (BD OptEIA™ Set Mouse IL-10 Cat. 2657KI)

Perm/Wash-Puffer (BD Biosciences, Cat. 554723)

Cytometric Bead Array (CBA)

Maus IL-2 Flex Set (BD Biosciences, Cat. 558297)

Maus IL-4 Flex Set (BD Biosciences, Cat. 558298)

Maus IL-5 Flex Set (BD Biosciences, Cat. 558302)

Maus IL-6 Flex Set (BD Biosciences, Cat. 558301)

Maus IL-10 Flex Set (BD Biosciences, Cat. 558300)

Maus IL-12p70 Flex Set (BD Biosciences, Cat. 558303)

Maus IFN γ Flex Set (BD Biosciences, Cat. 558296)

Maus TNF Flex Set (BD Biosciences, Cat. 558299)

FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Cat. 51204)

EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Cat. D5001)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Gewinnung von Milz- und Lymphknotenzellen

Zur Herstellung einer Zellsuspension wurden Milz und Lymphknoten (inguinale, mesenterische, lumbale, axillare, brachiale und cervicale Lymphknoten) aus der Maus präpariert und die Organe über ein Nygonsieb (70 μ m) zerrieben. Für die Erythrozytenlyse wurden die mit BSS/BSA gewaschenen Milzzellen 10 min mit TAC-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 2-mal mit BSS/BSA gewaschen (5 min bei 4 °C, 1500 rpm). Anschließend wurden die Lymphknoten- und Milzzellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe von Trypanblau-Färbung wurde die Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Suspension 1:10 bzw. bei geringer Zellzahl 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Ca. 10 µl der gut gemischten Verdünnung wurden zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer gegeben, anschließend hellleuchtende Zellen im Mikroskop als lebende Zellen gezählt. Tote Zellen, die sich durch das Trypanblau bläulich verfärben, wurden nicht mitgezählt.

3.1.3 Zellaufreinigung

3.1.3.1 Negative Selektion von CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

Lymphknoten- bzw. Milzzellsuspension wurde in BSS/BSA aufgenommen ($1 \cdot 10^8$ Zellen/ml). Pro $1 \cdot 10^8$ Zellen wurden je 1 µl Biotin Ratte anti-Maus Ter 119/erythroid cells (markiert Erythrozyten), Biotin Ratte anti-Maus CD8a (markiert cytotoxische T-Zellen), Biotin Ratte anti-Maus CD49b NK pan (markiert NK-Zellen), Biotin Ratte anti-Maus CD45R/B220 (markiert B-Zellen), Biotin Ratte anti-Maus CD11b (markiert Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen), Biotin Maus anti-Ratte IgG und Biotin Ziege anti-Maus IgG (letzteres nicht bei CD28SA behandelten Mäusen) für 15 min 4 °C inkubiert. Bei der Aufreinigung CD4⁺CD25⁻ Zellen wurden zusätzlich 5 µl Biotin Ratte anti-Maus CD25 (markiert regulatorische und aktivierte T-Zellen) zugegeben. Die ungebundenen Antikörper wurden durch Waschen (4 °C, 5 min, 1500 rpm) mit BSS/BSA entfernt. Die Zellen wurden in BSS/BSA resuspendiert ($1 \cdot 10^8$ /Zellen/ml), pro $1 \cdot 10^8$ Zellen 50 µl Streptavidin MicroBeads zugegeben und für 20 min unter mehrmaligem, sanftem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ein zweites Mal gewaschen und auf die vorher vorbereitete LS-Säule bzw. LD-Säule bei CD4⁺CD25⁻ Aufreinigung gegeben. Die erhaltenen unmarkierten Zellen waren mit einer Reinheit von über 95% CD4⁺ bzw. über 98% CD4⁺CD25⁻.

3.1.3.2 Positive Selektion von CD4⁺CD25⁺ Zellen

Der Isolation von CD4⁺ Zellen wurde die Isolation der CD25⁺ Zellen angeschlossen. Zu den CD4⁺ Zellen wurde pro $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml 15 µl Biotin Ratte anti-Maus CD25 zugegeben. Dabei wurde der Klon 7D4 verwendet, der die Funktion des IL-2-Rezeptors nicht beeinträchtigt. Nach 15-minütiger Inkubation im Kühlschrank wurden die ungebundenen Antikörper gewaschen (4 °C, 5 min, 1500 rpm) und anschließend pro $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml 50 µl Streptavidin MicroBeads zugegeben. Die Partikel wurden für 20 min bei 4 °C inkubiert und die Zellen nach einem weiteren Waschschrift über eine LS- oder MS-Säule getrennt. Die

CD25⁺ Zellen wurden dabei in der Säule durch die magnetische Bindung festgehalten und erst nach dem Waschen der Säule mit Hilfe eines Stempels außerhalb des Magnetfeldes herausgelöst. Die Reinheit der CD4⁺CD25⁺ Zellen betrug mindestens 70%.

3.1.3.3 Anreicherung durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS-Sort)

Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung von Zellen mit bestimmten Oberflächenmarkern ist das Sortieren der Zellen mittels FACS-Sorter. Die Zellsuspension wird dabei so durch eine Düse gepresst, dass die extrazellulär gefärbten bzw. durch ein Transgen fluoreszierenden Zellen einzeln nacheinander an einem Laser vorbeigeführt werden. Der Laser misst wie bei einem FACS-Gerät die Fluoreszenz und die Lichtstreuung. Anhand dieser Werte werden die gewünschten Zellen ermittelt und im Dotplot auf dem Bildschirm markiert. Im Anschluss an den Laser ist im FACS-Sorter eine Sortierelektronik angeschlossen. Aus dem Flüssigkeitsstrahl bilden sich hier kleine Tröpfchen, die von der Sortierelektronik je nach Markierung der Zelle positiv oder negativ aufgeladen werden. Je nach Ladung der Tröpfchen werden sie dann nach rechts oder links abgelenkt und somit die darin enthaltenen Zellen getrennt. So konnten Zellen in IL-10⁺/IL-10⁻ (mittels Phycoerythrin (PE) Markierung), IL-10⁺Foxp3⁺ /IL-10⁻Foxp3⁺ (mittels PE und transgenem GFP (*grün fluoreszierendes Protein*)), Foxp3⁺ /Foxp3⁻ (mittels transgenem GFP bzw. RFP (*rot fluoreszierendes Protein*)) aufgetrennt werden. Die Reinheit betrug zwischen 90% und 99%.

3.1.4 Kultivierung von T-Zellen

Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS und SC kultiviert und auf unterschiedliche Weise stimuliert: anti-CD3 immobilisiert (1 bzw. 2 µg/ml), IL-2 (200 U/ml) und/oder anti-CD28 (5 µg/ml). Verwendet wurden aufgereinigte CD4⁺, CD4⁺CD25⁺ bzw. IL-10⁺Foxp3⁺/IL-10⁻Foxp3⁺ Milz- und Lymphknotenzellen, die für 30 min bis drei Tage in einer 24, 48 oder 96 Napf-Platte kultiviert wurden. Die Zellkonzentration lag dabei zwischen 2,5·10⁵ und 1·10⁶ Zellen/ml.

3.1.5 *In vitro* Generierung induzierter regulatorischer T-Zellen

Aufgereinigte CD4⁺CD25⁻ bzw. CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen wurden mit immobilisierten anti-CD3 (0,2 - 5 µg/ml) und anti-CD28 (2,5 - 160 µg/ml) bzw. immobilisierten CD28SA (5 - 20 µg/ml, Exbio) oder mit an Dynabeads gebundenen anti-CD3/anti-CD28 (Verhältnis 1:10 bzw. 1:3) bzw. CD28SA (100 µg/ml, Serotec) in An- und Abwesenheit von IL-2 (100 U/ml) und TGFβ (5 ng/ml) stimuliert. Bei Kultivierung über längere Zeiträume wurden die Zellen alle 3-4 Tage gesplittet und das fehlende Volumen mit warmem Medium und IL-2 (200 U/ml) aufgefüllt. Um die Abhängigkeit der Konversion von IL-2 und TGFβ zu

bestimmen, wurden die Zellen in Anwesenheit von Inhibitoren und blockierenden Antikörpern kultiviert: SB431542 (ALK5 (TGF β Typ I Rezeptor) Inhibitor, blockiert TGF β Signalweg, 40 nmol/ml), S4B6 (anti-IL-2 Antikörper, blockiert IL-2 Bindung an IL-2 Rezeptor, 10 μ g/ml), anti-TGF β (anti-TGF β Antikörper, blockiert TGF β Bindung an TGF β Rezeptor, 0,2 μ g/ml).

3.1.5.1 mittels immobilisierten Antikörpern

Für die Immobilisierung von anti-CD3 und anti-CD28 wurden die Antikörper in Bikarbonat-Puffer über Nacht bei 4 °C inkubiert (50 μ l/Napf einer 96 Napf Flachbodenplatte). Am nächsten Tag wurde die Lösung abgesaugt und dreimal mit BSS/BSA gewaschen. Für die Immobilisierung des CD28SA wurde die Platte mit Ziege anti-Maus Antikörpern (50 μ g/ml) in Bikarbonat-Puffer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit BSS/BSA abgewaschen. Um eine optimale Bindung des Superagonisten an den anti-Maus Antikörper zu ermöglichen, wurde er mindestens 30 min vor den Zellen in die Näpfe gegeben. Die CD4⁺CD25⁻ Zellen ($5 \cdot 10^5$ /ml) wurden anschließend für vier Tage bei 37 °C kultiviert.

3.1.5.2 mittels Antikörper-beschichteten Dynabeads

Pan Maus IgG bzw. Schaf anti-Maus IgG Dynabeads wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß im 10-fachen Volumen der Stocklösung in PBS aufgenommen. Nach einer Minute im Magnetfeld wurde das überschüssige PBS abpipettiert und dreimal durch frisches PBS ersetzt. Die nun gewaschenen Dynabeads wurden mit CD28SA (100 μ g/ml) bzw. mit Ratte anti-Maus CD3 und Maus anti-Maus CD28 Antikörpern im Verhältnis 1:10 für mindestens eine Stunde bei 37 °C auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads wieder dreimal im 10-fachen Volumen der Stocklösung mit PBS gewaschen und zuletzt in RPMI Medium resuspendiert. Es wurden $2 \cdot 10^6$ CD4⁺CD25⁻ bzw. CD4⁺Foxp3⁻ Zellen mit $5 \cdot 10^6$ Dynabeads/ml zwischen einem und zehn Tagen in einer Flachbodenplatte bei 37 °C kultiviert. Zur Weiterverwendung bzw. für die FACS-Analyse wurden die Dynabeads mit Hilfe des Magneten von den Zellen durch mehrmaliges Waschen mit warmen RPMI Medium oder BSS/BSA getrennt.

3.1.6 *In vitro* Suppressionsassay

Aufgereinigte CD4⁺CD25⁻ Effektor-T-Zellen ($5 \cdot 10^4$) von kongenen Thy1.1 Mäusen wurden mit CFSE (10 μ M) für 5 min bei Raumtemperatur markiert und für drei Tage in einer 96 Napf U-Bodenplatte zusammen mit verschiedenen Verdünnungen isolierter Tregs in Anwesenheit von löslichem anti-CD3 (1 μ g/ml) und bestrahlten, aufgereinigten Thy1.2⁻

Milz APZs (20 Gy , $2 \cdot 10^5$) kultiviert. Die Proliferation der Effektorzellen wurde anhand der Verdünnung des CFSE bestimmt. Die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (acd) wurde nach der Formel $\Sigma(\% \text{ der Zellen in Generation } (n) \cdot n)/100$, ($n = \text{Nummer der Generation}$) berechnet. Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Suppression von IL-10 wurde zusätzlich blockierender anti-IL-10 Rezeptor Antikörper ($10 \mu\text{g/ml}$) zugegeben.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA Aufreinigung

Die Aufreinigung von $1 \cdot 10^6$ und $2 \cdot 10^6$ isolierten $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ bzw. $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^-$ Zellen wurde mit Hilfe des FlexiGene DNA Kits entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Abschließend wurde die DNA je nach Pelletgröße in $20\text{-}50 \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst.

3.2.2 Nachweis von DNA Methylierung

Der Nachweis methylierter DNA in Treg spezifischen Demethylierungsregionen (TSDR) im *Foxp3* Locus wurde am Pathologischen Institut von Dr. Stefan Klein-Heßling durchgeführt. Für die Bestimmung des Methylierungsstatus macht man sich zu Nutze, dass methyliertes Cytosin stabil ist gegenüber einer Bisulfit-Behandlung, während unmethyliertes Cytosin in Urazil umgewandelt wird. Durch anschließende Sequenzierung des Amp2 Bereiches (Floess *et al.*, 2007) der TSDR wurde der Methylierungszustand von 12 CpGs bestimmt.

3.3 Tierexperimentelle Methoden

3.3.1 *In vivo* Expansion mit CD28SA D665

Maus anti-Maus superagonistischer monoklonaler CD28 Antikörper (D665) wurde von Exbio oder Serotec im Bioreaktor mit einer geringen Endotoxin Konzentration produziert. CD28SA ($200 \mu\text{g/Maus}$) oder PBS als Kontrolle wurden intraperitoneal injiziert.

3.3.2 Depletion regulatorischer T-Zellen *in vivo*

DEREG (*depletion of regulatory T-cells*) Mäuse, die neben GFP auch einen Diphtherietoxin (DT) Rezeptor unter der Kontrolle des *Foxp3* Promotors exprimieren, wurde an fünf Tagen jeweils intraperitoneal DT ($1 \mu\text{g}$) injiziert, bevor sie abschließend mit CD28SA behandelt wurden. Kontrollgruppen erhielten PBS anstelle von DT und/oder CD28SA. Die Effektivität der *Foxp3* Depletion wurde mit Hilfe der GFP Expression in Blutproben am FACS überprüft.

3.3.3 Induktion einer systemischen Zytokinausschüttung mit Corticosteroid Behandlung

C57BL/6 Mäuse wurden drei Stunden vor der CD28SA Stimulation (200 µg) mit Dexamethason (Dex, 5 µg/g Maus) intraperitoneal vorbehandelt. Die einmalige intravenöse Injektion von bakteriellem Superantigen SEB (Staphylokokken Enterotoxin B, 50 µg) wurde anschließend zeitgleich mit dem Superagonisten verabreicht. Mittels CBA wurde eine Stunde nach der letzten Injektion die Zytokinkonzentration im Blutserum analysiert.

3.3.4 Implantation eines Polyester-Polyurethan Schwämmchens

Polyester-Polyurethan Schwämmchen (5x5 mm²) getränkt mit hitzeinaktivierten *Listeria monocytogenes* wurden C57BL/6 Mäusen unter Isofluran Narkose subkutan implantiert (Thiede *et al.*, 1988). Nach vier Tagen wurden die Mäuse mit CD28SA (200 µg) oder PBS intraperitoneal behandelt. An Tag 7 wurden die Schwämmchen wieder entnommen und nach mehrmaligem Waschen mit BSS/BSA die eingewanderten Zellen Foxp3 und IL-10 via IL-10 Sekretionsassay gefärbt. Zum Vergleich wurden die Lymphknotenzellen dieser Mäuse analysiert.

3.3.5 Adoptiver Zelltransfer

Aufgereinigte CD4⁺, CD4⁺Foxp3⁻ bzw. IL-10⁻CD4⁺ T-Zellen aus unbehandelten bzw. CD28SA stimulierten Thy1.1, DEREK oder CD28-defizienten Mäusen wurden, mit Ausnahme der CD4⁺Foxp3⁻ Zellen aus DEREK Mäusen, für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit CFSE (10 µM) markiert. 7·10⁶ (CD4⁺Foxp3⁻) bzw. 1·10⁷ Zellen wurden in PBS ein Tag vor der CD28SA Stimulation intravenös in C57BL/6, Thy1.1, CD28-defiziente oder IL-2-defiziente Mäuse transferiert. Drei Tage nach der Stimulation wurden die Lymphknotenzellen analysiert. Anhand der CFSE Verdünnung der transferierten Zellen wurde die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (acd) bestimmt (Berechnung s. *Abschnitt 3.1.6*).

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 FACS-Analyse (Durchflusszytometrie)

3.4.1.1 Extrazelluläre Färbung

Bei einer extrazellulären Färbung werden Oberflächenmoleküle einer Zelle markiert. Dazu wurde eine Zellsuspension (1·10⁶ Zellen) mit FACS-Puffer gewaschen (4 °C, 5 min, 1500 rpm) und alle freien unspezifischen Bindungsstellen durch die 10-minütige Inkubation (4 °C im Dunkeln) mit F_c-Block gebunden. Anschließend erfolgte eine 15-30 minütige Inkubation (4 °C im Dunkeln) des jeweiligen Antikörpers (z.B. anti-CD4 Fluoresceinisothio-

cyanat (FITC)). Darauf wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (4 °C, 5 min, 1500 rpm) und falls notwendig ein sekundärer Antikörper (z.B. Streptavidin PerCP) für 20-30 min zugegeben. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen entweder für eine anschließende intrazelluläre Färbung fixiert oder direkt analysiert.

3.4.1.2 Intrazelluläre Färbung

Bei einer intrazellulären Färbung werden Proteine, die sich im Zellplasma oder im Zellkern befinden, gefärbt. Der Antikörper muss hierfür in die Zelle eindringen können.

Für die Färbung von Zytokinen wie z.B. IL-10 müssen die Zellen mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) und Ionomycin zur Produktion des Zytokins angeregt werden. PMA wirkt antigenunabhängig, intrazellulär stimulierend auf den Aktivierungsstatus der T-Zellen. Ionomycin bewirkt als Ionophor, dass PMA in die Zelle eingeschleust werden kann. Zusätzlich wird Monensin zugegeben, das einen Stopp in der Zytokinsekretion bewirkt, so dass es zu einer Anreicherung in der Zelle kommt. Für die gemeinsame Färbung von IL-10 und Foxp3 wurden die Zellen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) für vier Stunden mit PMA/Ionomycin/ Monensin in RPMI-Medium restimuliert. Nach der extrazellulären Färbung wurden die Zellen für mindestens 30 min mit Fixation/Permeabilization-Puffer (eBiosc) bei 4 °C im Dunkeln fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (4 °C, 5 min, 1500 rpm) und für 15 min im Perm/Wash-Puffer (BD) (4 °C im Dunkeln) inkubiert. Die Zellen waren nun durchlässig für den IL-10-Antikörper, der 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert wurde. Für die folgende Foxp3 Färbung wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer und einmal mit Permeabilisation-Puffer (eBiosc) gewaschen (4 °C, 5 min, 1500 rpm). Auch der Foxp3-Antikörper wurde 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit FACS-Puffer konnten die Zellen im FACS-Gerät analysiert werden. Für die Färbung anderer intrazellulärer Proteine (z.B. Helios, CTLA-4) wurde nach der Fixierung gleich die Permeabilisierung mit Permeabilisation-Puffer (eBiosc) abgeschlossen.

3.4.1.3 Annexin V- und 7AAD-Färbung

Annexin V ist ein Marker für apoptotische Zellen und bindet Phosphatidylserin, das im frühen Apoptosestadium auf die Außenseite der Membran gelangt. Bei intakten Zellen befindet sich Phosphatidylserin auf der cytoplasmatischen Innenseite der Membran, so dass Annexin V lebende Zellen nicht binden kann. 7AAD (Z Aminoactinomycin D) interkaliert mit DNA, die aber nur in toten Zellen mit aufgebrochener Membran für 7AAD zugänglich ist. 7AAD ist ein später apoptotischer Marker.

Für die Färbung wurden die Zellen ($1 \cdot 10^6$ Zellen) im FACS-Puffer aufgenommen und gewaschen (4 °C, 5 min, 1500 rpm). Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V und 7AAD 15 min lang inkubiert, mit FACS-Puffer verdünnt und innerhalb von 30 min am FACS-Gerät analysiert.

3.4.2 ELISA

Für den IL-10 ELISA wurden Mikrotiterplatten mit anti-Maus IL-10 „Capture“ Antikörper in „Coating“-Puffer bei 4 °C über Nacht immobilisiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasch-Puffer wurden die unspezifischen Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit „Assay Diluent“ geblockt. Der Standard wurde in einer Verdünnungsreihe aufgetragen und die Proben im Verhältnis 1:1 mit „Assay Diluent“ gemischt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde die Platte 5-mal gewaschen. Das IL-10 wurde vom biotinylierten anti-Maus IL-10 Detektions-Antikörper gebunden, an den wiederum das Streptavidin der Meerrettich-Peroxidase band. Die überschüssigen Reagenzien wurden nach einer Stunde abgewaschen. Das Enzym reagierte nun mit dem zugegebenen Substrat in einer Farbreaktion. Nach 15-20 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von H_3PO_4 abgestoppt. Der Menge an gebundenem IL-10 entsprechend wurde das Substrat in eine farbige Substanz umgesetzt. Daher konnte man anhand der Farbintensität, die durch photometrische Messung mit dem ELISA-Reader bestimmt wurde, auf die Menge an IL-10 in der Probe rückschließen. Mit Hilfe der Standardgeraden konnte die IL-10 Konzentration in pg/ml berechnet werden.

3.4.3 Cytometric Bead Array

Cytometric Bead Array (CBA) ist eine durchflusszytometrische Methode, die eine gleichzeitige sehr sensitive Quantifizierung (10 pg/ml) von mehreren Proteinen erlaubt. Antikörper beschichtete Partikel binden dabei spezifisch an das zu analysierende Protein. Da jede Partikel-Sorte des Arrays eine spezifische Fluoreszenz besitzt, können die Partikel gemischt und gleichzeitig analysiert werden.

Für die Quantifizierung von Zytokinen im Blutserum oder im Kulturüberstand wurden Maus „Capture Beads“, Standard bzw. PE Detektionsreagenz für IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN γ und TNF jeweils miteinander gemischt. Von der Standardlösung mit bekannter Konzentration der Zytokine wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Blutproben (Verdünnung 1:4) bzw. der Kulturüberstand (Verdünnung 1:10) und die Standardverdünnungsreihe wurden anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der „Capture Bead“ Mischung inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer wurde das

PE Detektionsreagenz-Gemisch für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Die Analyse am LSR II erfolgte nach einem abschließenden Waschschrift.

3.4.4 IL-10 Sekretionsassay

Mit Hilfe des Maus IL-10 Sekretionsassay lassen sich IL-10 produzierende Zellen nicht nur färben, sondern auch über den FACS-Sorter isolieren.

Die unisolierten, CD4⁺ oder CD4⁺CD25⁺ Lymphknoten- oder Milzzellen wurden durch CD28SA Stimulation *in vivo* bzw. zusätzlich über Nacht in einer 24 Napf-Platte (Stimulation s. *Abschnitt 3.1.4*) zur IL-10 Produktion angeregt. Die Zellsuspension wurde mit „IL-10 Catch Reagent“, einem Hybridantikörper spezifisch für das von allen Leukozyten exprimierte CD45 und für IL-10, für 45 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit sezerniertes IL-10 konnte so von den Antikörpern auf der IL-10 produzierenden Zelle gebunden werden. Die überschüssigen Antikörper und das ungebundene IL-10 wurden in einem Waschschrift entfernt und anschließend der IL-10 Detektions-Antikörper zugegeben. Dieser mit PE gekoppelte Antikörper band an das IL-10 der IL-10 produzierenden Zellen. Durch die Markierung der positiven Zellen mit PE konnten diese im FACS-Sorter von den ungefärbten Zellen getrennt werden. Die Reinheit der positiven Zellen betrug über 92% und die der negativen über 98%.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Zytokinausschüttung in CD28SA behandelten Mäusen

CD28SA wurde als Therapie bei unterschiedlichen inflammatorischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen im NagermodeLL erfolgreich eingesetzt. Die Injektion des Antikörpers bewirkte dabei unter anderem eine gut verträgliche polyklonale Expansion der Tregs (Kitazawa *et al.*, 2008; Lin, C. H. *et al.*, 2003). Ganz im Gegensatz dazu kam es bei der Erprobung des vollständig humanisierten superagonistischen CD28 mAk TGN1412 während der ersten Phase der klinischen Studie zu einer lebensbedrohlichen Zytokinausschüttung bei den freiwilligen Testpersonen (Suntharalingam *et al.*, 2006). Diese Komplikation wurde weder durch die vorangegangenen Experimente an Nagern noch durch die vorklinischen Studien an humanen mononuklearen Zellen des Blutes vorhergesehen (Duff, 2006). Um die mögliche Ursache für die fehlende Zytokinausschüttung im Nagersystem zu ermitteln, sollte der Mechanismus, durch den der Maus anti-Maus CD28SA D665 murine Tregs expandiert, näher untersucht werden.

4.1.1 Wirkung von CD28SA auf regulatorische T-Zellen

C57BL/6 Mäuse wurden einmal intraperitoneal (i.p.) mit Maus anti-Maus CD28SA (D665) behandelt. Ähnlich wie bei CD28SA behandelten Ratten (Lin, C. H. *et al.*, 2003) konnte auch in Mäusen drei bis vier Tage nach der CD28SA Injektion eine starke Splenomegalie (Vergrößerung der Milz) und Lymphadenopathie (Vergrößerung der Lymphknoten) beobachtet werden (**Abb. 6**). Den größten Anteil an der Zellexpansion hatten dabei die CD4⁺ T-Zellen (5-fach im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle), innerhalb derer insbesondere die CD4⁺Foxp3⁺ Tregs dramatisch zunahm (15-fach im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) (**Abb. 7**). Der Anteil an Tregs in CD4⁺ T-Zellen stieg von 5% bis 10% in unbehandelten Mäusen nach CD28SA Behandlung auf bis zu 40% der CD4⁺ T-Zellen an (**Abb. 7A**). Die kinetische Analyse zeigte eine transiente Expansion der Tregs und CD4⁺ T-Zellen, die drei bis vier Tage nach CD28SA Behandlung ihr Maximum erreichte. Nach acht Tagen näherten sich die Zellzahlen wieder den Ausgangswerten, wobei der Anteil an Foxp3⁺ Zellen etwas erhöht blieb (**Abb. 7B**).

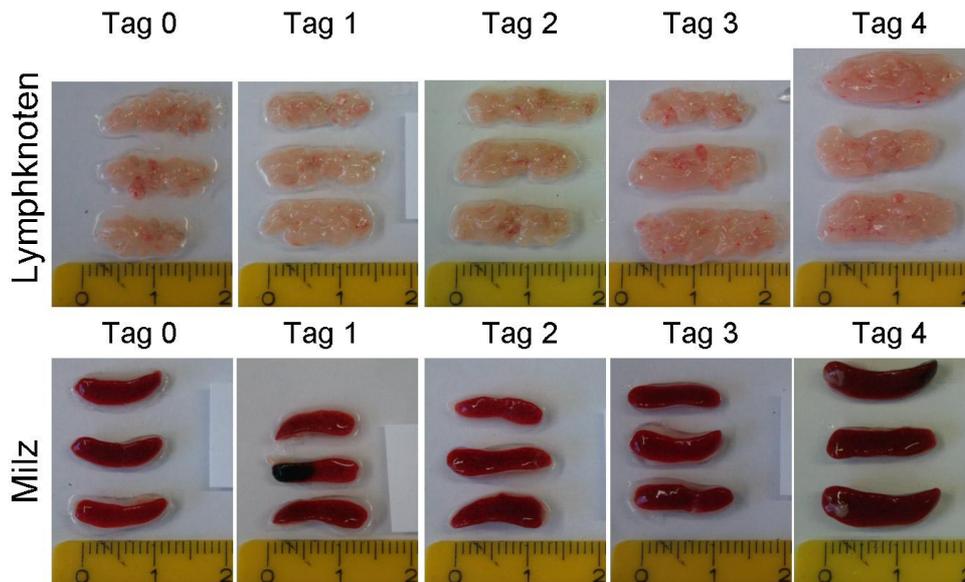


Abb. 6: Zellexpansion in Lymphknoten und Milz nach *in vivo* CD28SA Behandlung
Lymphknoten und Milz von C57BL/6 Mäusen wurden 0-4 Tage nach CD28SA Behandlung entnommen und deren Größe miteinander verglichen.

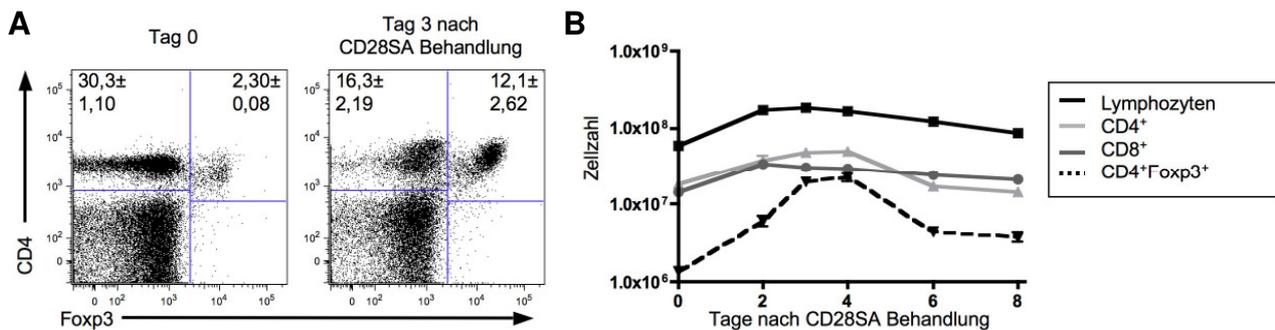


Abb. 7: T-Zellantwort auf *in vivo* CD28SA Behandlung
(A) CD4 und Foxp3 Färbung in unstimulierten Mäusen und Mäusen 3 Tage nach CD28SA Behandlung *in vivo*. (B) Kinetik der Zellzahlen nach CD28SA Gabe. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SD von 3 Mäusen.

Sowohl die Gesamtzahl der Lymphozyten, die Anzahl an CD4⁺ und an CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen als auch der Anteil an Foxp3⁺ in CD4⁺ T-Zellen stieg in Abhängigkeit von der CD28SA Dosis in den Lymphknoten und der Milz an (**Abb. 8**). Die optimale Dosis von 200 µg/Maus wurde bei allen weiteren *in vivo* Experimenten verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen drei Tage nach CD28SA Behandlung analysiert. Es stellte sich die Frage, ob der dramatische Anstieg an Foxp3⁺ T-Zellen eine Folge von Zellteilung bereits vorhandener Tregs und/oder wie in *Abschnitt 1.5* beschrieben einer Induktion der Foxp3 Expression in konventionellen T-Zellen war. Dies sollte durch adoptive Zelltransfers geklärt werden.

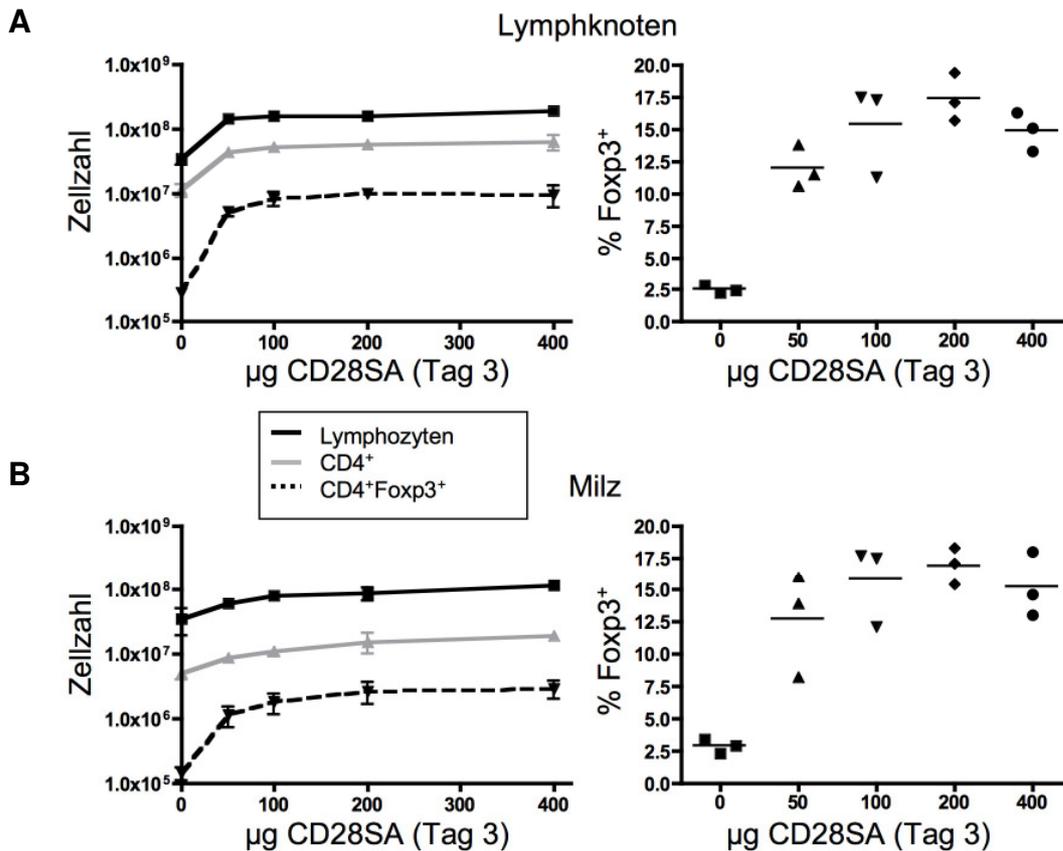


Abb. 8: Titration der CD28SA Konzentration *in vivo*

Zellzahl der Lymphozyten, CD4⁺ und CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen und Anteil der Foxp3⁺ in den CD4⁺ T-Zellen in (A) Lymphknoten und (B) Milz in Abhängigkeit der CD28SA Konzentration 3 Tage nach Injektion. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SD von 3 Mäusen.

Zuerst wurden CD4⁺ T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen mit CFSE markiert und kongenen Thy1.1 Mäusen i.v. (intravenös) injiziert. Diese Mäuse wurden nach 24 Stunden mit CD28SA stimuliert. Nach weiteren drei Tagen konnte anhand der CFSE Markierung die Anzahl an Zellteilungen der transferierten T-Zellen in Abhängigkeit der Foxp3 Expression analysiert werden. Im Einklang mit den Kinetikdaten, bei denen ein deutlich stärkerer Zellzahlanstieg in den CD4⁺Foxp3⁺ als in den CD4⁺ T-Zellen beobachtet wurde (**Abb. 7B**), zeigte sich eine präferenzielle Teilung der Foxp3⁺ Tregs gegenüber der Foxp3⁻ Tkons (**Abb. 9**).

Um die Möglichkeit der CD28SA vermittelten Foxp3 Induktion in Tkons zu überprüfen, wurden aufgereinigte Thy1.2⁺CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen aus DREG Mäusen in kongene Thy1.1 Mäuse transferiert und diese nach 24 Stunden mit CD28SA behandelt. An Tag 4 wurden die transferierten Zellen auf Foxp3 Expression untersucht. Zu beachten ist, dass die CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen nach der Aufreinigung noch einen geringen Anteil an Foxp3⁺ Zellen (<1%) enthielt. (**Abb. 10**, links). Der Anteil an Foxp3⁺ in den CD4⁺ T-Zellen stieg nach der Stimulation mit CD28SA auf 1,38% an. Im Vergleich dazu enthielten die endogenen Zellen jedoch über 33% Foxp3⁺ Zellen in den CD4⁺ T-Zellen (**Abb. 10**, rechts). Der beo-

bachtete Anstieg an F_{oxp3}⁺ Zellen von unter 1% auf 1,38% innerhalb der transferierten Zellen könnte durch eine geringe *de novo* Induktion der F_{oxp3} Expression in T_kons entstanden sein. Aufgrund des hohen Expansionsfaktors der endogenen F_{oxp3}⁺ T-Zellen ist jedoch die Proliferation der vorhandenen Tregs in der aufgereinigten Ausgangszellpopulation wahrscheinlicher.

Der Grund für die Zunahme an Tregs nach CD28SA Stimulation ist somit die Proliferation bereits vorhandener F_{oxp3}⁺ Zellen.

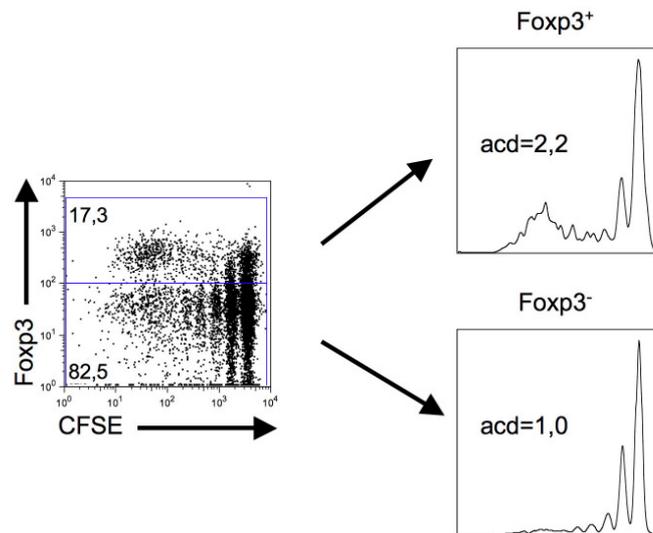


Abb. 9: Zellteilung der T_kons und Tregs nach CD28 Stimulation *in vivo*

1·10⁷ aufgereinigte CFSE-markierte CD4⁺ T-Zellen wurden einen Tag vor CD28SA Behandlung i.v. in kongene Thy1.1 Mäuse transferiert. Die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (acd) der F_{oxp3}⁺ und F_{oxp3}⁻ Zellen wurde mittels CFSE Verdünnung an Tag 4 bestimmt.

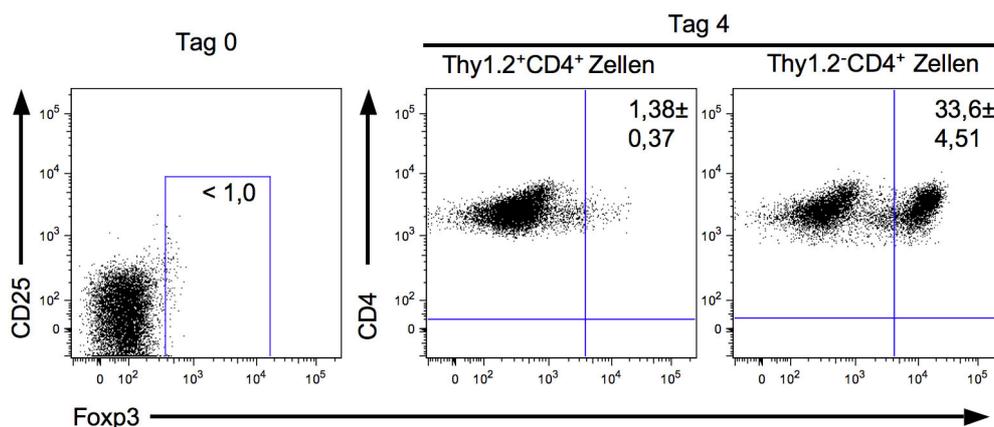


Abb. 10: Präferentielle Expansion bereits existierender Tregs nach CD28SA Stimulation

1·10⁷ aufgereinigte CD4⁺F_{oxp3}⁻ T-Zellen aus DEREK Mäusen wurden einen Tag vor CD28SA Behandlung i.v. in kongene Thy1.1 Mäuse transferiert. Der Anteil an F_{oxp3}⁺ T-Zellen wurde an Tag 4 bestimmt. Die Zahlen zeigen Mittelwerte ± SD von 3 Mäusen.

4.1.2 IL-2 Abhängigkeit der CD28SA vermittelten CD4⁺ T-Zellproliferation

Für die Aktivierung von T-Zellen wird neben der Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und Antigen-präsentierendem MHC-Molekül auch ein kostimulatorisches Signal, das z.B. über die Interaktion von CD28 mit CD80/86 entsteht, benötigt (Hara *et al.*, 1985). Die Aktivierung des TZR führt zur Sekretion von IL-2 und zur Expression des IL-2 Rezeptors. IL-2 stimuliert das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben aktivierter T-Zellen. Es ist jedoch auch für Tregs essentiell, da diese selbst kein IL-2 produzieren können und dieses sowohl für den Erhalt der Homöostase als auch für die Aktivierung und Proliferation benötigen (Barthlott *et al.*, 2005; de la Rosa *et al.*, 2004). Die Abhängigkeit der CD28SA induzierten Proliferation von CD28 bzw. IL-2 vermittelten Signalen wurde mit Hilfe von transgenen Mäusen und adoptiven Zelltransfers analysiert.

Zur Klärung der Abhängigkeit der CD4⁺ T-Zellproliferation vom CD28 Signal wurden CFSE markierte CD4⁺ T-Zellen von wildtypischen oder CD28 defizienten Mäusen, die jeweils ca. 10% bzw. 2% Tregs enthielten, in wildtypische Mäuse transferiert, die einen Tag später mit CD28SA stimuliert wurden. Die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (acd) der Tkons und Tregs wurde an Tag 4 analysiert (**Abb. 11A**). Wildtypische transferierte Tkons und Tregs teilten sich im Gegensatz zu den CD28 defizienten Donorzellen. Beim Transfer CFSE markierter Wildtyp-Zellen in CD28 defiziente Mäuse teilten sich die Zellpopulationen ebenfalls, allerdings in einem geringeren Maße verglichen mit dem Transfer in Wildtypmäuse. Daraus lässt sich schließen, dass das CD28 Signal für die Tkons und Tregs selbst „in cis“ wichtig ist. Allerdings scheint auch ein weiteres von „Bystander“ Zellen abhängiges Signal für beide Populationen notwendig zu sein.

Ein wichtiges Signal, das sowohl Tkons als auch Tregs für die Aktivierung und Proliferation benötigen, ist IL-2. Ob dieses Signal auch für die CD28SA induzierte Proliferation eine Rolle spielt, wurde durch den Transfer wildtypischer CFSE markierter CD4⁺ T-Zellen in wildtypische und IL-2 defiziente Mäuse überprüft (**Abb. 11B**). Ähnlich wie bei fehlendem CD28 Signal konnten sich die transferierten Zellen im IL-2 defizienten Empfängertier nur in geringem Maße teilen. Das von den wildtypischen Spenderzellen produzierte IL-2 reichte nicht aus, um eine ähnlich starke Proliferation wie bei einem Transfer in wildtypische Mäuse zu generieren. Dies zeigte, dass die CD28SA vermittelte Proliferation sowohl von Tkons als auch von Tregs von parakrinem IL-2 abhängig ist.

