

Alloantigen-spezifische regulatorische T-Zellen zur Toleranzinduktion nach Organtransplantation

Von der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Nadja Seltrecht geb. Saal

geboren am 07.02.1981 in Wilhelmshaven

2012

Referent: Prof. Dr. Hans Heinrich Wedemeyer

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Schwinzer

Tag der Promotion: 29.02.2012

„Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifels.“

Richard P. Feynman

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Abstract.....	8
<u>Kapitel 1 Einleitung.....</u>	9
Angeborene und adaptive Immunität.....	9
Die Bedeutung der T-Zellen im Immunsystem.....	10
Mechanismen der Toleranz.....	11
Foxp3-Tregs	12
Induktion und Mechanismen.....	12
Funktion der natürlichen und induzierten Foxp3-Tregs.....	13
Stabilität und Antigenpezifität von Tregs	15
Weitere Moleküle zur Charakterisierung von Tregs	16
Andere regulatorische Zellen.....	16
Die Immunreaktion nach der Organtransplantation.....	16
Klinische Immunsuppression	16
Allotoleranz in Tiermodellen	18
Die Rolle von Tregs in der Allotoleranz	19
Tregs in der Stammzelltransplantation beim Menschen.....	21
Tregs in der soliden Organtransplantation beim Menschen.....	21
Fragen, Probleme und Perspektiven	22
<u>Kapitel 2 Material & Methoden.....</u>	25
Material	25
Allgemeines Laborzubehör	25
Molekularbiologische und Proteinbiochemische Komponenten	26
Zellkultur	26
Mausarbeit und Zubehör.....	28
Immunhistochemie.....	28
FACS	28
Antikörper.....	29
Primäre Antikörper	29
Sekundäre Antikörper	30

Zytokine (rekombinante Antikörper).....	31
Restriktionsenzyme.....	31
Plasmide	31
Mausstämme	32
Zelllinien.....	33
Geräte	33
Kits	34
Puffer und Lösungen:	34
Methoden	37
Methoden der Molekularbiologie	37
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
Restriktion von Plasmiden	38
Dephosphoylierung.....	39
Ligation	39
Transformation in <i>E.coli</i>	40
Mini-Plasmidpräparationen aus Bakterien.....	40
Endotoxin-freie (EF) Maxipräparation.....	40
Kryokonservierung von Bakterien.....	40
RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen	41
Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription	41
Analyse von transgenen Mäusen	42
Methoden der Zellkultur	42
Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation	42
Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen.....	42
Zellzählung.....	42
Zelllinien und ihre Kultivierung.....	43
Präparation von primären murinen Zellen	43
Isolation von murinen Milzzellen.....	43
Isolation von murinen Zellen aus Lymphknoten	43
Generierung von murinen Dendritischen Zellen	43
Herstellung von Zelllysaten.....	43
Färbung von Oberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Messungen (FACS).....	44
Färbung von intrazellulären Markermolekülen für durchflusszytometrische Messungen (FACS).....	44
Färbung von Zytokinen für durchflusszytometrische Messungen (FACS)	45
Anreicherung von Zellen über magnetische Zellsortierung (MACS)	45
Anreicherung von Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	45
Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE	45
Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26	46
Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DDAO	46

Messung der Zellproliferation durch den Einbau von radioaktivem 3H-Thymidin	46
Stimulation von murinen T-Zellen	47
Immunhistochemische Färbungen.....	47
Herstellung von Gewebeschnitten	47
Herstellung von Paraffinschnitten	47
Herstellung von Gefrierschnitten (Kryoschnitte).....	47
H&E-Färbung auf Paraffinschnitten	48
Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten	48
Transfektion eukaryontischer Zellen.....	49
Transduktion eukaryontischer Zellen- Titerbestimmung.....	49
Transduktion muriner T-Zellen.....	49
Intravenöse Injektion bei der Maus.....	50
Intraperitoneale Injektion bei der Maus.....	50
Adoptiver Transfer von Maus-Splenozyten	50
Anästhesie bei der Maus	50
Haut-Transplantation bei der Maus	51
Statistik	51

Kapitel 3 Ergebnisse..... 52

Teil I	52
Alloantigenspezifische Aktivierung von murinen CD4 ⁺ T-Zellen über den direkten Erkennungsweg	52
Anreicherung von allospezifisch aktivierten CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD69 ⁺ T-Zellen	55
Alloantigenspezifische Aktivierung von murinen CD4 ⁺ T-Zellen über den indirekten Erkennungsweg	55
Das retrovirale System und Vektorkonstruktion	58
Virusproduktion Foxp3-Thy1.1 und Thy1.1 und Titerbestimmung	58
Effizienz der Transduktion muriner T-Zellen.....	59
Expansion transduzierter T-Zellen.....	60
Regulatorischer T-Zellphänotyp von transduzierten Tregs.....	61
Suppressions-Assay - <i>In Vitro</i>	62
Hauttransplantation im lymphopenen Mausmodell.....	63
Nicht lymphopene Transplantationsmodelle.....	65
Teil II Mechanismen der allospezifischen Immunregulation	72
Langzeit-Überleben der allospezifischen Tregs <i>in vivo</i>	72
Alloantigen-spezifische Toleranzinduktion	73
Systemische Toleranz	74
Transfer tolerogener Splenozyten	75
Transplantierte Haut in der Histologie	76
Treg-Depletion nach Toleranzinduktion <i>in vivo</i>	79

<i>De novo</i> induzierte Foxp3-Expression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	82
---	----

Kapitel 4 Diskussion 87

Foxp3-transduzierte Tregs erzeugen Toleranz im klinisch relevanten immunkompetenten Transplantationsmodell.....	87
Alloantigen-spezifische Tregs sind effektiver bei der Induktion von Toleranz.....	88
Alloantigenspezifische Foxp3-transduzierte Tregs sind funktionell und stabil	90
Einfluss der Foxp3-Transduktion auf den endogenen <i>foxp3</i> -Locus	91
Langzeit-Persistenz der Tregs.....	92
Lokale Toleranzinduktion.....	93
Sicherheit in der Anwendung transduzierter Tregs	95
Ausblick.....	96

Kapitel 5 Anhang 97

Literaturverzeichnis.....	97
Abbildungsverzeichnis	110
Abkürzungsverzeichnis	111
Lebenslauf.....	114
Danksagung	115

Zusammenfassung

Regulatorische Zellen und insbesondere CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs) spielen eine bedeutende Rolle für die Induktion allospezifischer Toleranz. Dennoch konnte bislang durch alleinigen Transfer von Tregs aus dem natürlichen T-Zellrepertoire keine allospezifische Toleranz erzeugt werden. Während polyspezifische Tregs zwar in der Lage sind eine Graft versus Host Disease nach Stammzelltransplantation zu verhindern, zeigen sie sich größtenteils ineffizient bei der Abwendung unerwünschter Immunantworten bei Autoimmunität und nach Transplantationen. Antigen-spezifische Tregs hingegen werden unter solchen nicht lymphopenen Bedingungen benötigt. Die Stabilität des Treg-Phänotyps wird zudem immer wieder stark in Frage gestellt. Für die Translation adoptiver Tregs in die Klinik sind daher stabile, antigen-spezifische Tregs in ausreichender Anzahl von entscheidender Bedeutung.