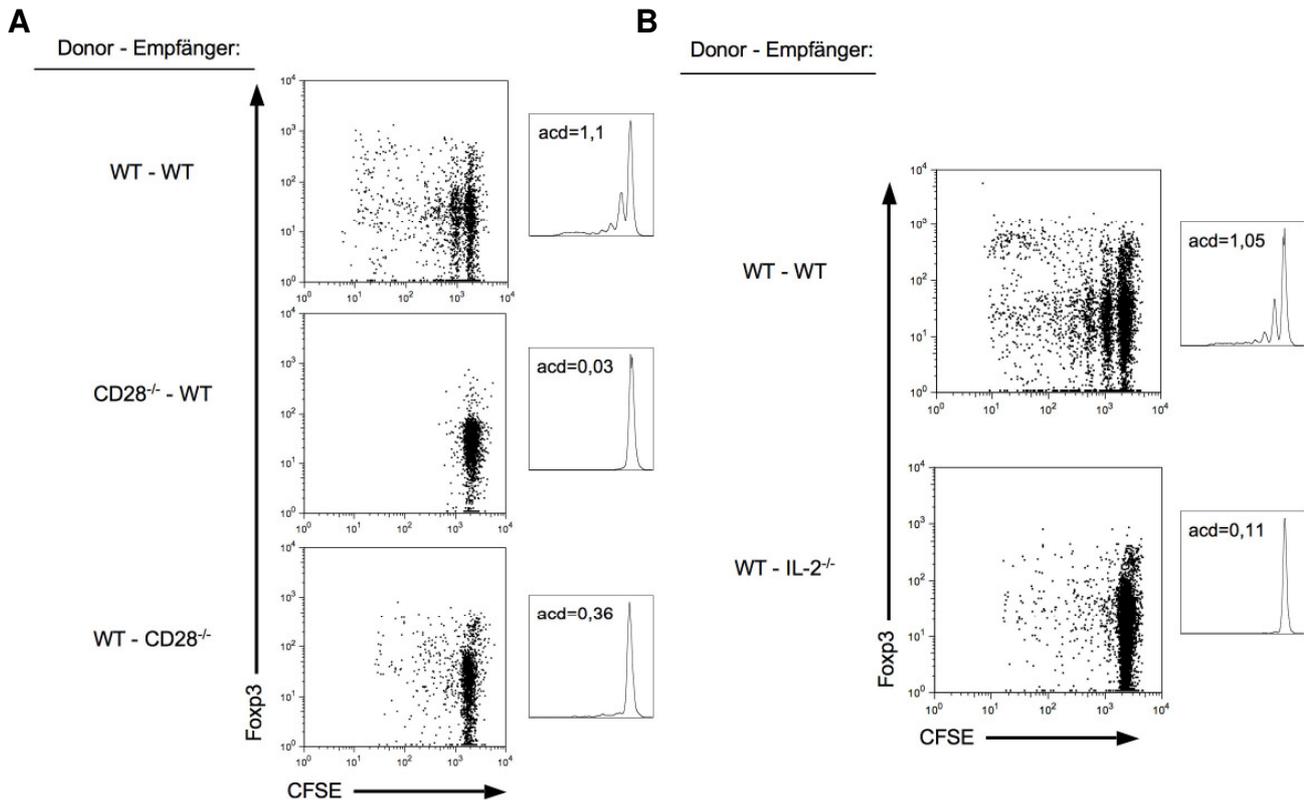


Abb. 11: CD28SA induzierte CD4⁺ T-Zellaktivierung in Abhängigkeit von CD28 und IL-2

1·10⁷ aufgereinigte CFSE-markierte CD4⁺ T-Zellen aus C57BL/6 oder kongenen Thy1.1 Mäusen wurden einen Tag vor CD28SA Behandlung i.v. in kongene Thy1.1 oder knock-out Mäuse transfertiert und nach 3 Tagen analysiert. **(A)** Abhängigkeit der Zellexpansion der transfertierten Zellen von CD28 auf Donor- und Empfängerzellen. **(B)** Abhängigkeit der Zellexpansion der transfertierten Zellen von der IL-2 Produktion der Empfängerzellen. Die Daten sind repräsentativ für jeweils zwei Versuche.

Zusammen ergeben diese Daten, dass für die CD28SA induzierte Expansion das CD28 Signal auf zweifache Weise benötigt wird. Zum einen müssen Tregs und Tkons selbst durch das Signal aktiviert werden, zum anderen induziert das CD28 Signal die Produktion des für die Proliferation benötigten IL-2 in „Bystander“ Tkons.

4.1.3 Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die systemische Zytokinausschüttung in CD28SA behandelten Mäusen

Die intravenöse Gabe von TGN1412 führte bei gesunden Testpersonen zu einer plötzlichen und schnellen Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF und IL-6 (Suntharalingam *et al.*, 2006). Ob es auch im Maussystem nach CD28SA Stimulation zur Ausschüttung von Zytokinen kommt, wurde mittels CBA (*cytometric bead array*) analysiert. Dazu wurden zwei, vier und 24 Stunden nach der CD28SA Injektion die Zytokinkonzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN γ und TNF im Blutserum analysiert. In unbehandelten Mäusen (0 Std.) konnten insgesamt nur sehr geringe Zytokinmengen in

der Zirkulation nachgewiesen werden (**Tabelle 3**). Auch nach CD28SA Injektion kam es in der Maus zu keiner starken Zunahme. Der höchste Anstieg auf ca. 170 pg/ml (nach 2 Std.) konnte bei IL-6 verzeichnet werden, der aber im Vergleich zur TGN1412 Studie mit Konzentrationen von über 5000 pg/ml (nach 4 Std.) (Suntharalingam *et al.*, 2006) immer noch sehr gering war. Auch die Mengen an pro-inflammatorischem TNF (nach 4 Std.: ca. 60 pg/ml, Vergleich TGN1412 Studie: 4600 pg/ml (Suntharalingam *et al.*, 2006)) und an anti-inflammatorischem IL-10 (nach 4 Std.: ca. 80 pg/ml, Vergleich TGN1412 Studie: 2000 pg/ml (Suntharalingam *et al.*, 2006)) stiegen kurzfristig an. Überraschenderweise konnte trotz der Abhängigkeit der CD28SA induzierten Proliferation von parakrinem IL-2 (**Abb. 11**) in der Maus lediglich ein minimaler Anstieg der IL-2 Konzentration (25 pg/ml nach 2 Std. im Vergleich zu 4000 pg/ml (nach 4 Std.) in der TGN1412 Studie (Suntharalingam *et al.*, 2006)) gemessen werden.

Zytokine (pg/ml)	Stunden nach CD28SA Injektion			
	0 Std.	2 Std.	4 Std.	24 Std.
IL-2	ND	26,43 ± 8,50	12,84 ± 5,17	ND
IL-4	0,49 ± 0,44	1,96 ± 0,90	1,87 ± 0,95	1,59 ± 1,50
IL-5	0,11 ± 0,18	1,11 ± 0,20	4,91 ± 1,68	25,97 ± 3,67
IL-6	1,71 ± 1,62	168,16 ± 54,67	125,09 ± 72,06	7,21 ± 3,61
IL-10	0,21 ± 0,16	9,86 ± 3,48	78,15 ± 54,44	6,94 ± 10,01
IL-12p70	0,13 ± 0,23	ND	0,88 ± 1,53	15,21 ± 18,13
IFN γ	0,42 ± 0,37	3,66 ± 3,41	1,08 ± 0,12	2,28 ± 0,32
TNF	ND	27,97 ± 24,73	56,07 ± 71,20	ND

Tabelle 3: Zytokinkonzentrationen im Blutserum nach CD28SA Injektion *in vivo*

Die Zytokinkonzentration wurde mittels CBA in unstimulierten Mäusen und 2, 4, und 24 Stunden nach CD28SA Behandlung gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SD von 3 Mäusen. ND: nicht detektierbar

Eine mögliche Erklärung für die geringe Menge an messbarem IL-2 in der Zirkulation wäre, dass Tregs, die den hochaffinen IL-2 Rezeptor konstitutiv exprimieren, nach CD28SA Stimulation das von Tkons produzierte IL-2 sofort aufbrauchen. Dieses IL-2 steht folglich den Tkons für die weitere Aktivierung nicht zur Verfügung. Zusätzlich können die nun aktivierten Tregs die Ausschüttung anderer Zytokine supprimieren. Um die Hypothese, dass die Tregs ausschlaggebend für die Suppression der systemischen Zytokinsekretion sind, zu überprüfen, wurden Tregs vor der CD28SA Behandlung *in vivo* depletiert. Dazu wurden DEREK (*depletion of regulatory T-cells*) Mäuse verwendet. Diese Tiere exprimieren ein Fusionsprotein bestehend aus eGFP und dem humanen Diphtherietoxin (DT)-Rezeptor unter der Kontrolle des *Foxp3* Promotors (Lahl *et al.*, 2007). DT hemmt in Zellen, die den spezifischen Rezeptor exprimieren, die Proteinsynthese, was im weiteren Verlauf zur

Apoptose der Zelle führt (Übersicht in Madshus *et al.*, 1992). Da Mauszellen resistent gegen DT sind (Pappenheimer *et al.*, 1982), werden in DEREK Mäusen bei DT Behandlung selektiv Foxp3 exprimierende Zellen depletiert. Zusätzlich kann durch die Foxp3 anzeigende GFP Expression die Depletion der Tregs im Blut und in den Lymphknoten direkt mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. DEREK Mäusen wurde nach fünfmaliger i.p. Behandlung mit DT an Tag 6 CD28SA injiziert. Zwei, vier und 24 Stunden später wurde den Mäusen Blut entnommen und im Serum mittels CBA die Zytokinkonzentrationen der gleichen Zytokine wie zuvor (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN γ , TNF) gemessen. Verglichen wurden die Zytokinmengen mit denen aus PBS, DT oder CD28SA behandelten DEREK bzw. WT (Wildtyp) Mäusen. Wie in **Abb. 12A** gezeigt war die Depletion der Foxp3⁺ Zellen in DT behandelten Mäusen erfolgreich. 24 Stunden nach der CD28SA Behandlung exprimierten in den Lymphknoten ca. 13% der CD4⁺ Zellen Foxp3. Dagegen konnte durch die vorherige DT Injektion die Frequenz auf unter 1% gesenkt werden. Die deutlich erhöhte Frequenz an CD25⁺ Zellen deutet allerdings auf einen gesteigerten Anteil an aktivierten T-Zellen hin, die wahrscheinlich eine Konsequenz der mangelnden Kontrolle durch Tregs ist.

In wildtypischen mit DT oder PBS behandelten Mäusen bzw. in PBS behandelten DEREK Mäusen kam es zu keiner systemischen Zytokinausschüttung. Auch blieb die Menge an zirkulierendem IL-4, IL-10, IL-12p70 und IFN γ in den übrigen behandelten DEREK Tieren niedrig. Eine leichte Erhöhung konnte dagegen bei der IL-5 Konzentration in der Treg depletierten und mit CD28SA behandelten Gruppe gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Wie in **Abb. 12B** dargestellt stiegen die Zytokinlevel von IL-2, IL-6 und TNF zwei bzw. vier Stunden nach CD28SA Gabe in der Gruppe mit depletierten Tregs im Vergleich zur Gruppe mit Tregs signifikant stärker an. Nach 24 Stunden sank die Zytokinkonzentration bereits wieder mit einem von der Treg Depletion abhängigem, signifikantem Unterschied. Dies zeigte, dass CD28SA durchaus auch in Mäusen die Fähigkeit besitzt, eine systemische Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine ähnlich wie beim Menschen auszulösen. Diese kann jedoch durch die Anwesenheit der Tregs inhibiert werden.

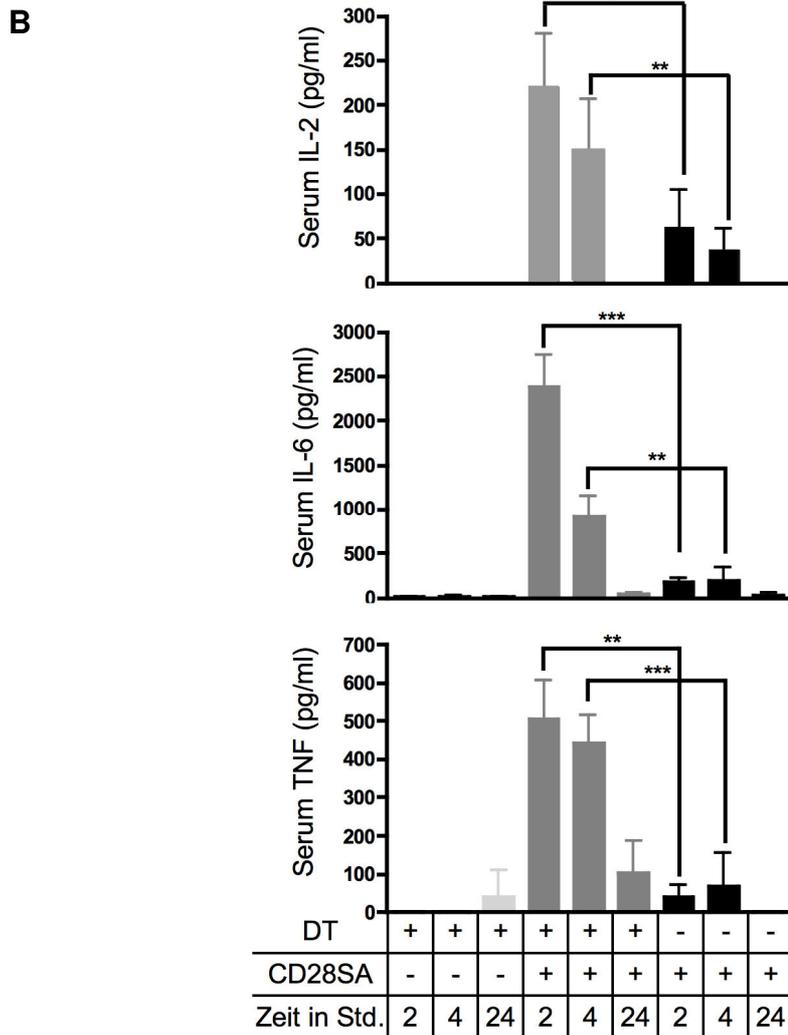
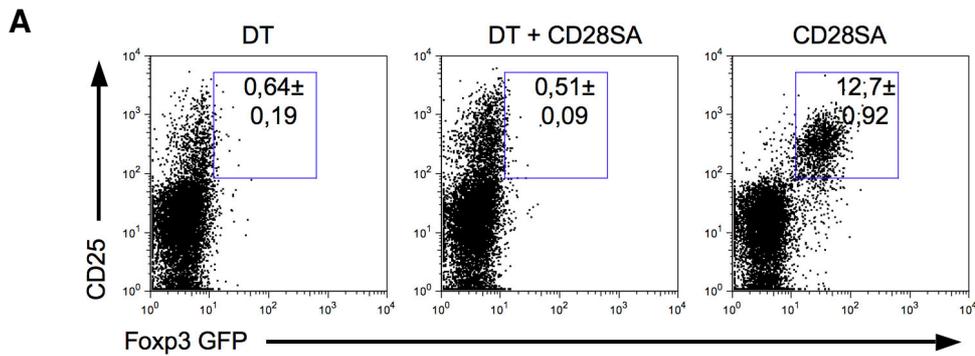


Abb. 12: Systemische Zytokinausschüttung in Treg depletierten Mäusen nach CD28SA Behandlung

DEREG Mäuse wurden fünf Mal i.p. mit Diphtherietoxin (1 µg/Maus und Tag) zur Depletion der Tregs vorbehandelt und einen Tag nach der letzten Injektion mit CD28SA stimuliert. **(A)** Frequenz der Fxp3 GFP⁺ Zellen in den CD4⁺ T-Zellen 24 Stunden nach CD28SA Injektion in den Lymphknoten. **(B)** Zytokinkonzentrationen im Blutserum gemessen 2, 4 und 24 Stunden nach CD28SA Gabe mittels CBA. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Mäusen. Ungepaarter t-Test: *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001

4.1.4 Einfluss von Corticosteroiden auf regulatorische T-Zellen nach CD28SA Behandlung

OKT3, ein Maus mAK, der spezifisch an die Epsilon-Kette des CD3 Moleküls bindet, wurde als Immunsuppressivum gegen Abstoßungsprozesse transplanterter Gewebe eingesetzt. Ähnlich wie TGN1412 verursacht auch OKT3 ein „Cytokine-Release Syndrom“, das sich jedoch durch die vorherige Gabe hoher Mengen an Corticosteroiden kontrollieren lässt (Chatenoud *et al.*, 1991). Corticosteroide wirken anti-inflammatorisch und immunsupprimierend, da sie unter anderem den Zugang der Leukozyten zu entzündliche Bereiche inhibieren. Zudem können sie die Funktion der Leukozyten wie auch der Fibroblasten und Endothelzellen beeinflussen und die Produktion und Wirkung humoraler Faktoren, wie proinflammatorischer Zytokine, supprimieren (Übersicht in Boumpas *et al.*, 1993). Um zukünftig über die Anwendung einer Kombination von Corticosteroid und TGN1412 nachzudenken, muss zunächst geklärt werden, ob der positive Effekt von CD28SA wie z.B. die Aktivierung der Tregs auch bei Gabe von Steroiden erhalten bleibt. Dazu wurden Mäuse drei Stunden vor der Gabe von CD28SA mit Dexamethason (Dex) behandelt. Da Mäuse auf CD28SA nicht mit einer systemischen Zytokinausschüttung reagieren (**Tabelle 3**), wurde diesen zusammen mit CD28SA das Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) injiziert. Das Superantigen SEB bindet, anders als andere Antigene, direkt an die α -Kette des MHC II-Moleküls und wird von der $V\beta$ -Kette des TZR erkannt. Dies führt zu einer massiven T-Zellaktivierung mit der daraus folgenden raschen Sekretion von Zytokinen wie TNF, IL-6 und IL-2 (Übersicht in Miethke *et al.*, 1993; Papageorgiou *et al.*, 2000). Die Zytokinkonzentrationen im Blutserum wurden aufgrund der schnellen SEB vermittelten Freisetzung von Zytokinen bereits eine Stunde nach der CD28SA bzw. SEB Injektion mittels CBA analysiert.

Für die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-12p70 konnte in keiner der Versuchsgruppen eine signifikante Änderung der Zytokinmenge gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Auch bei unbehandelten, CD28SA, Dex und Dex/CD28SA Mäusen konnten lediglich minimale Zytokinkonzentrationen nachgewiesen werden (**Abb. 13**). Im Gegensatz dazu kam es in der SEB und SEB/CD28SA Gruppe zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-2, IL-6, IL-10, TNF und IFN γ mit einem Trend zu stärkerer Zytokinausschüttung bei SEB/CD28SA Behandlung, der jedoch nur im Fall von IL-6 (4-facher Anstieg zu SEB) signifikant war. Durch die Vorbehandlung der SEB und SEB/CD28SA Mäuse mit Dex konnte die Menge an sezerniertem IL-2 um das bis zu 4-fache, bei IL-6 um das bis zu 10-fache, bei IL-10 um das bis zu 6-fache, bei TNF um das bis zu 20-fache und bei IFN γ um das bis zu 30-fache gesenkt werden im Vergleich zur jeweiligen Gruppe ohne Dex Vorbehandlung. Die Corti-

costeroid Vorbehandlung stellte somit eine effektive Methode dar, eine toxische Zytokinausschüttung zu inhibieren.

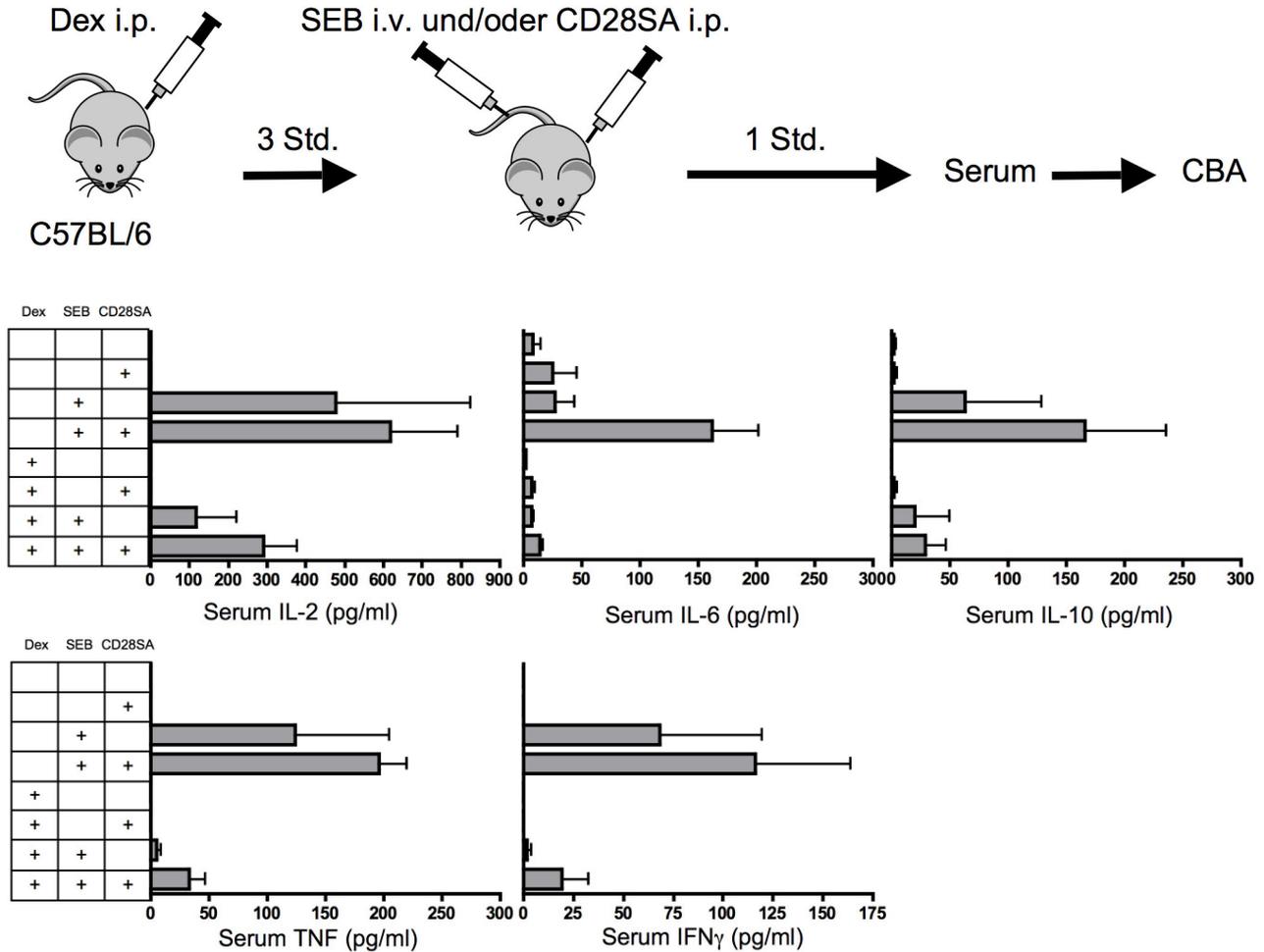


Abb. 13: Einfluss von Dexamethason auf die systemische Zytokinausschüttung
 Dexamethason behandelte Mäuse wurden nach 3 Stunden mit CD28SA und/oder SEB behandelt. Die Zytokinkonzentration im Blutserum wurde mittels CBA eine Stunde nach der letzten Injektion bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von jeweils 3 Mäusen.

Um nun die Frage, ob die positiven Effekte der CD28SA Behandlung auf die Tregs auch in Anwesenheit von Corticosteroiden bestehen bleiben, zu beantworten, wurden CD4⁺ T-Zellen aus Thy1.1 Mäusen mit dem Proliferationsmarker CFSE markiert und in kongene Thy1.2 C57BL/6 Mäuse transferiert. Nach 24 Stunden folgte der CD28SA Injektion eine dreimalige Behandlung mit Dex. Anschließend wurde die Proliferation der Donorzellen in Abhängigkeit ihrer Foxp3 Expression analysiert und mit den Kontrollgruppen verglichen, die unbehandelt blieben oder jeweils nur CD28SA bzw. Dex erhielten. Zusätzlich wurden die Zellzahlen und der Anteil an Foxp3⁺ T-Zellen in der jeweiligen Gruppe untersucht.

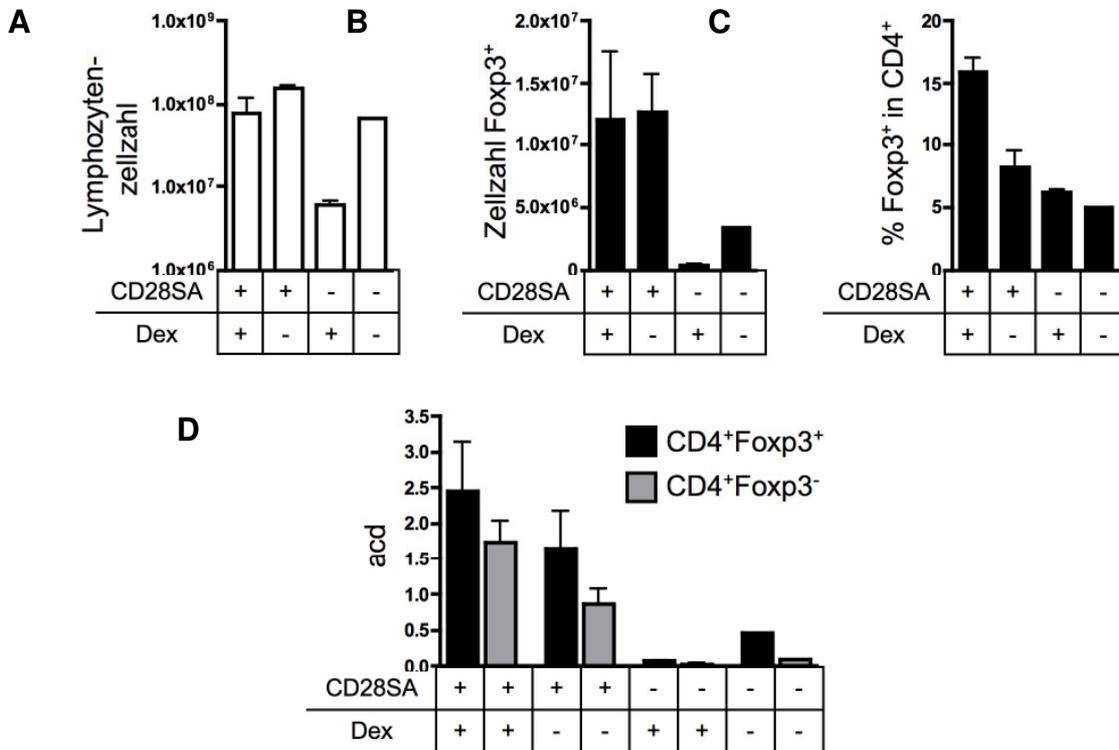


Abb. 14: Einfluss von Dexamethason auf die CD28SA induzierte T-Zellteilung

1·10⁷ aufgereinigte CFSE markierte CD4⁺ T-Zellen wurden einen Tag vor CD28SA Behandlung i.v. in kongene Thy1.1 Mäuse transfertiert. Anschließend wurden die Mäuse täglich mit Dexamethason behandelt. An Tag 4 wurde **(A)** die Lymphozytenzellzahl, **(B)** die Anzahl Foxp3⁺ Zellen und **(C)** der Anteil an Foxp3⁺ in CD4⁺ Zellen ermittelt. **(D)** Außerdem wurde die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (acd) der Foxp3⁺ und Foxp3⁻ Zellen mittels CFSE Verdünnung bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils zwei Mäusen.

Dex führte unter anderem durch die Induktion von Apoptose in Lymphozyten (Smith *et al.*, 2010) zu einer Reduktion der Gesamtlymphozytenzellzahl (**Abb. 14A**) und der Anzahl an Foxp3⁺ Tregs (**Abb. 14B**), obwohl der Anteil an Tregs in den CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen sich sogar etwas erhöhte (**Abb. 14C**). Bei der gleichzeitigen Behandlung von Mäusen mit CD28SA und Dex konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl der Gesamtzellen oder der Tregs im Vergleich zu CD28SA behandelten Mäusen beobachtet werden. Der Anteil an Foxp3⁺ Tregs dagegen war in CD28SA und Dex behandelten Mäusen fast doppelt so hoch wie in CD28SA behandelten (**Abb. 14C**). Die CD28SA vermittelte Proliferation der transfertierten Zellen wurde durch die Behandlung nicht negativ beeinflusst. Es kam durch die gleichzeitige Dex Injektionen sogar zu einer leicht verstärkten Expansion der CFSE markierten Zellen (**Abb. 14D**).

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass trotz Corticosteroid Behandlung sowohl die CD28SA vermittelte präferentielle Expansion der Tregs (**Abb. 14C, D**) als auch die stark supprimierende Wirkung der Tregs erhalten blieb (Gogishvili *et al.*, 2009).

Die prophylaktische Behandlung mit Corticosteroiden scheint somit zumindest in Mäusen eine geeignete Methode zu sein, um einerseits das CD28SA vermittelte „Cytokine-Release Syndrom“ zu inhibieren und andererseits die erwünschten Effekte des CD28SA nicht zu beeinträchtigen. Inwiefern sich diese Ergebnisse auf das humane System übertragen lassen, müsste jedoch durch weitere Experimente z.B. mit humanen PBMCs untersucht werden.

4.1.5 Zusammenfassung

CD28SA ist ein hoch potenter Treg Aktivator, der bei *in vivo* Gabe zu einer präferentiellen Expansion der Tregs gegenüber den Tkons führt. Für die Aktivierung ist das CD28 vermittelte Signal für die Tregs selbst wichtig. Jedoch kommt es nur durch die zusätzliche Stimulation der Tkons und der damit verbundenen IL-2 Produktion zur Proliferation und vollständigen Aktivierung der Tregs. Während TGN1412, ein humaner CD28SA, im Menschen einen Zytokinsturm auslöste, konnte in Mäusen keine solche systemische Zytokinausschüttung beobachtet werden. Durch die *in vivo* Depletion der Tregs konnte aber gezeigt werden, dass in Mäusen die Tregs die inflammatorische Antwort effektiv kontrollieren konnten. Wie in *Abschnitt 5.1* noch ausführlich diskutiert wird, ist der entscheidende Unterschied zwischen Menschen und Mäusen die Frequenz an CD4⁺ Effektorgedächtniszellen, die bei Menschen deutlich höher liegt. Während durch die geringe Anzahl dieser Zellen in Mäusen durch die Stimulation mit CD28SA nur geringe Mengen an proinflammatorischen Zytokinen ausgeschüttet werden, die von den murinen Tregs leicht kontrolliert werden können, kann die entsprechend deutlich höhere Zytokinmenge beim Menschen durch deren Tregs nicht mehr kontrolliert werden. Weiter wurde die Kompatibilität einer Corticosteroid Behandlung mit der CD28SA induzierten Treg Aktivierung getestet. Trotz der Abhängigkeit der Tregs von parakrinem IL-2 beeinträchtigt der Schutz vor einer systemischen Zytokinausschüttung durch die Vorbehandlung mit Corticosteroiden nicht die positive Wirkung der CD28SA Stimulation.

4.2 Ursprung und Schicksal Interleukin-10 produzierender regulatorischer T-Zellen

Interleukin 10 (IL-10) kann von vielen Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems produziert werden. Als immunsupprimierendes und anti-inflammatorisches Zytokin spielt es eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle und dem Erhalt der Immunhomöostase (Übersicht in Moore *et al.*, 2001). Auch unter den CD4⁺ T-Zellen gibt es zahlreiche IL-10 produzierende Subpopulationen, wie Tr1 Zellen, Tr1 ähnliche Zellen, CD46-stimulierte, Vitamin D3 und Dex induzierte IL-10-sezernierende T-Zellen und auch Foxp3⁺ Tregs. Sie können aufgrund von bestimmten Markern, ihrer Entstehungsgeschichte oder ihrer Lokalisation unterschieden werden (Übersicht in Fujio *et al.*, 2010; Maynard *et al.*, 2007). Die Relevanz der IL-10 Produktion durch CD4⁺ T-Zellen für die Immunregulation wird dadurch deutlich, dass Mäuse mit einer CD4 spezifischen IL-10 Defizienz ähnlich wie Mäuse mit einer generellen IL-10 Defizienz an einer tödlich verlaufenden, spontanen entzündlichen Darmerkrankung leiden (Kuhn *et al.*, 1993 Roers *et al.*, 2004). Die Rolle des von Foxp3⁺ Tregs produzierten IL-10 war dagegen lange nicht klar. *In vitro* Studien zeigten, dass IL-10 nicht für die Treg vermittelte Suppression der Effektorzellproliferation notwendig war (Thornton *et al.*, 1998). Dies wurde auch in einigen *in vivo* Studien, bei denen andere Treg-Regulationsmechanismen als die IL-10 Produktion die entscheidende Rolle spielen, bestätigt. Trotzdem gab es etliche Studien, in denen das von Tregs produzierte IL-10 den entscheidenden Faktor für die Regulation der Immunantwort darstellte (Übersicht in Tang *et al.*, 2008). Klarheit brachte schließlich die Analyse transgener Mäuse mit einer Foxp3-spezifischen Deletion des IL-10 Gens. Damit konnte gezeigt werden, dass die IL-10 Produktion von Tregs zwar nicht für die Kontrolle der systemischen Autoimmunität, jedoch für den Erhalt der Homöostase an Oberflächen wie Darm oder Lunge essentiell war (Rubtsov *et al.*, 2008).

Über die Funktion sowie das weitere Schicksal der IL-10 produzierenden Tregs ist bis jetzt jedoch wenig bekannt. Einer der Gründe dafür ist, dass in Mäusen mit „ruhemem“ Immunsystem nur ein sehr geringer Anteil der Tregs überhaupt IL-10 produziert und diese hauptsächlich im Darmgewebe nachgewiesen werden können (Maynard *et al.*, 2007). Ein geeignetes Hilfsmittel, das eine nähere Charakterisierung ermöglichen könnte, ist die *in vivo* Behandlung mit CD28SA. Es ist sowohl im Ratten- als auch im Mausmodell bekannt, dass CD28SA neben der polyklonalen Expansion der Tregs auch die IL-10 Produktion in diesen Zellen induzieren (Guilliams *et al.*, 2008; Kitazawa *et al.*, 2008; Lin, C. H. *et al.*, 2003; Rodriguez-Palmero *et al.*, 1999). Während meiner Diplomarbeit „Charakterisierung und Identifizierung von Subpopulationen regulatorischer T-Zellen der Maus“ konnte bereits

ein geeignetes Färbeprotokoll für den gleichzeitigen Nachweis von IL-10 Produktion und dem Treg spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 etabliert werden. So wurden bereits erste Hinweise darauf gesammelt, dass IL-10 produzierende Tregs keine stabile Subpopulation darstellen, sondern bei *in vitro* Restimulation neue IL-10 Produzenten in der aufgereinigten IL-10 negativen Population auftreten können. Zudem wurden sowohl durch eine vergleichende Analyse der Genexpression IL-10 produzierender und nicht-produzierender CD4⁺CD25⁺ T-Zellen als auch durch *in vitro* Versuche mit aufgereinigten IL-10 positiven Tregs Anzeichen für eine höhere Apoptosesensitivität in den IL-10 produzierenden Tregs beobachtet. Weiterführende Experimente sollen nun Einzelheiten zu der Funktion, dem Ursprung und dem weiteren Schicksal der IL-10 produzierenden Tregs darlegen.

4.2.1 CD28 Superagonist induzierte IL-10 Produktion in regulatorischen T-Zellen

C57BL/6 Mäusen wurde eine einmalige Dosis Maus anti-Maus CD28SA (D665) i.p. verabreicht. Drei Tage später wurden Lymphknotenzellen mittels IL-10 Sekretionsassay und intrazellulärer Färbung auf die Produktion von IL-10 in den Foxp3⁺ Tregs hin untersucht. Während in den Lymphknoten unstimulierter Mäuse lediglich 2-3% der Tregs IL-10 produzierten (ca. 5·10⁴ Zellen der entnommenen Lymphknotenzellen), stieg dieser Anteil drei Tage nach CD28SA Behandlung auf 20-40% an (**Abb. 15A**). Besonders dramatisch war die Zunahme der Zellzahl der CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺ Zellen, die um das 125-fache anstieg. Im Vergleich dazu steigerte sich die Zellzahl der CD4⁺ Zellen nur um das 8-fache und die der CD4⁺Foxp3⁺ Zellen um das 15-fache (**Abb. 15B, C**). Ähnlich wie auch schon in **Abb. 7B** in *Abschnitt 4.1.1* beschrieben, waren sowohl die Zellexpansion als auch die Induktion der IL-10 Produktion in den Tregs transient. Die Antwort erreichte drei bis vier Tage nach der Injektion ihr Maximum, woraufhin sich die Zellzahlen bis zum achten Tag wieder ihrem Anfangsniveau annäherten (**Abb. 15B**). Während die Anzahl an Foxp3⁺ T-Zellen auch an Tag 8 noch etwas erhöht war, sank die Menge an IL-10⁺Foxp3⁺ Zellen wieder auf den Ausgangswert.

Zur Optimierung der Stimulation wurde die CD28SA Konzentration *in vivo* titriert und anschließend die IL-10 und Foxp3 Expression analysiert. Mit einer Dosis von 200 µg CD28SA pro Maus konnte nicht nur ein Maximum an Tregs expandiert, sondern auch die stärkste Induktion der IL-10 Produktion sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz beobachtet werden (**Abb. 16**).

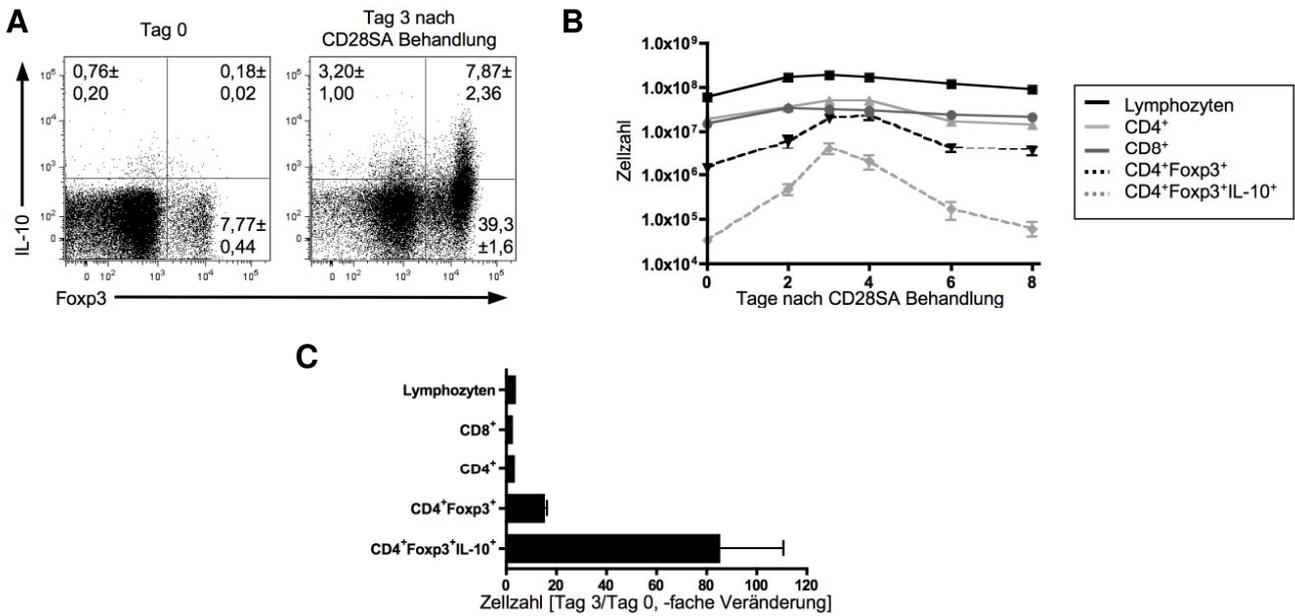


Abb. 15: IL-10 und Foxp3 Expression von CD4⁺ T-Zellen in unbehandelten und CD28SA behandelten C57BL/6 Mäusen

(A) IL-10 und Foxp3 Expression in unstimulierten Mäusen und in Mäusen 3 Tage nach CD28SA Behandlung. (B) Kinetik der Zellpopulationen definiert durch ihre CD8, CD4, Foxp3 und IL-10 Expression 0 bis 8 Tage nach CD28SA Injektion. (C) Verhältnis der Zellzahlen von Tag 3 zu Tag 0 nach CD28SA Stimulation. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Mäusen.

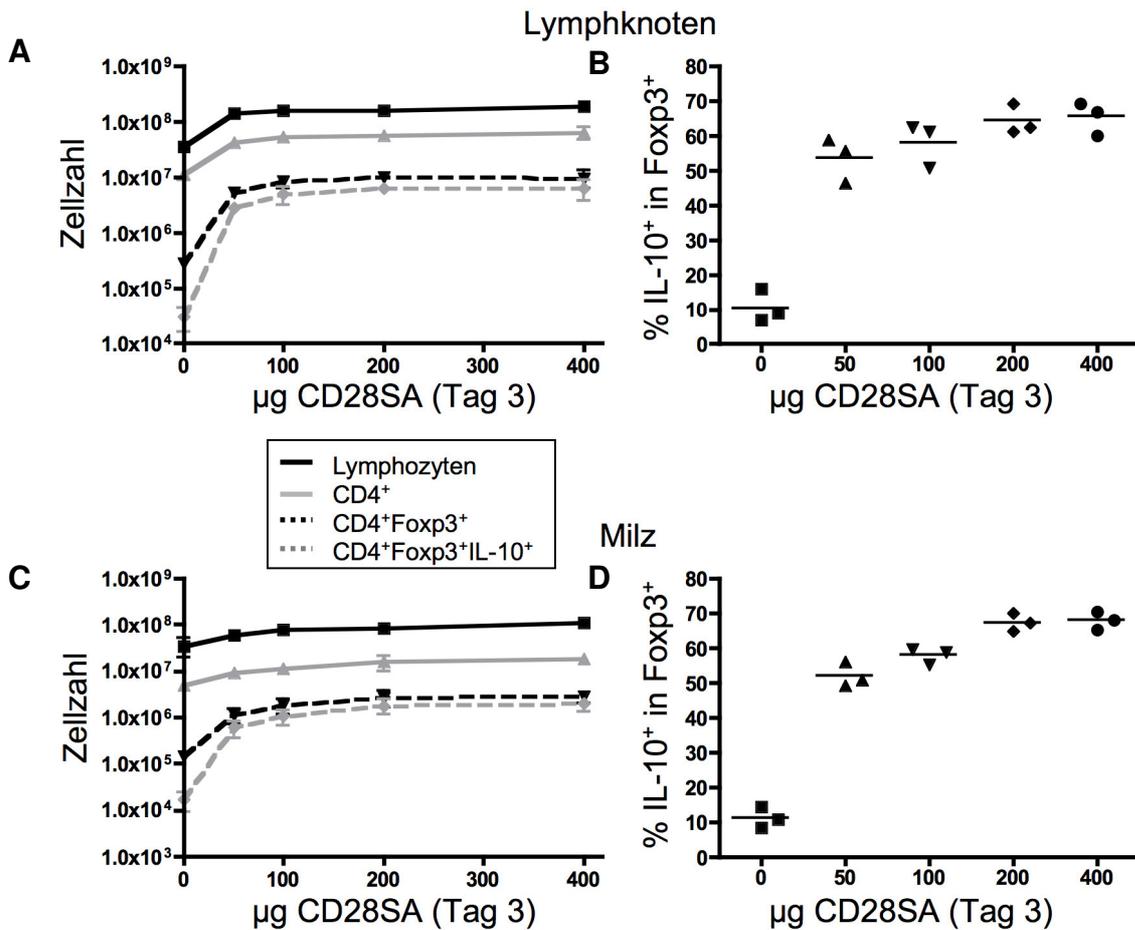


Abb. 16: Titration der CD28SA Konzentration *in vivo*

Anzahl der Zellpopulationen abhängig von CD4, Foxp3 und IL-10 Expression (A, C) und Anteil der IL-10⁺ Zellen in Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen (B, D) in Lymphknoten (A, B) und Milz (C, D) in Abhängigkeit der CD28SA Konzentration 3 Tage nach Injektion. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Mäusen.

Die Zunahme der Treg Zellzahl hatte ihren Ursprung mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Proliferation bereits vorhandener Foxp3⁺ T-Zellen und nicht in der Konversion von Tkons zu Foxp3 exprimierenden T-Zellen (**Abb. 10** in *Abschnitt 4.1.1*). Ob IL-10⁺Foxp3⁺ Zellen von Foxp3⁻ T-Zellen abstammen, wurde durch den Transfer aufgereinigter Thy1.2⁺CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen aus DEREK Mäusen in kongene Thy1.1 Mäuse analysiert. 24 Stunden nach dem Transfer wurden die Mäuse mit CD28SA stimuliert und nach weiteren drei Tagen auf die Anwesenheit von IL-10⁺Foxp3⁺ Zellen untersucht. Wie vermutet stammen IL-10 produzierende Tregs, wie auch Foxp3⁺ Tregs, nicht von Foxp3⁻ T-Zellen sondern von Foxp3⁺ Tregs ab (0,06% in den transferierten im Vergleich zu 6% in den endogenen CD4⁺ T-Zellen) (**Abb. 17**).

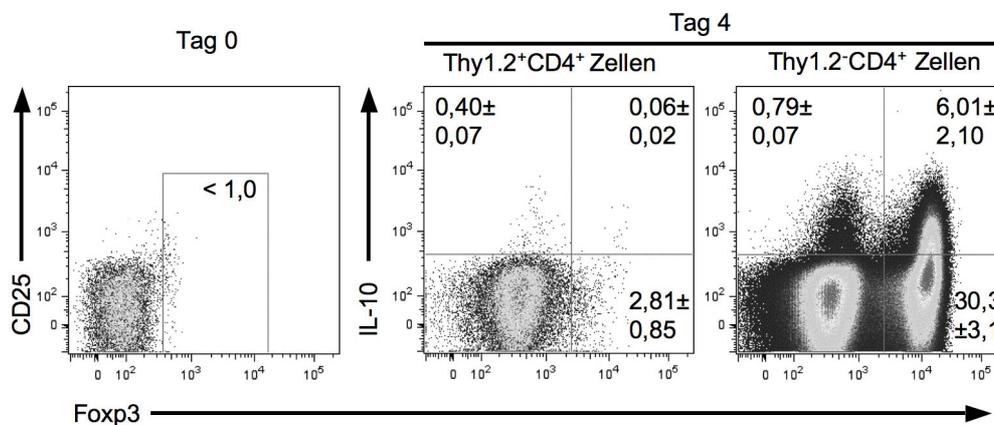


Abb. 17: Präferentielle Expansion bereits existierender Tregs nach CD28SA Stimulation

1·10⁷ CFSE-markierte, aufgereinigte CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen von DEREK Mäusen wurden einen Tag vor CD28SA Behandlung i.v. in kongene Thy1.1 Mäuse transferiert. Die IL-10 und Foxp3 Expression der Thy1.2⁺ Donorzellen und der Thy1.2⁻ Empfängerzellen wurde an Tag 4 analysiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von 4 Mäusen.

Um mehr über den Zusammenhang zwischen Proliferation und Induktion der IL-10 Produktion herauszufinden, wurden CFSE markierte CD4⁺ T-Zellen in kongene Thy1.1 Mäuse transferiert. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse mit CD28SA behandelt und nach drei weiteren Tagen die transferierten Zellen analysiert. Wie auch schon in **Abb. 9** dargestellt, teilten sich Tregs im Vergleich zu den Tkons stärker (**Abb. 18A**). Tregs, die IL-10 produzieren, konnten interessanterweise bevorzugt in den Zellen nachgewiesen werden, die sich bereits mehrere Male geteilt hatten (**Abb. 18B**). Aus der Beobachtung, dass die Zellzahl der IL-10⁺Foxp3⁺ und die der gesamten Foxp3⁺ Zellen leicht zeitversetzt anstiegen (**Abb. 15B** und Daten nicht gezeigt) und IL-10 Produzenten hauptsächlich in Zellen, die sich bereits mehrfach geteilt hatten, zu finden waren (**Abb. 18**), konnte gefolgert werden, dass nach Stimulation mit CD28SA die Tregs zunächst proliferieren, bevor die IL-10 Produktion angeschaltet wird.

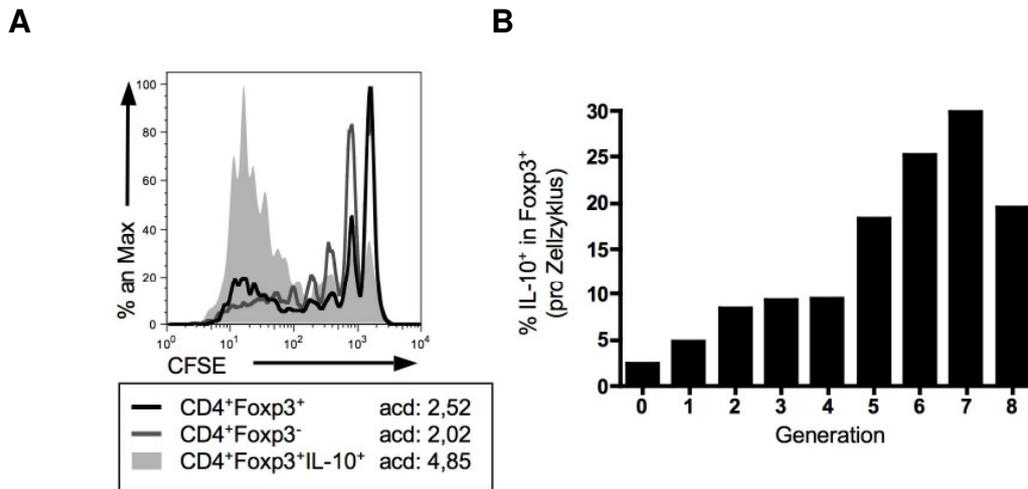


Abb. 18: Zellteilung in Abhängigkeit der Foxp3 und IL-10 Expression

1·10⁷ aufgereinigte CFSE markierte CD4⁺ T-Zellen wurden einen Tag vor der CD28SA Behandlung i.v. in kongene Thy1.1 Mäuse transfertiert. 3 Tage später wurden die Zellteilung, die Foxp3 und IL-10 Expression in den transfertierten Zellen analysiert. **(A)** CFSE Verdünnung der einzelnen Populationen mit dazugehöriger, durchschnittlicher Anzahl der Zellteilungen (acd). **(B)** Anteil an IL-10 Produzenten in den Foxp3⁺ T-Zellen der jeweiligen Generation. Die Daten repräsentieren die gepoolten Ergebnisse von 2 Mäusen.

4.2.2 Phänotyp IL-10 produzierender regulatorischer T-Zellen

Durch die Expansion und Induktion der IL-10 produzierenden Tregs konnte eine ausreichende Menge an Zellen gewonnen werden, um sie näher zu charakterisieren. Für einen Vergleich des Phänotyps IL-10 produzierender und nicht-produzierender Tregs wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Expression von Markern spezifisch für Tregs bzw. Effektor-/ Gedächtniszellen (**Tabelle 4**) wurde in unstimulierten und in CD28SA stimulierten C57BL/6 Mäusen (Tag 3) mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten mAKs untersucht. Verglichen wurde anschließend in Abhängigkeit der IL-10 und/oder Foxp3 Expression die gemessene durchschnittliche Fluoreszenzintensität, die über die Antikörper mit der Menge an exprimierten Markern korreliert (**Abb. 19**).

Marker	Beschreibung	Funktion und Expression	Referenz
CD25	α-Kette des IL-2 Rezeptors	bildet mit CD122 und CD132 den hochaffinen IL-2R, exprimiert auf aktivierten T-Zellen und konstitutiv auf Tregs	Nelson, 2002
CD39	Ektonukleotidase	hydrolysiert zusammen mit CD73 ATP/ADP zu immuninhibierendem Adenosin, exprimiert auf Tregs und Gedächtniszellen	Zhou <i>et al.</i> , 2009
CD44	Glycoprotein	bindet Hyluaronsäure, vermittelt Adhäsion, exprimiert auf Tregs und Effektor-/ Gedächtniszellen	Liu <i>et al.</i> , 2009; Swain <i>et al.</i> , 1996

Marker	Beschreibung	Funktion und Expression	Referenz
CD45RB	Tyrosinphosphatase	wichtig für TZR vermitteltes Signal, exprimiert auf naiven T-Zellen	Swain <i>et al.</i> , 1996
CTLA-4	Immunglobulin	bindet CD80/CD86, negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung, exprimiert auf Tregs und aktivierten T-Zellen	Yi <i>et al.</i> , 2006
Foxp3	Transkriptionsfaktor	Masterregulator für die Entwicklung und Funktion von Tregs, exprimiert in iTregs und nTregs	Yi <i>et al.</i> , 2006
GITR	Transmembranglycoprotein	inhibiert Suppression der Tregs, kostimuliert Tkons, bindet GITR-L, exprimiert auf Tregs und aktivierten T-Zellen	Nocentini <i>et al.</i> , 2005
ICOS	Immunglobulin	kostimuliert Tkons, bindet ICOS-L, exprimiert auf aktivierten Tregs und T-Zellen	Hutloff <i>et al.</i> , 1999; Redpath <i>et al.</i> , 2013
IL-10R	Typ II Zytokinrezeptor	bindet IL-10, exprimiert auf T-Zellen und Tregs	Moore <i>et al.</i> , 2001
LAP	C-terminale Pro-Region des Vorläuferproteins von TGFβ	erhält inaktiven Status sezernierten TGFβ, exprimiert auf aktivierten Tregs	Khalil, 1999; Tran <i>et al.</i> , 2009
PD-1	Immunglobulin	reguliert T-Zellaktivierung, bindet PD-L1, PDL2, exprimiert auf Tregs und aktivierten T-Zellen	Francisco <i>et al.</i> , 2010

Tabelle 4: Marker für die Charakterisierung von Tregs bzw. Effektor-/ Gedächtniszellen

Sowohl unstimulierte als auch stimulierte Foxp3⁺ Tregs exprimieren im Vergleich zu Foxp3⁻ Tkons einen Phänotyp ähnlich wie Gedächtniszellen, da sie viel CD44 und wenig CD45RB exprimieren (**Abb. 19**). Ähnlich wie bei einer TZR Stimulation wird durch die CD28SA Stimulation auch in den Tkons die CD44 Expression hochreguliert (Kelly *et al.*, 1988). Nicht bestätigt werden konnte die positive Korrelation zwischen starker CD44 Expression und IL-10 Sekretion, wie sie bei Foxp3⁺ Thymozyten bekannt ist (Liu *et al.*, 2009). Treg Marker, die für die Funktionalität der Foxp3⁺ Zellen wesentlich sind, wie CD25, CD39, ICOS, PD-1 und CTLA-4, wurden in den Foxp3⁺ Tregs nach CD28SA Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Tregs zum Teil stark hochreguliert, wobei die Expression besonders in den IL-10 produzierenden Tregs anstieg. Auch das Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors Foxp3, der häufig als „Masterregulator“ der Tregs beschrieben wird (Übersicht in Lal *et al.*, 2009), stieg nach CD28SA Injektion signifikant an. In der Literatur wurde beschrieben, dass IL-10 unter bestimmten Bedingungen wichtig für den Erhalt der Foxp3 Expression ist (Murai *et al.*, 2009). Um einen möglichen Einfluss des CD28SA induzierten IL-10 auf die Tregs zu beurteilen, wurde die IL-10 Rezeptor (IL-10R) Expression analysiert. Im Verhältnis zu den CD4⁻ Zellen wurden in den Tregs lediglich geringe Men-

gen an IL-10R gemessen. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied in der Rezeptorexpression zwischen IL-10 Produzenten und Nicht-Produzenten nachgewiesen werden.

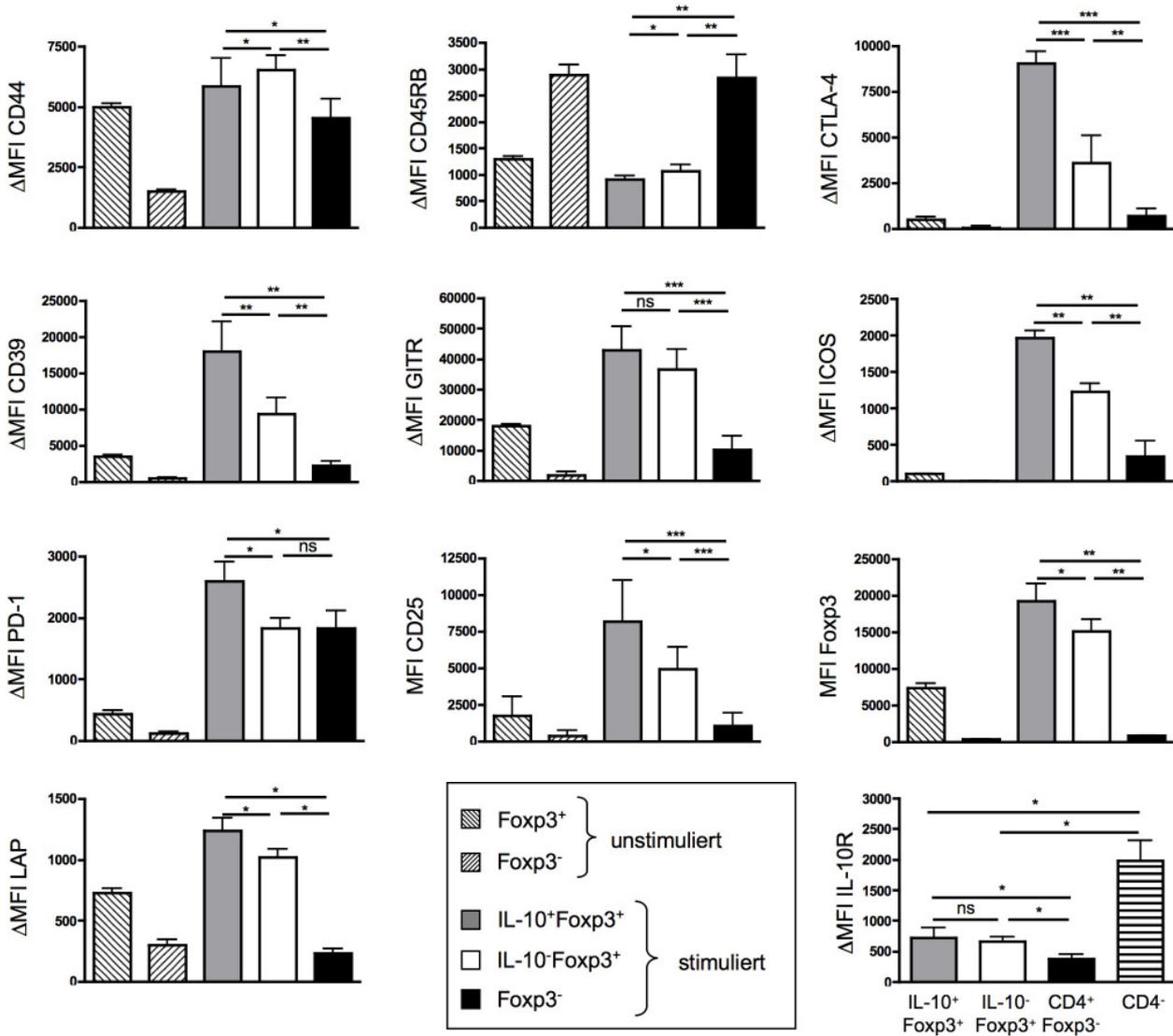


Abb. 19: Phänotyp IL-10⁺ und IL-10⁻ Tregs 3 Tage nach CD28SA Behandlung

Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der dedektierten Marker, die spezifisch für Gedächtniszellen bzw. Tregs sind, wurde in unstimulierten und stimulierten CD4⁺ T-Zellen (Tag 3) in Abhängigkeit von IL-10 und/oder Foxp3 Expression analysiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von 4-8 Mäusen. Mann-Whitney U Test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, ns: kein signifikanter Unterschied, Δ MFI (durchschnittliche Fluoreszenzintensität) = (MFI(Marker) - MFI(Isotyp))

Der Transkriptionsfaktor Helios wurde ursprünglich als Marker für im Thymus generierte nTregs beschrieben, um diese von den in der Peripherie induzierten iTregs unterscheiden zu können (Thornton *et al.*, 2010). Nachfolgende Publikationen zeigten jedoch, dass Helios Expression auch ein Hinweis für eine kürzlich stattgefundenene T-Zell-Aktivierung sein kann und mit Markern für Antigenkontakt und Proliferation korreliert, aber unabhängig von der Foxp3 Expression ist (Akimova *et al.*, 2011; Serre *et al.*, 2011). Ein Fehlen der Helios Expression könnte zudem ein Hinweis für eine unterschiedliche Stimulationsgeschichte innerhalb der Treg Population sein (Gottschalk *et al.*, 2012). Während in

unstimulierten Mäusen ca. 70% der Tregs und 5% der CD4⁺ Tkons Helios exprimieren (**Abb. 20A** und Thornton *et al.*, 2010), verschieben sich die Verhältnisse nach CD28SA Behandlung (Tag 3) leicht zu 60% Helios⁺ in Tregs und 15% Helios⁺ in CD4⁺ Tkons (**Abb. 20A**). Die Schlussfolgerung, dass CD28SA stimulierte IL-10⁺ Tregs stärker aktivierte Zellen sind (**Abb. 19**), konnte jedoch weder durch eine höhere Frequenz an Helios⁺ Zellen noch durch eine höhere Expression an Helios in den IL-10 Produzenten bestätigt werden (**Abb. 20B** und Daten nicht gezeigt).

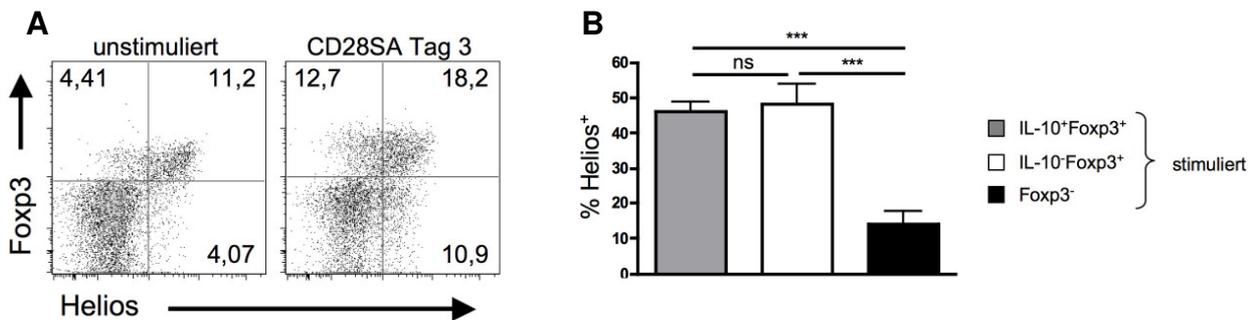


Abb. 20: Helios Expression in unstimulierten und CD28SA stimulierten Tregs
(A) Helios Expression in CD4⁺ T-Zellen in Anhängigkeit von Foxp3 Expression **(B)** Anteil an Helios⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von IL-10 und/oder Foxp3 Expression. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von 3 Mäusen.
 Ungepaarter t-Test: *** p < 0.001, ns: kein signifikanter Unterschied

4.2.3 Funktionalität IL-10 produzierender regulatorischer T-Zellen

Durch die *in vivo* Behandlung mit CD28SA werden Effektormoleküle wie CTLA-4, CD25, CD39 und LAP (*latency-associated peptide*) in den Tregs und insbesondere in den IL-10 produzierenden Tregs hochreguliert. Dies könnte auf eine erhöhte Funktionalität dieser Zellen hindeuten. Um diese Hypothese zu testen, wurden CD4⁺CD25⁺ Zellen aus CD28SA stimulierten Mäusen mit dem IL-10 Sekretionsassay angefärbt und anschließend mittels FACS-Sorter in IL-10⁺ und IL-10⁻ Zellen getrennt. Um eine höhere Reinheit an Foxp3⁺ Zellen zu erhalten, wurden alternativ IL-10⁺Foxp3⁺ und IL-10⁻Foxp3⁺ Tregs aus DEREK Mäusen (Foxp3 Reporter Maus) verwendet. Die Zellpopulationen wurden anschließend in verschiedenen Konzentrationen (Teff: Treg: 1:1 – 1:1/27) mit CFSE markierten CD4⁺CD25⁻ Effektor-T-Zellen (Teff) und bestrahlten APZs in Anwesenheit von anti-CD3 kultiviert. Zum Vergleich wurden unaufgetrennte CD4⁺CD25⁺ bzw. CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen aus unstimulierten und CD28SA stimulierten Mäusen verwendet. Ob die Tregs die Teff Proliferation inhibieren konnten, wurde anhand der durchschnittlichen Anzahl der Zellteilungen (acd) der Teffs bestimmt. Der maximal mögliche acd-Wert wurde bei Stimulation der Teffs mit APZs und anti-CD3 in Abwesenheit von Tregs bestimmt. Durch die CD28SA Behandlung konnte die inhibierende Wirkung der Tregs im Vergleich zu unstimulierten Tregs um das mehr als 10-fache gesteigert werden (**Abb. 21A, C**).

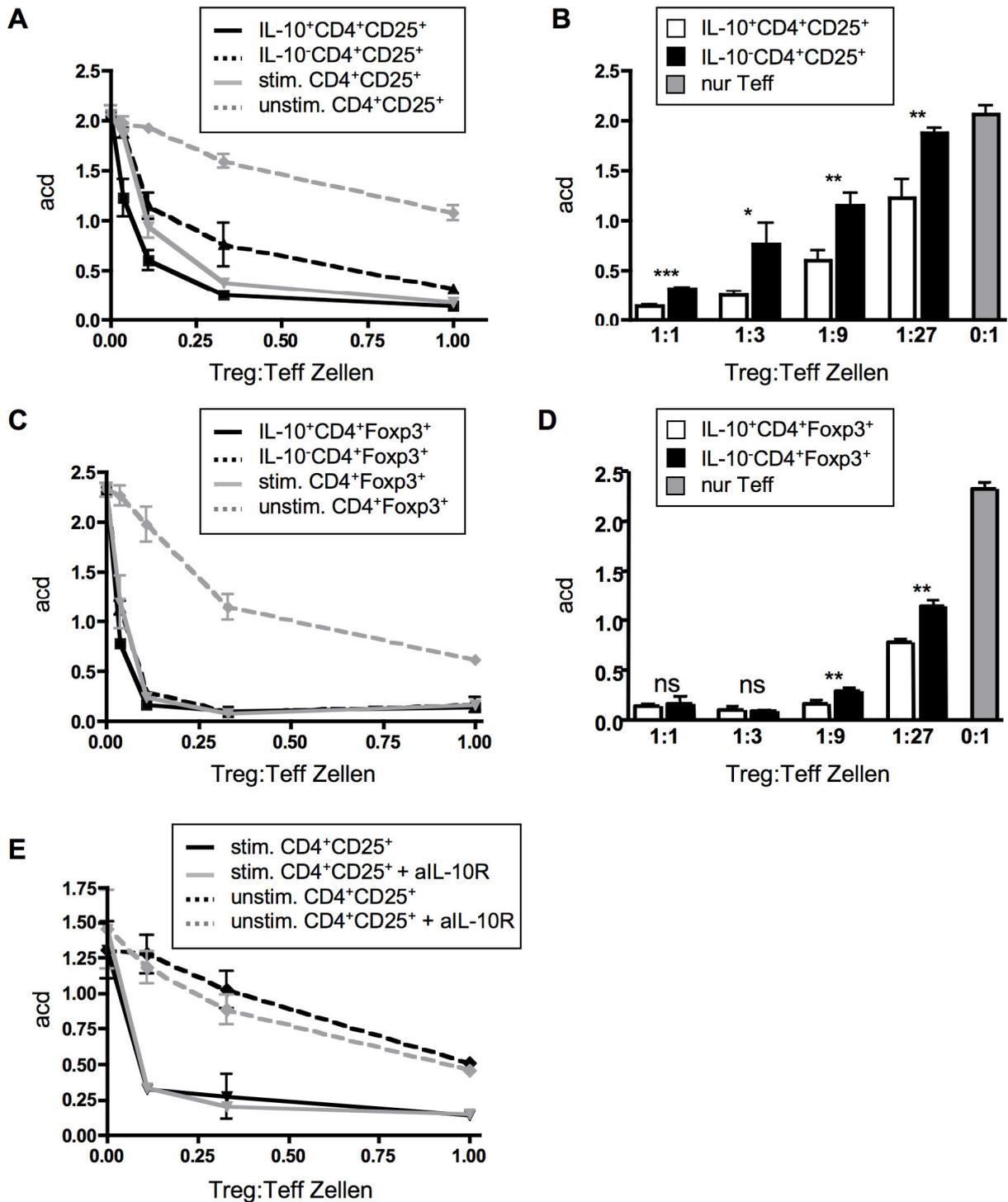


Abb. 21: Suppressierende Wirkung unterschiedlicher Treg Populationen

(A) Aufgereinigte CD4⁺CD25⁺ Tregs aus CD28SA behandelten Mäusen wurden mit IL-10 Sekretionsassay gefärbt. Isolierte IL-10⁺ und IL-10⁻CD4⁺CD25⁺ Tregs wurden mit CFSE markierten naiven CD4⁺CD25⁻ Effektor-T-Zellen und bestrahlten APZs in Anwesenheit von anti-CD3 für 3 Tage kultiviert. Als Kontrollen wurden stimulierte CD4⁺CD25⁺ Tregs und CD4⁺CD25⁺ Tregs aus unbehandelten Mäusen verwendet. (B) Säulendiagramm der acd-Werte der IL-10⁺ und IL-10⁻CD4⁺CD25⁺ Tregs mit statistischer Analyse. (C und D) wie (A und B) aber mit aufgereinigten Foxp3⁺ Tregs aus unstimulierten und CD28SA stimulierten DEREK Mäusen. (E) Blockierender anti-IL-10R Antikörper (10 mg/ml) wurde zur Kultur stimulierter und unstimulierter CD4⁺CD25⁺ Tregs zugesetzt, um die IL-10 Abhängigkeit der Treg Suppression zu überprüfen.

Die Daten zeigen die durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen (acd, Mittelwert ± SD) der Effektorzellen von jeweils 3 Proben. Ungepaarter t-Test: * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.001, ns: kein signifikanter Unterschied

Auch IL-10⁺ und IL-10⁻ Tregs wirkten beide stark supprimierend, wobei die Aktivität der IL-10 Produzenten die der Nicht-Produzenten etwas überstieg (**Abb. 21A-D**). Durch die höhere Reinheit der Tregs bei Verwendung von DEREK Mäusen hatten alle Foxp3⁺ Treg Populationen im Vergleich zu den CD4⁺CD25⁺ Treg Populationen eine höhere inhibierende Wirkung. Dadurch wurde jedoch bei der 1:1 und 1:1/3 Verdünnung die maximal mögliche Suppression der Teffs erreicht. Mögliche Unterschiede in der Aktivität ließen sich bei diesen Verdünnungen nicht messen (**Abb. 21C, D**). Um die Bedeutung der CD28SA induzierten IL-10 Produktion bei der Suppression der Effektorzellen zu beurteilen, wurde dem Suppressionsassay mit CD4⁺CD25⁺ Tregs aus unstimulierten und CD28SA stimulierten Mäusen ein blockierender anti-IL-10 Rezeptor Antikörper zugefügt. Wie jedoch auch aus der Literatur bekannt, spielt IL-10 im *in vitro* Assay keine Rolle (**Abb. 21E** und (Maynard *et al.*, 2007; Thornton *et al.*, 1998)).

Diese Daten bestätigen die Hypothese, dass die Hochregulation von Effektormolekülen durch CD28SA Behandlung auch zu einer hohen *in vitro* Suppressivität führt. Diese steht zwar mit dem IL-10 produzierenden Phänotyp der Tregs in Zusammenhang, ist jedoch von IL-10 selbst unabhängig.

4.2.4 Migration CD28SA stimulierter regulatorischer T-Zellen

Damit Tregs ihre immunregulatorische Funktion ausüben können, müssen sie die Fähigkeit besitzen, in Kontakt mit anderen Zellen wie APZs und Tkons zu kommen. Abhängig von der Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen können Tregs dazu in unterschiedliche Bereiche des Organismus wandern. Zum Beispiel werden Zellen, die Rezeptoren wie CCR5, CCR6 und CD103 exprimieren, in entzündliche Gewebe rekrutiert, während Zellen, die CCR7 und CD62L exprimieren, in den Lymphknoten verweilen (Huehn *et al.*, 2004; Zhang, N. *et al.*, 2009). IL-10 produzierende Tregs wurden hauptsächlich an Orten mit einer stattfindenden Immunantwort nachgewiesen (Maynard *et al.*, 2007). Durch Antikörperfärbung verschiedener mit Migration assoziierter Moleküle sollte nun analysiert werden, ob auch CD28SA aktivierte IL-10 produzierende Tregs die notwendigen Rezeptoren exprimieren, um in Entzündungsbereiche einwandern zu können (**Abb. 22**). Dazu wurde die Expression der Migrationsmoleküle zusammen mit der von Foxp3 und IL-10 in C57BL/6 Mäusen über vier Tage nach CD28SA Behandlung untersucht. Wie auch schon früher dargestellt, exprimieren die meisten Tregs in den Lymphknoten unstimulierter Mäuse CCR7 und ca. 40% der Tregs CD62L (Huehn *et al.*, 2005). Die Rezeptoren CD103, CCR5 und CCR6, die für das Wandern der Zellen in Entzündungsbereiche wichtig sind, werden in unstimulierten Mäusen dagegen nur von 35% (CD103),

10% (CCR5) und 10% (CCR6) der Tregs exprimiert. Dieses Expressionsmuster verschiebt sich nach der Injektion des CD28SA hin zu weniger CCR7⁺ Tregs (70% → 20-10%) und mehr CCR5⁺ und CCR6⁺ Tregs (10% → 50%) an Tag 3 bis 4. Die Frequenz an CD103⁺ Tregs wie auch die der CD62L⁺ Tregs (40% → 60%) blieb dabei nahezu unverändert. Sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Mäusen ist der Anteil an CCR5⁺, CCR6⁺ und CD103⁺ Zellen in IL-10 produzierenden Tregs deutlich höher als in den Foxp3⁺ Nicht-Produzenten (**Abb. 22 und** Daten nicht gezeigt). Durch die Untersuchung der lymphoiden Organe können allerdings nicht alle Zellen mit einem entzündungssuchenden Phänotyp erfasst werden, da wahrscheinlich ein Teil dieser Zellen zum Zeitpunkt der Analyse die Lymphknoten bereits verlassen hat.

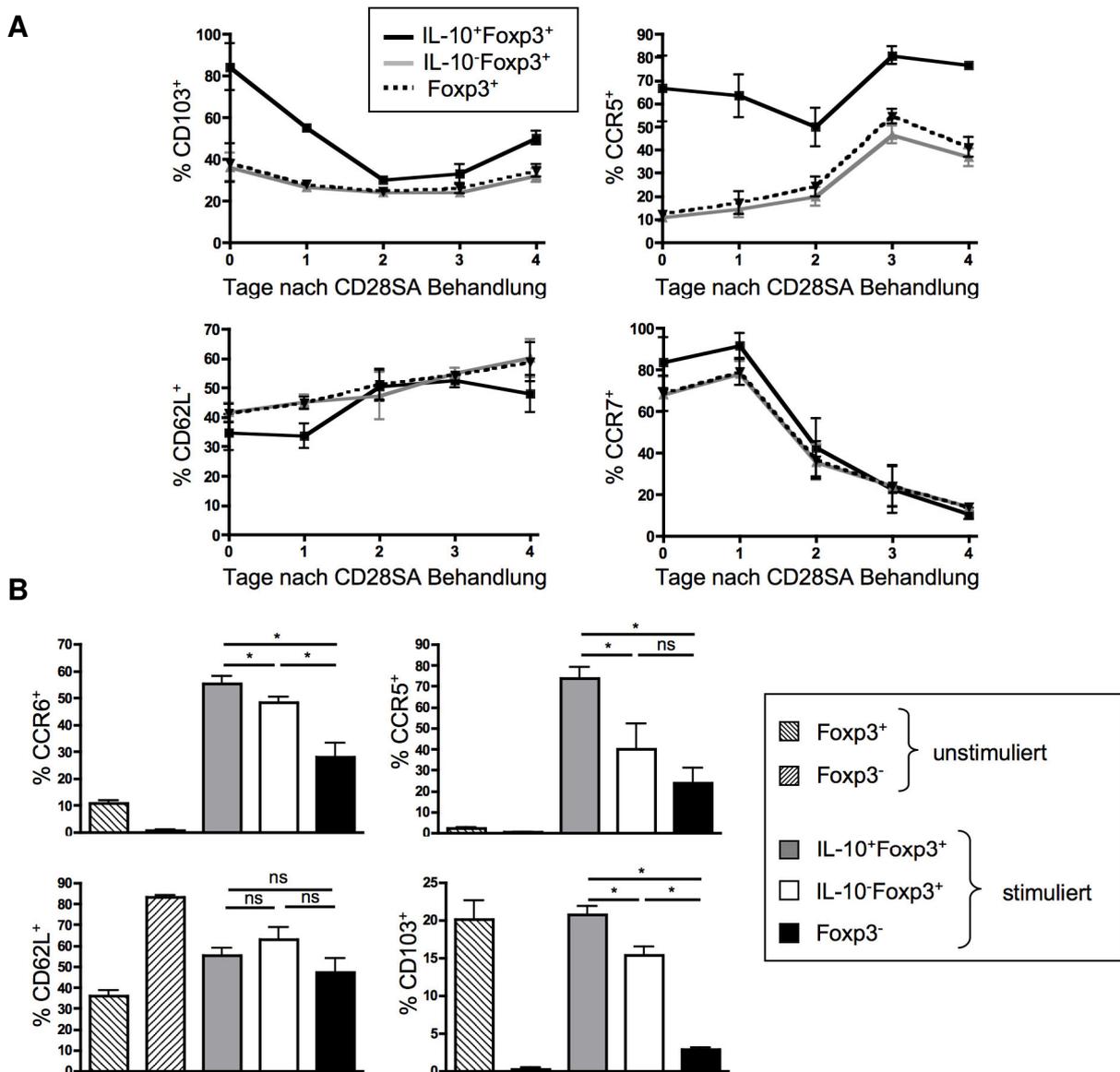


Abb. 22: Expression von Migrationsmarkern in Tregs nach CD28SA Stimulation
(A) FACS-Analyse der Migrationsmarker in IL-10⁺Foxp3⁺, IL-10⁻Foxp3⁺ und Foxp3⁺ Tregs 0-4 Tage nach CD28SA Injektion bzw. **(B)** in CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von IL-10 und/oder Foxp3 Expression vor und 3 Tage nach CD28SA Injektion. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von 3-5 Mäusen. Mann-Whitney U Test: * p<0.05, ns: kein signifikanter Unterschied

Die starke Expression von CD103, CCR5 und CCR6, die auch in IL-10 produzierenden Tregs unstimulierter Mäuse auftritt (**Abb. 22A** und Daten nicht gezeigt), bestärkt die Annahme, dass die IL-10 Produzenten aktivierte Zellen sind, die von IL-10⁻ Tregs abstammen. Dementsprechend ließ sich der anfängliche Abfall in der Frequenz an CD103⁺ in IL-10⁺ Tregs (**Abb. 22A**) am besten durch die zeitlich versetzte Induktion der IL-10 und CD103 Expression nach CD28SA Stimulation erklären. In allen Foxp3⁺ Tregs wurde unabhängig von der IL-10 Produktion die CCR7 Expression nach CD28SA Injektion stark reduziert. Zusammenfassend führen die bisherigen Ergebnisse zu der Hypothese, dass nach der Aktivierung die Tregs zunächst proliferieren, anschließend beginnen IL-10 zu produzieren, um dann durch die Verschiebung im Expressionsmuster der Migrationsmarker hin zu einem entzündungssuchenden Phänotyp (CCR7⁻ CCR5⁺ CCR6⁺) in Gewebe mit stattfindender Immunantwort einzuwandern.

Zur weiteren Prüfung dieser Annahme sollte die Wanderung von Tregs in entzündliche Gewebe direkt analysiert werden. Daher wurden C57BL/6 Mäusen Schwämme unter die Haut implantiert, die entzündungsauslösende hitzeinaktivierte *Listeria monocytogenes* enthielten. Zur Induktion von Proliferation und Expression von CCR5 und CCR6 in Tregs wurden die Tiere vier Tage nach der Implantation mit CD28SA behandelt. Nach weiteren drei Tagen wurden die eingewanderten Zellen aus den entnommenen Schwämmen durch mehrmaliges Spülen mit BSS/BSA herausgewaschen und ihre Foxp3 und IL-10 Expression analysiert. Die eingewanderten Zellen in den PBS behandelten Kontrolltieren enthielten in dem gesetzten Monozyten/Lymphozyten Fenster etwa 2-3 mal weniger CD4⁺ T-Zellen (0,87% ±0,17) als in CD28SA behandelten Tieren (2,21% ±0,33) (**Abb. 23**). Ein hoher Anteil von ca. 40% der CD4⁺ T-Zellen exprimierte in beiden Gruppen Foxp3 und jeweils etwa ein Drittel dieser Tregs sezernierte IL-10. Ähnlich verhielten sich die Anteile in den Lymphknoten der CD28SA stimulierten Mäuse, auch wenn hier der Anteil an IL-10 Produzenten innerhalb der Tregs mit ca. 25% etwas niedriger lag als in den Schwämmchen. Im Gegensatz dazu konnten in den unstimulierten Lymphknoten nur geringe Anteile an Foxp3⁺ (ca. 7%) und an IL-10⁺ Tregs (< 1%) detektiert werden (**Abb. 23**).

IL-10 produzierende oder zumindest IL-10 kompetente Tregs scheinen sich somit in der Tat bevorzugt an Orten mit entzündlichen Prozessen anzusammeln. Sogar im Falle von sehr geringen Mengen an IL-10⁺ Tregs in den sekundären lymphoiden Geweben der PBS behandelten Kontrolltiere kam es zu einer starken lokalen Anreicherung dieser Zellen.