Die Generierung alloantigen-spezifischer Tregs erfolgte durch Stimulation naiver BALB/c-CD4⁺ T-Zellen mit bestrahlten Donorsplenozyten (C57BL/B6). Die allospezifischen CD25⁺CD69⁺ T-Zellen wurden isoliert und durch Transduktion mit dem Transkriptionsfaktor Foxp3 zu Tregs umprogrammiert. Diese entsprachen den charakteristischen Merkmalen natürlicher regulatorischer T-Zellen. Außerdem waren sie bis zu 18-fach expandierbar und bewahrten dabei ihren regulatorischen Phänotyp. Nachdem diese Tregs eine alloantigene Lymphozytenreaktion signifikant unterdrücken konnten, wurde ihre Leistungsfähigkeit durch Verhindern der akuten Transplantatabstoßung im lymphopenen sowie nicht lymphopenen Hauttransplantationsmodell unter Beweis gestellt. Erstmals konnte in einem stark immunogenen Modell mit vollständiger MHC-Diskrepanz (C57BL/6 → BALB/c), ohne die Verabreichung von chronischer Immunsuppression, eine langanhaltende Allotoleranz induziert werden. Dabei erwiesen sich Tregs mit indirekter Alloantigen-spezifität im Vergleich zu polyspezifisch aktivierten Tregs als die erfolgreicheren. Erstmals konnte Langzeitpersistenz sowie lokale Akkumulation als wichtiger Mechanismus der Treg-vermittelten Allotoleranz gezeigt werden. Tatsächlich war die Toleranz durch die Tregs von dem tolerierten Transplantat transferierbar. Die Tatsache, dass die infektiöse sowie deletionale Toleranz alloreaktiver T-Zellen keinen signifikanten Beitrag zur Toleranzinduktion und -erhaltung leistete, deutet auf eine entscheidende Relevanz der transferierten Tregs bei der Induktion der Langzeit-Toleranz hin. Außerdem war für die Toleranzerhaltung die lokale Präsenz alloantigen-spezifischer Tregs ausreichend. Foxp3 transduzierte Tregs bewiesen sogar unter lymphopenen und inflammatorischen Konditionen einen stabilen Phänotyp. Ferner erwies sich die adoptive Treg-Therapie als sicher und es wurde keine Transformation beobachtet. Die konstante Expression des integrierten *foxp3*-Locus war essentiell, da der endogene *foxp3*-Locus trotz seiner Expression methyliert blieb.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass hinreichende Anzahlen stabiler alloantigen-spezifischer Tregs aus dem polyklonalen Repertoire naiver T-Zellen generiert werden können. Erstmals konnte Allotoleranz im nicht lymphopenen Hauttransplantations-Modell in einer stark immunogenen Stammkombination erreicht werden. Antigen-spezifische Tregs könnten daher ein großes therapeutisches Potenzial bei der soliden Organtransplantation haben.

Schlagworte: Tregs; Toleranz; Transplantation

Abstract

Regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells (Tregs) play an important role in the induction of allospecific tolerance. Yet, the sole transfer of Tregs from the natural repertoire was not capable of inducing allotolerance so far. In addition, while polyspecific Tregs are sufficient to prevent graft versus host disease after stem cell transplantation, they are largely inefficient in averting unwanted immune responses to autoimmunity and transplantation. Instead, antigen-specific Tregs will be needed under such non-lymphopenic conditions. Furthermore the stability of the Treg phenotype has recently been questioned. Therefore, translation of adoptive Treg-transfer into clinics will need stable and antigen-specific Tregs in sufficient numbers. Alloantigen-specific Tregs were generated by stimulating naïve recipient CD4⁺ T cells with irradiated donor splenocytes: CD25⁺CD69⁺ allospecific recipient CD4⁺ T cells were isolated and transduced efficiently with Foxp3. These transduced Tregs phenotypically resembled natural Tregs and could be expanded up to 18-fold *in vitro* while maintaining a stable Treg phenotype. Furthermore the transduced cells showed suppressive capacity *in vitro* as well as *in vivo* by preventing acute allograft rejection in a lymphopenic and for the first time in a non-lymphopenic and strongly immunogenic skin transplantation model with full MHC mismatch (C57BL/6→ BALB/c). Long-term tolerance could be achieved in both models. Interestingly alloantigen-specific Tregs with indirect recognition were far more efficient in this model than their polyspecific counterparts. For the first time we could demonstrate long-term persistence and local accumulation as major mechanisms of Treg mediated allotolerance. In fact tolerance could be transferred by Tregs from the tolerated graft. Infectious and deletional tolerance of alloreactive T cells did not contribute significantly to tolerance identifying the transferred Tregs as major mediators of long-term tolerance. In addition for maintenance of tolerance the local presence of alloantigen-specific Tregs was sufficient and presence of these cells in secondary lymphoid compartments was not needed. Foxp3 transduced Tregs exhibited a stable phenotype even under lymphopenic and inflammatory conditions. Furthermore adoptive Treg therapy was safe and no transformation was observed. Constant expression from the integrated *foxp3* locus was needed, as the endogenous *foxp3* locus remained methylated despite expression of endogenous Foxp3.

The results prove that large numbers of stable alloantigen-specific Tregs can be generated from a polyclonal repertoire of naïve T cells. This is the first time that allotolerance was achieved in a non-lymphopenic transplantation model using skin grafts in an immunogenic strain combination. Therefore, antigen-specific Tregs might have a huge therapeutic potential after solid organ transplantation.

Keywords: Tregs; tolerance; transplantation

Kapitel 1 Einleitung

Angeborene und adaptive Immunität

Das Immunsystem hat seine Zuständigkeit in der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien und Parasiten, aber auch entarteten körpereigenen Zellen. Man unterscheidet eine angeborene und eine erworbene Immunität. Die angeborenen Immunmechanismen sind ererbt, antigenunabhängig und damit relativ unspezifisch. Sie erfolgen als erstes und dienen der Rekrutierung weiterer Immunzellen zum Infektionsort, deren Aktivierung und Aktivierung der Zellen der adaptiven oder erworbenen Immunantwort. Die adaptive Immunantwort ist antigenspezifisch. Die Antigenpezifität der beteiligten Zellen muss sich jedoch erst entwickeln. So bildet jede B-Zelle ihren eigenen B-Zellrezeptor und jede T-Zelle ihren eigenen T-Zellrezeptor (TCR) aus. Anschließend werden die Zellen aufgrund ihrer Spezifität selektiert und zirkulieren dann als naive B- bzw. T-Zellen durch den Organismus. Im Verlauf einer Infektion werden die B- und T-Lymphozyten, die Antigene eines Pathogens erkennen können, aktiviert und expandieren daraufhin klonal (Quintans und Lefkovits 1974). Hinzu kommt, dass sich beim adaptiven Immunsystem ein Gedächtnis entwickelt, so dass bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen die Immunantwort sehr viel schneller und effektiver ausfällt (Babich 1965; Nossal 1965; Schmitt 1965). Vermittelt wird die antigenspezifische Antwort durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) der angeborenen Immunität. Hierbei handelt es sich vor allem um dendritische Zellen (DC), B-Zellen und Makrophagen. Makrophagen und DC sind somit beteiligt, die adaptive Immunantwort zu initialisieren. Sie phagozytieren Pathogene durch Pinozytose (Inaba 1990), Makropinozytose (Sallusto 1995), Phagozytose (Reis e Sousa et al., 1993) oder Endozytose über FC-Rezeptoren (Radoux 1985), prozessieren sie (Brown 1991) und präsentieren Peptidbruchstücke an der Zelloberfläche mit Hilfe der beiden Haupthistokompatibilitätskomplexe I und II (MHC, major histocompatibility complex), was als Antigenpräsentation bezeichnet wird (Falk 1990; Rotzschke 1990). Die Antigen-Erkennung beinhaltet direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen dem TCR einer T-Zelle und dem MHC-Peptid-Komplex einer APC (Roosnek 1988). Der Proteinkomplex MHC-Klasse II (Major histocompatibility complex) wird von CD4⁺ exprimierenden T-Helferzellen erkannt, der MHC-Klasse I Komplex von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Die Gene für MHC werden im humanen System als HLA (Humanes Leukozyten Antigen) bezeichnet. Eine naive T-Zelle kann nur vollständig aktiviert werden, wenn sie neben dem ersten Signal über MHC:TCR-Interaktion, noch ein zweites, kostimulatorisches Signal erhält (Jenkins 1991; Schwartz 1992; Bluestone 1993; Lenschow 1993). Eine T-Zelle, die nur das erste Signal über den TCR ohne gleichzeitige Kostimulation bekommt, wird nicht aktiviert sondern anerg, d.h. auch bei erneuter Stimulation mit erstem und zweitem Signal ist die T-Zelle nicht mehr aktivierbar (Gimmi 1993; Maier und Greene 1998). Dieser Mechanismus ist wichtig für den Organismus, um die periphere Toleranz gegen Autoantigene aufrecht zu erhalten, denn nicht alle autoreaktiven Thymozyten werden durch die zentrale Toleranz eliminiert (King 1994). Die Aktivierung der APC, notwendig zur Initialisierung der primären oder sekundären Immunantwort, kann durch

endogene oder exogene Gefahrensignale induziert werden (Gallucci und Matzinger 2001). Endogene Gefahrensignale, sogenannte DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) können durch geschädigtes oder gestresstes Gewebe oder nekrotische Zellen vermittelt werden. Hierbei handelt es sich u. a. um Hitzeschockproteine, Nukleotide oder Zytokine, wie die Interferone (IFN) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Oettgen 1980; Cumberbatch und Kimber 1992). Zu den exogenen Gefahrensignalen gehören z.B. Zellwandbestandteile von Bakterien wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Proteoglykane, Flagellin oder bakterielle DNA. Diese Moleküle, PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*), haben hochkonservierte Struktur motive (Bianchi 2007). Sie werden überwiegend über die Toll-like-Rezeptoren (TLR) (Yamagata 1994; Rock 1998) der Zellen erkannt. TLRs gehören zu den *pattern recognition receptors* (PRR). Dies sind Moleküle, die zur angeborenen Immunität gehören und eine große Rolle bei der Aktivierung von Entzündungsreaktionen spielen.

Die Bedeutung der T-Zellen im Immunsystem

Die Vorläufer T-Lymphozyten migrieren aus dem Knochenmark in den Thymus zur Reifung. Haben die Zellen eine zu geringe Anzahl hochaffiner TCR-Interaktionen zu Selbst-MHC-Molekülen werden sie beseitigt. Nur wenn die Erkennung mit einer hohen Anzahl von TCR-Interaktionen mit niedriger Affinität erfolgt, werden diese zunächst noch CD4⁺CD8⁺ doppelpositiven Zellen positiv selektioniert und differenzieren sich entweder zu CD4⁺ oder CD8⁺ einzelpositiven T-Zellen (Williams 1999; Love 2000). Im Anschluss werden selbst-reaktive Zellen mit hoher Avidität zu Selbstantigenen durch negative Selektion deletioniert (Fowlkes 1988). Nach Abschluss der Maturation treten die T-Zellen in den Blutkreislauf ein, um dann in die peripheren lymphoiden Organe einzudringen. Die Zellen zirkulieren ständig zwischen Blut und lymphoidem Gewebe und scannen APC nach Antigen ab. Durch Lymphgefäße werden sie dem Blutstrom wieder zugeführt. DC nehmen in der Peripherie Antigen auf und wandern durch die afferenten Lymphgefäße zu den drainierenden Lymphknoten. Dort präsentieren die DC den rezirkulierenden T-Zellen Antigen. Im Falle einer Infektion erkennen die Lymphozyten ihr Antigen, werden dann im Lymphknoten retiniert und aktiviert und beginnen zu proliferieren. Das bedeutet, dass nur die Lymphozyten aktiviert werden, proliferieren und differenzieren, deren Rezeptoren ihr Antigen erkannt haben und ein zusätzliches Kostimulationssignal erhalten haben. Dieser Prozess, Selektion genannt, hat eine klonale Expansion zur Folge (Howard und Wilson 1974; Kamat und Henney 1975). Nach Antigenerkennung stoppt die T-Zelle die Migration, vergrößert sich und beginnt sich zu teilen. Dann beginnt die Differenzierung zu einer Effektorzelle. Unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie Typ I Interferon oder IL-1, IL-12 entwickelt sich eine CD4⁺ T-Zelle zu einer TH1-Zelle (T-Helfer). Diese produziert Zytokine (u.a. IFN- γ und IL-12) und rekrutiert und aktiviert u.a. zytotoxische T-Zellen, die das Oberflächenmolekül CD8 tragen. Diese erkennen und zerstören viral, bakteriell, protozoeninfizierte Zellen sowie Tumorzellen und fremde Zellen, wie z.B. auch solche aus Transplantaten, indem sie ihre Apoptose einleiten. Unter Einwirkung von Zytokinen wie IL-4 entstehen TH2-Zellen. Sie rekrutieren und aktivieren die humorale Immunität z.B. gegen Würmer und Toxine, spielen aber auch eine Rolle bei der chronischen Transplantatabstoßung. Des-

weiteren kann es zu einer Differenzierung der CD4⁺ Zellen in TH3, TH9, TH17, TH22, TFH und regulatorischen T-Zellen (Tregs) kommen (Abb. 1). Effektoren haben eine limitierte Lebensdauer und gehen nach der Infektion zum Großteil in Apoptose, um die Homöostase zu erhalten. Eine ganz wichtige T-Zellpopulation stellen die Gedächtnis-T-Zellen (*memory* T cells) dar. Nach erfolgreicher Bekämpfung einer Infektion klingt die Inflammation ab, wobei einige wenige spezifische *memory* T-Zellen dauerhaft im System verbleiben, um bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Pathogen schneller und effizienter reagieren zu können, da sie eine viel geringere Aktivierungsschwelle als naive T-Zellen und die Fähigkeit zur Reaktion auf niedrig affine Interaktionen bei Antigenkontakt haben (Sallusto 1999; Rogers 2000). Sie sind somit für eine immerwährende, lebenslange Immunität verantwortlich. Jede T-Zelle exprimiert einen eigenen, antigenspezifischen TCR. Lymphozyten des adaptiven Immunsystems haben die außerordentliche Fähigkeit zwischen körpereigenem und -fremdem Material zu unterscheiden (Selbst- und Fremdan-tigen bzw. syngen und allogene). Dabei können Sie gegen Pathogene kämpfen und gleichzeitig Toleranz allen körpereigenen Zellen gegenüber gewähren. Dabei muss eine gute Balance zwischen Autoimmunität und Pathogen-Verteidigung durch zellintrinsische als auch -extrinsische Prozesse erhalten bleiben.