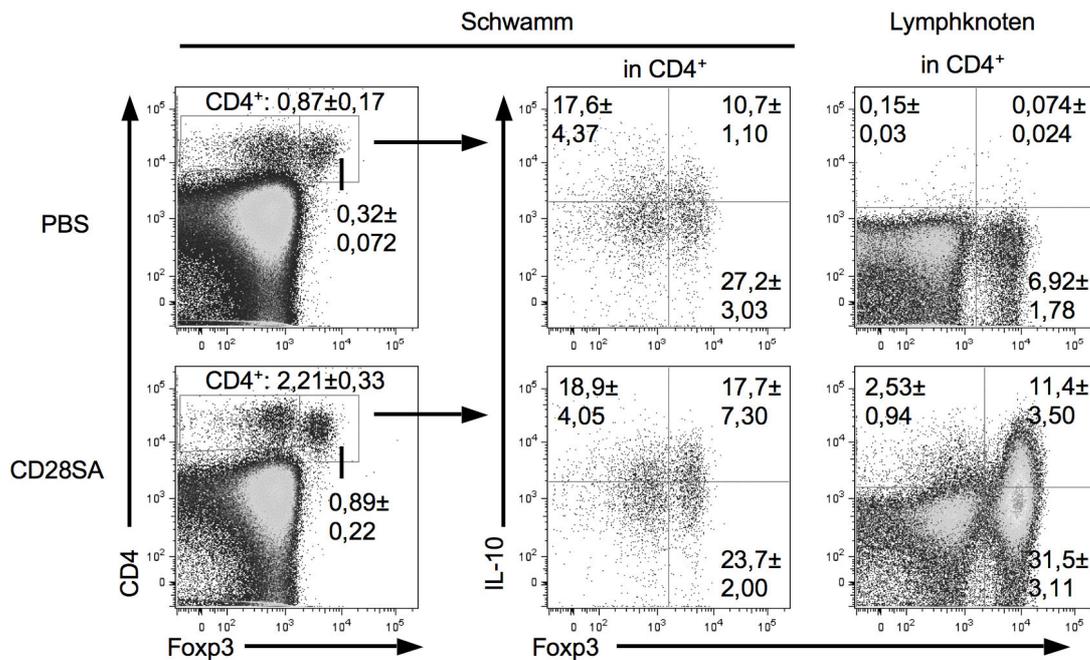


Abb. 23: Migration der Tregs *in vivo*

Schwämmchen mit hitzeinaktivierten *Listeria monocytogenes* wurden C57BL/6 Mäusen subkutan implantiert. Nach 4 Tagen wurden die Mäuse mit CD28SA oder PBS behandelt. An Tag 7 wurden die Zellen aus den Schwämmchen herausgewaschen, analysiert und mit CD4⁺ Lymphknotenzellen verglichen. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von 3 Mäusen. (Durchgeführt unter Mithilfe von E. Ribechini)

4.2.5 Stabilität der IL-10 Produktion regulatorischer T-Zellen *in vitro*

Für die Induktion der IL-10 Produktion benötigen Tregs eine Kombination aus TZR Signal und IL-2 (Barthlott *et al.*, 2005). Es wurde beobachtet, dass der Anteil der Tregs, die *in vivo* durch CD28SA zur IL-10 Produktion angeregt wurden, *in vitro* bei 37 °C schnell abfiel (**Abb. 24**). Um zu klären, unter welchen Bedingungen die IL-10 Produktion erhalten werden kann, wurden zunächst CD4⁺ T-Zellen aus unstimulierten bzw. CD28SA stimulierten Mäusen aufgereinigt und für bis zu 24 Stunden in Medium oder mit anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 kultiviert. Anschließend wurde mittels IL-10 Sekretionsassay die IL-10 Produktion in den Tregs ermittelt. Wie bereits in **Abb. 15A** gezeigt wurde, sezerniert in unstimulierten Mäusen nur ein sehr geringer Anteil an Tregs IL-10. Auch durch die Stimulation mit anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 kam es innerhalb der beobachteten 24 Stunden zu keiner zusätzlichen Induktion der IL-10 Produktion (**Abb. 24**). Im Gegensatz dazu konnte durch die Stimulation mit anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 der Anteil an IL-10 produzierenden Tregs aus *in vivo* CD28SA stimulierten Tieren von 15% auf bis zu 60% gesteigert werden.

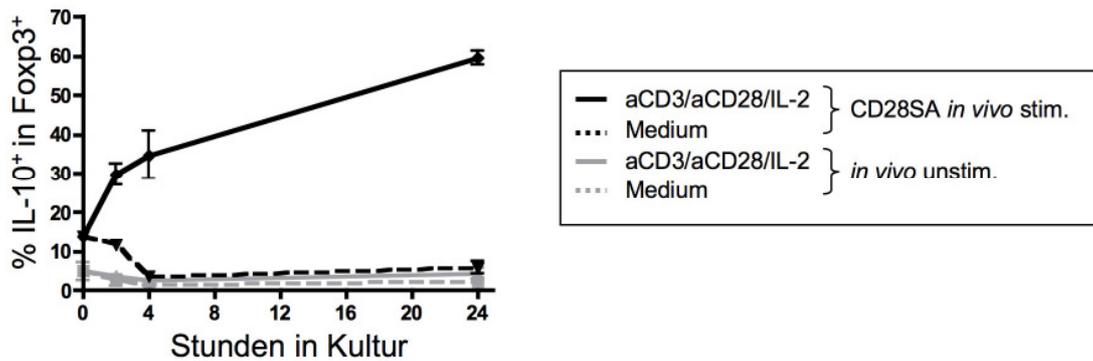


Abb. 24: Stabilität der IL-10 Produktion CD28SA stimulierter Tregs *in vitro*

CD4⁺ T-Zellen wurden aus CD28SA behandelten und unbehandelten C57BL/6 Mäusen an Tag 3 isoliert und wie angegeben mit bzw. ohne anti-CD3 (immobilisiert, 1 µg/ml), anti-CD28 (immobilisiert, 5 µg/ml), und IL-2 (200 U/ml) kultiviert. Nach 2, 4 und 24 Stunden wurde der Anteil an IL-10 Produzenten in den Foxp3⁺ Zellen mit Hilfe des IL-10 Sekretionsassays ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Proben.

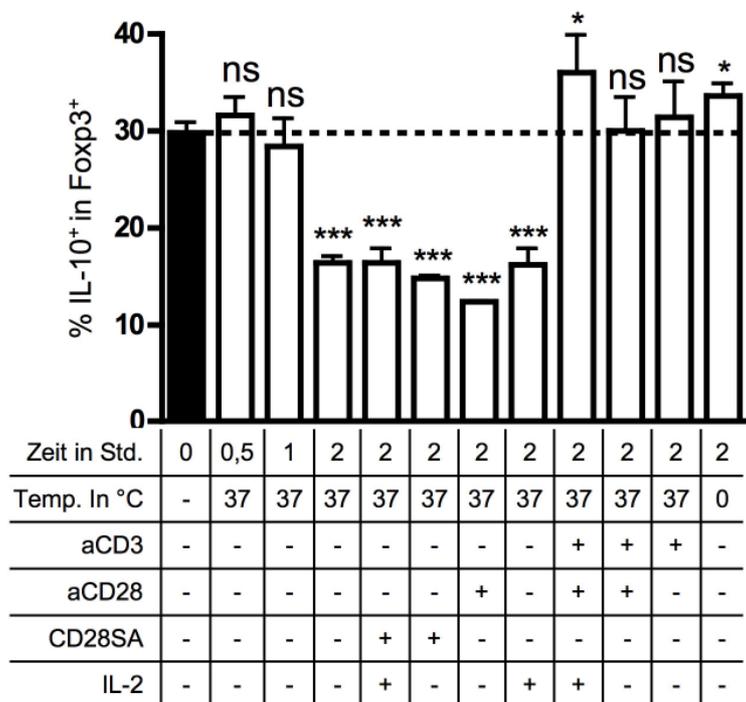


Abb. 25: Einfluss der Kulturbedingungen auf die Stabilität der IL-10 Produktion

CD4⁺ T-Zellen wurden aus CD28SA behandelten C57BL/6 Mäusen an Tag 3 isoliert und unter den angegebenen Bedingungen mit anti-CD3 (immobilisiert, 1 µg/ml), anti-CD28 (immobilisiert, 5 µg/ml), CD28SA (immobilisiert, 10 µg/ml) und IL-2 (200 U/ml) für bis zu 2 Stunden kultiviert, der Anteil an IL-10 Produzenten in den Foxp3⁺ Zellen mit Hilfe IL-10 Sekretionsassay ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Proben.

Um die entscheidenden Faktoren bzw. die entscheidende Faktorkombination, die für den Erhalt bzw. die zusätzliche Induktion der IL-10 Produktion erforderlich sind, zu ermitteln, wurden CD4⁺ T-Zellen aus CD28SA stimulierten Mäusen für bis zu zwei Stunden unter den in **Abb. 25** angegebenen Bedingungen kultiviert. In CD4⁺ T-Zellen, die für zwei Stunden bei 37 °C in Medium kultiviert wurden, reduzierte sich die Frequenz an IL-10⁺ Tregs um die Hälfte. Dagegen verminderte sich der Anteil bei Zellen, die für zwei Stunden auf

Eis inkubiert wurden, nicht. Überraschenderweise konnte CD28SA mit und ohne IL-2 den Verlust an IL-10⁺ Tregs nicht verhindern. Grund dafür könnte sein, dass die CD28 Moleküle durch die *in vivo* Behandlung mit CD28SA moduliert wurden oder noch mit CD28SA besetzt sind. Lediglich die Anwesenheit von anti-CD3 stabilisierte die IL-10 Produktion unabhängig von der Anwesenheit von anti-CD28 und/ oder exogenem IL-2. Für den Erhalt der IL-10 Produktion scheint somit die Stimulation des TZR wesentlich zu sein, möglicherweise in Kombination mit dem durch die CD28SA Bindung induzierten, noch vorhandenen CD28 Signal. Fraglich bleibt, ob das Absinken des Anteils an IL-10 Produzenten mit einem Absterben der IL-10⁺ Zellen oder mit der Termination der IL-10 Produktion zusammenhängt.

4.2.6 Induktion der IL-10 Produktion in IL-10 negativen regulatorischen T-Zellen

Die Ergebnisse aus **Abb. 15** und **Abb. 18** und meiner Diplomarbeit gaben Hinweise darauf, dass IL-10 produzierende Foxp3⁺ Tregs von nicht-produzierenden Foxp3⁺ Tregs abstammen könnten. Dies sollte im Folgenden durch die Aufreinigung von IL-10⁺Foxp3⁺ und IL-10⁻Foxp3⁺ T-Zellen sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Versuchen geklärt werden.

4.2.6.1 Stabilität der IL-10 produzierenden Tregs *in vitro*

Für die Isolation von IL-10⁺Foxp3⁺ und IL-10⁻Foxp3⁺ T-Zellen mit hoher Reinheit wurden DEREK Mäuse (Foxp3-Reporter Maus) mit CD28SA behandelt und nach drei Tagen die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aufgereinigt. Diese wurden, um einen noch höheren Anteil an IL-10 Produzenten zu erhalten, für 24 Stunden unter den in *Abschnitt 4.2.5* dargestellten Bedingungen (anti-CD3/anti-CD28/IL-2) kultiviert. Anschließend wurden die mit dem IL-10 Sekretionsassay gefärbten Zellen durch den FACS-Sorter in IL-10⁺Foxp3⁺ und IL-10⁻Foxp3⁺ Zellen aufgetrennt (**Abb. 26A**). Neben diesen sortierten Zellen wurden zur Kontrolle ungetrennte Zellen für weitere drei Tage mit anti-CD3/anti-CD28/IL-2 stimuliert. Täglich wurde die Zellzahl bestimmt und die Fähigkeit der Zellen zur IL-10 Produktion durch Restimulation mit PMA/Ionomycin in Anwesenheit von Monensin und anschließender intrazellulärer Färbung mit anti-IL-10 mAK überprüft. Während die Zellzahl der Foxp3⁺ T-Zellen die ersten zwei Tage in allen drei Gruppen um etwa die Hälfte abnahm, stiegen die Zellzahlen der ungetrennten und IL-10⁻Foxp3⁺ Tregs an Tag 3 wieder an (**Abb. 26B**). Im Gegensatz dazu setzte sich der negative Trend in den IL-10⁺Foxp3⁺ Zellen fort, so dass an Tag 3 nur ca. 20% der ursprünglichen Foxp3⁺ Zellen übrig blieben. Zusätzlich zur Abnahme der Gesamtzellzahl an Foxp3⁺ in den IL-10⁺Foxp3⁺ Zellen sank sowohl der Anteil als auch die Zahl der IL-10 Produzenten dramatisch (**Abb. 26C, D**). Dagegen konnten in den ursprünglich IL-10⁻Foxp3⁺ Zellen bereits nach 24 Stunden ca. 20% IL-10⁺ Zellen

nachgewiesen werden (**Abb. 26D**). Die Anwesenheit von neuen IL-10 Produzenten wurde durch die mittels ELISA nachgewiesene steigende IL-10 Konzentration bestätigt (**Abb. 26E**).

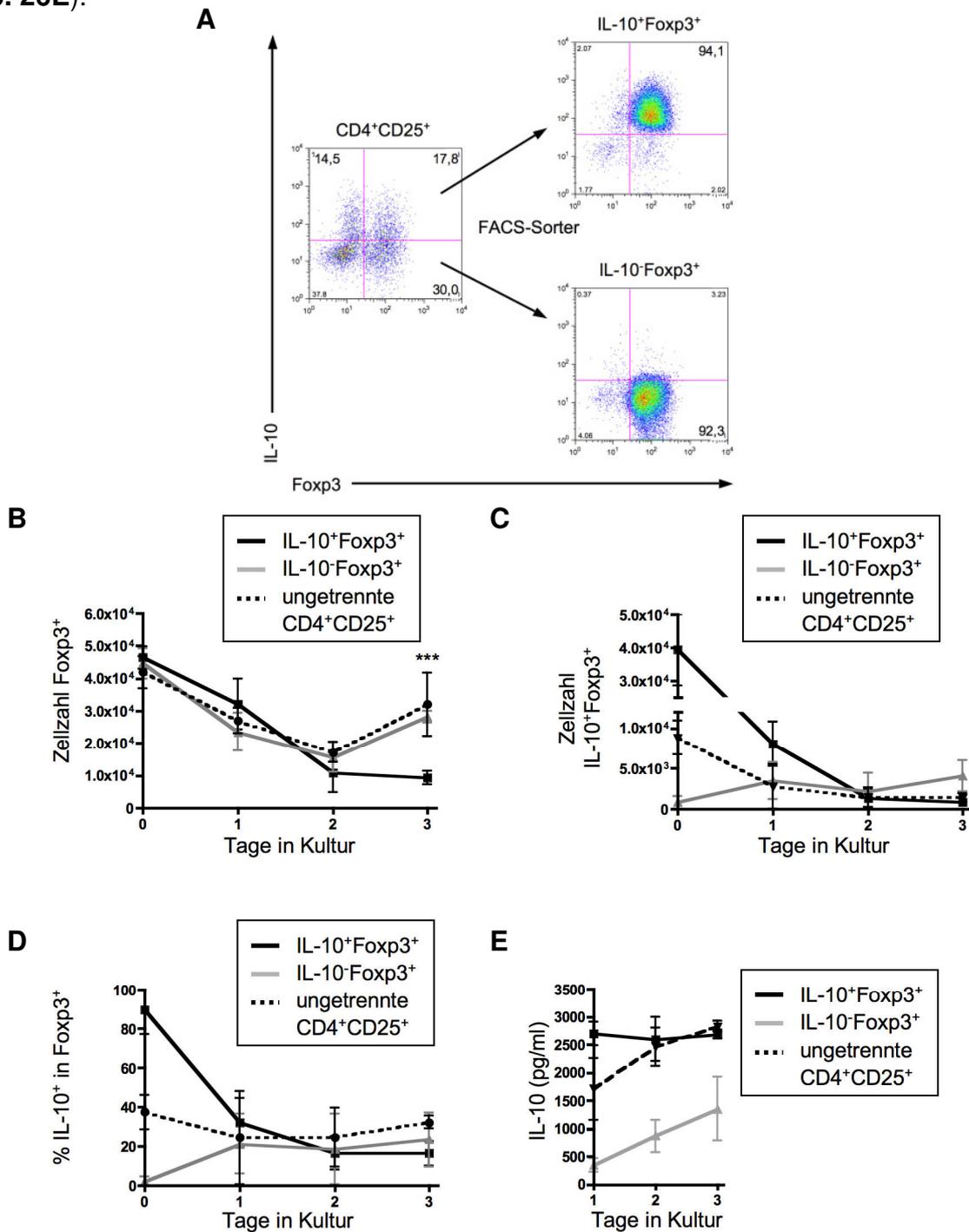


Abb. 26: Instabilität des IL-10 produzierenden Phänotyps *in vitro*

Isolierte CD4⁺CD25⁺ Tregs aus CD28SA behandelten DEREG Mäusen wurden 24 Stunden mit anti-CD3 (immobilisiert, 1 µg/ml), anti-CD28 (immobilisiert, 5 µg/ml) und IL-2 (200 U/ml) stimuliert. Anschließend wurden die mit IL-10 Sekretionsassay gefärbten Zellen via FACS-Sorter in IL-10⁺Foxp3⁺ und IL-10⁻Foxp3⁺ Zellen aufgetrennt (**A**). Die aufgereinigten Zellen wurden für weitere 1 bis 3 Tage mit anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 weiterkultiviert und (**B**) die Zellzahlen der Foxp3⁺, (**C**) der IL-10⁺Foxp3⁺ Zellen und (**D**) der Anteil an IL-10 Produzenten in Foxp3⁺ Tregs bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht weiter aufgereinigte CD4⁺CD25⁺ T-Zellen verwendet. (**E**) Die IL-10 Konzentration im Kulturüberstand wurde mittels IL-10 ELISA bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Experimenten. *** p<0.001 im Vergleich IL-10⁺Foxp3⁺ zu IL-10⁻Foxp3⁺ Zellen

Demzufolge nimmt sowohl die Zellzahl als auch das Ausmaß der Zytokinproduktion in den IL-10 produzierenden Tregs auch unter optimalen Kulturbedingungen ab, während kultivierte Nicht-Produzenten besser überleben und neue IL-10 Produzenten hervorbringen können.

4.2.6.2 Akquisition der IL-10 Produktion von Tregs *in vivo*

Zur Überprüfung der *de novo* Induktion von IL-10 sezernierenden Tregs in ursprünglich IL-10 negativen Tregs unter *in vivo* Bedingungen wurden Gesamt- und IL-10⁻ CD4⁺ T-Zellen aus CD28SA behandelten Thy1.1 Mäusen isoliert. Nach der CFSE Markierung wurden die Zellen in kongene C57BL/6 Mäusen injiziert, die wiederum nach 24 Stunden mit CD28SA behandelt wurden, um die Zellen weiter zu vermehren und zur IL-10 Produktion anzuregen. Die Analyse der IL-10 und Foxp3 Expression an Tag 4 zeigte, dass sich hauptsächlich die Foxp3⁺ T-Zellen geteilt hatten (**Abb. 27**). Dies führte zu einem Anstieg in der Frequenz an Foxp3⁺ Zellen von 7% auf 18% in den transferierten Gesamtzellen und von 20% auf 30% in den transferierten IL-10⁻ T-Zellen. Die Induktion der IL-10 Produktion fand dabei fast ausschließlich in Foxp3⁺ T-Zellen statt. Interessanterweise konnten in den transferierten IL-10⁻CD4⁺ T-Zellen deutlich mehr IL-10 Produzenten (12,3% IL-10⁺ in Foxp3⁺ bzw. 4,38% IL-10⁺ in CD4⁺) nachgewiesen werden als in den transferierten Gesamtzellen (6,32% IL-10⁺ in Foxp3⁺ bzw. 1,24% IL-10⁺ in CD4⁺). Dies weist daraufhin, wie effektiv die Induktion neuer IL-10 Produzenten aus Nicht-Produzenten ist. In Übereinstimmung mit den Daten transferierter unstimulierter CD4⁺ T-Zellen (**Abb. 18**) wurden die IL-10 Produzenten auch in **Abb. 27** hauptsächlich in den bereits expandierten Zellen nachgewiesen.

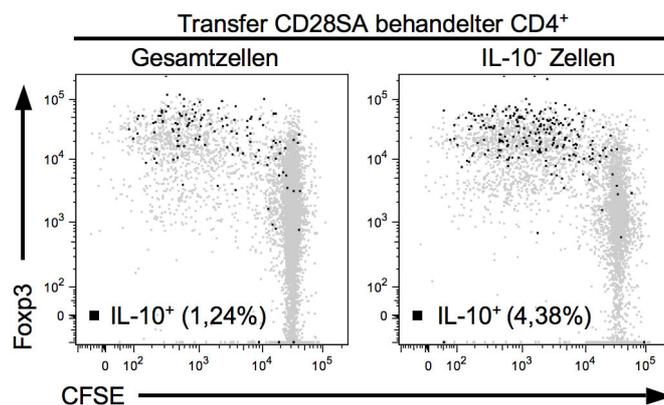


Abb. 27: *In vivo* Konversion IL-10 negativer Tregs

1·10⁷ aufgereinigte CFSE-markierte CD4⁺ bzw. CD4⁺IL-10⁻ T-Zellen aus Thy1.1 Mäusen 3 Tage nach CD28SA Stimulation wurden einen Tag vor der CD28SA Behandlung i.v. in kongene Thy1.2 Mäuse transferiert. 3 Tage später wurden die Zellteilung, die Foxp3 und IL-10 Expression in den transferierten Zellen analysiert. Die Graphen zeigen die FACS-Analyse der transferierten T-Zellen mit dem prozentualen Anteil an IL-10 produzierenden Zellen (Mittelwert von 2-3 Mäusen/Gruppe).

Zusammenfassend ist der IL-10 produzierende Phänotyp der Tregs weder in den *in vitro* noch in den *in vivo* Versuchen stabil. Vielmehr können nach der Expansion IL-10⁻ Tregs zu IL-10 produzierenden Tregs konvertieren, die dann, wie in *Abschnitt 4.2.4* gezeigt wurde, in entzündliche Gewebe einwandern.

4.2.7 Apoptosesensitivität IL-10 produzierender regulatorischer T-Zellen

Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein geregelt ablaufendes Zerstörungsprogramm der Zelle, das zum Abbau der Kern-DNA, Degeneration und Kondensation des Zellkerns sowie zur Phagozytose der Zellfragmente führt, ohne dabei eine Entzündungsreaktion auszulösen. Dieser Prozess spielt in T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung, der Differenzierung und beim Erhalt der Homöostase (Übersicht in Xu *et al.*, 2007). Durch das Fehlen von Überlebenssignalen (wie z.B. IL-2) oder durch apoptose-induzierende Signale (wie z.B. DNA Schäden, TNF oder FasL) werden eine Reihe von Cysteinproteasen, sogenannten Caspasen, aktiviert, die unter anderem zur Chromatin Kondensation und indirekt zur Fragmentierung der DNA führen. Eine besondere Rolle bei der Apoptoseregulation spielen Proteine der Bcl-2 Familie, die entsprechend ihrer Funktion in pro- und anti-apoptotische Mitglieder unterteilt werden. Anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-2 und Bcl-xL können den programmierten Zelltod verhindern und so das Überleben der Zelle sichern, während pro-apoptotische Moleküle wie Bax, Bim und Bad den Zelltod herbeiführen (Übersicht in Gross, A. *et al.*, 1999).

In **Abb. 26** wurde trotz optimaler Kulturbedingungen ein starker Abfall in der Anzahl der lebenden Foxp3⁺ Zellen, insbesondere in den IL-10 produzierenden Tregs, beobachtet. Um zu klären, ob diese Abnahme an lebenden Zellen durch eine erhöhte Apoptosesensitivität entsteht, wurden die kultivierten IL-10⁺Foxp3⁺ und IL-10⁻Foxp3⁺ Zellen (wie in **Abb. 26**) auf die Expression der Apoptosemarker Annexin V und 7AAD untersucht. Annexin V bindet Phosphatidylserin, das in einem frühen Apoptosestadium auf die Außenseite der Membran gelangt. 7AAD (7 Aminoactinomycin D), das ein spätes Apoptosestadium anzeigt, interkaliert mit der DNA, die nur in toten Zellen mit aufgebrochener Membran frei zugänglich ist (Schmid *et al.*, 1992; Zhang, G. *et al.*, 1997). Wie bereits angenommen stieg der Gesamtanteil an apoptotischen (Annexin V⁺7AAD⁻ und Annexin V⁺7AAD⁺) Zellen in den IL-10⁺Foxp3⁺ Zellen (aus Versuch **Abb. 26**) kontinuierlich an, während sich der Anteil in den IL-10⁻Foxp3⁺ Zellen bereits nach einem Tag stabilisierte (**Abb. 28A**).

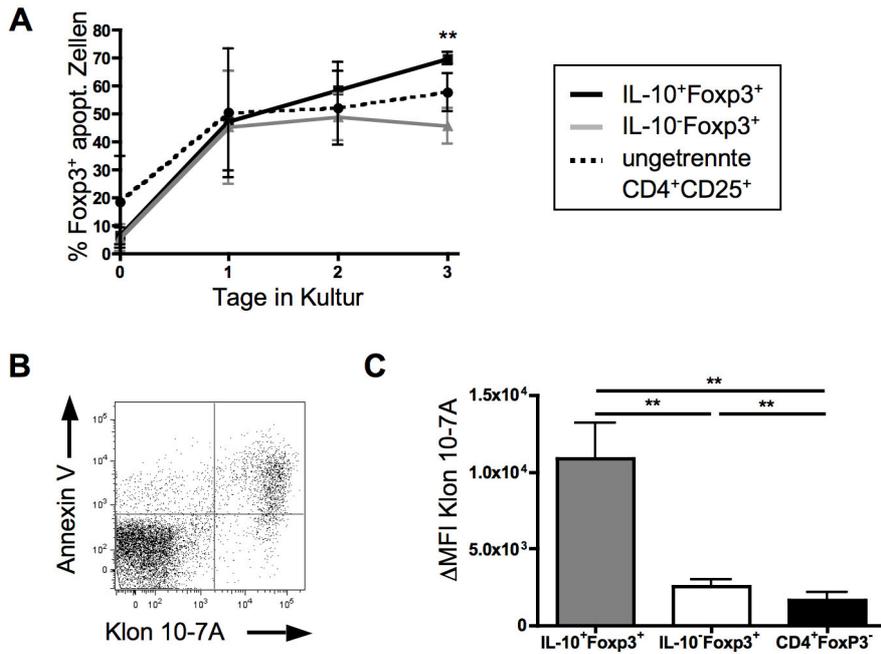


Abb. 28: Apoptoseanfälligkeit der IL-10 produzierenden Tregs

(A) Isolierte CD4⁺CD25⁺ Tregs aus CD28SA behandelten DEREK Mäusen wurden 24 Stunden mit anti-CD3 (immobilisiert, 1 µg/ml), anti-CD28 (immobilisiert, 5 µg/ml) und IL-2 (200 U/ml) stimuliert. Anschließend wurden die mit IL-10 Sekretionsassay gefärbten Zellen via FACS-Sorter in IL-10⁺Foxp3⁺ und IL-10⁻Foxp3⁺ Zellen aufgetrennt. Die aufgereinigten Zellen wurden für weitere 1 bis 3 Tage mit anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 weiterkultiviert und auf Annexin V und 7AAD positive Zellen analysiert. Als Kontrolle wurden nicht weiter aufgereinigte CD4⁺CD25⁺ T-Zellen verwendet. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von 3 Experimenten. ** p<0.005 im Vergleich IL-10⁺Foxp3⁺ zu IL-10⁻Foxp3⁺ Zellen (B) FACS-Analyse der Doppelfärbung mit Annexin V und Klon 10-7A (Phospholipide) (C) Durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Klon 10-7A Färbung von CD4⁺ T-Zellen 3 Tage nach D665 Injektion in Abhängigkeit von IL-10 und Foxp3. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von 3 bzw. 6 Mäusen. Ungepaarter t-Test: ** p<0.005, ΔMFI (durchschnittliche Fluoreszenzintensität) = (MFI(Marker)–MFI(Isotyp))

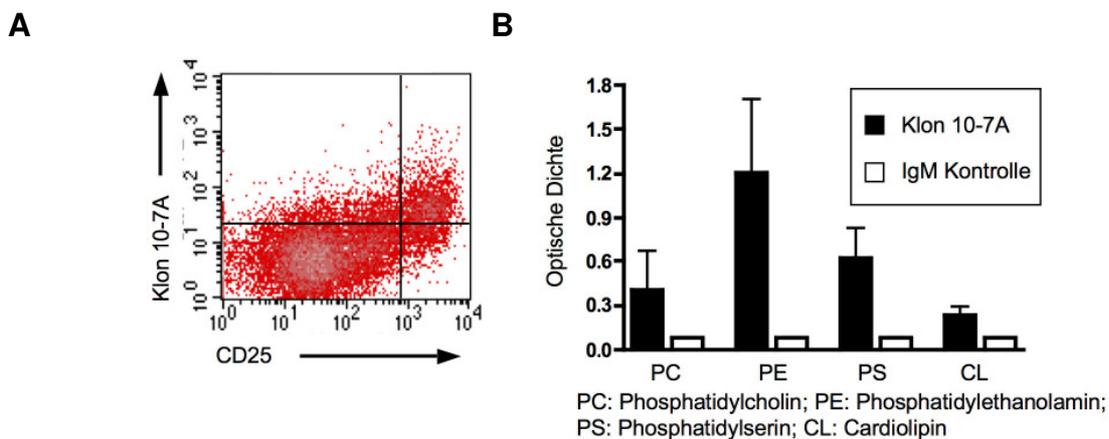


Abb. 29: Charakterisierung des Klons 10-7A

(A) Aufgereinigten *in vivo* mit CD28SA aktivierten Ratten T-Zellen wurden 48 Stunden in Medium mit IL-2 inkubiert und anschließend mit Klon 10-7A und CD25 gefärbt. (B) Mittels ELISA wurden Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Cardiolipin als spezifische Antigene des monoklonalen Antikörpers Klon 10-7A ermittelt. (Durchgeführt von K. McPherson (A) und M. Herrmann (B))

Der IgM Antikörper Klon 10-7A, den Frau K. McPherson in unserer Arbeitsgruppe isolierte, um damit aktivierte Ratten Tregs zu detektieren (**Abb. 29A**), bindet ähnlich wie Annexin V, an Phospholipide, zeigt jedoch eine bessere Auflösung als die Annexin V Färbung (**Abb. 28B**). Er ist, wie durch ELISA von Herrn M. Herrmann (Erlangen) bestimmt wurde, spezifisch für die Phospholipide Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Cardiolipin (**Abb. 29B**). Um den angenommenen prä-apoptotischen Phänotyp der IL-10 produzierenden Tregs auch *ex vivo* zu überprüfen, wurden Zellen aus CD28SA behandelten Mäusen mit mAKs 10-7A, IL-10 und Foxp3 gefärbt. In der Tat exponierten IL-10 produzierende Tregs deutlich mehr Phospholipide auf ihrer äußeren Plasmamembran als IL-10⁻ Tregs oder Tkons (**Abb. 28C**).

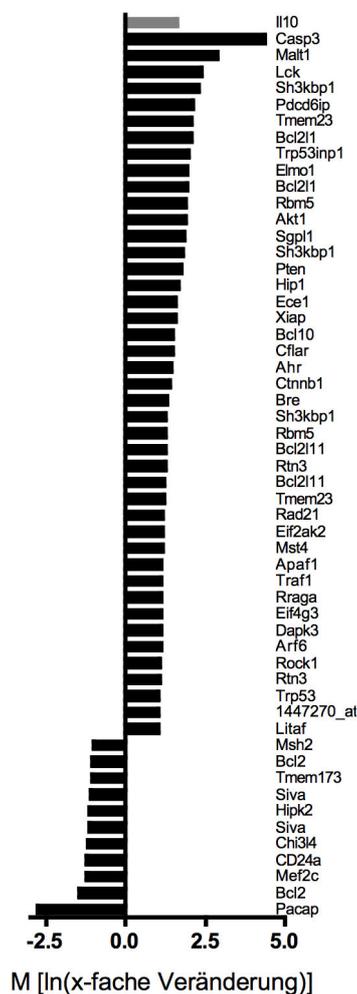


Abb. 30: Genexpressionsdaten des Funktionsclusters „Apoptose“ (DAVID)

IL-10⁺ und IL-10⁻CD4⁺CD25⁺ Tregs wurden aus CD28SA stimulierten C57BL/6 Mäusen an Tag 3 aufgereinigt und die Genexpression mittels Microarray analysiert. Es wurden die Gene ausgewählt, deren Transkripte eine < 2-fache Veränderung und einen bereinigten p-Wert > 0,001 zeigten. (Daten aus meiner Diplomarbeit „Charakterisierung und Identifizierung von Subpopulationen regulatorischer T-Zellen der Maus“)

Dies bestätigten die Ergebnisse der vergleichenden Genexpressionsanalyse (siehe Diplomarbeit) von aufgereinigten IL-10⁺CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und IL-10⁻CD4⁺CD25⁺ T-Zellen. Hier konnte gezeigt werden, dass mehrere pro-apoptotische Gene wie Caspase 3, Pten,

Bcl211 (Bim), Rock1 oder Apaf1 in den IL-10 produzierenden Tregs im Vergleich zu den nicht-produzierenden Tregs hochreguliert wurden, während für die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 das Gegenteil zutraf (**Abb. 30**). Yamaguchi *et al.*, 2007 zeigten bereits, dass antigen-spezifische Tregs nach *in vivo* Aktivierung nur wenig anti-apoptotisches Bcl-2 Protein exprimieren. Auch die *in vivo* mit CD28SA aktivierten Tregs und insbesondere die IL-10⁺Foxp3⁺ Tregs exprimierten deutlich weniger Bcl-2 Protein als die damit verglichenen Tkons (**Abb. 31**).

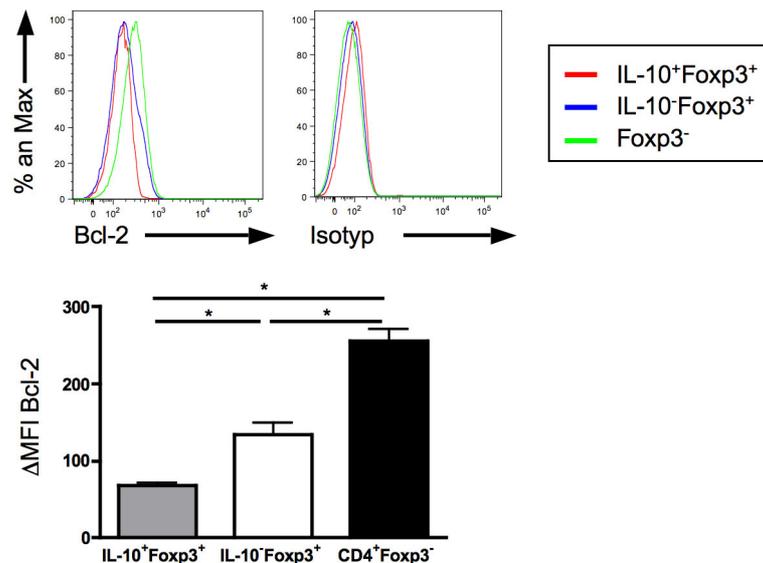


Abb. 31: Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 in CD28SA behandelten T-Zellen
 CD4⁺ T-Zellen aus CD28SA behandelten Mäusen wurden an Tag 3 auf Bcl-2, IL-10 und Foxp3 Expression analysiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von 3 Mäusen. Ungepaarter t-Test: * p<0.05, ΔMFI (durchschnittliche Fluoreszenzintensität) = (MFI(Marker)–MFI(Isotyp))

Einen abschließenden Hinweis, dass IL-10 produzierende Tregs apoptoseanfällig sind, wurde durch Färbung *in vivo* aktivierter Tregs mit einem Antikörper spezifisch für aktive Caspase 3 erlangt. Caspase 3 ist eine Effektor-Caspase, deren inaktive Vorläuferform durch die Initiator-Caspasen 8 und 9 aktiviert wird und maßgeblich am programmierten Tod der Zellen beteiligt ist (Übersicht in Xu *et al.*, 2007). Durch die Genexpressionsanalyse war zwar bereits bekannt, dass IL-10⁺CD4⁺CD25⁺ Zellen deutlich mehr (78-fach) Caspase 3 exprimieren als IL-10⁻CD4⁺CD25⁺ Zellen (**Abb. 30**), jedoch konnten daraus keine Schlussfolgerungen über die Menge an funktionell aktivem Protein gezogen werden. *Ex vivo* Färbung von *in vivo* CD28SA stimulierten Lymphknotenzellen ergab einen signifikant höheren Anteil an aktiver Caspase 3 positiven Zellen in den IL-10 Produzenten als in den Nicht-Produzenten (**Abb. 32A**). Auch aufgereinigte CD4⁺CD25⁺ aus CD28SA behandelten Mäusen, kultiviert mit anti-CD3, anti-CD28 und IL-2, zeigten nach drei Tagen deutlich mehr aktive Caspase 3 positive Zellen in IL-10⁺Foxp3⁺ Zellen als in den IL-10⁻Foxp3⁺ (**Abb. 32B**).

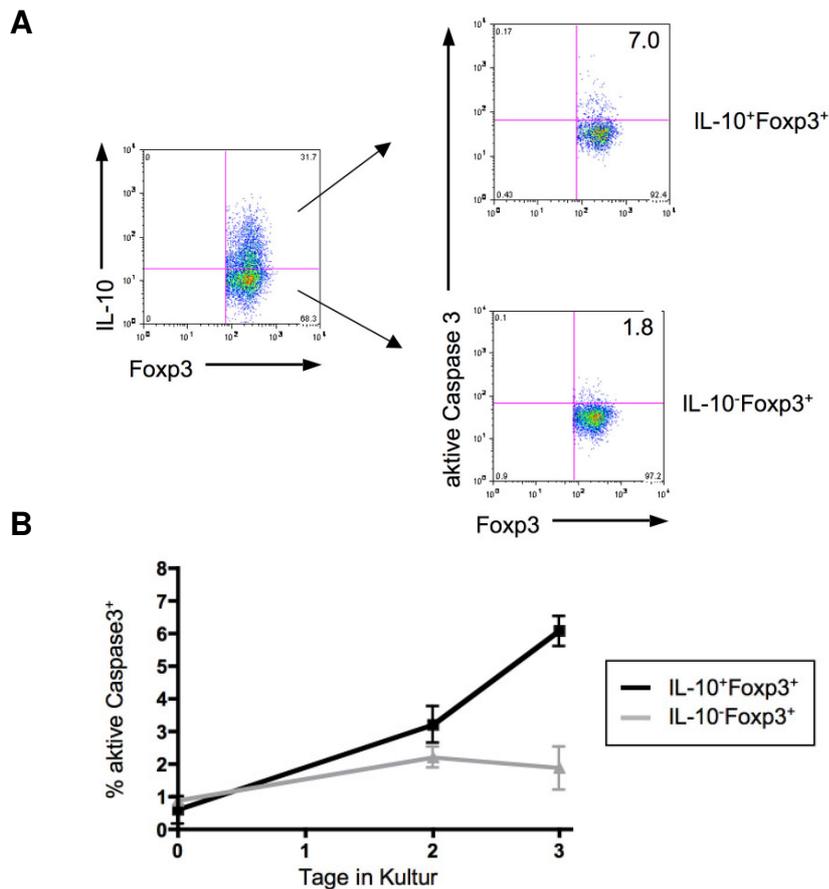


Abb. 32: Höherer Anteil aktive Caspase3 exprimierender Zellen in IL-10⁺Foxp3⁺ Tregs

(A) CD4⁺ T-Zellen aus CD28SA behandelten Mäusen wurden an Tag 3 auf aktive Caspase 3, IL-10 und Foxp3 Expression analysiert. (B) Aufgereinigte CD4⁺CD25⁺ aus CD28SA stimulierten Mäusen wurden für 2 bis 3 Tage mit anti-CD3 (immobilisiert, 1 µg/ml), anti-CD28 (immobilisiert, 5 µg/ml) und IL-2 (200 U/ml) kultiviert und auf aktive Caspase 3, IL-10 und Foxp3 Expression analysiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Proben.

4.2.8 Zusammenfassung

Im „ruhenden“ Immunsystem kommen in den Lymphknoten nur wenige IL-10 produzierende Tregs vor. Durch die polyklonale *in vivo* Stimulation der Tregs mit CD28SA nimmt neben der Vermehrung der Tregs auch die IL-10 Produktion in den Tregs dramatisch zu. Diese wird im Vergleich zur Expansion zeitlich leicht versetzt induziert. Durch die Anreicherung der IL-10 Produzenten wurde es möglich, sowohl den Phänotyp als auch die Funktion dieser Tregs näher zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass CD28SA induzierte IL-10 produzierende Tregs stark aktivierte Zellen mit hoher supprimierender Aktivität sind. Jedoch vermittelte zumindest bei den durchgeführten *in vitro* Assays das produzierte IL-10 nicht die inhibierende Aktivität der Tregs. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass durch die CD28SA Stimulation sich das Muster der von Tregs exprimierten Migrationsmarker verschob. Der lymphknotensuchende CCR7⁺CCR5⁻CCR6⁻

IL-10 negative Phänotyp veränderte sich nach der Stimulation in einen entzündungssuchenden CCR7⁻CCR5⁺CCR6⁺ Phänotyp mit vermehrter IL-10 Produktion. Im Einklang damit wurden die funktionell hoch aktiven IL-10 Produzenten verstärkt in entzündlichen Bereichen nachgewiesen. Abschließend wurde beobachtet, dass aufgereinigte *in vitro* weiterkultivierte IL-10 positive Tregs eine höhere Apoptoseanfälligkeit aufweisen im Vergleich zu aufgereinigten IL-10 negativen Tregs, aus denen dafür neue IL-10 Produzenten entstehen können. Diese Daten unterstützen ein Modell, bei dem die Aktivierung der Tregs zu einer terminalen Differenzierung der Zellen führt, die letztendlich durch das programmierte Absterben der Zellen auch für das Ende der Immunsuppression sorgt (**Abb. 33**).

Zusammenfassend konnten unsere Daten somit einen Zusammenhang zwischen klonaler Expansion, funktioneller Differenzierung, Migration in Entzündungsherde und erhöhter Apoptosesensitivität nach polyklonaler Treg Stimulation herstellen.