Mechanismen der Toleranz

Die zentrale Toleranz sorgt dafür, dass selbstreaktive T-Zellen den Thymus nicht verlassen, indem sie negativ selektioniert werden, wenn die Affinität der Interaktion vom TCR mit ihrem MHC/Selbst-Peptid Komplex zu hoch ist (Hogquist 2005). Thymozyten mit niedriger Affinität für Selbstantigen entgehen der negativen Selektion und gelangen in die Peripherie. Dort werden sie durch periphere Toleranzmechanismen kontrolliert, welche auch Immunreaktionen gegen Fremdan-tigen regulieren. Erhalten Zellen in der Peripherie nicht genügend Überlebenssignale über ihren TCR oder durch die Zytokine IL-7 und IL-15 oder binden zwar ihren MHC-Peptid-Komplex, erhalten aber keine kostimulatorischen Signale, werden sie anerg oder gehen in Apoptose (Stockinger 1999). Dieser Mechanismus wird als deletionale oder rezessive Toleranz bezeichnet (Wells 2001). Inadäquate TCR-Signale terminieren so die Lebensdauer einer naiven T-Zelle, die kein spezifisches Antigen gebunden hat und die einer aktivierten Effektorzelle, wenn eine Infektion abgeklungen und kein stimulierendes Antigen mehr vorhanden ist. Andernfalls können effektorische T-Zellen durch regulatorische Zellen supprimiert und dadurch ebenfalls entweder in Apoptose oder den Zustand der Anergie geschickt werden, was die dominante Toleranz kennzeichnet (Rudensky 2005). Die wichtigste Population der regulatorischen T-Zellen sind die CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs. Das Immunsystem hat also Mechanismen entwickelt, eigenes von Fremdmaterial unterscheiden und in adäquatem Maß auf das Fremdmaterial reagieren zu können.

Foxp3-Tregs

Induktion und Mechanismen

Die Bedeutung von FOXP3 Tregs der beschriebenen Immunhomöostase zeigt sich in Erkrankungen, bei welchen FOXP3 Tregs fehlen. Durch eine spontane Missense-Mutation im *foxp3*-Locus entstehen sogenannte scurfy-Mäuse, die eine fatale lymphoproliferative Störung mit vergrößerter Milz und Lymphknoten, als auch eine schwere Anämie zeigen (Brunkow 2001; Schubert 2001). Der Mensch leidet durch die selten auftretende FOXP3-Disfunktion am IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) (Bennett 2001; Wildin 2002), die charakterisiert ist durch Dermatitis, Kachexie (Ausmagerung), Wachstumsstörung, Autoimmunenteropathie, Typ I Diabetes, chronische Inflammationen wie Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis mit exzessiver Zytokinproduktion, die zur Thyreoiditis führen kann, sowie einer autoimmun-hämolytischen Anämie. Der Grund für die fehlende FOXP3-Funktion sind entweder Missense-Mutationen in der DNA-Bindedomäne innerhalb des *foxp3*-Gens, oder eine Mutation außerhalb dieser Region (Wildin 2001, Bennett 2001). Bisher sind etwa 20 verschiedene solcher Mutationen bekannt. Das *foxp3*-Gen liegt auf dem X-Chromosom und wird rezessiv vererbt. Menschen mit diesen Anomalien sind derzeit auf immunsupprimierende Therapien oder eine allogene Stammzelltransplantation angewiesen. FOXP3 ist in der Entwicklung und Funktion von Tregs nachweislich lebenslänglich von großer Relevanz und nicht nur in der frühkindlichen Phase, während der Entstehung des Immunsystems. Denn die akute Depletion von Foxp3⁺ Tregs führt zu einer schnellen letalen autoimmunen Erkrankung in erwachsenen Mäusen (Kim 2007; Chinen 2010). Regulatoren werden vor allem über die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 in der Maus (Brunkow, Jeffery et al. 2001; Schubert, Jeffery et al. 2001; Hori 2003) bzw. FOXP3 im humanen Immunsystem (Bennett, Christie et al. 2001; Wildin, Smyk-Pearson et al. 2002) definiert, da er als der spezifischste in Maus und Mensch erachtet wird. Die Foxp3-Expression ist in der Maus fast ausschließlich auf regulatorische T-Zellen beschränkt (Hori, Nomura et al. 2003), im humanen Organismus aber nur der überwiegende Teil. Durch TCR-Stimulation und -Aktivierung der Zellen kann FOXP3 auch in nicht regulatorischen T-Zellen auf niedrigem Niveau induziert werden (Mantel 2006).

In der Peripherie von gesunden Mäusen befinden sich etwa 5-15% (Suri-Payer 1998; Itoh 1999), beim Menschen 1-5% regulatorische T-Zellen (Stephens 2001). Bei den CD4⁺ T-Zellen unterscheidet man bisher vier verschiedene Populationen von Regulatoren: natürliche Tregs (nTregs, CD25⁺Foxp3⁺), induzierte Tregs (iTregs, CD25⁺Foxp3⁺), Tr1 bzw. Th3 (CD25⁻Foxp3⁻, Abb. 1). Sie fungieren als Suppressoren diverser Nichtregulatoren wie CD4⁺-Effektoren, CD8⁺-, DC, B-, NK-, NKT-Zellen, Makrophagen und Mastzellen.

Natürliche Tregs (nTregs) entwickeln sich kontinuierlich im Thymus kontrolliert selektioniert über hoch-avide MHC Klasse II-abhängige TCR-Interaktionen (Jordan 2001; Sakaguchi 2001; Apostolou 2002; Fontenot 2005) und migrieren dann ins periphere Gewebe (Josefowicz und Rudensky 2009). Dort sind sie für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gegen Selbst verantwortlich. Die Bedeutung der Entwicklung dieser Zellen wurde in Studien deutlich, in denen die neonatale Thymektomie, aufgrund der verspäteten Erzeugung und des Exports von Tregs aus dem Thymus, zu multiplen Autoimmunerkrankungen führte (Asano 1996; Fontenot 2005). Es gibt aber auch T-Zellen, die in der Peripherie erst zu Tregs indu-

ziert werden. Diese iTregs tauchen u.a. in den mesenterischen Lymphknoten während der Induktion der oralen Toleranz auf (Mucida 2005; Coombes und Maloy 2007). Sie differenzieren sich in den sekundären lymphoiden Organen und Geweben, wie zum Beispiel in der Lamina propria des Darms als Antwort auf Mikroben- oder Lebensmittel-Antigene (Sun 2007), in chronisch entzündetem Gewebe (Curotto de Lafaille 2008), in transplantierten (Cobbold 2004) oder tumorösen (Liu 2007) Organen. Das exakte Umfeld, das iTregs zur Differenzierung benötigen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber es ist bekannt, dass die Entwicklung von Foxp3⁺ iTregs einer TCR-Stimulation und CD28-Kostimulation bedarf (Salomon 2000; Hsieh 2004) und von den Zytokinen TGF-β und IL-2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* abhängig ist (Fu 2004). Tregs selbst können kein IL-2 produzieren, benötigen es aber, um Foxp3 stabil zu exprimieren und somit ihren regulatorischen Phänotyp zu erhalten (Thornton 2004; Sakaguchi 2006).