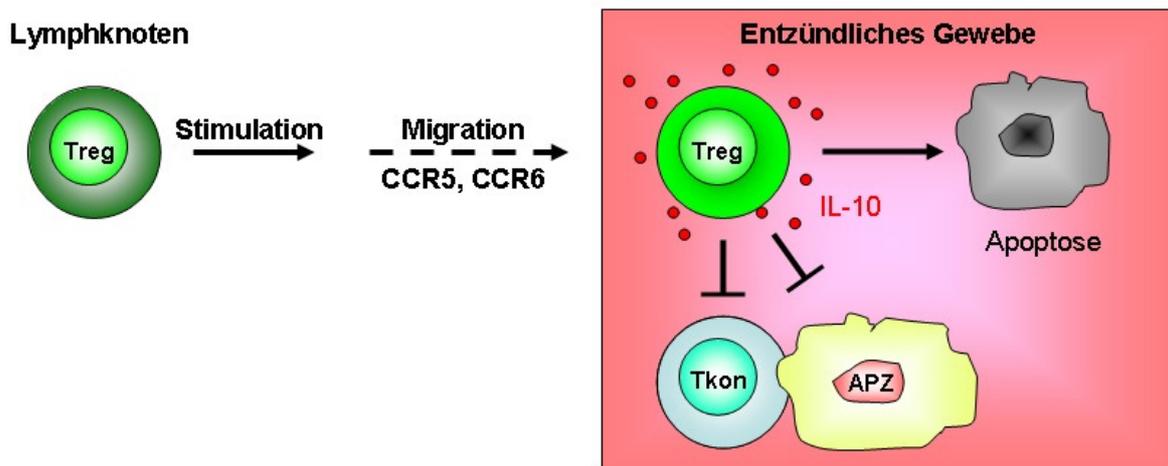


Abb. 33: Terminale Differenzierung und Apoptose IL-10 produzierender Tregs

Tregs in den lymphoiden Organen werden durch einen Stimulus (normal Kostimulation und IL-2) aktiviert. Dies führt zu Veränderungen in den Oberflächenrezeptoren (CCR5, CCR6, CD103), die die aktivierten Tregs in entzündliches Gewebe leiten, und zur Induktion der IL-10 Produktion. Die supprimierenden Effekte sind selbst-limitierend, da auf die IL-10 Produktion die Apoptose der Tregs folgt.

4.3 Die Rolle der CD28 Kostimulation bei der Konversion konventioneller zu regulatorischen CD4⁺ T-Zellen

Tregs, die wichtig für den Erhalt der Homöostase des Immunsystems sind, können in zwei Subpopulationen unterteilt werden, natürlich vorkommende (nTregs) und induzierte Tregs (iTregs). Während nTregs sich im Thymus zu Foxp3 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen differenzieren, können sich in der Peripherie unter einer Vielzahl von Bedingungen aus reifen Tkons CD4⁺Foxp3⁺ iTregs entwickeln. Beide spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Immunantwort. Auf Grund von Unterschieden im TZR-Repertoires wird jedoch davon ausgegangen, dass nTregs und iTregs zum Teil unterschiedliche Funktionen besitzen. nTregs verleihen demnach eher Toleranz gegen Selbstantigene, während iTregs eine Toleranz gegen Fremdartigene wie z.B. Allergene im Darm ermöglichen (Übersicht in Mayne *et al.*, 2013). iTregs lassen sich auch durch die Stimulation des TZR in Anwesenheit von TGFβ *in vitro* generieren. Bezüglich der Notwendigkeit der Kostimulation durch CD28 gab es einige widersprüchliche Ergebnisse. Einerseits konnte mit Hilfe von CD28 defizienten Mäusen gezeigt werden, dass CD28 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* für die Entstehung von iTregs notwendig ist (Guo, F. *et al.*, 2008). Andererseits zeigten *in vitro* Daten, dass ein starkes CD28 Signal die Foxp3 Induktion in Tkons inhibieren kann bzw. dass IL-2 bei fehlendem CD28 Signal Tkons zu Foxp3 T-Zellen konvertieren kann (Selvaraj *et al.*, 2007; Semple *et al.*, 2011). Eine gute Erklärung für diese Widersprüche wurde von Gabrysova *et al.* dargestellt, die zeigten, dass die integrierte Stärke des TZR/CD28 Signals die Effektivität der Foxp3 Induktion in Abhängigkeit der Zytokine IL-2 und TGFβ reguliert (Gabrysova *et al.*, 2011). Hier konnte auch beobachtet werden, dass ein schwaches TZR Signal in Kombination mit einem starken CD28 Signal zu einer effektiven iTreg Induktion führt. Da bei der Stimulation von T-Zellen durch CD28SA ähnliche TZR und CD28 Signalstärken zusammenspielen, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die *in vitro* CD28SA Stimulation ebenfalls in naiven Tkons Foxp3 Expression induzieren kann und welche Eigenschaften die so generierten iTregs haben.

4.3.1 Konversion zu regulatorischen T-Zellen bei suboptimaler T-Zellrezeptor Stimulation

Um zu bestätigen, dass bei schwachem TZR Signal und starkem CD28 Signal naive T-Zellen zu iTregs differenzieren, wurden zunächst naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen aufgereinigt und mit unterschiedlichen Konzentrationen an immobilisierten Antikörpern (anti-CD3: 0-5 µg/ml, anti-CD28: 0-160 µg/ml) kultiviert. Nach drei Tagen wurden die Zellzahl und die Foxp3 Expression der CD4⁺ Zellen analysiert. Während die

maximale Gesamtzellzahl durch die Kombination aus hoher anti-CD3 und anti-CD28 Konzentration erreicht wurde (**Abb. 34A**), konnten die maximale Anzahl und Frequenz an $CD4^+Foxp3^+$ T-Zellen, wie auch schon von Gabrysova *et al.*, 2011 beschrieben, nur bei niedriger anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) und hoher anti-CD28 (40 bzw. 160 $\mu\text{g/ml}$) Konzentration erreicht werden (**Abb. 34B, C**). Eine wie von Gabrysova *et al.*, 2011 beschriebene Hemmung der Foxp3 Induktion bei starker TZR Stimulation mit gleichzeitig starker CD28 Stimulation konnte, evtl. auf Grund der Unterschiede in den Kulturbedingungen (immobilisierter gegen löslichen CD28 mA-K und unterschiedliche CD28 mA-K Klone), nicht beobachtet werden.

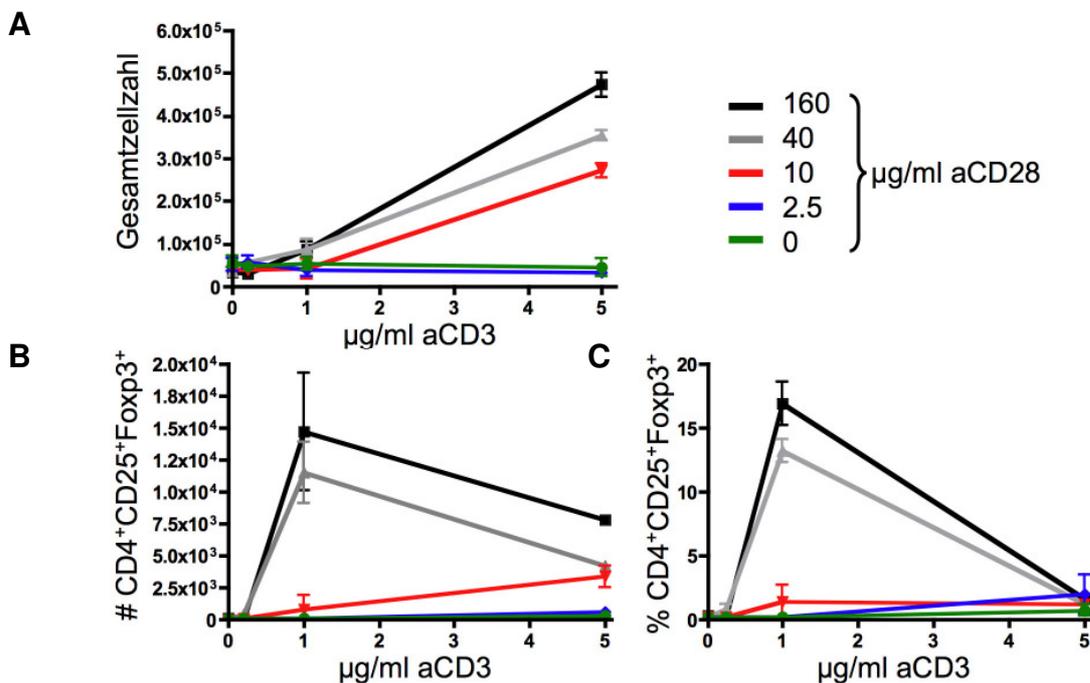


Abb. 34: Abhängigkeit der Foxp3 Induktion von der anti-CD3 und anti-CD28 Konzentration

Aufgereinigte $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an anti-CD3 und anti-CD28 (beide immobilisiert) stimuliert. An Tag 3 wurden (**A**) die Gesamtzellzahl, (**B**) die Zellzahl und (**C**) der Anteil an $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Zellen analysiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von jeweils 3 Proben.

Ebenfalls ein schwaches (tonisches) TZR Signal in Kombination mit einem starken CD28 Signal erhalten die Zellen bei Stimulation mit CD28SA. Obwohl *in vivo* kaum eine Konversion von $CD4^+Foxp3^-$ zu $Foxp3^+$ T-Zellen durch CD28SA induziert wurde (**Abb. 10**), konnte bei *in vitro* Versuchen mit $CD4^+CD25^-$ T-Zellen ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Gesamtzellzahl sowie der Frequenz und der Anzahl an $Foxp3^+$ T-Zellen ermittelt werden (**Abb. 35**). Aufgrund einer hohen Variabilität in der Effektivität der Foxp3 Induktion mit immobilisiertem CD28SA wurden alternativ antikörpergebundene Dynabeads mit CD28SA inkubiert und für die Konversion naiver Tkons getestet. Erstaunlicherweise überstieg die mit CD28SA Dynabeads induzierte Foxp3 Expression deutlich die der durch immobilisier-

ten CD28SA vermittelten (**Abb. 36**). Daraufhin wurde für die weiteren Experimente die Stimulation mit Dynabeads bevorzugt. Zudem bieten Dynabeads den Vorteil, dass die Zellen nach der Stimulation über einen Magneten wieder von diesen getrennt werden und so die iTregs ohne weitere Aktivierung analysiert werden können.

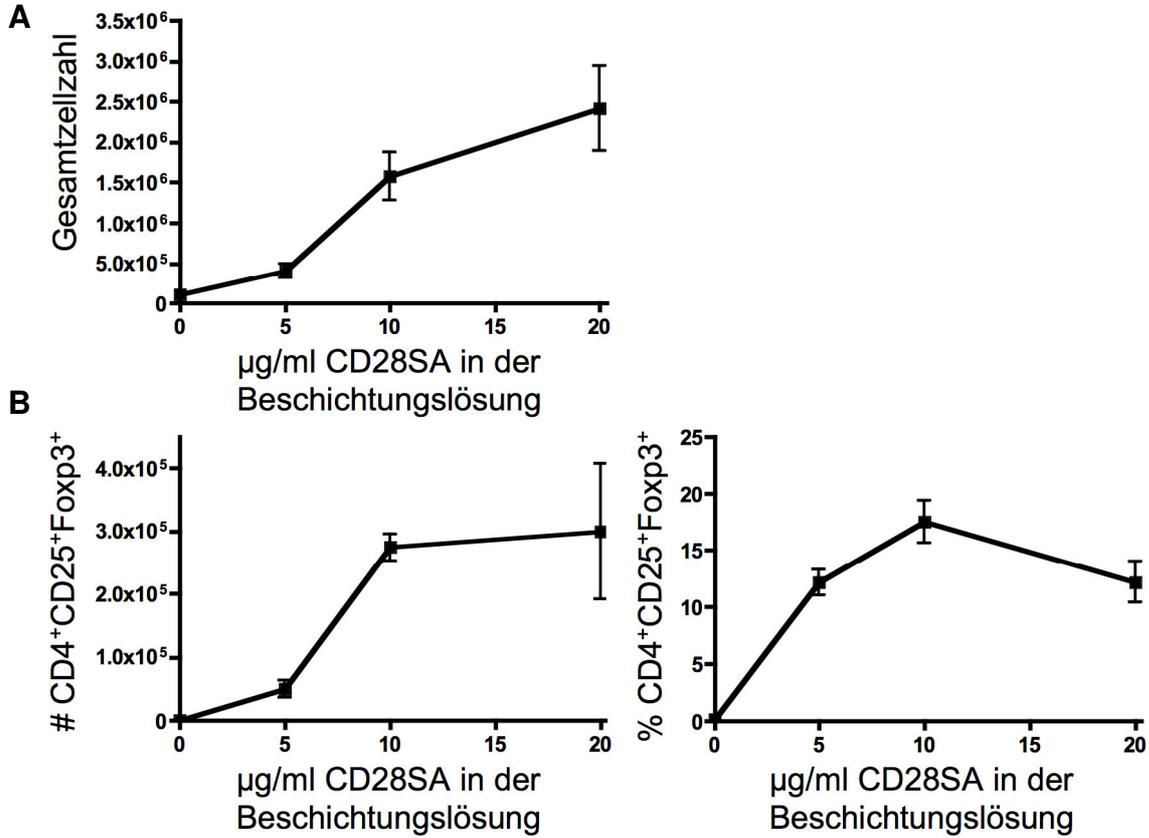


Abb. 35: Abhängigkeit der Foxp3 Induktion von der CD28SA Konzentration

Aufgereinigte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an CD28SA (immobilisiert) stimuliert. An Tag 4 wurden (A) die Gesamtzellzahl, (B) die Zellzahl und (C) der Anteil an CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Zellen analysiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Proben.

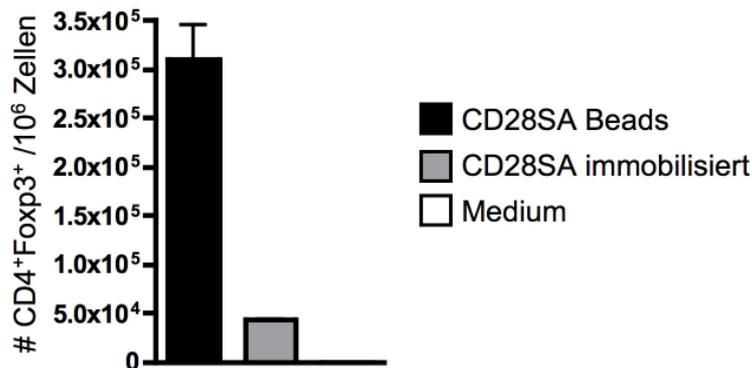


Abb. 36: Vergleich der Effektivität der Foxp3 Induktion

Aufgereinigte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mit CD28SA (immobilisiert, 10 µg/ml) bzw. mit CD28SA Dynabeads stimuliert. An Tag 3 wurde die Anzahl der CD4⁺Foxp3⁺ Zellen verglichen. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Proben.

Ein Vergleich der CD28SA vermittelten Konversion mit einer für die iTreg Induktion optimierten Stimulation (anti-CD3/anti-CD28 (im Verhältnis 1:10) Dynabeads in Anwesenheit

von exogenem IL-2 und TGF β) sollte Aufschluss über die Effektivität von CD28SA bringen. Dazu wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aufgereinigt und über zehn Tage die Anzahl und die Frequenz an Foxp3⁺ T-Zellen unter den jeweiligen Kulturbedingungen bestimmt. Um die Zellzahlen auf einem ähnlichen Niveau zu halten, wurden die Zellen alle drei bis vier Tage auf zwei Nöpfe aufgeteilt und das fehlende Volumen mit warmem Medium und IL-2 (200 U/ml) ersetzt. Das zugesetzte IL-2 diente der Stabilisierung der generierten iTregs (Chen, Q., Kim, *et al.*, 2011). Während der Prozentsatz an CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen bei Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads über die beobachteten zehn Tage konstant über dem mit CD28SA Dynabeads erzielten lag (**Abb. 37B**), konnten aufgrund der höheren Gesamtzellzahl in der CD28SA Stimulation (**Abb. 37A**) ab dem fünften Tag mehr iTregs durch die CD28SA Stimulation induziert werden (**Abb. 37C**).

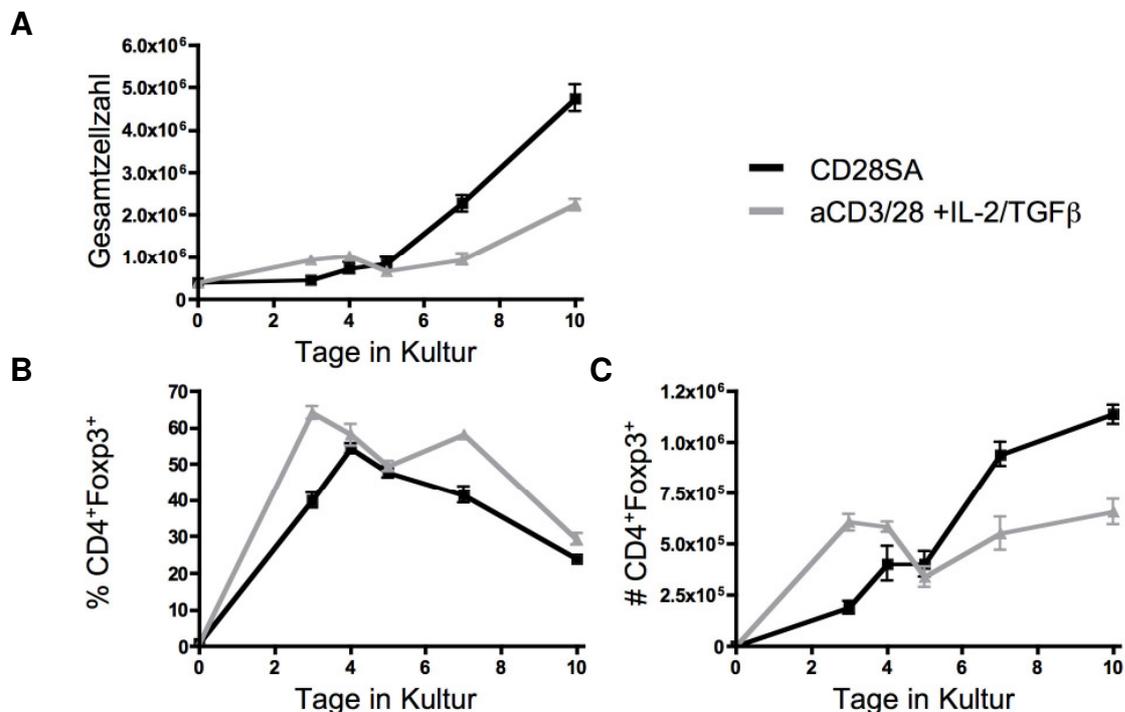


Abb. 37: Kinetik der Foxp3 Induktion

Aufgereinigte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mit CD28SA Dynabeads bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) und TGF β (5 ng/ml) stimuliert. An Tag 3, 4, 5, 7 und 10 wurden (**A**) die Gesamtzellzahl, (**B**) der Anteil und (**C**) die Zellzahl an CD4⁺Foxp3⁺ Zellen analysiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von jeweils 3 Proben.

Durch die Depletion der CD25⁺ Zellen können nicht alle Foxp3⁺ Tregs entfernt werden, da eine kleine Subpopulation der Foxp3⁺ Tregs CD25 nicht oder nur schwach exprimiert (Fontenot *et al.*, 2005). Um die Bedeutung dieser Foxp3⁺ Zellen, die weniger als 1% der eingesetzten Zellen ausmachen, bei der Konversion beurteilen zu können, wurden einerseits Tkons aus OT-II RAG1^{-/-} Mäusen verwendet und andererseits Thy1.1⁺CD4⁺CD25⁻ mit CD4⁺Foxp3⁺ aus kongenen Thy1.2 Mäusen gezielt kontaminiert.

OT-II RAG1^{-/-} Mäuse besitzen einen transgenen TZR spezifisch für Hühner Ovalbumin (OVA), das von MHC-Klasse II I-Ab Molekülen präsentiert wird (Barnden *et al.*, 1998). Aufgrund der RAG1 (*recombination activating gene 1*) Defizienz können diese Tiere die somatische Rekombination des TZR und BZR nicht durchführen und besitzen deshalb nur CD4⁺ T-Zellen mit OVA spezifischem TZR. Zudem enthalten die CD4⁺ T-Zellen dieser Mäuse keine Foxp3⁺ Tregs. Grund dafür ist, dass über den transgenen TZR, dessen Peptid nicht im Thymus exprimiert wird, die für die Treg Entwicklung notwendige Signalstärke nicht vermittelt werden kann (Übersicht in Simons *et al.*, 2010). Um nun Konversion in Tkons unabhängig von nTregs zu untersuchen, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus OT-II RAG1^{-/-} Mäusen isoliert und für sieben Tage mit CD28SA Dynabeads bzw. anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (+ IL-2/TGFβ) stimuliert. Wie in **Abb. 38** deutlich wird, konnten beide Kulturbedingungen in naiven Tkons Foxp3 Expression und damit Konversion induzieren. Die Frequenz und auch die Anzahl an Foxp3⁺ T-Zellen lag jedoch niedriger als bei Versuchen mit Zellen aus C57BL/6 Mäusen (**Abb. 37**).

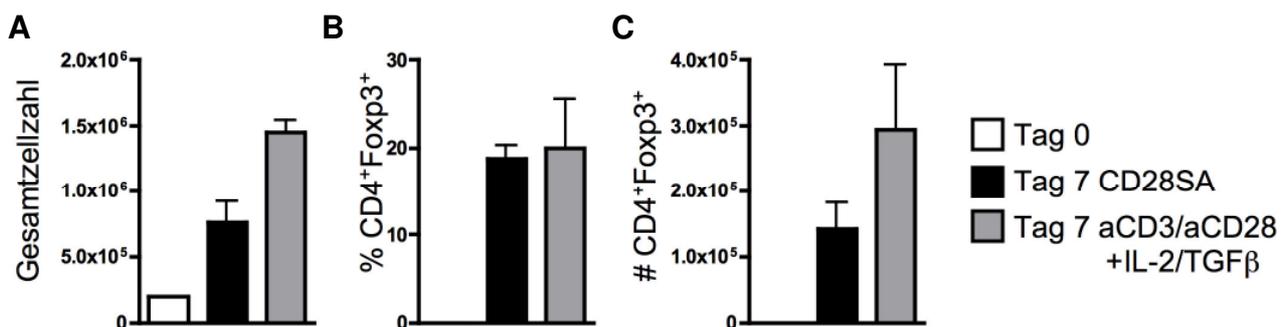


Abb. 38: Foxp3 Induktion in OT-II Rag1^{-/-} T-Zellen

Aufgereinigte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mit CD28SA Dynabeads bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) und TGFβ (5 ng/ml) stimuliert. An Tag 7 wurden (A) die Gesamtzellzahl, (B) der Anteil und (C) die Zellzahl an CD4⁺Foxp3⁺ Zellen miteinander verglichen. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Proben. (Durchgeführt unter Mithilfe von V. Schneider)

Welchen Anteil kontaminierende Tregs an der aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nicht-TZR transgener Mäuse entstehenden Foxp3⁺ T-Zellpopulation haben, wurde mit folgendem Versuch ermittelt. CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Thy1.1 Mäusen wurden aufgereinigt, CFSE markiert und für sieben Tage mit CD28SA Dynabeads bzw. anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (+ IL-2/TGFβ) kultiviert. Diese Kultur enthielt 0,84% Foxp3⁺ T-Zellen (**Abb. 39A links**). Zusätzlich wurden aus Foxp3.RFP Mäusen, die das Reporter gen RFP unter Kontrolle des *Foxp3* Promotors exprimieren, mit dem FACS-Sorter CD4⁺Foxp3 (RFP)⁺ Zellen aufgereinigt. Diese ebenfalls CFSE markierten, kongenen Zellen wurden mit einem Anteil von 1% bzw. 0,5% der Kultur zugesetzt. Nach zwei, drei, vier und sieben Tagen wurden die Anzahl an CD4⁺Foxp3⁺ Zellen und die durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen (acd) der Thy1.1⁺ und der Thy1.2⁺ Zellen bestimmt. Während die Anzahl an Foxp3⁺ Zellen in Thy1.1⁺ Zellen

bei beiden Kulturbedingungen stetig anstieg, blieb die Anzahl der zugesetzten Thy1.2⁺ Foxp3⁺ Zellen in etwa konstant (**Abb. 39B**). Die konstante Zellzahl stand jedoch in Kontrast zu den hohen acd-Werten, die denen der Thy1.1⁺Foxp3⁺ Zellen bei anti-CD3/anti-CD28 Stimulation ähnelten (**Abb. 39C**). Wahrscheinlich wurde die Proliferationsrate der Thy1.2⁺Foxp3⁺ Zellen durch eine ähnlich hohe Sterberate ausgeglichen.

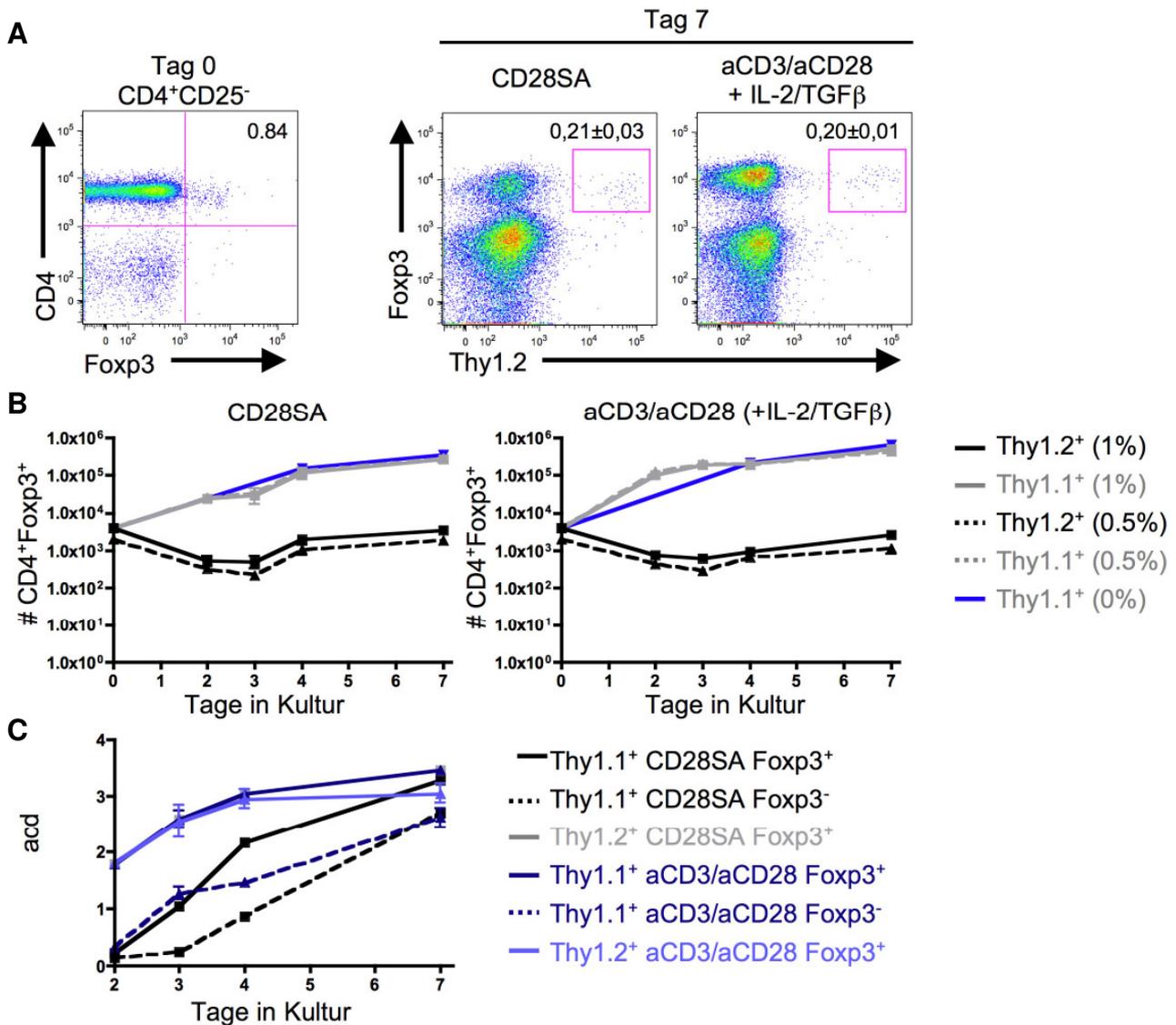


Abb. 39: Spiking der CD4⁺CD25⁻ Kultur mit CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen

(A) Aufgereinigte CFSE markierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen von Thy1.1 Mäusen wurden mit CD28SA Dynabeads bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) und TGFβ (5 ng/ml) stimuliert. Zusätzlich wurden 1·10³ bzw. 2·10³ isolierte CFSE markierte Thy1.2⁺ CD4⁺Foxp3⁺ Zellen von Foxp3.RFP Mäusen als „Kontamination“ zugefügt. An Tag 2, 3, 4 und 7 wurden (B) die Zellzahl CD4⁺Foxp3⁺ Zellen und (C) die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (acd) bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von jeweils 3 Proben. (Durchgeführt unter Mithilfe von V. Schneider)

Zusammen zeigten die Versuche mit OT-II RAG^{-/-} Zellen sowie das Spiking der CD4⁺CD25⁻ Kultur mit CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen eindeutig, dass durch CD28SA und anti-CD3/anti-CD28 (+ IL-2/TGFβ) Stimulation Konversion induziert wurde. Der Anteil von ca. 1% an

kontaminierenden Foxp3⁺ Tregs innerhalb der iTregs war dabei vernachlässigbar gering und dies, obwohl CD28SA *in vivo* Tregs dramatisch expandieren kann (**Abb. 9**).

CD28SA ist somit *in vitro*, wenn auch nicht *in vivo*, wahrscheinlich bedingt durch die besondere Kombination aus schwachem TZR und starkem CD28SA Signal, sehr effektiv im Generieren von iTreg. Im Folgenden sollten die Umstände der iTreg Induktion sowie deren Phänotyp und Funktionalität überprüft werden.

4.3.2 Einfluss von IL-2 und TGFβ auf die Konversion von konventionellen zu regulatorischen CD4⁺ T-Zellen

Sowohl IL-2 als auch TGFβ sind wesentlich für die *in vitro* Konversion von Tkons zu iTregs (Chen, W. *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2007). Während TGFβ zusammen mit IL-2 die Foxp3 Expression induziert, kann IL-2 zusätzlich diese Zellen expandieren (Zheng *et al.*, 2007). Um zu klären, ob die CD28SA Stimulation ebenfalls abhängig von IL-2 und TGFβ ist, bzw. ob die iTreg Induktion durch diese Zytokine weiter gesteigert werden kann, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in Anwesenheit von exogenem IL-2, TGFβ bzw. Zytokinsignalweg-Inhibitoren und blockierenden Antikörpern inkubiert. Nach viertägiger Stimulation mit CD28SA oder anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads wurden die Gesamtzellzahl und die Anzahl an CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen der unterschiedlichen Kulturbedingungen verglichen.

Im Gegensatz zur Stimulation der naiven T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads konnte die Stimulation mit CD28SA Dynabeads ohne die Zugabe von exogenem IL-2 und TGFβ in vielen Zellen eine Foxp3 Expression induzieren (**Abb. 40**). Die Frequenz (1,7-fach) und auch die Menge (1,4-fach) an iTregs konnte nur durch die Zugabe beider Zytokine gesteigert werden. Die Zugabe von TGFβ konnte die Frequenz an Foxp3⁺ Zellen deutlich erhöhen, durch die inhibierende Wirkung von TGFβ auf die Zellproliferation (Delisle *et al.*, 2013) blieb die Gesamtzellzahl jedoch gering. Die Zugabe von IL-2 allein beeinflusste die Menge an Tregs nicht signifikant. Im Gegensatz dazu konnte IL-2 bei Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads die Gesamtzellzahl und die Menge an iTregs signifikant steigern. Eine wirklich effiziente Foxp3 Induktion konnte aber nur durch die Zugabe beider Zytokine erzeugt werden.

Da CD28SA unabhängig von exogenem IL-2 und TGFβ iTregs effektiv induzieren konnte, stellte sich die Frage, ob diese Konversion unabhängig von diesen Zytokinen ist. Eine Blockade des TGFβ Typ I Rezeptors (ALK5) durch den Inhibitor SB431542 (Inman *et al.*, 2002) sowie die Zugabe von blockierendem anti-TGFβ Antikörper konnten jedoch nachweisen, dass TGFβ essentiell für die Konversion war. Ähnliches zeigte sich auch durch die Zugabe von blockierendem anti-IL-2 Antikörper (S4B6) für IL-2. In allen Fällen wurde die

Inhibition der Foxp3 Induktion zumindest teilweise durch die zusätzliche Zugabe des jeweils blockierten Zytokins wieder aufgehoben (**Abb. 40**).

Die CD28SA vermittelte iTreg Konversion benötigt somit neben der TZR/CD28 Stimulation auch die Zytokine IL-2 und TGF β . Aufgrund einer optimalen endogenen IL-2 und TGF β Produktion und/oder durch CD28SA vermittelte zellintrinsische Veränderungen ist die Konversion jedoch weitestgehend unabhängig von exogenen Zytokinen.

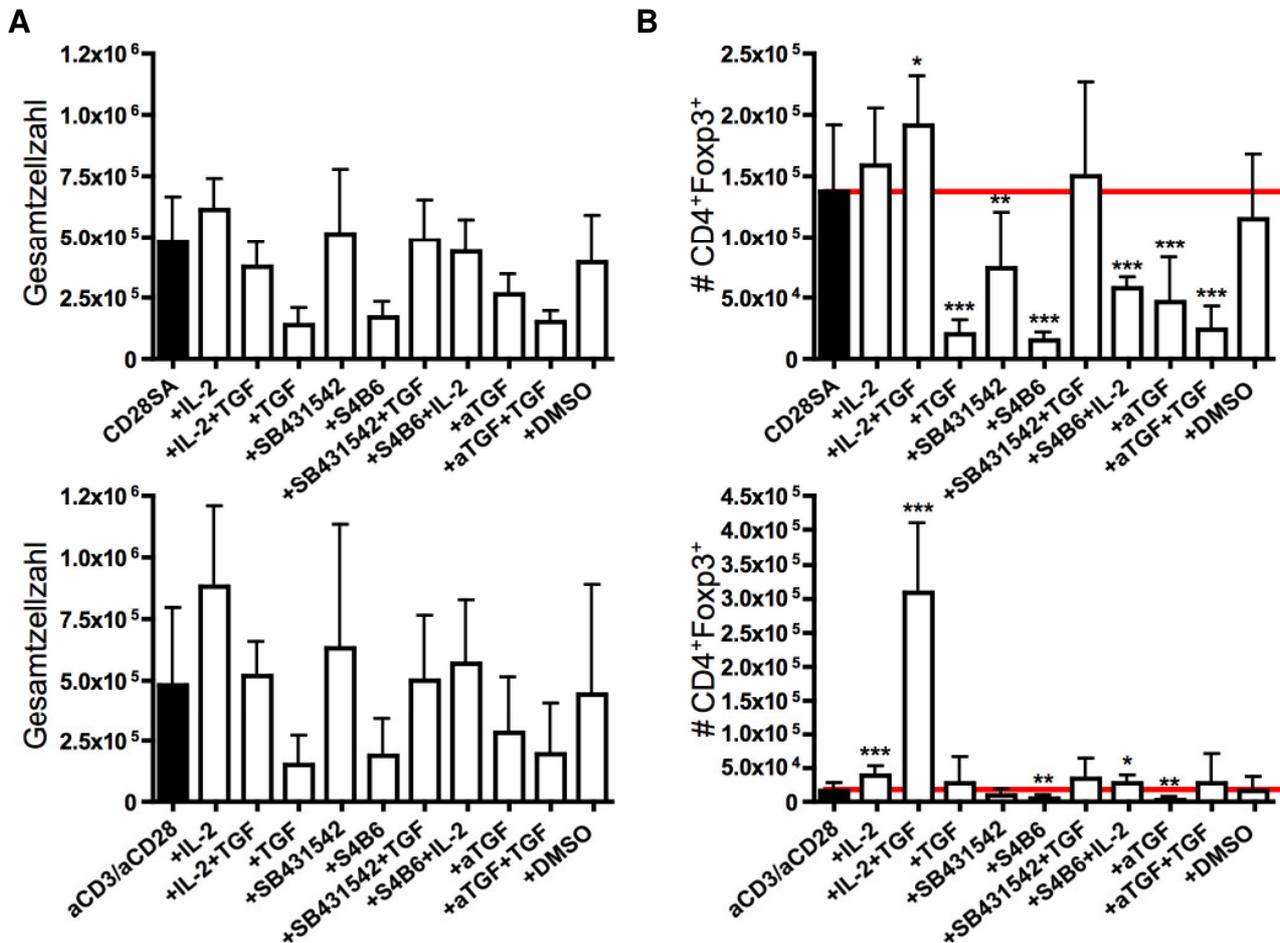


Abb. 40: Konversion in Abhängigkeit von IL-2 und TGF β

Aufgereinigte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mit CD28SA Dynabeads bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads in An- und Abwesenheit von IL-2 (500 U/ml), TGF β (5 ng/ml), SB431542 (TGF β Inhibitor, 40 nmol/ml), S4B6 (blockierender IL-2 mAK, 10 μ g/ml) und aTGF (blockierender TGF β mAK, 0,2 μ g/ml) stimuliert. An Tag 3 wurden (**A**) die Gesamtzellzahl und (**B**) die Zellzahl der CD4⁺Foxp3⁺ Zellen bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von jeweils 9-15 Proben.

Mann-Whitney U Test: * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.001

4.3.3 Phänotyp induzierter regulatorischer T-Zellen

Es ist bekannt, dass *in vitro* generierte iTregs Teile der Treg Signaturgene nicht exprimieren (Hill *et al.*, 2007) und sich damit auch phänotypisch in der Expression Treg spezifischer Marker von *ex vivo* Tregs unterscheiden. Inwiefern sich CD28SA induzierte iTregs und *ex vivo* Tregs bzw. *in vitro* CD28SA stimulierte Tregs ähneln, wurde durch FACS-Analyse verschiedener Aktivierungs- und Treg spezifischer Marker untersucht (Informatio-

nen zu den Markern **Tabelle 4**, Seite 55). Dazu wurden CD4⁺Foxp3⁻ bzw. CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen aus Foxp3.RFP Mäusen mit dem FACS-Sorter aufgereinigt, mit anti-CD3/anti-CD28 (+ IL-2/ TGFβ) bzw. CD28SA Dynabeads stimuliert und an Tag 7 mit *ex vivo* CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit ihrer Foxp3 Expression miteinander verglichen. Zunächst fiel auf, dass durch die Stimulation mit CD28SA bzw. anti-CD3/anti-CD28 iTregs alle Marker, mit Ausnahme von CD45RB, CD69 und CTLA-4 bei anti-CD3/anti-CD28 Stimulation im Vergleich zu *ex vivo* Tregs, hochregulierten (**Abb. 41**). Im Einklang mit den Ergebnissen aus *Abschnitt 4.1* und *4.2* erwies sich CD28SA auch *in vitro* als sehr potenter Treg Aktivator im Vergleich zur konventionellen Stimulation. Zwischen CD28SA und anti-CD3/anti-CD28 induzierten iTregs konnten bis auf die etwas erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle ICOS und CTLA-4 und einer etwas niedrigeren Foxp3 Expression in CD28SA stimulierten iTregs keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (**Abb. 41**). CD28SA iTregs exprimierten im Vergleich zu *ex vivo* Tregs mehr CD25, GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein*) und LAP, weniger PD-1, CD103, CTLA-4, Helios und Foxp3 und ähnliche Mengen an ICOS, CD45RB und CD69. Der Vergleich zwischen anti-CD3/anti-CD28 iTregs und *ex vivo* Tregs fällt ähnlich aus mit dem Unterschied, dass *ex vivo* Tregs mehr ICOS exprimieren als iTregs.

Diese Unterschiede könnten jedoch Folge der *in vitro* Aktivierung der Zellen sein. Daher wurden zusätzlich auf die gleiche Weise aktivierte *ex vivo* Tregs herangezogen. Anti-CD3/anti-CD28 induzierte iTregs zeigten im Vergleich zu den aktivierten *ex vivo* Tregs ein ähnliches Expressionslevel für CD25, CD45RB, CD69 und CTLA-4, ein stärkeres Level für GITR und ein zum Teil deutlich schwächeres Level für die übrigen Marker. Aufgrund der bereits beschriebenen starken Treg Aktivierung durch CD28SA wiesen die iTregs im Vergleich zu den aktivierten Tregs bis auf GITR in allen Markern eine teils deutlich schwächere Expression auf. Jedoch ließen sich im Vergleich der jeweiligen Foxp3⁺ mit den dazugehörigen Foxp3⁻ T-Zellen ähnliche Tendenzen ablesen. So sind sowohl iTregs als auch *ex vivo* Tregs im Verhältnis zu den Foxp3⁻ Zellen CD25^{hoch}, CD45RB^{niedrig} und GITR^{hoch}. Dagegen wurde wohl aufgrund der Stimulation z.B. CD69, CTLA-4 oder LAP auch in den Foxp3⁻ Zellen hochreguliert.

Ein besonders hervorstechender Unterschied zwischen den iTregs und den *ex vivo* Tregs offenbarte sich bei der Helios Expression. Der Transkriptionsfaktor Helios wurde ursprünglich als ein spezifischer Marker für nTregs beschrieben, der von *in vitro* induzierten iTregs nicht exprimiert wird (Thornton *et al.*, 2010). In Übereinstimmung damit exprimierten *ex vivo* Tregs und aktivierte Tregs, die beide wahrscheinlich einen hohen Anteil an nTregs enthalten (Thornton *et al.*, 2010), im Gegensatz zu den iTregs große Mengen an Helios.

Eine mit T-Zellaktivierung und Proliferation verbundene Helios Expression, wie sie von Akimova *et al.* dargestellt wurde (Akimova *et al.*, 2011), konnte durch die hier verwendeten Stimulationsbedingungen nicht bestätigt werden. Der Phänotyp CD28SA induzierter iTregs liegt somit zwischen dem der nTregs und Tkons. Einige Merkmale, wie der CD45^{niedrig}, GITR^{hoch} Phänotyp und die Expression der Effektormoleküle CD25 und CTLA-4, teilen sich iTregs mit nTregs, während andere Merkmale, wie die niedrige Expression von PD-1 oder Helios, eher dem Phänotyp von Tkons entspricht. Die Art der Stimulation, ob mit anti-CD3/anti-CD28 oder CD28SA Dynabeads, spielt für den Phänotyp der iTregs im Gegensatz zum Phänotyp der aktivierten Tregs nur eine geringe Rolle. Foxp3 bestimmt neben anderen Faktoren den Phänotyp und die Funktion der Tregs (Hill *et al.*, 2007). Die auffallend niedrige Foxp3 Expression in den iTregs korreliert mit den phänotypischen Unterschieden und könnte zudem ein Hinweis auf Unterschiede in der Funktionalität sein.

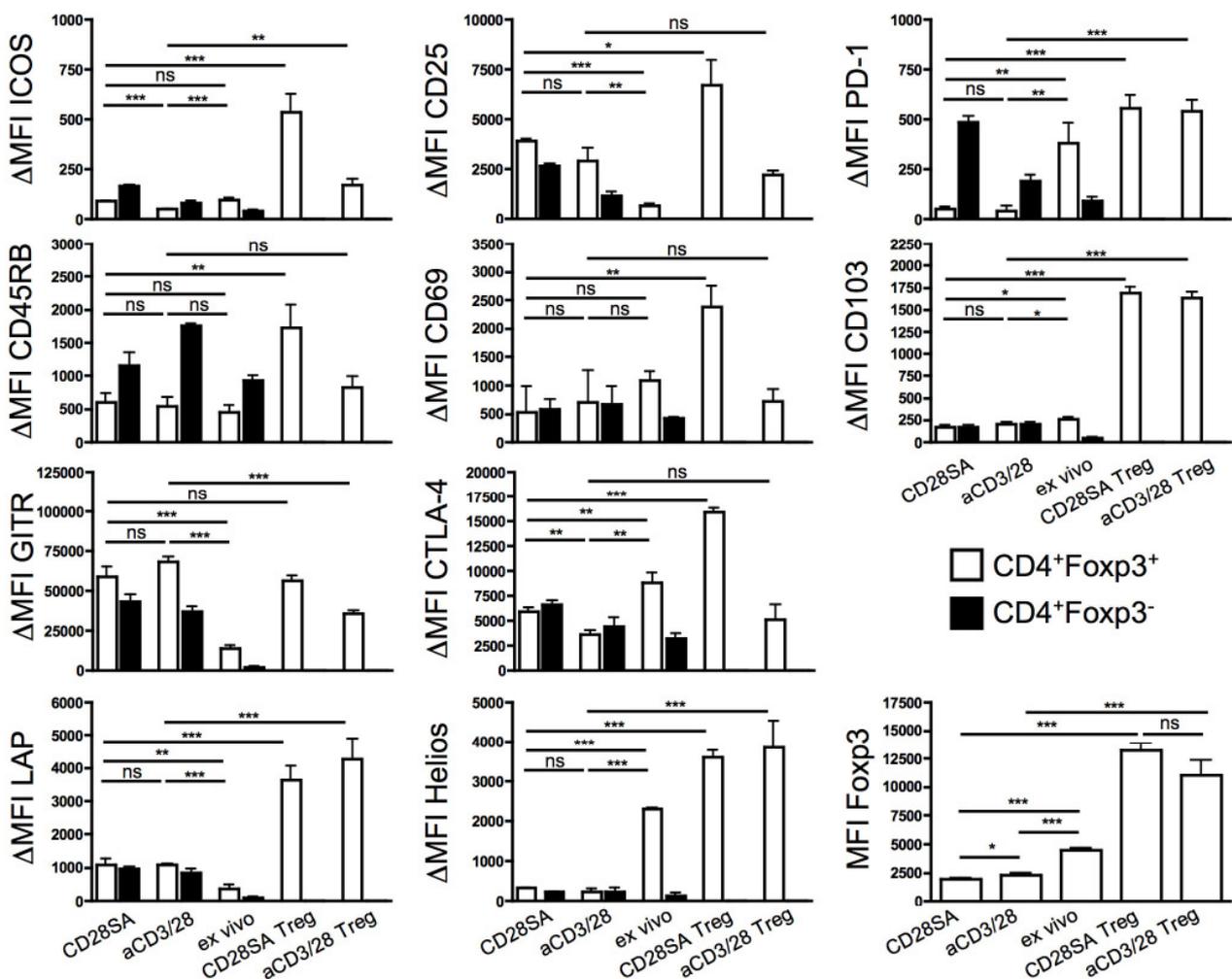


Abb. 41: Phänotyp der iTregs im Vergleich zu *ex vivo* und *in vitro* aktivierten Tregs
 Aufgereinigte CD4⁺Foxp3⁻ bzw. CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen wurden mit CD28SA Dynabeads bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml bzw. 500 U/ml für CD4⁺Foxp3⁺) und TGFβ (5 ng/ml) für 7 Tage stimuliert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) von Markern spezifisch für Gedächtniszellen bzw. Tregs wurde von unstimulierten Zellen bzw. den stimulierten CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der Foxp3 Expression analysiert. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SD von 3 Proben bzw. 3 Mäusen. Ungepaarter t-Test: * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.001, ns: kein signifikanter Unterschied, ΔMFI (durchschnittliche Fluoreszenzintensität) = (MFI(Marker)–MFI(Isotyp)).

Wie IL-2 und TGF β können auch andere Zytokine im Kulturüberstand die Induktion der Foxp3 Expression in Tkons sowohl positiv als auch negativ beeinflussen (Bettelli *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2009; Takaki *et al.*, 2008; Zhang, Q., Cui, *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2007). Daher wurden die Zytokinkonzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ und TNF im Überstand der mit anti-CD3/anti-CD28 (+ IL-2/TGF β) bzw. CD28SA Dynabeads stimulierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach zwei bis 96 Stunden mit Hilfe eines CBA ermittelt. Im Überstand konnten zu keinem Zeitpunkt größere Mengen an IL-4 oder IL-5 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Konzentration an iTreg induzierendem IL-2 war überraschenderweise insgesamt gering (**Abb. 42**). Die wahrscheinlichste Erklärung für die niedrige IL-2 Konzentration ist die Bindung an den IL-2R und der sofortige IL-2 Verbrauch bedingt durch die wesentliche Rolle von IL-2 bei der T-Zellaktivierung und iTreg Induktion. Das zugesetzte rekombinante humane IL-2 in der anti-CD3/anti-CD28 Kultur beeinflusste die Messung aufgrund der CBA Spezifität für murines IL-2 nicht. Es wäre jedoch eine Erklärung für die etwas höheren IL-2 Konzentrationen in der anti-CD3/anti-CD28 Kultur zu Beginn der Stimulation.

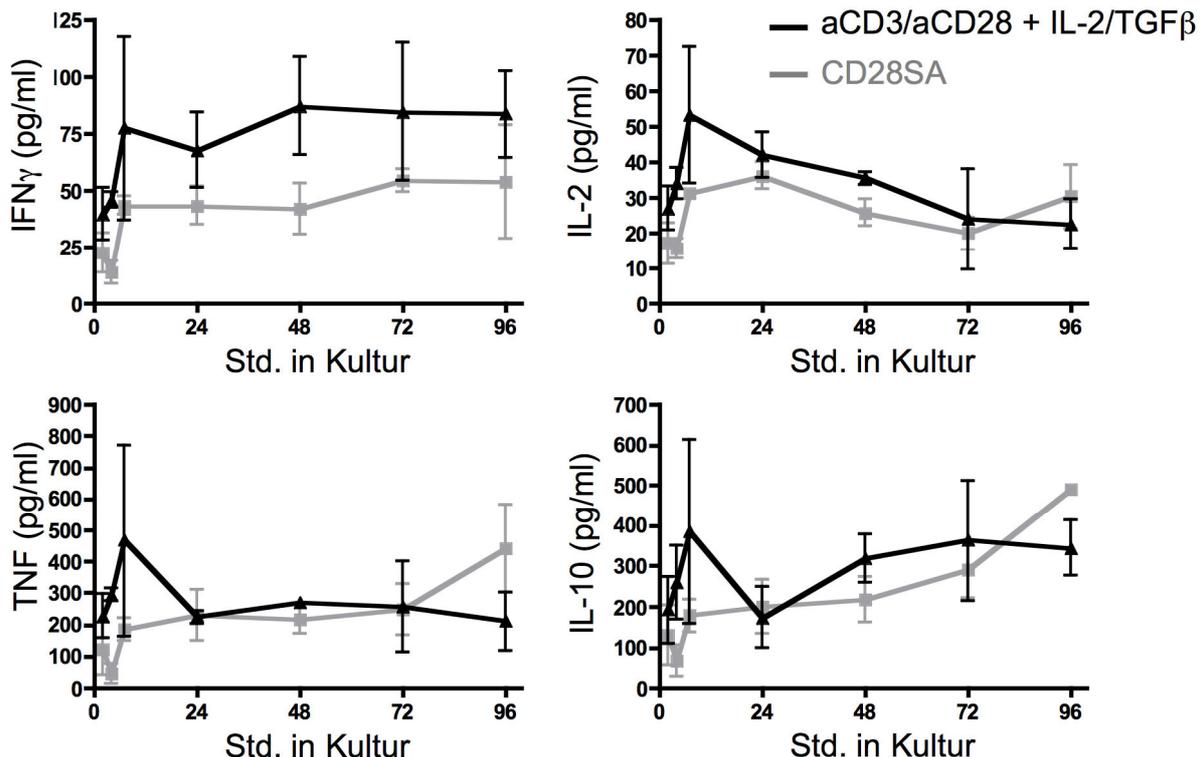


Abb. 42: Kinetik der Zytokine im Kulturüberstand nach CD28SA bzw. anti-CD3/anti-CD28 Stimulation

Aufgereinigte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mit CD28SA Dynabeads bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) und TGF β (5 ng/ml) stimuliert. Nach 2, 4, 7, 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde die Konzentration der Zytokine im Kulturüberstand mittels CBA bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von jeweils 3 Proben. (Durchgeführt unter Mithilfe von V. Schneider)

Größere, jedoch für beide Stimulationsbedingungen ähnliche Mengen wurden für TNF und IL-10 nachgewiesen. Signifikante Unterschiede in der Konzentration gab es bei den unterschiedlichen Kulturbedingungen nur bei IFN γ (**Abb. 42**). Ob die Menge an TNF und IFN γ , wie beschrieben, die iTreg Induktion verminderten, muss noch geklärt werden (Chang *et al.*, 2009; Zhang, Q. *et al.*, 2013).

Um die Quelle der nachgewiesenen Zytokine zu ermitteln, wurden die Zellen der genannten Kulturen nach 24 bis 96 Stunden für vier Stunden in Anwesenheit von PMA/Ionomycin und Monensin restimuliert und die Zytokinproduktion in Abhängigkeit der Foxp3 Expression analysiert. Die Zellen produzierten kaum bis kein IL-4, IL-10, IL-17 oder IFN γ während der beobachteten vier Tage (Daten nicht gezeigt). Dafür produzierten bis zu 60% der Foxp3⁺ und bis zu 30% der Foxp3⁻ CD4⁺ T-Zellen TNF (**Abb. 43**). Die Hypothese, dass das produzierte IL-2 direkt verbraucht oder gebunden wird und so im Kulturüberstand nicht mehr nachgewiesen werden kann, wurde durch den hohen Anteil an IL-2 Produzenten mit bis zu 85% in der Foxp3⁺ und 60% in den Foxp3⁻ CD4⁺ T-Zellen bestätigt. Ein kennzeichnendes Merkmal für nTregs ist allerdings, dass sie aufgrund der Foxp3 Expression kein IL-2 und TNF produzieren können (Williams *et al.*, 2007). Der hohe Anteil an IL-2 und TNF produzierenden iTregs, der unabhängig von den Kulturbedingungen auftrat, stellte somit neben den Unterschieden in der Markerexpression (**Abb. 41**) einen weiteren Hinweis dar, dass CD28SA induzierte iTregs nicht funktionell äquivalent mit nTregs sind.

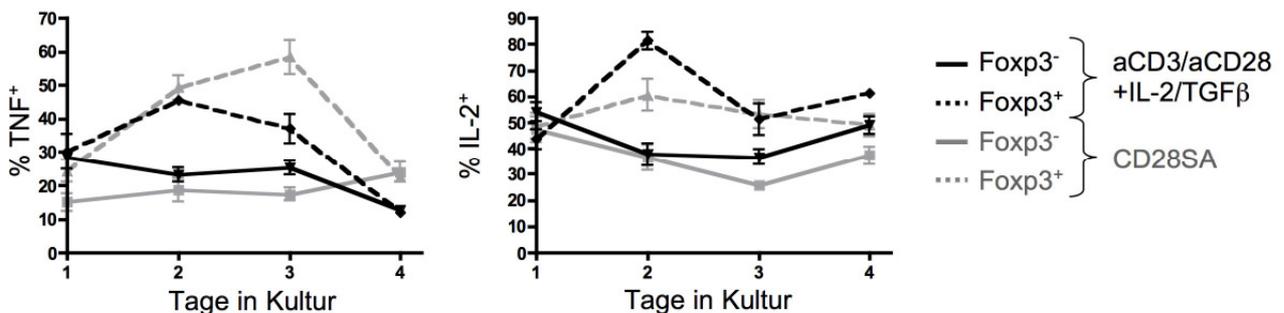


Abb. 43: Kinetik der Zytokin produzierenden Zellen nach CD28SA bzw. anti-CD3/anti-CD28 Stimulation

Aufgereinigte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden mit CD28SA Dynabeads bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) und TGF β (5 ng/ml) stimuliert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde der Anteil an Zytokin-produzierenden Zellen nach Restimulation mit PMA/Ionomycin und Monensin bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von jeweils 3 Proben. (Durchgeföhrt unter Mithilfe von V. Schneider)

4.3.4 Stabilität und Funktionalität induzierter regulatorischer T-Zellen

Von großem Interesse war die Frage nach der Funktionalität der durch CD28SA induzierten Foxp3⁺ T-Zellen. In der Literatur besteht Uneinigkeit über die supprimierende Eigenschaft *in vitro* generierter Foxp3⁺ iTregs. Während in einigen Publikationen iTregs als ähn-

lich gute Suppressoren wie nTregs beschrieben wurden (Aricha *et al.*, 2008; Chen, W. *et al.*, 2003), konnten andere kaum eine supprimierende Aktivität feststellen (Hill *et al.*, 2007; Miyao *et al.*, 2012). Die supprimierende Aktivität CD28SA induzierter iTregs wurde mit Hilfe eines *in vitro* Suppressionsassays untersucht.

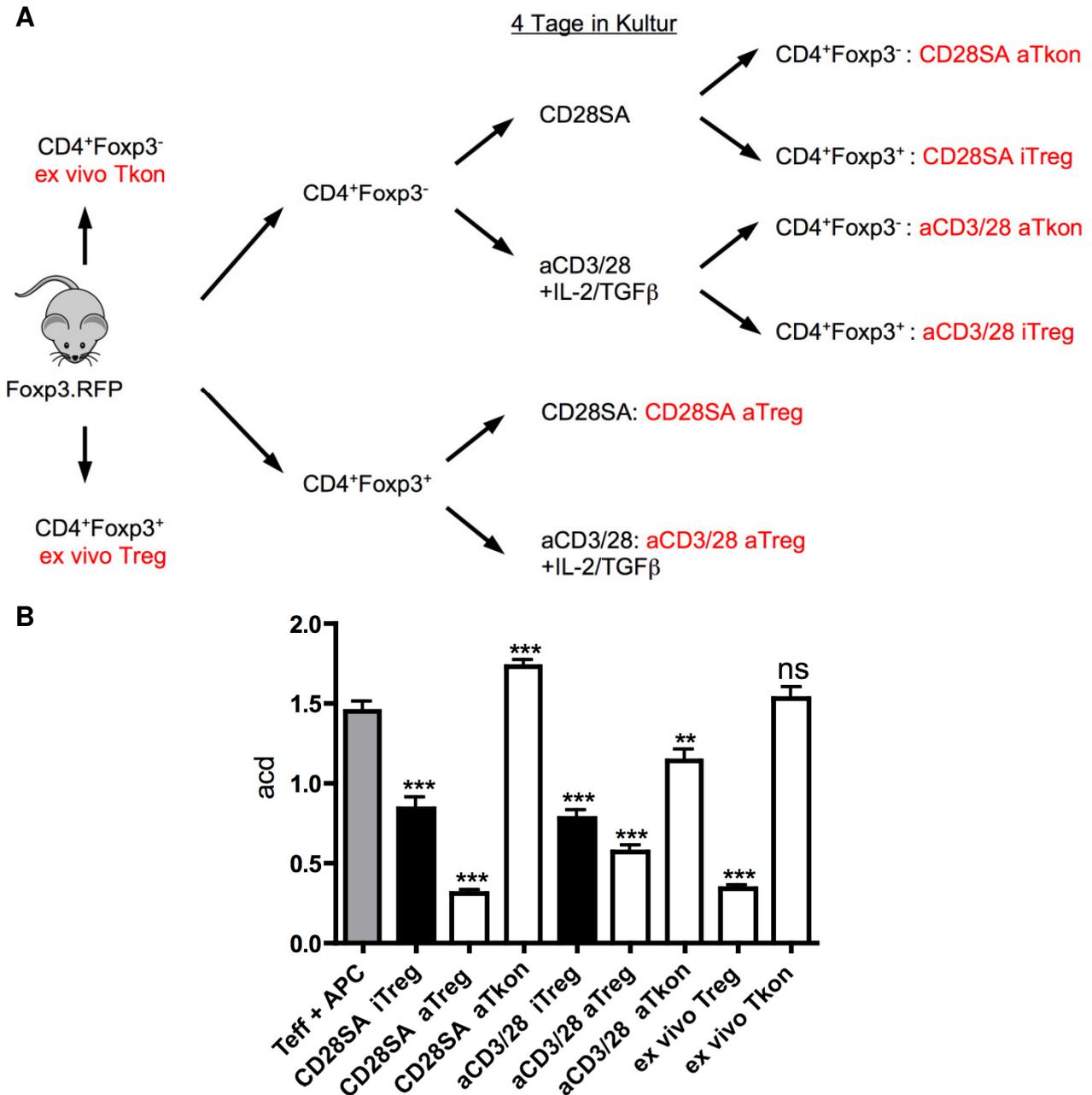


Abb. 44: Supprimierende Wirkung unterschiedlicher T-Zellpopulationen

Aufgereinigte $CD4^+Foxp3^-$ T-Zellen wurden mit CD28SA Dynabeads bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) und TGF β (5 ng/ml) stimuliert. An Tag 4 wurden die in (A) angegebenen Populationen isoliert. Diese wurden mit CFSE markierten naiven Thy1.1 $^+CD4^+CD25^-$ Effektor-T-Zellen und bestrahlten APZs in Anwesenheit von anti-CD3 für 3 Tage kultiviert. Als Kontrollen wurden $CD4^+Foxp3^+$ Treg bzw. $CD4^+Foxp3^-$ T-Zellen aus unbehandelten Mäusen verwendet. (B) zeigt die durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen (acd, Mittelwert \pm SD) der Effektorzellen von jeweils 3 Proben.

Dazu wurden aufgereinigte CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen aus Foxp3.RFP Mäusen für vier Tage mit anti-CD3/anti-CD28 (+ IL-2/TGFβ) bzw. CD28SA Dynabeads kultiviert und anschließend die Zellen anhand ihrer Foxp3 Expression erneut sortiert (**Abb. 44A**). Die gewonnenen Zellen wurden darauf mit CFSE markierten, naiven Thy1.1⁺CD4⁺CD25⁻ Effektor-T-Zellen und bestrahlten APZs in Anwesenheit von anti-CD3 für weitere drei Tage kultiviert. Zum Vergleich wurden unter den gleichen Bedingungen (plus für das Überleben essentielles IL-2) kultivierte Tregs und unstimulierte *ex vivo* Tregs (**Abb. 44A**) verwendet. Sowohl *ex vivo* Tregs als auch die durch CD28SA bzw. anti-CD3/anti-CD28 stimulierten Tregs zeigten eine starke Suppressivität, während *ex vivo* Tkons die Proliferation der Effektorzellen nicht inhibieren konnten (**Abb. 44B**). Die CD28SA bzw. anti-CD3/anti-CD28 induzierten Foxp3⁺ T-Zellen wirkten ebenfalls supprimierend, allerdings etwa 2-3-fach schwächer als *ex vivo* bzw. aktivierte Tregs (**Abb. 44B** und Daten nicht gezeigt). Einen signifikanten Unterschied in der Effizienz der Suppression beider iTregs konnte nicht festgestellt werden. Die Verlängerung der Stimulationsphase auf sieben Tage brachte anstatt der angestrebten Verbesserung der Funktionalität eher eine Verschlechterung (Daten nicht gezeigt).

Neben der Funktionalität spielt für therapeutische Zwecke auch die Stabilität der iTregs eine entscheidende Rolle. Bisherige Daten zeigten, dass nTregs im Gegensatz zu *in vitro* generierten iTregs eine sehr stabile Foxp3 Expression aufweisen (Miyao *et al.*, 2012). Die stabile Foxp3 Expression der nTregs wird zumindest zum Teil durch die DNA Demethylierung, einer konservierten, nicht-kodierenden Region (TSDR) im *Foxp3* Gen, erklärt (Floess *et al.*, 2007). DNA Methylierung ist, neben Histonmodifikationen, ein epigenetischer Mechanismus, der erlaubt, dass ein spezifisches Muster der Genexpression an Nachkommen differenzierter Zellen vererbt werden kann, ohne die DNA Sequenz selbst zu verändern. In Säugerzellen bewirkt die DNA Methylierung meist ein Gene-Silencing (Übersicht in Ansel *et al.*, 2003).

Um einen Hinweis auf die Stabilität der Foxp3 Expression in den CD28SA induzierten iTregs zu erhalten, wurden sortierte CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen aus Foxp3.RFP Mäusen für sieben Tage mit anti-CD3/anti-CD28 (+ IL-2/TGFβ) bzw. CD28SA Dynabeads stimuliert und anschließend die DNA der isolierten Foxp3 exprimierenden iTregs aufgereinigt. Zum Vergleich wurde die DNA aus sortierten CD4⁺Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺Foxp3⁻ Tkons aufgereinigt. Demethylierte CpGs wurden mittels EZ DNA Methylation Kit detektiert. Dabei werden durch einen chemischen Prozess demethylierte Cytosine in Thymidin umgewandelt, während methylierte Cytosine unverändert bleiben. Durch die anschließende Sequenzierung der TSDR konnten im von Floess *et al.*, 2007 beschriebenen Amp2 Bereich zwölf CpG-Stellen, die in nTregs im Gegensatz zu Tkons demethyliert sind, untersucht werden. Wie

erwartet waren alle zwölf Positionen in den Tkons methyliert und in den *ex vivo* Tregs unmethyliert (**Abb. 45**). Anti-CD3/anti-CD28 bzw. CD28SA induzierte iTregs zeigten jedoch einen intermediären Phänotyp mit teilweise demethylierten CpGs (**Abb. 45**). Dies bedingt möglicherweise eine geringere Stabilität der Foxp3 Expression in iTregs im Vergleich zu nTregs. Da jedoch gezeigt wurde, dass der Abschluss des Demethylierungsprozesses sowohl in nTregs als auch in *in vivo* generierten iTregs einige Zeit benötigt (Curotto de Lafaille *et al.*, 2009), könnte eine Veränderung der Kulturbedingungen bzw. eine Verlängerung der Kulturzeit in Anwesenheit von IL-2 ohne weitere Stimulation, den Grad der Demethylierung im TSDR erhöhen. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass auch *in vivo* generierte iTregs mit einem vollständig demethylierten TSDR gefunden wurden (Polansky *et al.*, 2008). Dies bedeutet jedoch auch, dass der Methylierungsstatus nicht immer ein geeignetes Unterscheidungskriterium zwischen nTregs und iTregs darstellt.

Anteil an demethylierten CpGs im Amp2 Bereich der TSDR

Position Amp2	38	74	90	124	151	156	205	224	228	236	298	368
Treg (n=5)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
iTreg 3/28 (n=6)	16,7	16,7	0	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	33,3	33,3	16,7	66,7
iTreg CD28SA (n=4)	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	75	50
Tkon (n=5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

100-80%
 79-60%
 59-40%
 39-20%
 19- 0%

Abb. 45: Methylierungsstatus der Treg spezifischen Demethylierungsstellen im Foxp3 Gen

Die DNA unstimulierter CD4⁺Foxp3⁺ Tregs und CD4⁺Foxp3⁻ Tkons bzw. von für 7 Tage mit CD28SA Dynabeads bzw. mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) und TGFβ (5 ng/ml) stimulierten CD4⁺Foxp3⁺ iTregs wurde mit Hilfe von C-T Konversion auf methylierte Cytosine hin untersucht. (Durchgeführt unter Mithilfe von S. Klein-Heßling)

4.3.5 Zusammenfassung

Für die Entwicklung von nTregs im Thymus werden TZR Signale mit hoher Affinität bei gleichzeitiger Kostimulation über CD28 benötigt. Dagegen fördern schwache TZR Signale in Anwesenheit von TGFβ in der Peripherie die Differenzierung von iTregs aus Tkons. Die durchgeführten *in vitro* Versuche zeigten, dass die maximale Anzahl an Foxp3⁺ T-Zellen durch eine niedrige Konzentration an immobilisiertem anti-CD3 mAK (= schwaches TZR Signal) in Kombination mit einer hohen Konzentration an immobilisiertem anti-CD28 mAK (= starkes CD28 Signal) in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen induziert werden kann. Ähnlich dazu vermittelt CD28SA ein starkes CD28 Signal, das das schwache, tonische TZR Signal, das durch das „Scannen“ von MHC-Molekülen vermittelt wird, amplifiziert. Obgleich CD28SA Stimulation *in vivo* eine Foxp3 Expression in Tkons kaum induzieren kann, war die *in vitro* Konversion sehr effektiv. Im Vergleich zur Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads,

bei der nur durch Zusatz von IL-2 und TGF β größere Mengen an T-Zellen Foxp3 exprimierten, konnte die CD28SA Stimulation auch ohne den Zusatz von Zytokinen viele Foxp3⁺ T-Zellen induzieren. Der Effekt der Blockade des IL-2 bzw. TGF β Signals zeigte, dass die CD28SA vermittelte Konversion nicht unabhängig von diesen Zytokinen ist, sondern vielmehr eine ausreichende Menge an Zytokinen von den Zellen selbst produziert wird. Die CD28SA bzw. anti-CD3/anti-CD28 induzierten Foxp3⁺ T-Zellen ließen sich teils eher mit *ex vivo* Tregs (CD25^{hoch}, GITR^{hoch} und CD45RB^{niedrig}), teils eher mit Tkons (PD-1^{niedrig}, CD103^{niedrig} oder Helios^{niedrig}, Produktion von IL-2 und TNF) vergleichen. Dieser intermediäre Phänotyp spiegelte sich auch im Methylierungsstatus der TSDR wieder, der zwischen dem der nTregs (vollständige Demethylierung) und der Tkons (vollständige Methylierung) lag und auf eine geringe Stabilität der Foxp3 Expression hinweist. Zusammen mit der eher geringen *in vitro* Suppressivität ist trotz der effektiven CD28SA vermittelten Induktion und Expansion der iTregs *in vitro* eine Verwendung dieser Zellen für therapeutische Zwecke fraglich.

5 Diskussion

5.1 Kombination aus CD28SA und Corticosteroiden als anti-inflammatorische Therapiemöglichkeit?

Trotz der zahlreichen vielversprechenden vorklinischen Daten, die eine CD28SA Behandlung mit positiven präventiven sowie therapeutischen Effekten bei Modellen für Autoimmun- und inflammatorischen Erkrankungen in Verbindung brachten, konnte sich die Hoffnung, Autoimmunerkrankungen des Menschen wie rheumatischer Arthritis, Multipler Sklerose und chronischer lymphatischer Leukämie vom B-Zelltyp (Duff, 2006) mit CD28SA zu behandeln, aufgrund der induzierten systemischen Zytokinausschüttung nicht erfüllen. Das aufgetretene „Cytokine-Release Syndrom“ beim Menschen wurde durch Experimente mit Nagern nicht angezeigt. Aus diesem Grund sollte hier der Mechanismus der CD28SA Stimulation, die besondere Rolle der aktivierten Tregs dabei, sowie die Möglichkeit einer schützenden Corticosteroid Behandlung untersucht werden.

Die *in vivo* Stimulation mit CD28SA induziert in Ratten wie auch in Mäusen eine Expansion von CD4⁺ T-Zellen und insbesondere von CD4⁺CD25⁺ bzw. CD4⁺Foxp3⁺ Tregs (**Abb. 7** und Lin, C. H. *et al.*, 2003). Sowohl naive T-Zellen als auch Tregs sind abhängig von CD28 Signalen. Naive T-Zellen benötigen diese Signale für die optimale Aktivierung, die Zytokinproduktion, die Proliferation und das Überleben (Übersicht in Bour-Jordan *et al.*, 2011). Tregs dagegen sind bereits bei ihrer Entstehung im Thymus abhängig von CD28 Signalen wie auch später in der Peripherie. Zwei kürzlich veröffentlichte Studien zeigen, dass CD28 Signale in der Peripherie zellintrinsisch die Proliferation, das Überleben und die *in vivo* Funktion der Tregs beeinflussen (Gogishvili *et al.*, 2013; Zhang, R., Huynh, *et al.*, 2013). Zudem sind Tregs durch die Abhängigkeit von IL-2, das von aktivierten Tkons produziert wird, auch zellextrinsisch von CD28 Signalen abhängig (Tang *et al.*, 2003). Dies spiegelt sich auch im Mechanismus der CD28SA induzierten Stimulation wider, wie mit Hilfe von adoptiven Zelltransfers und CD28-defizienten bzw. IL-2-defizienten Mäusen gezeigt wurde (**Abb. 11**). Fehlt den transferierten Tkons und Tregs das CD28 Signal (zellintrinsisch), können sich die Zellen trotz des von den Empfängerzellen produzierten IL-2 nicht teilen (**Abb. 11A**). Bei CD28- bzw. IL-2-defizienten Empfängertieren induziert die CD28SA Stimulation keine ausreichende IL-2 Produktion (zellextrinsisch), wodurch die transferierten Zellen ebenfalls kaum proliferieren können (**Abb. 11**).

Der starke Anstieg in der Anzahl und Frequenz der Tregs ergibt sich aus einer präferenziellen Proliferation von Tregs gegenüber Tkons (**Abb. 9**). Eine Rekrutierung von Foxp3

exprimierenden Zellen aus den Tkons konnte durch den Transfer CD25⁻ bzw. Foxp3⁻ CD4⁺ T-Zellen nahezu ausgeschlossen werden (**Abb. 10** und Beyersdorf, Gaupp, *et al.*, 2005; Gogishvili *et al.*, 2009). Die bevorzugte Expansion der Tregs wird insbesondere bei niedrigen CD28SA Konzentrationen deutlich, da Tregs bei dieser Konzentration bereits proliferieren, während die Anzahl an Tkons noch nicht beeinflusst wird (Beyersdorf, Gaupp, *et al.*, 2005). Tregs erhalten vermutlich aufgrund ihrer Selbstreaktivität durch die Interaktion mit Selbstpeptid-beladenen MHC-Molekülen aktivierende TZR Signale, die essentiell für die supprimierende Funktion der Tregs sind (Delpoux *et al.*, 2012). Die so entstandenen Signale induzieren eine Hyper-Phosphorylierung in den nachfolgenden Signalmolekülen (SLP-76-Vav-Itk Signalosom) und können durch CD28SA amplifiziert werden. Im Gegensatz dazu erhalten die fremd-reaktiven Tkons nur schwache „tonische“ Signale. Die folgende Treg Proliferation übersteigt darauf die der Tkons deutlich (Dennehy *et al.*, 2007). Eine Notwendigkeit dieser durch das Scannen von MHC-Molekülen entstehenden Signale für die Aktivierung durch CD28SA wurde auch durch die Blockade bzw. die Defizienz von MHC II-Molekülen bestätigt, die zu einer deutlichen Verminderung der präferenziellen Expansion muriner Tregs führt (unveröffentlichte Daten: B. Becklund, T. Gulde, D. Langenhorst und T. Hünig). Abschließend konnte die Hypothese auch durch *in vitro* Experimente mit humanen PBMCs unterstützt werden (Romer *et al.*, 2011).

Tregs nehmen durch CD28SA Stimulation nicht nur quantitativ zu, sondern werden auch funktionell aktiviert. Zudem erlangen die aktivierten Tregs einen entzündungssuchenden Phänotyp (CCR7⁻ CCR5⁺ CCR6⁺), der sie vermehrt in Gewebe mit stattfindender Immunantwort einwandern lässt (**Abb. 22**, und **Abb. 23**). Die funktionelle Aktivierung zeigt sich zum einen in der höheren *in vitro* Suppressivität CD28SA aktivierter Tregs im Vergleich zu unstimulierten Tregs (Gogishvili *et al.*, 2009 und **Abb. 21**), zum anderen inhibiert bzw. vermindert die *in vivo* CD28SA Stimulation bzw. der Transfer von zuvor CD28SA stimulierten T-Zellen den Krankheitsverlauf bei verschiedenen murinen Krankheitsmodellen (**Tabelle 1**). Der Hauptgrund für die *in vivo* Effekte scheinen die expandierten und aktivierten Tregs zu sein, da eine Depletion der CD25⁺ bzw. Foxp3⁺ Zellen diese positive Wirkung deutlich abschwächt (Beyersdorf *et al.*, 2009; Gogishvili *et al.*, 2009).

Zusammengefasst bestätigen die Daten das 2007 veröffentlichte Aktivierungsmodell der CD28SA Stimulation (Übersicht in Hünig, 2007). Ähnlich wie bei der „normalen“ Immunantwort werden Tkons durch CD28SA aktiviert und zur IL-2 Produktion angeregt. Im Gegensatz zur „normalen“ Immunantwort werden die Tregs aber bei der CD28SA Stimulation nicht zeitlich versetzt, sondern zeitgleich mit den Tkons aktiviert. Das von Tkons produzierte IL-2 führt daher sofort zur Proliferation und funktionellen Aktivierung der Tregs. Bedingt

durch die Suppression der Tkon und der dadurch abnehmenden Menge an IL-2 erfolgt nach drei bis vier Tagen die Kontraktion beider Zellpopulationen. In Abwesenheit von Tregs kann die Tkon Aktivierung nicht reguliert werden und es kommt in Mäusen ähnlich wie beim Menschen zu einer deutlichen Zunahme in der IL-2 Konzentration im Plasma und folglich auch zu einer gesteigerten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine (**Abb. 12**).

Seit der ersten Verwendung des mAK OKT3 zu therapeutischen Zwecken in den 1990er Jahren wurden über 30 mAKs zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Tumoren oder anderen Krankheiten eingesetzt (Übersicht in Buss *et al.*, 2012). Wie einleitend beschrieben, schien auch der humanisierte CD28SA Antikörper TGN1412 ein weiterer vielversprechender Kandidat zu sein, der jedoch bei seiner Erprobung im Menschen ein „Cytokine-Release Syndrom“ auslöste. Die dabei im Serum der Testpersonen in hohen Konzentrationen nachgewiesenen pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ werden von T-Zellen insbesondere nach Kostimulation mit CD28 ausgeschüttet (Thompson *et al.*, 1989). Die Zytokinsekretion konnte schließlich durch die Gabe von Corticosteroiden eingedämmt werden (Suntharalingam *et al.*, 2006). Die Frage stellte sich daraufhin der Fachwelt, warum die Experimente mit Nagern, Primaten oder menschlichen PBMCs die pathologischen Nebeneffekte der CD28SA Behandlung nicht vorhersagten. Durch intensive Forschung sind inzwischen verschiedene Mechanismen bekannt, die dazu beigetragen haben.

Wie hier gezeigt, induzierte im murinen System CD28SA im Gegensatz zum Menschen nur eine geringe Konzentrationserhöhung der pro-inflammatorischen Zytokine im Blut (Maximalwert: ca. 170 pg/ml IL-6, **Tabelle 3**). Ein Grund für diesen Unterschied zum Menschen ist die effektive Kontrolle der CD28SA vermittelten Tkon Aktivierung durch Tregs, wie durch die Treg Depletion vor der CD28SA Injektion durch den dramatischen Anstieg in der Serumkonzentration von IL-2, IL-6 und TNF deutlich wurde (**Abb. 12**). Zudem zeigte der 4- bis 5-fach stärkere Anstieg der IL-2 Konzentration in Treg-depletierten Tieren, wie schnell und effektiv Tregs IL-2 konsumieren und damit die Tkon Aktivierung kontrollieren können (**Abb. 12** und Hünig, 2007). Dies stimmt auch mit Daten aus dem Rattenmodell überein, bei dem eine transiente Erhöhung von Zytokin mRNA nach der CD28SA Injektion beobachtet wurde, jedoch keine systemische Zytokinausschüttung (Muller *et al.*, 2008). Der Hauptgrund für die Unterschiede liegt jedoch nicht in der höheren Effektivität der murinen Tregs gegenüber humanen, sondern in der unterschiedlichen Zusammensetzung der T-Zellpopulation bei Mensch und Labortier. Es ist inzwischen bekannt, dass hauptsächlich Effektorgedächtnis-T-Zellen, die gehäuft in Geweben vorkommen und sehr schnell auf

eine erneute Stimulation reagieren, die pro-inflammatorischen Zytokine im Menschen nach der TGN1412 Gabe ausschütteten (Eastwood *et al.*, 2010; Romer *et al.*, 2011). Labortiere, die unter besonders hygienischen Bedingungen gehalten werden, besitzen aufgrund der geringen Anzahl an Infektionen nur wenige dieser Zellen. Zusätzlich wird der Unterschied in der Zusammensetzung der T-Zellen durch die längere Lebensspanne der Menschen, während der sich aufgrund zahlreicher Infektionen eine Fülle von Effektorgedächtniszellen ansammeln, verstärkt (Hünig, 2012). Durch die Stimulation mit CD28SA ergibt sich daher bei Mäusen eine geringere Zytokinausschüttung (**Tabelle 3**), die wiederum durch Tregs leichter unter Kontrolle gebracht werden kann.

Ebenfalls durch Spezies-spezifische Eigenschaften der Effektorgedächtniszellen lässt sich die fehlende pathologische Ausschüttung von Zytokinen in Langschwanzmakaken erklären. Wie erst vier Jahre nach der TGN1412 Katastrophe bekannt wurde, exprimieren die CD4⁺ Effektorgedächtnis-T-Zellen in diesen Primaten kein CD28 und können so durch TGN1412 nicht stimuliert werden (Eastwood *et al.*, 2010). Auch kürzlich beschriebene Unterschiede in der IgG4 und FcR Interaktion bei Menschen und Langschwanzmakaken geben Anlass zur Vorsicht bei der Verwendung dieser Primaten zur vorklinischen Erprobung monoklonaler Antikörper (Warncke *et al.*, 2012). Schließlich konnten auch *in vitro* Versuche mit humanen PBMCs den Zytokinsturm nicht vorhersagen. TGN1412 führt bei löslicher Zugabe *in vitro* zu keiner Zytokinproduktion oder Proliferation der Zellen, im Gegensatz zu dem monoklonalen anti-CD3 Antikörper OKT3. Durch den fehlenden Zellkontakt in der Zirkulation können die Zellen MHC-Moleküle nicht mehr scannen und verlieren folglich das „tonische“ TZR Signal (Stefanova *et al.*, 2002). Durch die Kultur der PBMCs bei hoher Zelldichte kann das Signal wiederhergestellt werden und von CD28SA zur Amplifikation und damit zur einer OKT3 ähnlichen Aktivierung der Zellen genutzt werden (Romer *et al.*, 2011).

Trotz des Fehlschlages der Sicherheitsprüfung des CD28SA TGN1412 bestünde die Möglichkeit, ähnlich wie bei OKT3 und anderen therapeutischen monoklonalen Antikörpern, die systemische Zytokinausschüttung durch die Gabe von Corticosteroiden zu verhindern (Chatenoud *et al.*, 1991). OKT3 (Muronomab) wurde als Immunsuppressivum gegen Organabstoßungsprozesse bei Transplantationen eingesetzt und induziert neben der T-Zellaktivierung gefolgt von einer systemischen Zytokinausschüttung die Depletion der CD3⁺ Zellen (Stankova *et al.*, 1989). Inzwischen wurde das Medikament, trotz der erfolgreichen Suppression des „Cytokine-Release Syndroms“ durch eine zusätzliche Corticosteroid-Behandlung, aufgrund von Nebenwirkungen und besseren Alternativen vom Markt genommen (Reichert, 2012). Da Mäuse auf CD28SA Stimulation nicht mit einer systemi-

schen Zytokinausschüttung reagieren (**Tabelle 3**), wurde in meinen Experimenten ein artifizierlicher Zytokinsturm mit Hilfe eines bakteriellen Superantigens (Übersicht in Miethke *et al.*, 1993) ausgelöst, um so die Kompatibilität der Corticosteroid-vermittelten Unterdrückung des „Cytokine-Release Syndroms“ mit der Treg Aktivierung durch CD28SA testen zu können. Die Ergebnisse zeigten, dass die Superantigen vermittelte Zytokinausschüttung unabhängig von einer CD28SA Behandlung effektiv durch Dexamethason eingedämmt werden kann (**Abb. 13**). Dex induziert in Tkons Apoptose, während Tregs resistent gegen den Dex-vermittelten Zelltod sind und zusätzlich durch IL-2 geschützt werden können (Chen, X. *et al.*, 2004). Die insgesamt niedrigere Zellzahl in den Lymphknoten bei gleichzeitig leicht erhöhter Foxp3 Frequenz (**Abb. 14**) bestätigt diese Daten. Die Kombination aus Dex und CD28SA senkte die Gesamtzellzahl im Vergleich zu einer reinen CD28SA Behandlung etwas. Da Tregs jedoch resistenter gegen Dex induzierte Apoptose sind und das produzierte IL-2 vermutlich dies zusätzlich verstärkt, verdoppelte sich ihre Frequenz gegenüber einer reinen CD28SA Behandlung nahezu. Neben der damit gleichbleibenden Anzahl an Tregs blieb auch die präferenzielle Expansion der Tregs gegenüber Tkons unter Dex Behandlung bestehen (**Abb. 14D**). Interessanterweise senkte die Glucocorticoid Behandlung die Superantigen induzierte IL-2 Produktion im Verhältnis zu den anderen Zytokinen (IL-6: 10-fache, TNF: 20-fache, IFN γ : 30-fache) nur um das 4-fache. Die verbleibende Menge an IL-2 reichte wohl deshalb den Tregs für die CD28SA vermittelte Stimulation aus und induzierte eine ähnlich starke, wenn nicht sogar stärkere *in vitro* immunsupprimierende Aktivität in Dex und CD28SA behandelten Tregs im Vergleich zu nur CD28SA stimulierten Tregs (Gogishvili *et al.*, 2009). Die unvollständige Unterdrückung der IL-2 Produktion durch Corticosteroide ist im Einklang mit deren anti-phlogistischen Wirkung, die nicht zu einer Reduktion der IL-2 abhängigen Tregs führt. Die Abhängigkeit der Tregs von parakrinem IL-2 scheint somit kein Hindernis für die Verwendung von Corticosteroiden zur Verminderung der CD28SA vermittelten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu sein.