Aus naiven CD4⁺ T-Zellen können sich, außer den bereits beschriebenen Zellpopulationen, auch Tr1-Zellen differenzieren. Ob des Weiteren die beschriebenen Th3 noch eine eigene Subpopulation bilden oder in die iTregs und Tr1-Zellen mit einzugliedern sind, ist in der Diskussion. Tr1-Zellen sind Foxp3-negative regulatorische T-Zellen und entwickeln sich zu funktionellen Suppressoren in der Peripherie im Milieu des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und tragen so zur antigenspezifischen supprimierenden Immunantwort bei (Bluestone und Abbas 2003; Roncarolo 2006). Gleichzeitig regeln sie IFN-γ, TNF-α, GM-CSF und IL-5 herunter (Chai 2008).

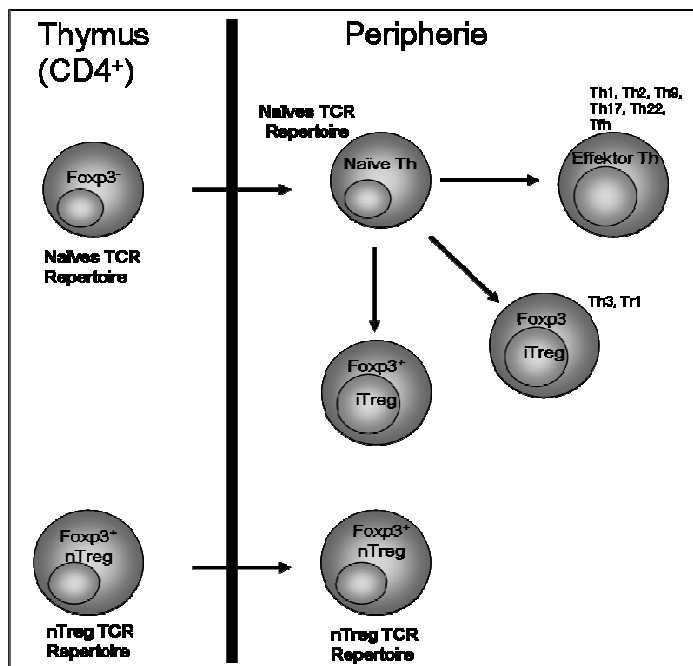


Abb. 1 : Entwicklung von effektorischen und regulatorischen T-Zellen. (Curotto de Lafaille und Lafaille 2009)

Funktion der natürlichen und induzierten Foxp3-Tregs

Immunantworten sind sowohl quantitativ als auch qualitativ darauf ausgelegt, eine optimale Abwehrleistung zu erzielen ohne den Organismus zu schädigen. So können die unterschiedlichsten Krankheitserreger erfolgreich bekämpft, die natürliche Tendenz zur Autoimmunität unter Kontrolle gehalten und die Lymphozyten-Effektorpopulationen durch homöostatische Prozesse in ausreichender Anzahl und Funktionsfähigkeit bereitgestellt werden. Die Kontrollmechanismen, welche diesen Aufgaben zugrunde liegen,

sind komplex und schließen für die Regulation autoreaktiver T-Zellen unterschiedliche Mechanismen ein. Die Details, wie Tregs ihre regulatorische bzw. supprimierende Arbeit verrichten, sind noch nicht lückenlos aufgeklärt. Aber klar ist, dass es sich um Mechanismen handelt, die durch direkten Zell-Zell-Kontakt zu Zellzyklusarrest, Apoptose (Ren 2007), Anergie oder fehlende Aktivierung von peripheren inflammatorischen APC, T-Zellen, B-, NK-, NKT-Zellen, Makrophagen und Mastzellen (Eroukhanoff 2009) führen (Abb. 2). Die Ausschüttung der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 (Asseman 1999), IL-35 und TGF- β (Rubtsov 2008) führen zu APC-Dysfunktion und T-Zell-Anergie. Einen weiteren supprimierenden Effekt stellt die Konkurrenz zwischen Tregs und Teffs um IL-2 dar, wobei Tregs durch Expression des 100fach höher affinen IL-2 Rezeptors Selektionsvorteile haben, während die Teffs durch den entstandenen Mangel anerg werden (de la Rosa 2004; von Boehmer 2005; Pandiyan 2007). Außerdem inhibieren Tregs die Induktion von IL-2-mRNA in Zielzellen (Thornton und Shevach 1998). Über den Perforin-Granzym-Weg können Tregs direkt Apoptose in T-Zellen einleiten (Grossman 2004; Gondek 2005). Des Weiteren können murine CTLA-4⁺ Tregs (cytotoxisches T-Lymphozyten Antigen-4 bzw. CD152) über CD80/86 in APC die Apoptose und Anergie in T-Zellen induzieren (Fallarino 2003; Paust und Cantor 2005). Die Interaktion von CTLA-4 und CD80/86 führt dabei auch zur Expression von Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in dendritischen Zellen, wodurch aufgrund des resultierenden Tryptophanmangels in der Umgebung die Aktivierung von T-Zellen verhindert wird (Mellor 2004). Tregs exprimieren auf ihrer Oberfläche Galectin-1, ein Beta-Galactosid-Bindeprotein, das Zellmatrix- und Zell-Zell-Interaktionen verhindert. Galectin-1 bindet an diverse Zielzellen und induziert somit Zellzyklusarrest und Apoptose (Garin 2007). Zudem können Lag-3 (Lymphocyte-activation gene, CD223) und FGL2 (Fibrinogen like protein 2), beide an der Oberfläche von Tregs exprimiert, an das MHC II bzw. Fc γ RIIB von DC binden und diese an ihrer Reifung hindern (Liang 2008; Shalev 2008). CD39, ein Treg-Oberflächenmarker hydrolysiert ATP (Adenosintriphosphat) zu AMP (Adenosinmonophosphat), was die Verfügbarkeit von ATP-abhängigen proinflammatorischen Signalketten verringert (Borsellino 2007).

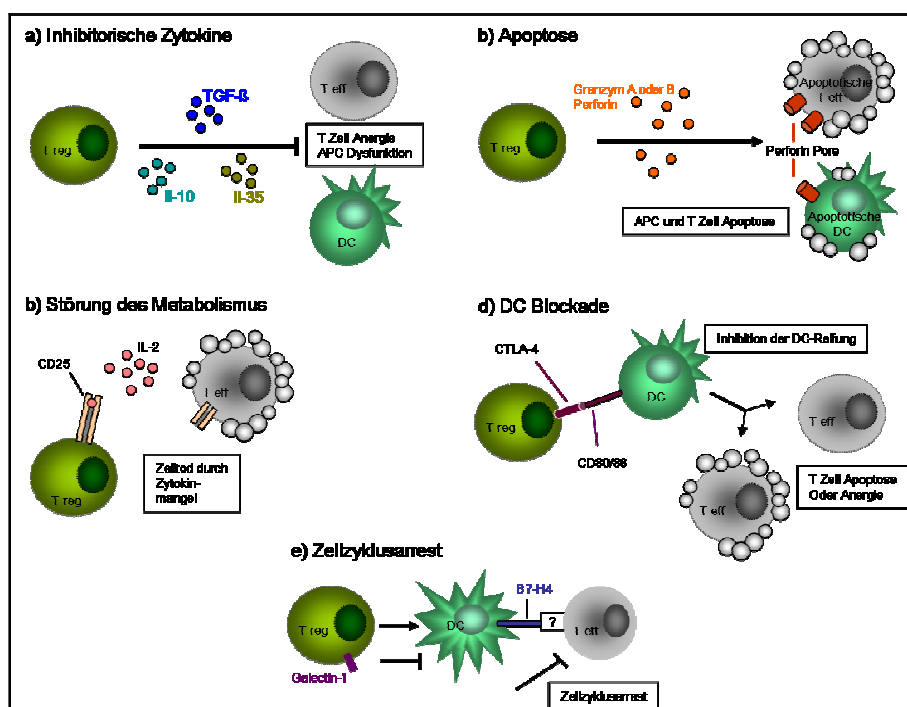


Abb. 2.: Darstellung der Suppressionsmechanismen von Tregs. a) Supprimierende Wirkung von Tregs auf Teffs mittels inhibitorischer Zytokine b) Tödliche Wirkung von Tregs auf Teffs durch Einleiten von Apoptose c) Zelltod der Teffs durch Konkurrenz um das lebenswichtige Zytokin IL-2 d) Durch CTLA-4-CD80/86-Bindung blockieren Tregs die Reifung von antigenpräsentierenden Zellen, den DC e) Tregs leiten den Zellzyklusarrest in effektorischen T-Zellen ein. (Grafik modifiziert nach (Zou 2006; Issa und Wood 2010)

Stabilität und Antigen-spezifität von Tregs

Natürliche und induzierte Tregs sind bisher phänotypisch nicht voneinander unterscheidbar, da sie die gleichen Marker aufweisen (Horwitz 2008). Der Prozentsatz an induzierten Tregs im CD4⁺ Repertoire in der Peripherie ist daher unbekannt. Wahrscheinlich ist aber, dass dieser unbeständig ist und in Abhängigkeit seines Milieus stets Schwankungen unterliegt, weil iTregs in spezieller inflammatorischer Umgebung entstehen, u.a. im Darm, wo die orale Toleranz eine wichtige Rolle spielt (Hadis 2011). Unterschiede in Überlebensrate, Antigen-spezifität und Stabilität sind bekannt, was die Möglichkeit nicht ausschließt, dass nTreg und iTregs separate Funktionen in der adaptiven Immunantwort haben. Eine Differenzierungsmethode zwischen nTreg und iTreg könnte durch den kürzlich entdeckten Transkriptionsfaktor Helios erfolgen. Dabei fand man die Expression von Helios auf im Thymus entstandenen Foxp3⁺ Zellen, aber nicht auf iTregs. Interessanterweise waren 70% der peripheren Tregs Helios⁺. Bis zu 30% der Tregs in der Peripherie könnten somit iTregs sein (Thornton 2010). In punkto Stabilität und Potenz scheinen nTregs und iTregs nicht identisch. Sind durch die Induktion von Foxp3 einmal iTregs entstanden, ist dessen kontinuierliche Expression essentiell, um Phänotyp und Funktion zu erhalten. Das wurde in Mausmodellen demonstriert, in denen die Deletion von Foxp3 in einem effektorischen T-Zell Phänotyp resultierte (Williams und Rudensky 2007). Kritisch für die Stabilität des Treg-Phänotyps scheint dabei der Demethylierungs-Zustand mehrerer CpG-Motive in der 5'Region des Foxp3-Promotors zu sein. Ein erhöhter Demethylierungsgrad korreliert mit einer stabilen Foxp3-Expression (Polansky und Huehn 2007; Polansky 2008). Dabei ist das TSDR (*Treg specific demethylated region*) in naiven und aktivierten CD4⁺ T-Zellen stark methyliert, während iTregs partiell und nTregs komplett demethyliert sind (Polansky, Kretschmer et al. 2008; Lal 2009). Studien zeigten, dass nTregs die stabileren und potenteren Suppressoren sind (Gupta 2008), eventuell weil sie kontinuierlich der Stimulation durch Selbstantigen ausgesetzt sind. Allerdings fand man zumindest in der Maus, dass sich nTregs durch das Zytokin IL-6 in IL-17 produzierende Effektoren verwandeln können (Min 2003), während iTregs resistent zu sein schienen (Zheng 2008). Es gibt allerdings auch Studien, in denen in Abhängigkeit von TGF- β und IL-2 induzierte Tregs keine verlässlichen Suppressoren darstellen, da sie die Expression von Foxp3 verloren hatten (Beres 2011). Möglich ist, dass iTregs wiederholte und beständige Antigenerkennung benötigen, um stabile Regulatoren zu bleiben.

Die beiden Treg-Populationen differieren jedoch auch in ihrer Antigen-spezifität und erforderlicher Stärke der TCR-Stimulation. Während nTregs hochaffine Interaktionen mit Selbst-Peptid-MHC-Komplexen und starke CD28 Kostimulation benötigen (Jordan, Boesteanu et al. 2001; Tai 2005), bedarf es bei der Konversion von iTregs in der Peripherie schwächerer, suboptimaler TCR-Stimulation durch Antigen aus der Umgebung und die reaktiven Zellen teilen sich weniger häufig (Kretschmer 2005). So geht man davon aus, dass ihr TCR-Repertoire dem naiver konventioneller T-Zellen entspricht, wobei es diesbezüglich kontroverse Studien gibt (Pacholczyk 2006). Obwohl eine suboptimale CD28-Kostimulation die Konversion zu iTregs erleichtert, ist hauptsächlich die Kostimulation durch CTLA-4 notwendig, da diese Tregs nicht in CTLA-4-defizienten Mäusen entstehen (Zheng 2006).

Weitere Moleküle zur Charakterisierung von Tregs

Die humane FOXP3-Expression ist in nTregs konstitutiv hoch, kann aber auch in anderen T-Zellen nach Aktivierung gesteigert werden. Charakteristisch für Regulatoren sind ferner eine hohe Expression von CD25, der IL-2-Rezeptor- α -Kette, CTLA-4 und GITR (glucokorticoinduziertes TNFR), die aber auch auf aktivierten Nichtregulatoren zu finden sind. Außerdem sind murine Tregs gekennzeichnet durch die Expression von CD45RB^{low}, humane Tregs durch CD45R0 (Powrie 1994). Des Weiteren lassen sich Tregs durch eine niedrigere Expression des IL-7R α (CD127) von Effektoren unterscheiden (Liu 2006). Da keine der Marker ausschließlich von einzelnen Populationen exprimiert werden, macht das die eindeutige Identifizierung von Regulatoren problematisch. GARP (glycoprotein-A repetitions predominant oder LRRC32= leucine-rich repeat containing 32) wird hingegen ausschließlich auf aktivierten humanen nTregs und nicht auf aktivierten Teffs exprimiert (Tran 2009). Das Gen befindet sich in einer Region, die in Maus und Mensch konserviert ist. GARP ist ein Oberflächenmolekül, bestehend aus einer kurzen cytoplasmatischen und einer Transmembran-Region und einer Zelloberflächen-Rezeptor-Domäne, die eine Reihenfolge gleicher leucinreicher (LRR) Motive enthalten. GARP wird für die Expression von TGF- β benötigt, da dieses nur durch LAP (*latency associated peptide*) in den aktiven Zustand übergeht. GARP ist wahrscheinlich für den Transport von LAP verantwortlich (Stockis 2009).