Generell sollte die herausragende immunsupprimierende Funktion muriner Tregs, die in Zusammenhang mit der geringen Anzahl an Effektorgedächtnis-T-Zellen steht, zur Vorsicht bei der Verwendung von Nagern in vorklinischen Studien von Immunmodulatoren mahnen. Sicherheitshalber sollten zusätzlich Experimente mit Treg-depletierten Mäusen durchgeführt werden, um mögliche Effekte der wenigen Gedächtniszellen sichtbar zu machen.

5.2 IL-10 produzierende regulatorische T-Zellen als terminaldifferenzierte Zellen

Die polyklonale *in vivo* Aktivierung von Tregs mit CD28SA induziert neben der bereits beschriebenen Expansion der Tregs auch die Produktion von IL-10 und die Expression von Effektormolekülen und bestimmten Migrationsmarkern.

Vorangegangene Studien zeigten, dass *in vitro* nach TZR und IL-2 Stimulation ein Teil der Tregs nach mehreren Zellteilungen anfängt, IL-10 zu produzieren (Barthlott *et al.*, 2005; de la Rosa *et al.*, 2004). Eine ähnliche Konversion, aber mit deutlich höherer Effizienz, zeigte sich auch nach der polyklonalen *in vivo* Aktivierung der Tregs mit CD28SA. Der ursprünglich geringe Anteil an IL-10 produzierenden Tregs (2-3%) steigerte sich drei Tage nach CD28SA Stimulation auf 20-40% (**Abb. 15**), wobei die meisten IL-10 Produzenten in den Zellen zu finden waren, die sich bereits fünf bis sieben Mal geteilt hatten (**Abb. 18**). Zudem konnte in aufgereinigten IL-10 negativen Tregs eine *in vivo* Restimulation mit CD28SA neue IL-10 Produzenten induzieren (**Abb. 27**). Wie auch schon im vorangegangenen *Abchnitt 5.1* beschrieben, stammen auch die IL-10 produzierenden Tregs hauptsächlich von bereits vorhandenen Tregs ab und nicht von in Foxp3⁺ T-Zellen konvertierten Tkons (**Abb. 17**). Der Mechanismus, der die IL-10 Sekretion in den beschriebenen *in vitro* und *in vivo* Experimenten induzierte, scheint vergleichbar zu sein, da auch bei Stimulation mit CD28SA die TZR Signale amplifiziert werden (Dennehy *et al.*, 2007) und durch die gleichzeitige Stimulation der Tkons IL-2 zu Verfügung steht (**Abb. 11**). Für die Aufrechterhaltung der IL-10 Produktion scheint zumindest *in vitro* eine weitere Stimulation des TZR wesentlich zu sein, da weder IL-2 noch CD28SA den Anteil an IL-10 Produzenten aufrecht erhalten konnte (**Abb. 25**). Auch im ruhenden Immunsystem konnte die Konversion von einem IL-10 inkompetenten zu einem IL-10 kompetenten Treg Phänotyp mit Hilfe von doppeltransgenen Reporter-mäusen für die IL-10 und Foxp3 Expression bestätigt werden (Maynard *et al.*, 2007). Da Tregs auch unter homöostatischen Bedingungen proliferieren (Fisson *et al.*, 2003), ergibt sich kein Konflikt aus der Beobachtung, dass die IL-10 Produktion nach CD28SA Stimulation mit einer starken Proliferation in Verbindung steht.

Die im ruhenden Immunsystem identifizierten IL-10 kompetenten Tregs (Maynard *et al.*, 2007) haben ähnlich wie IL-10 produzierende Tregs in CD28SA stimulierten Mäusen (**Abb. 19**) einen Phänotyp, der vergleichbar mit dem von aktivierten oder Gedächtnis-T-Zellen ist. Sie exprimieren hohe Mengen an CD44, GITR und ICOS und geringe Mengen an CD45RB auf ihrer Oberfläche (**Abb. 19**). Im Einklang damit wurden auch in CD44⁺ und in ICOS⁺ Tregs im Vergleich zu den jeweiligen Marker-negativen Tregs eine vermehrte IL-10 Produktion nachgewiesen (Liu *et al.*, 2009 Ito *et al.*, 2008). Da eine Blockade von ICOS zu einer verminderten IL-10 Sekretion in den Tregs führt, könnte ICOS, das CD28 in

der Funktion und Struktur ähnelt (Hutloff *et al.*, 1999), auch funktionell für die IL-10 Produktion von Bedeutung sein (Kornete *et al.*, 2012). Neben diesen und verschiedenen anderen Treg Markern exprimieren IL-10 produzierende Tregs im Vergleich zu den Nicht-Produzenten auch vermehrt Foxp3 (1,3-fach) (**Abb. 19**). Dies konnte ebenfalls in den aus aufgereinigten IL-10 negativen Tregs durch Restimulation mit anti-CD3/anti-CD28/IL-2 *in vitro* (**Abb. 26C, D**) bzw. mit CD28SA *in vivo* (**Abb. 27**) neu entstandenen IL-10 Produzenten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Erhöhte Foxp3 Level wurden zum einen mit dem Phänotyp aktivierter Tregs verbunden (Huehn *et al.*, 2004), zum anderen zeigten Tregs mit vermehrter Foxp3 Expression eine verstärkte Suppressivität gekoppelt mit einer vermehrten IL-10 und TGF β Expression (Chauhan *et al.*, 2009). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass IL-10 produzierende Tregs nach mehrfacher Zellteilung aus IL-10 negativen Tregs hervorgehen und besonders stark aktivierte Zellen sind, auch wenn sie keine vermehrte Helios Expression im Vergleich zu IL-10 negativen Tregs aufweisen (Akimova *et al.*, 2011).

Interessanterweise exprimieren insbesondere die IL-10 produzierenden Tregs nach CD28SA Stimulation große Mengen an Effektormolekülen, wie CD39, LAP, CTLA-4 oder CD25 (**Abb. 19**). Der auffälligste Unterschied konnte in der CTLA-4 Expression beobachtet werden. In IL-10 produzierenden Tregs wird etwa 2,5-mal mehr CTLA-4 exprimiert als in IL-10 negativen Tregs und etwa 20-mal mehr als in unstimulierten Tregs. Grund dafür könnte die starke CD28 Stimulation sein, da die CTLA-4 Expression unter anderem durch CD28 Signale reguliert wird (Alegre *et al.*, 1996). Erst kürzlich wurde ein weiterer wesentlicher Mechanismus des CTLA-4 Rezeptors, durch den Tregs regulierend wirken können, entdeckt. Demzufolge konkurriert CTLA-4 nicht nur mit CD28 um die gleichen Liganden CD80 und CD86, sondern kann diese Liganden zusätzlich durch Trans-Endozytose von der Membran der APZs entfernen (Qureshi *et al.*, 2011).

In vivo CD28SA aktivierte Tregs besitzen eine deutlich stärkere supprimierende Aktivität als unstimulierte Tregs sowohl *in vitro* (**Abb. 21** und Gogishvili *et al.*, 2009) als auch *in vivo* (Beyersdorf, Gaupp, *et al.*, 2005; Chen, J., Xie, *et al.*, 2011; Gogishvili *et al.*, 2009). Hervorzuheben ist die starke, wenn auch IL-10 unabhängige, supprimierende Wirkung CD28SA aktivierter, IL-10 produzierender Tregs *in vitro*, die mit der erhöhten Expression von Effektormolekülen korreliert und die inhibierende Aktivität der nicht-produzierenden Tregs leicht, aber signifikant übersteigt. Eine Studie, die ebenfalls die supprimierende Funktion der Tregs in Abhängigkeit der IL-10 Kompetenz untersuchte (Maynard *et al.*, 2007), konnte diesen Unterschied, wahrscheinlich aufgrund der starken Suppressivität

beider Gruppen und der damit verbundenen Messung im Sättigungsbereich ähnlich wie in **Abb. 21D** (1:1 und 1:3, Treg:Teff), allerdings nicht darstellen.

Wie bei Yamaguchi *et al.*, 2011 zusammengefasst, verwenden Tregs unter nicht-inflammatorischen und inflammatorischen Bedingungen möglicherweise unterschiedliche Mechanismen, um Immunantworten zu kontrollieren und die Homöostase zu erhalten. Insbesondere die unterschiedlichen Beiträge von CTLA-4 und IL-10 sprechen für diese Hypothese. Während Mäuse mit einer Treg-spezifischen CTLA-4 Defizienz an einer systemischen Proliferation von Lymphozyten und einer tödlich verlaufenden Autoimmunerkrankung leiden (Wing *et al.*, 2008), entwickeln Mäuse mit einer Treg-spezifischen IL-10 Defizienz nur an Oberflächen, die mit der Umwelt in Kontakt stehen, Entzündungen, aber keine systemische Autoimmunität (Rubtsov *et al.*, 2008). Auch sind IL-10 produzierende Tregs im ruhenden Immunsystem hauptsächlich im Darm nachzuweisen (Maynard *et al.*, 2007), in dem das von Tregs produzierte IL-10 eine besondere Rolle bei der Kontrolle von pro-inflammatorischen T_H17 Zellen spielt (Chaudhry *et al.*, 2011; Huber *et al.*, 2011). Im Einklang damit können IL-10 defiziente Tregs bestimmte Autoimmunerkrankungen verhindern, nicht aber entzündliche Darmerkrankungen (Asseman *et al.*, 1999; Suri-Payer *et al.*, 2001). CTLA-4 wird demnach also eher für die Kontrolle des Immunsystems bei physiologischen Immunantworten sowie unter ruhenden Bedingungen benötigt, um die Selbsttoleranz zu erhalten, während IL-10 einen zusätzlichen Mechanismus darstellt, um starke, selbstzerstörende Entzündungsprozesse zu kontrollieren. Damit korreliert, wie hier gezeigt, dass sowohl die IL-10 produzierenden Tregs im ruhenden System als auch unter polyklonal aktivierten Bedingungen die Fähigkeit besitzen, effizient in diese entzündlichen Gewebe einzuwandern (**Abb. 23**).

Die Migration von Tregs wird ähnlich wie die anderer Zellen durch die Expression bestimmter Migrationsrezeptoren reguliert. Auf Tregs mit einem Phänotyp, der Effektor-/ Gedächtniszellen ähnelt, wurden zum Beispiel überwiegend Rezeptoren gefunden, die eine Wanderung in Gewebe induzieren (Huehn *et al.*, 2004; Siewert *et al.*, 2007). Auch durch die CD28SA Stimulation werden auf Tregs der Rezeptor CCR7, durch den die Tregs in lymphoiden Organen verweilen (Zhang, N. *et al.*, 2009), herunterreguliert und die Rezeptoren CCR5 und CCR6, die die Wanderung in entzündliche Gewebe ermöglichen (Kang *et al.*, 2007; Kleinewietfeld *et al.*, 2005; Zhang, N. *et al.*, 2009), insbesondere auf den IL-10 produzierenden Tregs hochreguliert. Die wenigen Tregs in unmanipulierten Mäusen, die aufgrund von Interaktionen mit (Selbst)antigenen IL-10 produzieren, exprimieren ebenfalls CCR5, CCR6 und CD103 und besitzen somit die Kompetenz präferenziell in entzündliche Gewebe einzuwandern (**Abb. 22A** und Daten nicht gezeigt). Neben dem Phänotyp, der

Effektor-/ Gedächtniszellen gleicht, stellt dies einen weiteren Hinweis dar, dass die zahlreichen IL-10 sezernierenden Tregs, die durch polyklonale Aktivierung mit CD28SA entstehen, denen im ruhenden System entsprechen. Die hohe Effektivität, mit der IL-10 produzierende Tregs von beiderlei Ursprung in inflammatorische Bereiche rekrutiert werden können, zeigte sich durch das erhöhte Vorkommen von IL-10 Produzenten in dem artifizialen entzündlichen Gewebe (subkutan implantierter, hitzeinaktivierte *Listeria monocytogenes* enthaltenden Schwamm) im Vergleich zum Lymphknoten. Der Anteil an IL-10 Produzenten steigerte sich nach polyklonaler Aktivierung am Entzündungsort im Vergleich zu dem in den Lymphknoten um das 1,6-fache, während er bei unstimulierten Mäusen sogar um das dramatisch 145-fache anstieg (**Abb. 23**). Die präferenziell rekrutierten Tregs könnten durch ihre IL-10 Produktion zudem zur Differenzierung weiterer IL-10 produzierender T-Zellen aus CD4⁺Foxp3⁻ Zellen führen (4-facher Anstieg in CD28SA behandelten im Vergleich zu unstimulierten Lymphknoten, **Abb. 23**) und damit die Dämpfung der Entzündungsreaktion weiter beschleunigen (Groux *et al.*, 1997).

Ein entscheidender Befund war, dass die meisten der stark aktivierten Tregs nach der Expansion und der damit verbundenen Induktion der IL-10 Sekretion und dem Erlangen der Kompetenz, in entzündliche Gewebe einzuwandern, apoptotisch werden und zudem ein Großteil der verbleibenden Tregs ihre Fähigkeit zur IL-10 Produktion verlieren. Dies stellt sicher, dass nach erfolgreicher Beseitigung einer Infektion auch die Immunsuppression wieder beendet wird. Kürzlich veröffentlichte Daten bestätigen diesen Ablauf der Ereignisse auch im EAE (Experimentelle-Autoimmun-Enzephalomyelitis) Modell. Zur Unterscheidung der verschiedenen Treg Reifestadien diente allerdings KLRG1 (Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily G, Member 1) anstelle von IL-10 Produktion (Tauro *et al.*, 2013). Im Einklang mit der erhöhten Apoptosesensitivität der IL-10 sezernierenden Tregs (**Abb. 28A**) steht die bereits bekannte, gut untersuchte Verbindung zwischen intensiver Proliferation und darauffolgender Apoptose (Übersicht in Alenzi, 2004). Der durch Aktivierung induzierte Zelltod, AICD (activation-induced cell death), ist zum Teil abhängig von der Expression des Rezeptors CD95 (Fas) und seines Liganden CD95L (FasL) und kontrolliert neben anderen Mechanismen die Größe der Tkon Population. Es ist allerdings nicht klar, ob auch Tregs durch eine CD95 vermittelte Apoptoseinduktion kontrolliert werden können (Banz *et al.*, 2002; Fritsching *et al.*, 2006). Für humane Tregs konnte gezeigt werden, dass Tregs mit einem Phänotyp ähnlich wie Effektor-/ Gedächtniszellen hochsensitiv, naive/ruhende Tregs aber resistenter gegenüber dieser Apoptoseinduktion sind (Banz *et al.*, 2002). Im Einklang damit wurde beobachtet, dass insbesondere in aktivierten Tregs (Yamaguchi *et al.*, 2007) wie auch in den CD28SA aktivierten IL-10 produzierenden Tregs

(**Abb. 31**) das anti-apoptotische Protein Bcl-2 herunterreguliert wird. Zudem wurden in den IL-10 produzierenden Tregs pro-apoptotische Gene wie Bim und Caspase 3 hochreguliert (**Abb. 30**) und vermehrt aktiviertes Caspase 3 Protein exprimiert (**Abb. 32**). Eine verstärkte Expression von Bax in IL-10 sezernierenden Tregs, wie sie aufgrund von IL-2 Entzug in Tregs induziert wird (Xiong *et al.*, 2008), konnte zumindest auf mRNA Ebene nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren bewahrt die erhöhte Genexpression von Bcl-X_L (Bcl2l1 in **Abb. 30**), die in CD28SA stimulierten T-Zellen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber CD95 vermittelter Apoptose führt (Kerstan *et al.*, 2004), die IL-10 Produzenten nicht vor dem programmierten Zelltod. IL-10 selbst kann in verschiedenen Zelltypen, wie Mastzellen, Makrophagen oder CD4⁺ T-Zellen von SLE (*Systemischer Lupus erythematodes*) Patienten Apoptose induzieren (Bailey, D. P. *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005). Da jedoch CD28SA aktivierte Tregs nur geringe Mengen an IL-10R exprimieren und es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Expression auf IL-10 produzierenden und nicht-produzierenden Tregs gibt, scheint es eher unwahrscheinlich, dass IL-10 selbst zur präferenziellen Apoptoseinduktion führt (**Abb. 19**). Welche Mechanismen letztendlich zur Apoptose in den IL-10 produzierenden Tregs führen, bleibt noch zu klären. Interessant ist auch die Frage, ob ein Teil dieser terminaldifferenzierten IL-10 Produzenten dem System als Gedächtniszellen erhalten bleibt, wie es bereits für Tregs nach einer akuten viralen Infektion gezeigt wurde (Sanchez *et al.*, 2012).

Durch die gezeigten Daten konnte zwischen den nach einer polyklonalen Aktivierung auftretenden Ereignissen wie der klonalen Expansion, der funktionellen Differenzierung zu IL-10 Produzenten, der Migration in entzündliche Gewebe und dem programmierten Zelltod eine Verbindung hergestellt werden. Die Abfolge der Ereignisse spiegelt sich auch in der erfolgreichen Behandlung verschiedenster Krankheitsmodelle mit CD28SA wider, nach der sich abschließend die Homöostase von Tkons und Tregs wiederherstellt. Während die Entwicklung einer Behandlungsmethode mit CD28SA aufgrund des von CD4⁺ Effektorgedächtnis-T-Zellen induzierten Zytokinsturms im Menschen zunächst gestoppt wurde, scheint die polyklonale, transiente Aktivierung von Tregs auch in Zukunft eine attraktive und vielfältig einsetzbare Methode. Vor allem die Möglichkeit einer zeitgleichen Corticosteroidbehandlung, die im Mausmodell die positiven CD28SA vermittelten Effekte nicht beeinflusst (siehe *Abschnitt 4.1.4*), bestärkt diese Annahme.

5.3 Vergleich induzierter mit bona fide regulatorischen T-Zellen

CD28SA kann *in vitro* naive Tkons sehr effizient in Foxp3⁺ T-Zellen konvertieren. Die resultierenden iTregs zeigten jedoch sowohl im Phänotyp als auch in ihrer Funktion deutliche Unterschiede gegenüber *ex vivo* Tregs.

TZR Signale geringer Stärke fördern in der Peripherie in Kombination mit TGFβ die iTreg Differenzierung aus naiven Tkons (Gottschalk *et al.*, 2010; Kretschmer *et al.*, 2005). Die Notwendigkeit einer Kostimulation durch CD28 für die Differenzierung von iTregs ist allerdings anhand der Daten aus der Literatur nicht eindeutig. *In vivo* zeigten transferierte CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in CD80/CD86-defizienten Mäusen eine stark verminderte iTreg Konversion (Liang *et al.*, 2005). Auch *in vitro* konnten CD28-defiziente CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nicht zu iTregs differenzieren. Der Befund, dass die Zugabe von exogenem IL-2 die Konversion wiederherstellte (Guo, F. *et al.*, 2008), zusammen mit der Tatsache, dass CD28 Kostimulation zur IL-2 Produktion in T-Zellen führt (Fraser *et al.*, 1991), lässt darauf schließen, dass zumindest eine indirekte Abhängigkeit von CD28 kostimulatorischen Signalen besteht. Unter denen in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen konnte zwar die CD28 Abhängigkeit bestätigt werden, jedoch nicht die Substitution durch IL-2 (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise lag der Unterschied im Gebrauch von anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads zur Stimulation anstelle der von Guo, *et al.* verwendeten bestrahlten APZs und anti-CD3 mAks. Trotz der gezeigten Notwendigkeit des CD28 Signals hemmt eine starke CD28 Ligation bei gleichzeitig starker TZR Stimulation abhängig vom Lck Signalweg, aber unabhängig von IL-2 selbst, die Foxp3 Induktion (Semple *et al.*, 2011). Dieser Effekt lässt sich durch den Zusatz von all-trans-Retinsäure abschwächen (Benson *et al.*, 2007). Gleichzeitig scheint aber ein starkes CD28 Signal in Kombination mit einem schwachen TZR Signal die Konversion zu fördern (**Abb. 34** und Gabrysova *et al.*, 2011). Zusammengefasst kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass die Induktion der Foxp3 Expression in Tkons abhängig von der integrierten Stärke aus TZR und kostimulatorischem Signal und der IL-2 bzw. TGFβ Konzentration ist (Gabrysova *et al.*, 2011). Ob CD28 Signale neben der Induktion der IL-2 Produktion auch zellintrinsisch für die Induktion der Foxp3 Expression benötigt werden und welche Rolle andere Mitglieder der CD28 Familie wie z.B. CTLA-4 (Zheng *et al.*, 2006) oder ICOS spielen, bleibt noch näher zu untersuchen.

CD28SA induziert starke CD28 Signale und amplifiziert zudem die schwachen, tonischen TZR Signale, die Tkons durch das Scannen von MHC-Molekülen in ihrem Umfeld erhalten (Dennehy *et al.*, 2007; Stefanova *et al.*, 2002). Obwohl *in vivo* CD28SA in CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen kaum *de novo* Foxp3 Expression induziert (**Abb. 10**), differenzieren sich *in vitro*

unter CD28SA Stimulation ohne die Zugabe exogener Zytokine bis zu 50% der naiven Tkons zu Foxp3⁺ iTregs (**Abb. 37**). Eine Erklärung für die hohe Effektivität der *in vitro* CD28SA vermittelten Konversion könnte die geringe Phosphorylierung von Akt (Dennehy *et al.*, 2007) und die damit verbundene schwache Aktivierung des PI3K/Akt/mTor Signalweges sein, da gezeigt wurde, dass dieser Signalweg, der unter anderem durch ein starkes TZR Signal aktiviert wird, die Foxp3 Induktion in Tkons hemmt (Merkenschlager *et al.*, 2010; Sauer *et al.*, 2008). Zudem überstieg die Expansion der generierten iTregs die der verbleibenden Tkons deutlich (**Abb. 39C**) und das, obwohl die durch CD28SA Stimulation (**Abb. 39C**) ähnlich wie die durch anti-CD3/anti-CD28/TGFβ Stimulation (Selvaraj *et al.*, 2007) vermittelte Foxp3 Induktion unabhängig von der Proliferation der Zellen ist. Die effektive Zunahme an iTregs kann somit sowohl in der *de novo* Foxp3 Expression in Tkons als auch in der Proliferation der entstandenen iTregs begründet sein.

Die Zytokine IL-2 und TGFβ sind sowohl für nTregs als auch für iTregs von zentraler Bedeutung. Allerdings ist die Funktion, die diese Zytokine in den unterschiedlichen Treg Populationen einnehmen, unterschiedlich. nTregs benötigen IL-2 sowohl für ihre Entstehung als auch für die Homöostase in der Peripherie (Übersicht in Goldstein *et al.*, 2013). Die Rolle von TGFβ während der Differenzierung im Thymus ist noch unklar (Übersicht in Goldstein *et al.*, 2013) und auch in der Peripherie scheint es nicht hauptverantwortlich für den Erhalt der Homöostase oder der Foxp3 Expression zu sein (Josefowicz, Niec, *et al.*, 2012). In iTregs dagegen ist TGFβ für die Differenzierung und für die Homöostase von entscheidender Bedeutung. Es induziert die Bindung des Smad3/NFAT Komplexes an den Promotor und die CNS1 (conserved non-coding sequence 1) Enhancerregion im *Foxp3* Gen (Tone *et al.*, 2008). In Mäusen mit einer CNS1-Defizienz können sich deshalb Tkons nicht zu iTregs differenzieren (Josefowicz, Niec, *et al.*, 2012). Auch IL-2 hat eine nicht-redundante Funktion während der iTreg Differenzierung, die durch die Zytokine IL-4, IL-7, IL-15, die wie IL-2 zur Familie der „common gamma chain“ Zytokine gehören, nicht ersetzt aber unterstützt werden kann (Zheng *et al.*, 2007). Die CD28SA vermittelte iTreg Induktion ist, wie die Blockade des IL-2 bzw. des TGFβ Signalweges zeigte, ebenfalls abhängig von IL-2 und TGFβ, auch wenn die exogene Zugabe nur eine geringe Steigerung in der Anzahl an iTregs bewirkt (**Abb. 40**). Kürzlich wurden Daten, die auf ein „Zwei-Stufen-Modell“ der iTreg Differenzierung hinweisen, veröffentlicht. Während der ersten Stufe entstehen demnach durch die Stimulation von TZR und CD28 in Anwesenheit von TGFβ CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ Vorläuferzellen, die sich im zweiten Schritt durch IL-2 zu reifen stabilen supprimierenden CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTregs weiterentwickeln (Guo, Z. *et al.*, 2013). Da der erste, konditionierende Schritt durch IL-2 Signale gehemmt wird, könnte der hohe Anteil

an IL-2 Produzenten, der in der CD28SA Kultur beobachtet wurde (**Abb. 43**), inhibierend auf die iTreg Konversion wirken. Möglicherweise könnte so eine kurzzeitige Inkubation mit blockierenden anti-IL-2 mAK zu Beginn der Kultur neben der Effizienz auch die Stabilität und die supprimierende Aktivität der CD28SA iTregs verbessern. Neben IL-2 kann auch TNF, über den Smad3 und Akt Signalweg (Zhang, Q., Cui, *et al.*, 2013), und IL-4 bzw. IL-6, die jeweils in Kombination mit TGF β zur Differenzierung von T_H9 bzw. T_H17 Zellen führen (Übersicht in Jabeen *et al.*, 2012; Maddur *et al.*, 2012), die iTreg Differenzierung negativ beeinflussen. Die hohen Mengen an TNF in der CD28SA stimulierten Kultur könnten neben IL-2 somit ebenfalls zu einer verminderten iTreg Konversion führen (**Abb. 42**). IL-4 und IL-6 scheinen dagegen keinen Einfluss zu haben, da weder erhöhte IL-4 Konzentrationen im Kulturüberstand noch größere Mengen an IL-17 produzierenden T-Zellen nachgewiesen wurden (s. *Abschnitt 4.3.3*).

Der Phänotyp, die supprimierende Aktivität wie auch die Stabilität der iTregs sind stark abhängig von den Bedingungen, unter denen iTregs induziert werden. Die mit TGF β und TZR Stimulation *in vitro* generierten Foxp3⁺ T-Zellen scheinen sich dabei am meisten von *ex vivo* Tregs zu unterscheiden (Feuerer *et al.*, 2010), im Gegensatz zu *in vivo* generierten iTregs, die mehr Gemeinsamkeiten mit *ex vivo* Tregs haben (Feuerer *et al.*, 2010; Haribhai *et al.*, 2009). Auch die durch CD28SA generierten iTregs unterscheiden sich in den meisten Markern (**Abb. 41**), in ihrer Funktionalität (**Abb. 44**) wie auch im Methylierungsstatus der TSDR (**Abb. 45**) signifikant von unstimulierten bzw. von ebenfalls mit CD28SA aktivierten *ex vivo* Tregs. Obwohl früher Foxp3 als der Masterregulator für Tregs galt, unter anderem aufgrund des Treg ähnlichen Phänotyps, der durch den retroviralen Gentransfer von *Foxp3* in naiven CD4⁺ T-Zellen induziert wurde (Hori *et al.*, 2003), konnte inzwischen mit Hilfe modifizierter *Foxp3* Gene gezeigt werden, dass Teile der Treg Signatur, wie z.B. die CD25, CD44, CTLA-4, GITR oder ICOS Expression, nicht durch Foxp3 selbst reguliert werden (Gavin *et al.*, 2007; Lin, W. *et al.*, 2007), sondern durch T-Zellaktivierung, durch den IL-2 oder den TGF β Signalweg (Hill *et al.*, 2007). Trotz der unterschiedlichen Stimulation, der Unterschiede in der Markerexpression der CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen (**Abb. 41**) und in der IFN γ Konzentration im Kulturüberstand (**Abb. 42**) scheint die Stimulation via anti-CD3/anti-CD28 in Anwesenheit von IL-2 und TGF β bzw. via CD28SA dennoch zu iTregs mit einer ähnlichen Funktionalität und einem ähnlichen Phänotyp zu führen (**Tabelle 5**). Beide weisen jedoch etliche signifikante Unterschiede im Vergleich zu *ex vivo* Tregs auf (**Tabelle 5**).

Bis heute ist nicht eindeutig gesichert, ob *in vivo* nTregs und iTregs unterschiedliche Aufgaben besitzen und ob sie die gleichen Effektormechanismen verwenden. Die IL-10 Pro-

duktion kann, wie kürzlich mit Hilfe eines Colitis-Modells gezeigt wurde, sowohl von iTregs als auch von nTregs zur Kontrolle der Immunantwort verwendet werden (Schmitt *et al.*, 2012). Trotz erhöhter IL-10 Konzentrationen im Kulturüberstand konnte in den *in vitro* mit CD28SA und anti-CD3/anti-CD28 Stimulation generierten iTregs keine IL-10 Produktion beobachtet werden (s. *Abschnitt 4.3.3*). Neben den Effektormechanismen ist auch die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren, wie T-bet, IRF4, STAT3 und GATA-3, die als Masterregulatoren von polarisierten Helfer-T-Zellsubpopulationen gelten, für die Aufgabe der Tregs entscheidend (Übersicht in Schmitt *et al.*, 2013). Durch die CD28SA Stimulation wird in T-Zellen der T_H2-favorisierende Transkriptionsfaktor GATA-3 induziert (Rodriguez-Palmero *et al.*, 1999). Ob und welchen Einfluss dies auf die CD28SA vermittelte Induktion der Foxp3 Expression hat, bleibt jedoch ungewiss, da einerseits GATA-3 die TGF β vermittelte Foxp3 Induktion inhibieren kann (Mantel *et al.*, 2007), andererseits aber GATA-3 für den Erhalt einer hohen Foxp3 Expression und die Rekrutierung von Tregs in entzündlichen Geweben notwendig ist (Wohlfert *et al.*, 2011). Auf eine supprimierende Aktivität der iTregs deuten die Expression von Treg Effektormolekülen wie CD25, LAP und CTLA-4 hin (**Abb. 41**), die auch im *in vitro* Assay bestätigt wurde (**Abb. 44**). Eine Verlängerung der Kulturzeit mit CD28SA über vier Tage hinaus führt, wie auch anhand von Langzeitkulturen mit Ratten T-Zellen gezeigt wurde, zwar ebenfalls zu einer Foxp3 Induktion, aber nicht zu einer verstärkten Suppressivität der iTregs (Beyersdorf *et al.*, 2006 und Daten nicht gezeigt).

Epigenetische Modifikationen, insbesondere Histonmodifikationen und DNA Methylierung, spielen eine entscheidende Rolle in der Zelldifferenzierung und der Stabilisierung der Zelllinien (Übersicht in Ohkura *et al.*, 2013). In Tregs ist die epigenetische Modifikation der CpG reichen TSDR (auch CNS2) des *Foxp3* Gens mit der Stabilität der Foxp3 Expression verbunden (Polansky *et al.*, 2008). Aufgrund der Demethylierung in der CNS2 Region können nTregs unabhängig von den extrazellulären Bedingungen Foxp3 relativ stabil exprimieren. *In vitro* vermittelt das TGF β Signal die Histonmodifikation der CNS1 Region in Tkons, wodurch mehrere Transkriptionsfaktoren an die DNA binden können und die Foxp3 Expression transaktiviert wird. Die Hypomethylierung in der CNS2 Region, wie sie in nTregs oder in *in vivo* generierten iTregs beobachtet wird, kann durch TGF β allerdings nicht induziert werden (Übersicht in Ohkura *et al.*, 2013). Dies zeigte sich auch in den *in vitro* mit CD28SA generierten iTregs, deren TSDR nur partiell demethyliert war (**Abb. 45**), obwohl TGF β in den Kulturen nachgewiesen werden konnte. *In vivo* können jedoch bestimmte Faktoren oder Ereignisse, die noch zu bestimmen sind, zu einer vollständigen

Demethylierung der TSDR auch in *in vitro* generierten iTregs führen (Chen, Q., Kim, *et al.*, 2011; Schmitt *et al.*, 2012; Sela *et al.*, 2011,).

Zusammenfassend führt die Kombination aus starkem CD28 und schwachem TZR Signal zu einer effizienten iTreg Differenzierung *in vitro*, die sogar ohne die Zugabe exogener Zytokine eine höhere Ausbeute an Foxp3⁺ iTregs erreicht, als durch die Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 in Anwesenheit von IL-2 und TGFβ. Ob zellintrinsische Unterschiede, wie die schwache Aktivierung des PI3K/Akt/mTor Signalweges oder die erhöhte Expression von GATA-3, und/oder die optimale Konzentration an iTreg induzierendem IL-2 und TGFβ dies bedingen, bleibt zu klären.

		<i>ex vivo</i> Tregs	<i>in vitro</i> generierte iTregs	
			anti-CD3/anti-CD28*	CD28SA
<i>in vitro</i> Proliferation	Abb. 39	hoch	hoch	hoch (aber langsamer zunehmend)
Abhängigkeit von exogenen Zytokinen	Abb. 40	IL-2**	TGFβ und IL-2	endogenes TGFβ und IL-2 ausreichend
Markerexpression	Abb. 41	Foxp3 ^{hoch} , CD25 ^{hoch} , CTLA-4 ^{hoch} , CD45RB ^{niedrig}	Foxp3 ^{mittel} , CD25 ^{hoch} , CTLA-4 ^{hoch-mittel} , CD45RB ^{niedrig}	
spezifische Marker	Abb. 41	Helios ^{hoch}	Helios ^{niedrig}	
TSDR	Abb. 45	demethyliert	partiell demethyliert	partiell demethyliert (etwas schwächer)
Zytokinproduktion	Abb. 43	IL-10 kein IL-2, TNF***	keine IL-10 Produzenten nachweisbar IL-2, TNF	
supprimierende Aktivität	Abb. 44	stark	mittel	mittel

Tabelle 5: Vergleich von *ex vivo* Tregs mit anti-CD3/anti-CD28 und CD28SA *in vitro* generierten iTregs

* kultiviert in Anwesenheit von exogenem IL-2 und TGFβ

** Pandiyan *et al.*, 2008

*** Maynard *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007

5.4 Vielfältige Einsatzmöglichkeiten der superagonistischen Stimulation des CD28 Moleküls

Die Stimulation mit superagonistischem anti-CD28 Antikörper aktiviert naive T-Zellen ohne eine zusätzliche Ligation des TZR und führt zudem zu einer präferenziellen Expansion und Aktivierung von Foxp3⁺ Tregs. Neben den präventiven und therapeutischen Effekten einer *in vivo* Behandlung mit CD28SA (**Tabelle 1**) ermöglichte die superagonistische Stimulation des CD28 Moleküls neue Aspekte der Funktion dieses kostimulatorischen Rezeptors zu erforschen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass auch CD28-spezifische Signale die T-Zellproliferation induzieren und positiv auf das Überleben der T-Zellen wirken

(Dennehy *et al.*, 2003; Kerstan *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass das CD28 Molekül zur Ausübung seiner natürlichen Funktion nur monovalent an seine Liganden CD80/86 bindet (Collins *et al.*, 2002) und damit, im Gegensatz zu CD28SA, nur gemeinsam mit einem TZR Signal T-Zellen aktivieren kann (Dennehy *et al.*, 2006). Wie hier dargestellt, konnte die CD28SA Stimulation naiver T-Zellen zeigen, dass starke kostimulatorische Signale zusammen mit schwachen TZR Signalen bei naiven T-Zellen *in vitro* zu einer effektiven Foxp3 Induktion führen (*Abschnitt 4.3*). Veranlasst durch die Diskrepanz in der Zytokinausschüttung nach CD28SA Stimulation humaner PBMCs (*in vitro*) und menschlicher Testpersonen (*in vivo*) wurden neue *in vitro* Tests entwickelt, um vorklinische Studien sicherer zu gestalten (Bailey, L. *et al.*, 2013; Romer *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2011). Schließlich half die CD28SA vermittelte polyklonale Aktivierung der Tregs dabei Regulationsmechanismen (Bodor *et al.*, 2012) bzw. den Ursprung und das Schicksal bestimmter Treg-Subpopulationen (*Abschnitt 4.2*) näher zu analysieren. Auch künftig könnten die superagonistischen anti-CD28 Antikörper einen Beitrag bei der Erforschung von T-Zellen und Tregs im humanen oder Nagersystem leisten. Möglicherweise ist sogar die Behandlung von Autoimmunerkrankungen beim Menschen durch eine Kombination aus CD28SA und Corticosteroiden (*Abschnitt 4.1*) in Zukunft realisierbar.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung	Versuchsnr.	#
Abb. 1: Funktion der Kostimulation bei der T-Zellaktivierung	-	6
Abb. 2: Schematische Darstellung der Bindung von konventionellen.. und superagonistischen anti-CD28 mAKs	-	8
Abb. 3: Abhängigkeit der CD28SA vermittelten T-Zellaktivierung von proximalen TZR Signalen	-	9
Abb. 4: T-Zellentwicklung im Thymus in Abhängigkeit von der TZR Signalstärke	-	14
Abb. 5: Beispiele für Regulationsmechanismen der nTregs	-	18
Abb. 6: Zellexpansion in Lymphknoten und Milz nach <i>in vivo</i> CD28SA Behandlung	54	39
Abb. 7: T-Zellantwort auf <i>in vivo</i> CD28SA Behandlung	209	39
Abb. 8: Titration der CD28SA Konzentration <i>in vivo</i>	42	40
Abb. 9: Zellteilung der Tkons und Tregs nach CD28 Stimulation <i>in vivo</i>	53	41
Abb. 10: Präferentielle Expansion bereits existierender Tregs nach CD28SA Stimulation	234	41
Abb. 11: CD28SA induzierte CD4 ⁺ T-Zellaktivierung in Abhängigkeit von CD28 und IL-2	96, 102	43
Abb. 12: Systemische Zytokinausschüttung in Treg depletierten Mäusen nach CD28SA Behandlung	83	46
Abb. 13: Einfluss von Dexamethason auf die systemische Zytokinausschüttung	111	48
Abb. 14: Einfluss von Dexamethason auf die CD28SA induzierte T-Zellteilung	90	49
Abb. 15: IL-10 und Foxp3 Expression von CD4 ⁺ T-Zellen in unbehandelten und CD28SA behandelten C57BL/6 Mäusen	209	53
Abb. 16: Titration der CD28SA Konzentration <i>in vivo</i>	42	53
Abb. 17: Präferentielle Expansion bereits existierender Tregs nach CD28SA Stimulation	234	54
Abb. 18: Zellteilung in Abhängigkeit der Foxp3 und IL-10 Expression	49	55

Abbildung	Versuchsnr.	#
	209, 229, 233,	
Abb. 19: Phänotyp IL-10 ⁺ und IL-10 ⁻ Tregs 3 Tage nach CD28SA Behandlung	255	57
Abb. 20: Helios Expression in unstimulierten und CD28SA stimulierten Tregs	181, 183	58
Abb. 21: Suppressierende Wirkung unterschiedlicher Treg Populationen	142, 202, 230	59
Abb. 22: Expression von Migrationsmarkern in Tregs nach CD28SA Stimulation	98, 229, 233	61
Abb. 23: Migration der Tregs <i>in vivo</i>	165	63
Abb. 24: Stabilität der IL-10 Produktion CD28SA stimulierter Tregs <i>in vitro</i>	192	64
Abb. 25: Einfluss der Kulturbedingungen auf die Stabilität der IL-10 Produktion	190	64
	122, 125,	
Abb. 26: Instabilität des IL-10 produzierenden Phänotyps <i>in vitro</i>	176	66
Abb. 27: <i>In vivo</i> Konversion IL-10 negativer Tregs	158	67
	122, 125, 161, 163,	
Abb. 28: Apoptoseanfälligkeit der IL-10 produzierenden Tregs	176	69
Abb. 29: Charakterisierung des Klons 10-7A	-	69
Abb. 30: Genexpressionsdaten des Funktionsclusters „Apoptose“ (DAVID)	19	70
Abb. 31: Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 in CD28SA behandelten T-Zellen	234	71
Abb. 32: Höherer Anteil aktive Caspase3 exprimierender Zellen in IL-10 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs	51, 186	72
Abb. 33: Terminale Differenzierung und Apoptose IL-10 produzierender Tregs	-	73
Abb. 34: Abhängigkeit der Foxp3 Induktion von der anti-CD3 und anti-CD28 Konzentration	199	75

Abbildung	Versuchsnr.	#
Abb. 35: Abhängigkeit der Foxp3 Induktion von der CD28SA Konzentration	198	76
Abb. 36: Vergleich der Effektivität der Foxp3 Induktion	208	76
Abb. 37: Kinetik der Foxp3 Induktion	259	77
Abb. 38: Foxp3 Induktion in OT-II Rag1 ^{-/-} T-Zellen	265	78
Abb. 39: Spiking der CD4 ⁺ CD25 ⁻ Kultur mit CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen	263	79
	220, 221, 228, 233,	
Abb. 40: Konversion in Abhängigkeit von IL-2 und TGFβ	247	81
Abb. 41: Phänotyp der iTregs im Vergleich zu <i>ex vivo</i> und <i>in vitro</i> aktivierten Tregs	278	83
Abb. 42: Kinetik der Zytokine im Kulturüberstand nach CD28SA bzw. anti-CD3/anti-CD28 Stimulation	264	84
Abb. 43: Kinetik der Zytokin produzierenden Zellen nach CD28SA bzw. anti-CD3/anti-CD28 Stimulation	264	85
Abb. 44: Supprimierende Wirkung unterschiedlicher T-Zellpopulationen	250	86
Abb. 45: Methylierungsstatus der Treg spezifischen Demethylierungsstellen im <i>Foxp3</i> Gen	274	88
Tabellen	Versuchsnr.	#
Tabelle 1: Effekte von CD28SA in verschiedenen Nagermodellen für Autoimmunität und Transplantation	-	11
Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften und Merkmale von nTregs und iTregs	-	21
Tabelle 3: Zytokinkonzentrationen im Blutserum nach CD28SA Injektion <i>in vivo</i>	83	44
Tabelle 4: Marker für die Charakterisierung von Tregs bzw. Effektor-/ Gedächtniszellen	-	55
Tabelle 5: Vergleich von <i>ex vivo</i> Tregs mit anti-CD3/anti-CD28 und CD28SA <i>in vitro</i> generierten iTregs	-	104

7 Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7 Aminoactinomycin D
a	Anti
acd	Durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen
ADP	Adenosine diphosphate
AICD	Activation-induced cell death
AP1	Activation protein 1
APC	Allophycocyanin
apopt.	Apoptotisch
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosine triphosphate
Bcl-X _L	B-cell lymphoma-extra large
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	Balanced salt solution
BTLA	B and T lymphocyte attenuator
Btnl2	Butyrophilin-like protein 2
CBA	Cytometric Bead Array
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
Cdk	Cycline-dependent kinase
CFSE	Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester
CNS	Conserved non-coding sequence
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DEREG	Depletion of regulatory T-cells
Dex	Dexamethason
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSS	Dextran-Sulfat-Sodium
DT	Diphtherietoxin

DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle-Autoimmun-Enzephalomyelitis
Ebi3	Epstein Barr Virus induced 3
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	Forkhead box P3
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
HVEM	Herpesvirus entry mediator
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
ICOS	Inducible costimulator
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
ITAM	Immune receptor tyrosine-based activating motifs
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zelle
KLRG1	Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily G, Member 1
l	Liter
LAP	Latency-associate peptide
LAT	Linker for the activation of T cells
LK	Lymphknoten
mAK	Monoklonaler Antikörper
Max	Maximum

MFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minuten
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mTEC	Medullary thymic epithelial cell
n.d.	Nicht durchgeführt
ND	Nicht detektierbar
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF-κB	Nuclear factor κB
Nrp-1	Neuropilin-1
ns	Nicht signifikant
nTreg	Natürliche regulatorische T-Zelle
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PD-1	Programmed death-1
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PRR	Pattern recognition receptor
R	Rezeptor
RAG1	Recombination activating gene 1
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
rpm	Rounds per minute
SA	Superagonist
SD	Standardabweichung
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SLP-76	SRC homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa

SMAC	Supramolecular activation cluster
Std.	Stunden
stim.	Stimuliert
Teff	Effektor-T-Zellen
Temp.	Temperatur
TGF β	Transforming growth factor β
T _H	Helfer-T-Zelle
Tkon	Konventionelle T-Zelle
TLT-2	Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor necrosis factor
Tr1 Zelle	T regulatory type 1 Zelle
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSDR	Treg specific demethylation region
TZR	T-Zellrezeptor
U	Units
unstim.	Unstimuliert
WT	Wildtyp
ZAP-70	ζ -chain associated protein kinase 70 kDa

8 Literaturverzeichnis

- Akimova, T., Beier, U.H., Wang, L., Levine, M.H., Hancock, W.W. (2011), Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One*, 6: e24226.
- Alegre, M.L., Noel, P.J., Eisfelder, B.J., Chuang, E., Clark, M.R., Reiner, S.L., Thompson, C.B. (1996), Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J Immunol*, 157: 4762-70.
- Alenzi, F.Q. (2004), Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle. *Br J Biomed Sci*, 61: 99-102.
- Ansel, K.M., Lee, D.U., Rao, A. (2003), An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol*, 4: 616-23.
- Aricha, R., Feferman, T., Fuchs, S., Souroujon, M.C. (2008), Ex vivo generated regulatory T cells modulate experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*, 180: 2132-9.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., Powrie, F. (1999), An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*, 190: 995-1004.
- Bailey, D.P., Kashyap, M., Bouton, L.A., Murray, P.J., Ryan, J.J. (2006), Interleukin-10 induces apoptosis in developing mast cells and macrophages. *J Leukoc Biol*, 80: 581-9.
- Bailey, L., Moreno, L., Manigold, T., Krasniqi, S., Kropshofer, H., Hinton, H., Singer, T., Suter, L., Hansel, T.T., Mitchell, J.A. (2013), A simple whole blood bioassay detects cytokine responses to anti-CD28SA and anti-CD52 antibodies. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 68: 231-9.
- Banz, A., Pontoux, C., Papiernik, M. (2002), Modulation of Fas-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. *J Immunol*, 169: 750-7.
- Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., Carbone, F.R. (1998), Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol*, 76: 34-40.
- Barthlott, T., Moncrieffe, H., Veldhoen, M., Atkins, C.J., Christensen, J., O'Garra, A., Stockinger, B. (2005), CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol*, 17: 279-88.
- Beaudette-Zlatanova, B.C., Whalen, B., Zipris, D., Yagita, H., Rosing, J., Groen, H., Benjamin, C.D., Hünig, T., Drexhage, H.A., Ansari, M.J., Leif, J., Mordes, J.P., Greiner, D.L., Sayegh, M.H., Rossini, A.A. (2006), Costimulation and autoimmune diabetes in BB rats. *Am J Transplant*, 6: 894-902.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., Ochs, H.D. (2001), The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 27: 20-1.

- Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., Noelle, R.J. (2007), All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med*, 204: 1765-74.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K. (2006), Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441: 235-8.
- Beyersdorf, N., Gaupp, S., Balbach, K., Schmidt, J., Toyka, K.V., Lin, C.H., Hanke, T., Hünig, T., Kerkau, T., Gold, R. (2005), Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 202: 445-55.
- Beyersdorf, N., Hanke, T., Kerkau, T., Hünig, T. (2005), Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*, 64 Suppl 4: iv91-5.
- Beyersdorf, N., Balbach, K., Hünig, T., Kerkau, T. (2006), Large-scale expansion of rat CD4⁺ CD25⁺ T(reg) cells in the absence of T-cell receptor stimulation. *Immunology*, 119: 441-50.
- Beyersdorf, N., Ding, X., Hünig, T., Kerkau, T. (2009), Superagonistic CD28 stimulation of allogeneic T cells protects from acute graft-versus-host disease. *Blood*, 114: 4575-82.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., Cresswell, P. (2013), Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol*, 31: 443-73.
- Bodor, J., Bopp, T., Vaeth, M., Klein, M., Serfling, E., Hünig, T., Becker, C., Schild, H., Schmitt, E. (2012), Cyclic AMP underpins suppression by regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 42: 1375-84.
- Boumpas, D.T., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., Cupps, T.R., Balow, J.E. (1993), Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med*, 119: 1198-208.
- Bour-Jordan, H., Blueston, J.A. (2002), CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol*, 22: 1-7.
- Bour-Jordan, H., Esensten, J.H., Martinez-Llordella, M., Penaranda, C., Stumpf, M., Bluestone, J.A. (2011), Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunol Rev*, 241: 180-205.
- Boyman, O., Sprent, J. (2012), The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 12: 180-90.
- Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Moon, J.J., Chu, H.H., Lio, C.W., Vegoe, A.L., Hsieh, C.S., Jenkins, M.K., Farrar, M.A. (2008), Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity*, 28: 112-21.
- Buss, N.A., Henderson, S.J., McFarlane, M., Shenton, J.M., de Haan, L. (2012), Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr Opin Pharmacol*, 12: 615-22.

- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., Ley, T.J. (2007), Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 27: 635-46.
- Chang, J.H., Kim, Y.J., Han, S.H., Kang, C.Y. (2009), IFN-gamma-STAT1 signal regulates the differentiation of inducible Treg: potential role for ROS-mediated apoptosis. *Eur J Immunol*, 39: 1241-51.
- Chatenoud, L., Legendre, C., Ferran, C., Bach, J.F., Kreis, H. (1991), Corticosteroid inhibition of the OKT3-induced cytokine-related syndrome--dosage and kinetics prerequisites. *Transplantation*, 51: 334-8.
- Chaudhry, A., Samstein, R.M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M.C., Heinrich, J.M., Jack, R.S., Wunderlich, F.T., Bruning, J.C., Muller, W., Rudensky, A.Y. (2011), Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity*, 34: 566-78.
- Chauhan, S.K., Saban, D.R., Lee, H.K., Dana, R. (2009), Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *J Immunol*, 182: 148-53.
- Chen, J., Xie, L., Toyama, S., Hünig, T., Takahara, S., Li, X.K., Zhong, L. (2011), The effects of Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody in DSS-induced mice colitis. *Int Immunopharmacol*, 11: 610-7.
- Chen, Q., Kim, Y.C., Laurence, A., Punkosdy, G.A., Shevach, E.M. (2011), IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo. *J Immunol*, 186: 6329-37.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M. (2003), Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198: 1875-86.
- Chen, X., Murakami, T., Oppenheim, J.J., Howard, O.M. (2004), Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol*, 34: 859-69.
- Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D.I., van der Merwe, P.A., Davis, S.J. (2002), The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*, 17: 201-10.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., Vignali, D.A. (2007), The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450: 566-9.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., Powrie, F. (2007), A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204: 1757-64.
- Croft, M., Bradley, L.M., Swain, S.L. (1994), Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol*, 152: 2675-85.

- Curotto de Lafaille, M.A., Lafaille, J.J. (2009), Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30: 626-35.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., Scheffold, A. (2004), Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*, 34: 2480-8.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V.K., Strom, T.B., Robson, S.C. (2007), Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 204: 1257-65.
- Delisle, J.S., Giroux, M., Boucher, G., Landry, J.R., Hardy, M.P., Lemieux, S., Jones, R.G., Wilhelm, B.T., Perreault, C. (2013), The TGF-beta-Smad3 pathway inhibits CD28-dependent cell growth and proliferation of CD4 T cells. *Genes Immun*, 14: 115-26.
- Delpoux, A., Poitrasson-Riviere, M., Le Campion, A., Pommier, A., Yakonowsky, P., Jacques, S., Letourneur, F., Randriamampita, C., Lucas, B., Auffray, C. (2012), Foxp3-independent loss of regulatory CD4+ T-cell suppressive capacities induced by self-deprivation. *Eur J Immunol*, 42: 1237-49.
- Dempsey, P.W., Vaidya, S.A., Cheng, G. (2003), The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci*, 60: 2604-21.
- Dennehy, K.M., Kerstan, A., Bischof, A., Park, J.H., Na, S.Y., Hünig, T. (2003), Mitogenic signals through CD28 activate the protein kinase Ctheta-NF-kappaB pathway in primary peripheral T cells. *Int Immunol*, 15: 655-63.
- Dennehy, K.M., Elias, F., Zeder-Lutz, G., Ding, X., Altschuh, D., Luhder, F., Hünig, T. (2006), Cutting edge: monovalency of CD28 maintains the antigen dependence of T cell costimulatory responses. *J Immunol*, 176: 5725-9.
- Dennehy, K.M., Elias, F., Na, S.Y., Fischer, K.D., Hünig, T., Luhder, F. (2007), Mitogenic CD28 signals require the exchange factor Vav1 to enhance TCR signaling at the SLP-76-Vav-Itk signalosome. *J Immunol*, 178: 1363-71.
- Duff, G. (2006), Expert Scientific Group on Phase One Clinical Trials Final Report. *London: Department of Health, UK*,
- Eastwood, D., Findlay, L., Poole, S., Bird, C., Wadhwa, M., Moore, M., Burns, C., Thorpe, R., Stebbings, R. (2010), Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. *Br J Pharmacol*, 161: 512-26.
- Evans, E.J., Esnouf, R.M., Manso-Sancho, R., Gilbert, R.J., James, J.R., Yu, C., Fennelly, J.A., Vowles, C., Hanke, T., Walse, B., Hünig, T., Sorensen, P., Stuart, D.I., Davis, S.J. (2005), Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex. *Nat Immunol*, 6: 271-9.
- Feuerer, M., Hill, J.A., Kretschmer, K., von Boehmer, H., Mathis, D., Benoist, C. (2010), Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 5919-24.
- Fisson, S., Darrasse-Jeze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R., Salomon, B.L. (2003), Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med*, 198: 737-46.

- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A., Huehn, J. (2007), Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*, 5: e38.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. (2005), A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*, 6: 1142-51.
- Francisco, L.M., Sage, P.T., Sharpe, A.H. (2010), The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*, 236: 219-42.
- Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R., Weiss, A. (1991), Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science*, 251: 313-6.
- Fritzsching, B., Oberle, N., Pauly, E., Geffers, R., Buer, J., Poschl, J., Krammer, P., Linderkamp, O., Suri-Payer, E. (2006), Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood*, 108: 3371-8.
- Fujio, K., Okamura, T., Yamamoto, K. (2010), The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Adv Immunol*, 105: 99-130.
- Gabrysova, L., Christensen, J.R., Wu, X., Kissenpfennig, A., Malissen, B., O'Garra, A. (2011), Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF-beta-dependent differentiation and maintenance of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 41: 1242-8.
- Gavin, M.A., Rasmussen, J.P., Fontenot, J.D., Vasta, V., Manganiello, V.C., Beavo, J.A., Rudensky, A.Y. (2007), Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*, 445: 771-5.
- Gogishvili, T., Langenhorst, D., Luhder, F., Elias, F., Elflein, K., Dennehy, K.M., Gold, R., Hünig, T. (2009), Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28 superagonist treated mice. *PLoS One*, 4: e4643.
- Gogishvili, T., Luhder, F., Goebbels, S., Beer-Hammer, S., Pfeffer, K., Hünig, T. (2013), Cell-intrinsic and -extrinsic control of Treg-cell homeostasis and function revealed by induced CD28 deletion. *Eur J Immunol*, 43: 188-93.
- Goldstein, J.D., Perol, L., Zaragoza, B., Baeyens, A., Marodon, G., Piaggio, E. (2013), Role of cytokines in thymus- versus peripherally derived-regulatory T cell differentiation and function. *Front Immunol*, 4: 155.
- Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., Noelle, R.J. (2005), Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 174: 1783-6.
- Gottschalk, R.A., Corse, E., Allison, J.P. (2010), TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J Exp Med*, 207: 1701-11.
- Gottschalk, R.A., Corse, E., Allison, J.P. (2012), Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*, 188: 976-80.

- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L. (1999), The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285: 221-7.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., Puccetti, P. (2002), CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*, 3: 1097-101.
- Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. (1999), BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 13: 1899-911.
- Gross, J.A., St John, T., Allison, J.P. (1990), The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J Immunol*, 144: 3201-10.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., Roncarolo, M.G. (1997), A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389: 737-42.
- Guilliams, M., Bosschaerts, T., Herin, M., Hünig, T., Loi, P., Flamand, V., De Baetselier, P., Beschin, A. (2008), Experimental expansion of the regulatory T cell population increases resistance to African trypanosomiasis. *J Infect Dis*, 198: 781-91.
- Guo, F., Iclozan, C., Suh, W.K., Anasetti, C., Yu, X.Z. (2008), CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells. *J Immunol*, 181: 2285-91.
- Guo, Z., Khattar, M., Schroder, P.M., Miyahara, Y., Wang, G., He, X., Chen, W., Stepkowski, S.M. (2013), A dynamic dual role of IL-2 signaling in the two-step differentiation process of adaptive regulatory T cells. *J Immunol*, 190: 3153-62.
- Hanke, T. (2006), Lessons from TGN1412. *Lancet*, 368: 1569-70; author reply 70.
- Hara, T., Fu, S.M., Hansen, J.A. (1985), Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J Exp Med*, 161: 1513-24.
- Haribhai, D., Lin, W., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Salzman, N.H., Carlson, M.R., Li, S.H., Simpson, P.M., Chatila, T.A., Williams, C.B. (2009), A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J Immunol*, 182: 3461-8.
- Haribhai, D., Williams, J.B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E.G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S.H., Relland, L.M., Wise, P.M., Chen, A., Zheng, Y.Q., Simpson, P.M., Gorski, J., Salzman, N.H., Hessner, M.J., Chatila, T.A., Williams, C.B. (2011), A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity*, 35: 109-22.
- Hill, J.A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D., Benoist, C. (2007), Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity*, 27: 786-800.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003), Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299: 1057-61.

- Hsieh, C.S., Liang, Y., Tyznik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., Rudensky, A.Y. (2004), Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity*, 21: 267-77.
- Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor, W., Jr., Huber, F.J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C.J., Rudensky, A.Y., Roncarolo, M.G., Battaglia, M., Flavell, R.A. (2011), Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*, 34: 554-65.
- Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J.C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G.F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G.K., Niesner, U., de la Rosa, M., Schmidt, C.A., Brauer, R., Buer, J., Scheffold, A., Hamann, A. (2004), Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. *J Exp Med*, 199: 303-13.
- Huehn, J., Hamann, A. (2005), Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol*, 26: 632-6.
- Hünig, T., Dennehy, K. (2005), CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential. *Immunol Lett*, 100: 21-8.
- Hünig, T. (2007), Manipulation of regulatory T-cell number and function with CD28-specific monoclonal antibodies. *Adv Immunol*, 95: 111-48.
- Hünig, T. (2012), The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. *Nat Rev Immunol*, 12: 317-8.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., Kroczyk, R.A. (1999), ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 397: 263-6.
- Inman, G.J., Nicolas, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J., Hill, C.S. (2002), SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*, 62: 65-74.
- Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y.H., Park, W.R., Arima, K., Bover, L., Qin, F.X., Gilliet, M., Liu, Y.J. (2008), Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity*, 28: 870-80.
- Jabeen, R., Kaplan, M.H. (2012), The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr Opin Immunol*, 24: 303-7.
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.F., Rudensky, A.Y. (2012), Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*, 30: 531-64.
- Josefowicz, S.Z., Niec, R.E., Kim, H.Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D.T., Rudensky, A.Y. (2012), Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature*, 482: 395-9.
- Kang, S.G., Piniacki, R.J., Hogenesch, H., Lim, H.W., Wiebke, E., Braun, S.E., Matsumoto, S., Kim, C.H. (2007), Identification of a chemokine network that recruits

- FoxP3(+) regulatory T cells into chronically inflamed intestine. *Gastroenterology*, 132: 966-81.
- Karim, M., Feng, G., Wood, K.J., Bushell, A.R. (2005), CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood*, 105: 4871-7.
- Kaye, J., Hsu, M.L., Sauron, M.E., Jameson, S.C., Gascoigne, N.R., Hedrick, S.M. (1989), Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature*, 341: 746-9.
- Kelly, K., Shortman, K., Scollay, R. (1988), The surface phenotype of activated T lymphocytes. *Immunol Cell Biol*, 66 (Pt 4): 297-306.
- Kerstan, A., Hünig, T. (2004), Cutting edge: distinct TCR- and CD28-derived signals regulate CD95L, Bcl-xL, and the survival of primary T cells. *J Immunol*, 172: 1341-5.
- Khalil, N. (1999), TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect*, 1: 1255-63.
- Kim, J.M., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y. (2007), Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*, 8: 191-7.
- Kitazawa, Y., Fujino, M., Sakai, T., Azuma, H., Kimura, H., Isaka, Y., Takahara, S., Hünig, T., Abe, R., Li, X.K. (2008), Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody can prevent rat cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*, 27: 362-71.
- Kitazawa, Y., Fujino, M., Li, X.K., Xie, L., Ichimaru, N., Okumi, M., Nonomura, N., Tsujimura, A., Isaka, Y., Kimura, H., Hünig, T., Takahara, S. (2009), Superagonist CD28 antibody preferentially expanded Foxp3-expressing nTreg cells and prevented graft-versus-host diseases. *Cell Transplant*, 18: 627-37.
- Kitazawa, Y., Li, X.K., Liu, Z., Kimura, H., Isaka, Y., Hünig, T., Takahara, S. (2010), Prevention of graft-versus-host diseases by in vivo supCD28mAb-expanded antigen-specific nTreg cells. *Cell Transplant*, 19: 765-74.
- Kleinewietfeld, M., Puentes, F., Borsellino, G., Battistini, L., Rotzschke, O., Falk, K. (2005), CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood*, 105: 2877-86.
- Kornete, M., Sgouroudis, E., Piccirillo, C.A. (2012), ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3+ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 188: 1064-74.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., von Boehmer, H. (2005), Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*, 6: 1219-27.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Muller, W. (1993), Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75: 263-74.
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., Sparwasser, T. (2007), Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurvy-like disease. *J Exp Med*, 204: 57-63.

- Lal, G., Bromberg, J.S. (2009), Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood*, 114: 3727-35.
- Levin, S.E., Zhang, C., Kadlecsek, T.A., Shokat, K.M., Weiss, A. (2008), Inhibition of ZAP-70 kinase activity via an analog-sensitive allele blocks T cell receptor and CD28 superagonist signaling. *J Biol Chem*, 283: 15419-30.
- Liang, S., Alard, P., Zhao, Y., Parnell, S., Clark, S.L., Kosiewicz, M.M. (2005), Conversion of CD4⁺ CD25⁻ cells into CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med*, 201: 127-37.
- Lin, C.H., Hünig, T. (2003), Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur J Immunol*, 33: 626-38.
- Lin, W., Haribhai, D., Relland, L.M., Truong, N., Carlson, M.R., Williams, C.B., Chatila, T.A. (2007), Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol*, 8: 359-68.
- Lin, X., Chen, M., Liu, Y., Guo, Z., He, X., Brand, D., Zheng, S.G. (2013), Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 6: 116-23.
- Lio, C.W., Hsieh, C.S. (2008), A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*, 28: 100-11.
- Liu, T., Soong, L., Liu, G., König, R., Chopra, A.K. (2009), CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4⁺ Treg cells. *Biol Direct*, 4: 40.
- Lohr, J., Knoechel, B., Jiang, S., Sharpe, A.H., Abbas, A.K. (2003), The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol*, 4: 664-9.
- Luhder, F., Huang, Y., Dennehy, K.M., Guntermann, C., Müller, I., Winkler, E., Kerkau, T., Ikemizu, S., Davis, S.J., Hanke, T., Hünig, T. (2003), Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med*, 197: 955-66.
- Maddur, M.S., Miossec, P., Kaveri, S.V., Bayry, J. (2012), Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*, 181: 8-18.
- Madshus, I.H., Stenmark, H. (1992), Entry of ADP-ribosylating toxins into cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 175: 1-26.
- Mantel, P.Y., Kuipers, H., Boyman, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Lambrecht, B.N., Hendriks, R.W., Cramer, R., Akdis, C.A., Blaser, K., Schmidt-Weber, C.B. (2007), GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol*, 5: e329.
- Maynard, C.L., Harrington, L.E., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Zindl, C.L., Rudensky, A.Y., Weaver, C.T. (2007), Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol*, 8: 931-41.

- Mayne, C.G., Williams, C.B. (2013), Induced and Natural Regulatory T Cells in the Development of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*,
- Merkenschlager, M., von Boehmer, H. (2010), PI3 kinase signalling blocks Foxp3 expression by sequestering Foxo factors. *J Exp Med*, 207: 1347-50.
- Miethke, T., Wahl, C., Regele, D., Gaus, H., Heeg, K., Wagner, H. (1993), Superantigen mediated shock: a cytokine release syndrome. *Immunobiology*, 189: 270-84.
- Miyao, T., Floess, S., Setoguchi, R., Luche, H., Fehling, H.J., Waldmann, H., Huehn, J., Hori, S. (2012), Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity*, 36: 262-75.
- Miyasato, K., Takabatake, Y., Kaimori, J., Kimura, T., Kitamura, H., Kawachi, H., Li, X.K., Hünig, T., Takahara, S., Rakugi, H., Isaka, Y. (2011), CD28 superagonist-induced regulatory T cell expansion ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. *Clin Exp Nephrol*, 15: 50-7.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A. (2001), Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19: 683-765.
- Muller, N., van den Brandt, J., Odoardi, F., Tischner, D., Herath, J., Flugel, A., Reichardt, H.M. (2008), A CD28 superagonistic antibody elicits 2 functionally distinct waves of T cell activation in rats. *J Clin Invest*, 118: 1405-16.
- Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., Kronenberg, M. (2009), Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*, 10: 1178-84.
- Nakamura, K., Kitani, A., Strober, W. (2001), Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 194: 629-44.
- Nelson, B.H. (2002), Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance. *Curr Dir Autoimmun*, 5: 92-112.
- Nirula, A., Glaser, S.M., Kalled, S.L., Taylor, F.R. (2011), What is IgG4? A review of the biology of a unique immunoglobulin subtype. *Curr Opin Rheumatol*, 23: 119-24.
- Nocentini, G., Riccardi, C. (2005), GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol*, 35: 1016-22.
- Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., Jessberger, R., Trinchieri, G., Lira, S.A., Randolph, G.J., Bromberg, J.S. (2006), Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol*, 7: 652-62.
- Ohkura, N., Kitagawa, Y., Sakaguchi, S. (2013), Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*, 38: 414-23.
- Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kraj, P., Ignatowicz, L. (2006), Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity*, 25: 249-59.

- Pacholczyk, R., Kern, J. (2008), The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology*, 125: 450-8.
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., Lenardo, M.J. (2007), CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 8: 1353-62.
- Pandiyan, P., Lenardo, M.J. (2008), The control of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell survival. *Biol Direct*, 3: 6.
- Papageorgiou, A.C., Acharya, K.R. (2000), Microbial superantigens: from structure to function. *Trends Microbiol*, 8: 369-75.
- Pappenheimer, A.M., Jr., Harper, A.A., Moynihan, M., Brockes, J.P. (1982), Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells. *J Infect Dis*, 145: 94-102.
- Paterson, A.M., Vanguri, V.K., Sharpe, A.H. (2009), SnapShot: B7/CD28 costimulation. *Cell*, 137: 974-4 e1.
- Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., Huehn, J. (2008), DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol*, 38: 1654-63.
- Povoleri, G.A., Scotta, C., Nova-Lamperti, E.A., John, S., Lombardi, G., Afzali, B. (2013), Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators? *Front Immunol*, 4: 169.
- Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., Jeffery, L.E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T.Z., Futter, C.E., Anderson, G., Walker, L.S., Sansom, D.M. (2011), Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 332: 600-3.
- Read, S., Greenwald, R., Izcue, A., Robinson, N., Mandelbrot, D., Francisco, L., Sharpe, A.H., Powrie, F. (2006), Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol*, 177: 4376-83.
- Redpath, S.A., van der Werf, N., Cervera, A.M., MacDonald, A.S., Gray, D., Maizels, R.M., Taylor, M.D. (2013), ICOS controls Foxp3(+) regulatory T-cell expansion, maintenance and IL-10 production during helminth infection. *Eur J Immunol*, 43: 705-15.
- Reichert, J.M. (2012), Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs*, 4: 413-5.
- Rodriguez-Palmero, M., Hara, T., Thumbs, A., Hünig, T. (1999), Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation in vitro and in vivo. *Eur J Immunol*, 29: 3914-24.
- Rodriguez-Palmero, M., Franch, A., Castell, M., Pelegri, C., Perez-Cano, F.J., Kleinschnitz, C., Stoll, G., Hünig, T., Castellote, C. (2006), Effective treatment of adjuvant arthritis with a stimulatory CD28-specific monoclonal antibody. *J Rheumatol*, 33: 110-8.

- Roers, A., Siewe, L., Strittmatter, E., Deckert, M., Schluter, D., Stenzel, W., Gruber, A.D., Krieg, T., Rajewsky, K., Muller, W. (2004), T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp Med*, 200: 1289-97.
- Romer, P.S., Berr, S., Avota, E., Na, S.Y., Battaglia, M., ten Berge, I., Einsele, H., Hünig, T. (2011), Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood*, 118: 6772-82.
- Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., Jr., Muller, W., Rudensky, A.Y. (2008), Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 28: 546-58.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. (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: 1151-64.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., Bluestone, J.A. (2000), B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 12: 431-40.
- Sanchez-Lockhart, M., Kim, M., Miller, J. (2011), Cutting edge: A role for inside-out signaling in TCR regulation of CD28 ligand binding. *J Immunol*, 187: 5515-9.
- Sanchez, A.M., Zhu, J., Huang, X., Yang, Y. (2012), The development and function of memory regulatory T cells after acute viral infections. *J Immunol*, 189: 2805-14.
- Sandel, P.C., Monroe, J.G. (1999), Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity*, 10: 289-99.
- Sauer, S., Bruno, L., Hertweck, A., Finlay, D., Leleu, M., Spivakov, M., Knight, Z.A., Cobb, B.S., Cantrell, D., O'Connor, E., Shokat, K.M., Fisher, A.G., Morkenschlager, M. (2008), T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 7797-802.
- Schmid, I., Krall, W.J., Uittenbogaart, C.H., Braun, J., Giorgi, J.V. (1992), Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*, 13: 204-8.
- Schmidt, E.M., Wang, C.J., Ryan, G.A., Clough, L.E., Qureshi, O.S., Goodall, M., Abbas, A.K., Sharpe, A.H., Sansom, D.M., Walker, L.S. (2009), Ctlα-4 controls regulatory T cell peripheral homeostasis and is required for suppression of pancreatic islet autoimmunity. *J Immunol*, 182: 274-82.
- Schmidt, J., Elflein, K., Stienekemeier, M., Rodriguez-Palmero, M., Schneider, C., Toyka, K.V., Gold, R., Hünig, T. (2003), Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies. *J Neuroimmunol*, 140: 143-52.

- Schmitt, E.G., Haribhai, D., Williams, J.B., Aggarwal, P., Jia, S., Charbonnier, L.M., Yan, K., Lorier, R., Turner, A., Ziegelbauer, J., Georgiev, P., Simpson, P., Salzman, N.H., Hessner, M.J., Broeckel, U., Chatila, T.A., Williams, C.B. (2012), IL-10 produced by induced regulatory T cells (iTregs) controls colitis and pathogenic ex-iTregs during immunotherapy. *J Immunol*, 189: 5638-48.
- Schmitt, E.G., Williams, C.B. (2013), Generation and function of induced regulatory T cells. *Front Immunol*, 4: 152.
- Sela, U., Olds, P., Park, A., Schlesinger, S.J., Steinman, R.M. (2011), Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice. *J Exp Med*, 208: 2489-96.
- Selvaraj, R.K., Geiger, T.L. (2007), A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol*, 179: 11 p following 1390.
- Semple, K., Nguyen, A., Yu, Y., Wang, H., Anasetti, C., Yu, X.Z. (2011), Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. *Blood*, 117: 3096-103.
- Serre, K., Benezech, C., Desanti, G., Bobat, S., Toellner, K.M., Bird, R., Chan, S., Kastner, P., Cunningham, A.F., Maclennan, I.C., Mohr, E. (2011), Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression. *PLoS One*, 6: e20731.
- Sharpe, A.H., Freeman, G.J. (2002), The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2: 116-26.
- Sharpe, A.H. (2009), Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev*, 229: 5-11.
- Shevach, E.M. (2006), From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*, 25: 195-201.
- Siegmund, K., Feuerer, M., Siewert, C., Ghani, S., Haubold, U., Dankof, A., Krenn, V., Schon, M.P., Scheffold, A., Lowe, J.B., Hamann, A., Syrbe, U., Huehn, J. (2005), Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood*, 106: 3097-104.
- Siewert, C., Menning, A., Dudda, J., Siegmund, K., Lauer, U., Floess, S., Campbell, D.J., Hamann, A., Huehn, J. (2007), Induction of organ-selective CD4+ regulatory T cell homing. *Eur J Immunol*, 37: 978-89.
- Simons, D.M., Picca, C.C., Oh, S., Perng, O.A., Aitken, M., Erikson, J., Caton, A.J. (2010), How specificity for self-peptides shapes the development and function of regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 88: 1099-107.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., Jordan, M.S. (2009), T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 27: 591-619.
- Smith, L.K., Cidlowski, J.A. (2010), Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog Brain Res*, 182: 1-30.

- Stankova, J., Hoskin, D.W., Roder, J.C. (1989), Murine anti-CD3 monoclonal antibody induces potent cytolytic activity in both T and NK cell populations. *Cell Immunol*, 121: 13-29.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., Hogquist, K.A. (2003), Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*, 21: 139-76.
- Stefanova, I., Dorfman, J.R., Germain, R.N. (2002), Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature*, 420: 429-34.
- Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D., Panoskaltsis, N. (2006), Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*, 355: 1018-28.
- Suri-Payer, E., Cantor, H. (2001), Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun*, 16: 115-23.
- Swain, S.L., Croft, M., Dubey, C., Haynes, L., Rogers, P., Zhang, X., Bradley, L.M. (1996), From naive to memory T cells. *Immunol Rev*, 150: 143-67.
- Tacke, M., Hanke, G., Hanke, T., Hünig, T. (1997), CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol*, 27: 239-47.
- Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., Singer, A. (2005), CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol*, 6: 152-62.
- Takahama, Y. (2006), Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*, 6: 127-35.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., Sakaguchi, S. (1998), Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*, 10: 1969-80.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., Sakaguchi, S. (2000), Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*, 192: 303-10.
- Takaki, H., Ichiyama, K., Koga, K., Chinen, T., Takaesu, G., Sugiyama, Y., Kato, S., Yoshimura, A., Kobayashi, T. (2008), STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J Biol Chem*, 283: 14955-62.
- Tang, Q., Henriksen, K.J., Boden, E.K., Tooley, A.J., Ye, J., Subudhi, S.K., Zheng, X.X., Strom, T.B., Bluestone, J.A. (2003), Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 171: 3348-52.
- Tang, Q., Bluestone, J.A. (2008), The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*, 9: 239-44.

- Tauro, S., Nguyen, P., Li, B., Geiger, T.L. (2013), Diversification and senescence of Foxp3⁺ regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 43: 1195-207.
- Thiede, K., Momburg, F., Zangemeister, U., Schlag, P., Schirmacher, V. (1988), Growth and metastasis of human tumors in nude mice following tumor-cell inoculation into a vascularized polyurethane sponge matrix. *Int J Cancer*, 42: 939-45.
- Thompson, C.B., Lindsten, T., Ledbetter, J.A., Kunkel, S.L., Young, H.A., Emerson, S.G., Leiden, J.M., June, C.H. (1989), CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 1333-7.
- Thornton, A.M., Shevach, E.M. (1998), CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 188: 287-96.
- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., Shevach, E.M. (2010), Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol*, 184: 3433-41.
- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., Tone, M. (2008), Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol*, 9: 194-202.
- Tran, D.Q., Andersson, J., Wang, R., Ramsey, H., Unutmaz, D., Shevach, E.M. (2009), GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 13445-50.
- Turner, M.S., Kane, L.P., Morel, P.A. (2009), Dominant role of antigen dose in CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell induction and expansion. *J Immunol*, 183: 4895-903.
- Urakami, H., Ostanin, D.V., Hünig, T., Grisham, M.B. (2006), Combination of donor-specific blood transfusion with anti-CD28 antibody synergizes to prolong graft survival in rat liver transplantation. *Transplant Proc*, 38: 3244-6.
- van den Brandt, J., Fischer, H.J., Walter, L., Hünig, T., Klöting, I., Reichardt, H.M. (2010), Type 1 diabetes in BioBreeding rats is critically linked to an imbalance between Th17 and regulatory T cells and an altered TCR repertoire. *J Immunol*, 185: 2285-94.
- von Boehmer, H., Daniel, C. (2013), Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 12: 51-63.
- Walker, M.R., Makropoulos, D.A., Achuthanandam, R., Van Arsdell, S., Bugelski, P.J. (2011), Development of a human whole blood assay for prediction of cytokine release similar to anti-CD28 superagonists using multiplex cytokine and hierarchical cluster analysis. *Int Immunopharmacol*, 11: 1697-705.
- Walunas, T.L., Bakker, C.Y., Bluestone, J.A. (1996), CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med*, 183: 2541-50.
- Wan, Y.Y., Flavell, R.A. (2007), 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev*, 220: 199-213.

- Wang, H., Xu, J., Ji, X., Yang, X., Sun, K., Liu, X., Shen, Y. (2005), The abnormal apoptosis of T cell subsets and possible involvement of IL-10 in systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol*, 235: 117-21.
- Warncke, M., Calzascia, T., Coulot, M., Balke, N., Touil, R., Kolbinger, F., Heusser, C. (2012), Different adaptations of IgG effector function in human and nonhuman primates and implications for therapeutic antibody treatment. *J Immunol*, 188: 4405-11.
- Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., Yang, Y., Floess, S., Huehn, J., Oh, S., Li, M.O., Niec, R.E., Rudensky, A.Y., Dustin, M.L., Littman, D.R., Lafaille, J.J. (2012), Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells. *J Exp Med*, 209: 1723-42, S1.
- Williams, L.M., Rudensky, A.Y. (2007), Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol*, 8: 277-84.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2008), CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*, 322: 271-5.
- Wohlfert, E.A., Grainger, J.R., Bouladoux, N., Konkel, J.E., Oldenhove, G., Ribeiro, C.H., Hall, J.A., Yagi, R., Naik, S., Bhairavabhotla, R., Paul, W.E., Bosselut, R., Wei, G., Zhao, K., Oukka, M., Zhu, J., Belkaid, Y. (2011), GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest*, 121: 4503-15.
- Wong, J., Obst, R., Correia-Neves, M., Losyev, G., Mathis, D., Benoist, C. (2007), Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4⁺ T cells. *J Immunol*, 178: 7032-41.
- Xiong, Z., Song, J., Yan, Y., Huang, Y., Cowan, A., Wang, H., Yang, X.F. (2008), Higher expression of Bax in regulatory T cells increases vascular inflammation. *Front Biosci*, 13: 7143-55.
- Xu, G., Shi, Y. (2007), Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res*, 17: 759-71.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., Ruminiski, P., Weiss, D., Von Schack, D., Bluestone, J.A. (2012), Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med*, 209: 1713-22, S1-19.
- Yamaguchi, T., Hirota, K., Nagahama, K., Ohkawa, K., Takahashi, T., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2007), Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity*, 27: 145-59.
- Yamaguchi, T., Wing, J.B., Sakaguchi, S. (2011), Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol*, 23: 424-30.

- Yi, H., Zhen, Y., Jiang, L., Zheng, J., Zhao, Y. (2006), The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell Mol Immunol*, 3: 189-95.
- Zaiss, M.M., Frey, B., Hess, A., Zwerina, J., Luther, J., Nimmerjahn, F., Engelke, K., Kollias, G., Hünig, T., Schett, G., David, J.P. (2010), Regulatory T cells protect from local and systemic bone destruction in arthritis. *J Immunol*, 184: 7238-46.
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S.R., Yan, G. (1997), Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*, 23: 525-31.
- Zhang, N., Schroppel, B., Lal, G., Jakubzick, C., Mao, X., Chen, D., Yin, N., Jessberger, R., Ochando, J.C., Ding, Y., Bromberg, J.S. (2009), Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity*, 30: 458-69.
- Zhang, Q., Cui, F., Fang, L., Hong, J., Zheng, B., Zhang, J.Z. (2013), TNF-alpha impairs differentiation and function of TGF-beta-induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *J Mol Cell Biol*, 5: 85-98.
- Zhang, R., Huynh, A., Witcher, G., Chang, J., Maltzman, J.S., Turka, L.A. (2013), An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *J Clin Invest*, 123: 580-93.
- Zheng, S.G., Wang, J.H., Stohl, W., Kim, K.S., Gray, J.D., Horwitz, D.A. (2006), TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol*, 176: 3321-9.
- Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D., Horwitz, D.A. (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. *J Immunol*, 178: 2018-27.
- Zhou, Q., Yan, J., Putheti, P., Wu, Y., Sun, X., Toxavidis, V., Tigges, J., Kassam, N., Enjyoji, K., Robson, S.C., Strom, T.B., Gao, W. (2009), Isolated CD39 expression on CD4+ T cells denotes both regulatory and memory populations. *Am J Transplant*, 9: 2303-11.

Kongresse und Symposia

- 2007** 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology,
5.-8. Sept., Heidelberg, Deutschland
- Graduate Day of the 2nd Congress of the German Society for Stem Cell Research,
3. Okt., Würzburg, Deutschland
3. Internationales GSLS Symposium
8. Okt., Würzburg, Deutschland
- 2008** 4th Spring School on Immunology, 2.-7. März, Ettal, Deutschland
- 3rd Annual GK-Network Meeting der Universitäten Würzburg, Erlangen, Tübingen,
Vortrag: „Regulation of IL-10 production in “natural” regulatory T cells“,
6.-8. Juli, Wildbad, Deutschland
- Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies,
Poster: „Regulation of IL-10 production in “natural” regulatory T cells“,
3.-6. Sept., Wien, Österreich
- 2009** 4. Internationales GSLS Symposium „(Re)volution Research - Life and Science:
A Journey through time“, 26.-27. Mai, Würzburg, Deutschland
- 2nd European Congress of Immunology,
Poster: „Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28
superagonist treated mice“, 13.-16. Sept., Berlin, Deutschland
- 4th Annual GK-Network Meeting der Universitäten Würzburg, Erlangen, Tübingen,
Poster: „Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28
superagonist treated mice“, 15.-17. Nov., Schöntal, Deutschland
- 2010** 40th Annual Meeting of the German Society for Immunology,
Poster: „The fate of IL-10 producing nTreg cells: activation, migration and
apoptosis“, 22.-25. Sept., Leipzig, Deutschland
5. Internationales GSLS Symposium „Chiasma, on the Crossroads of Research“,
Poster: „The fate of IL-10 producing nTreg cells: activation, migration and
apoptosis“, 13.-14. Okt., Würzburg, Deutschland
- 2011** 6. Internationales GSLS Symposium „BioBang the Expanding Space of Life
Science“, 19.-20. Okt., Würzburg, Deutschland
- 2012** 7th Annual GK-Network Meeting der Universitäten Würzburg, Erlangen, Tübingen,
Poster: „The role of CD28 (co)stimulation for the conversion of conventional to
regulatory CD4 T cells“, 15.-17. Juli, Schöntal, Deutschland
7. Internationales GSLS Symposium „EPOS: Everything’s part of Science“,
16.-17. Okt., Würzburg, Deutschland