Andere regulatorische Zellen

In den letzten Jahren wurden weitere Subpopulationen mit regulierendem Phänotyp entdeckt. Außer CD4 exprimierenden Tregs existieren CD8⁺CD28⁻ Zellen mit der Fähigkeit zur Immunsuppression (Najafian 2003). Regulationspotenzial scheinen auch $\gamma\delta$ -TCR⁺ T-Zellen aufzuweisen (Nagaeva 2002), sowie CD8⁺ veto Zellen (Kronin 1997). Außerdem ist eine doppeltnegative Treg-Fraktion (DN T-Zellen) bekannt, die weder CD4 noch CD8 exprimiert, aber supprimierende Wirkung in Maus und auch Mensch zeigt (Zhang 2000). Einen wichtigen Beitrag zur Immunregulation leisten auch NKT-Zellen (Sharif 2002; Sharif 2002). Diese speziellen Zellen unterscheiden sich trotz des Vorhandenseins eines TCR von T-Zellen. Sie exprimieren NK-Zell-typische Oberflächenmarker und können gleichzeitig entweder einen CD8 oder CD4 Ko-rezeptor tragen, oder auch doppelt negativ für beide sein. Ihre Aktivierung wird nicht über den klassischen MHC-Komplex ausgelöst. Der TCR der bekanntesten Subpopulation besteht aus einer invarianten α -Kette in Kombination mit drei verschiedenen β -Ketten, die an ein MHC-ähnliches Molekül CD1d bindet, welches nicht Peptide, sondern Glycolipide präsentiert (Bendelac 1995; Zou 2006; Issa und Wood 2010).

Die Immunreaktion nach der Organtransplantation

Klinische Immunsuppression

Im Gegensatz zu genetisch identischen (syngenen) Individuen führt eine Transplantation bei sich unterscheidenden allogenen immunkompetenten Individuen in der Regel zu einer Immunantwort gegen das Transplantat, d.h. zu einer Abstoßung. Diese ist charakterisiert durch Inflammation des umliegenden Gewebes, Infiltration von reaktiven T-Zellen mit Effektorfunktion im Transplantat und letztlich zur Apoptose/Nekrose, wobei das Gewebe des Transplantats direkt angegriffen und zerstört wird, weil es zu einem Aufeinandertreffen von Donor- und Rezipientenzellen kommt. Kursierende T-Zellen erkennen auf direk-

tem Weg Fremd-Antigen auf körperfremden Donor-APC, die in die drainierenden Lymphknoten gelangt sind. Dies resultiert in der Rekrutierung von Th1- und Th17-Zellen in das Transplantat (Afzali 2007) und der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ . Möglicherweise führt der direkte Erkennungsweg nur zur Initiierung der Alloreaktion, ist aber nicht allein in den Abstoßungsvorgang involviert. Dafür könnte im Verlauf der indirekte bzw. semidirekte Weg verantwortlich sein, der erst im zweiten Teil des Inflammationsprozesses zur Wirkung kommt, da die Präkursorfrequenz alloreaktiver T-Zellen mit indirekter Antigenerkennung initial gering ist. Bei der „indirekten“ Antigenerkennung nehmen die Wirts-APC nekrotisches und/oder apoptotisches Fremdmaterial auf, prozessieren es zu Peptid und präsentieren dieses über ihr eigenes MHC ihren T-Zellen (Lechler 1982). Dies geschieht vornehmlich durch CD4⁺ T-Zellen. Die indirekte Alloantwort durch CD8⁺ Zellen erfolgt über „*cross-priming*“, wobei APC Donorproteine prozessieren und diese in Peptidform auf eigenen MHC Klasse I Molekülen präsentieren (Valujskikh 2002). Beim „semidirekten“, auch „Drei-Zell“ Modell genannt, kommt es zwischen Wirts- und Fremd-APC zu Zell-Zell-Kontakt, wobei nekrotische und apoptotische Komponenten der Membran transferiert werden können und so auf direktem Weg auf Empfänger-APC präsentiert werden (Herrera 2004; Smyth 2006). Fremd-APC entlassen außerdem kleine Vesikel, sogenannte Exosomen, die Allo-MHC enthalten und mit der Membran des Wirts-APC fusionieren. Das nun chimäre Wirts-APC stimuliert den direkten Erkennungsweg. Auf dem semidirekten Signalweg werden sowohl intakte MHC-Klasse I Moleküle direkt als auch internalisierte, prozessierte Donor-MHC-Moleküle als Peptide indirekt präsentiert (Abb. 3). Die prozessierten Donorantigene, die im Transplantat von den wirtseigenen APC präsentiert werden, aktivieren zugleich zytotoxische T- und alloreaktive B-Zellen, die wiederum donorspezifische Antikörper produzieren. Dies resultiert schließlich in einer Abstoßung, welche sich meist schnell entwickelt und steroidsensitiv ist (akute Abstoßung). Eine Immunreaktion kann sich aber auch erst langsam entwickeln und ist schwierig zu therapieren, was als chronische Abstoßung definiert wird. Hypothesen besagen, dass die indirekte Alloerkennung der forcierende Mechanismus für die chronische Abstoßung ist (Lechler 2005). Die Stärke der akuten Alloantwort liegt wahrscheinlich an der hohen Frequenz von T-Zellen mit direkter Spezifität (8-12% aller T-Zellen) (Baker 2001), während nur eine erheblich kleinere Anzahl an T-Zellen mit indirekter Spezifität im T-Zellrepertoire besteht.

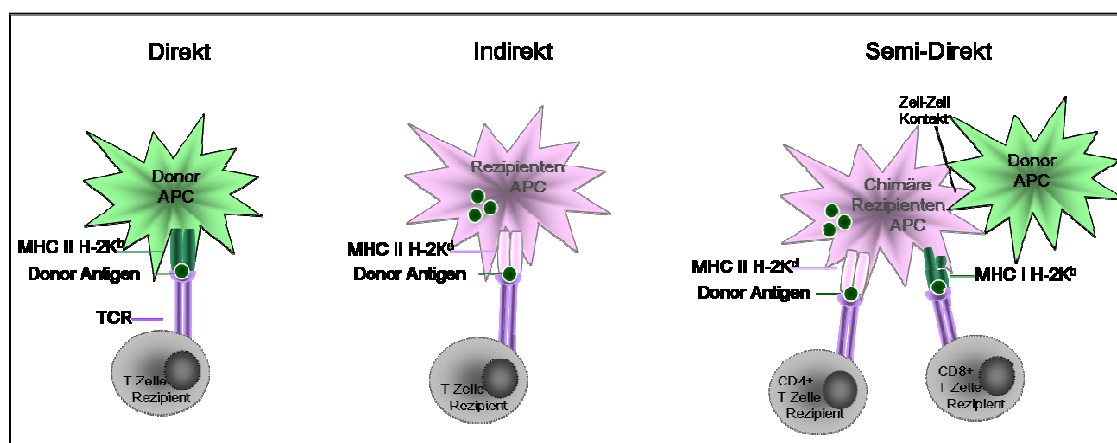


Abb. 3: Modell zur Darstellung der Unterschiede zwischen direkter, indirekter und semidirekter Antigenerkennung. (Modifiziert nach (Safinia 2010))

Immunsuppressiva wurden entwickelt aufgrund ihrer Fähigkeit, T-Zellen zu beseitigen oder Moleküle zu besetzen, die an der Signalkaskade der Lymphozyten- und APC-Aktivierung beteiligt sind. Seit fast zwanzig Jahren werden in der Autoimmun- und Transplantationstherapie Calcineurin-Inhibitoren als Immunsuppressoren verabreicht, die die akute Transplantatabstoßung reduzieren und die Akzeptanz des Transplantats erhöhen. Calcineurin ist ein Enzym, das maßgeblich an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist (Clipstone und Crabtree 1992). Tacrolimus (FK506) und Cyclosporin A sind Immunmodulatoren, die die Wirkung von Calcineurin hemmen (Borel 1976; Kino 1987). Diese werden auch in Kombination oder als Alternative zu Glucocorticoiden angewendet, da diese die Makrophagenfunktion und Zytokinproduktion hemmen und T-Zellapoptose induzieren können. Azathioprin, das durch DNA-Inkorporation die B- und T-Zellproliferation hemmt, sowie Mycophenolat-Mofetil (MMF) sind weitere Medikamente, die in der Transplantationsmedizin häufig Anwendung finden. Das Immunglobulin Alemtuzumab (Campath-1H) ist ein CD52⁺ Leukozyten depletierender Antikörper, der unspezifisch potenziell alloreaktive T-Zellen vernichtet und häufig zur Therapie nach Lungen- und Nierentransplantationen eingesetzt wird (Clatworthy 2009). Sirolimus (Rapamycin) und sein Derivat Everolimus werden ebenfalls zur Inhibition der T-Zellproliferation eingesetzt, da sie den mTOR-Signalweg (*mammalian target of rapamycin*) blockieren. Sie alle sind vor allem in der Posttransplantationsperiode wichtig, wenn die Inflammation besonders stark ist. Problematisch sind aber die Nebenwirkungen, die sich nach längerer Einnahme zeigen, wie Nephro- und Neurotoxizität und Wundheilungsstörungen, da die Wirkungsweise genereller und nicht spezifischer Natur ist. Ein fortwährend unterdrücktes Immunsystem birgt außerdem eine erhöhte Gefahr, da es seine Funktion nicht ausüben kann. So steigen das Risiko von Infektionen und die Anfälligkeit für Krebserkrankungen, da die malignen Zellen vom unterdrückten Immunsystem nicht ausreichend angegriffen werden können. Wenn auch die akuten Abstoßungsreaktionen durch die Medizin relativ erfolgreich therapierbar sind, so stellt die chronische Abstoßung nach wie vor ein großes Problem dar. Deswegen hat sich die Aufmerksamkeit auf neue immunsuppressorische Präparate gerichtet, deren Wirkung spezifischer und weniger toxisch sein sollten. In diese Richtung führen zum Beispiel die Antikörper Basiliximab und Rituximab, die selektiv CD25 exprimierende T-Zellen bzw. CD20 exprimierende B-Zellen depletieren oder ihre Aktivität modulieren.

Allotoleranz in Tiermodellen

Im Transplantationsfeld bekommt Toleranz somit eine wichtige Bedeutung, da die Immunantwort durch den riesigen Pool an allospezifischen T-Zellen und Alloantigenen prinzipiell erst dann beendet wird, wenn das Transplantat und damit das Antigen abgestoßen ist. Dies zu verhindern und auf relativ natürliche Weise Toleranz gegenüber „fremd“ zu induzieren, ist ein Mittelpunkt heutiger immunologischer Forschung. In der humanen und murinen Transplantation gibt es gelegentlich Individuen, die spontan ihr Transplantat ohne Immunsuppression akzeptieren (operationale Toleranz), was beweist, dass das Konzept der immunologischen Toleranz existiert. Das große Ziel bei der Transplantation und auch Therapie von Autoimmunerkrankheiten ist demzufolge, die natürlichen Regulationsmechanismen zu verstehen und sie im Körper zu induzieren und zu amplifizieren. Entscheidend dabei ist die gezielte Hemmung einer Immunantwort gegen Donoralloantigene, ohne die lebenslängliche Verabreichung von Immunsuppressiva. Toleranz kann also definiert werden über Reaktionslosigkeit gegen Selbstantigen oder Akzeptanz

eines Transplantats in Abwesenheit von chronischer Immunsuppression, während das Immunsystem weiterhin gegen Pathogene und maligne Zellen kämpft. Der Induktion und Erhaltung der peripheren Toleranz liegen mehrere zuvor beschriebene Strategien zugrunde, die nach heutigen Erkenntnissen vier aktive Mechanismen beinhalten: Klonale Deletion, Ignoranz, klonale Anergie und Regulation (Bluestone 2011). Die Existenz und das Konzept immunologischer Toleranz ist schon vor 60 Jahren bekannt geworden, da die Injektion allogenen Gewebes in Neugeborenen zu Toleranz folgender Allotransplantate führte (Billingham 1953). Toleranz in einem intakten und ausgereiften Organismus zu induzieren, ist hingegen eine bedeutend schwierigere Aufgabe, nicht zuletzt aufgrund der Existenz von *memory* T-Zellen (Adams 2003; Jones 2009). Denn diese sind besonders effiziente Induzierer von Transplantatabstoßung (Schenk 2008) und weniger sensitiv gegenüber T-Zell-depletierenden Antikörpern (Pearl 2005) sowie kostimulationsblockierenden Agenzien (Vu 2006).

Transplantationstoleranz konnte schon früh in Mäusen durch nichtdepletierende Antikörper, die CD4 bzw. CD8 T-Zellen blockieren, gegen Hauttransplantate erreicht werden (Cobbold 1990; Qin 1990). Damit existierte ein geeignetes Modell zur Identifizierung der verschiedenen zellulären und molekularen Komponenten, die zur Induktion und dem Erhalt der Toleranz notwendig sind. Seitdem existieren viele weitere Antikörper, die Kostimulations-, Adhäsionsmoleküle und den TCR-Komplex blockieren und damit dominante Toleranz induzieren können (Lehmann 1997; Kirk 1999). Seither haben sich verschiedene auch zellbasierte Strategien zur Induktion von Toleranz gegen Donorantigen entwickelt, wie z.B. durch die Transplantation von Knochenmark und den dadurch induzierten gemischten Chimärismus (*mixed chimerism*) (Spitzer 1999; Kawai 2008). Die Induktion von gemischtem Chimärismus ist in Mausmodellen mit Hilfe von CD4 und CD8 depletierenden Antikörpern und geringer Bestrahlungsdosis mittlerweile eine effektive Strategie zur Erzeugung von Allotoleranz (Sykes 1997). Auch Protokolle, die die Kombination von Kostimulationsblockern zusammen mit leichter Bestrahlung und/oder depletierenden monoklonalen Antikörpern vorsehen, können ohne die Zugabe von zytoreduktiver Behandlung gemischten Chimärismus induzieren (Durham 2000; Wekerle 2000).

Erfolge in der Induktion von Toleranz bei der murinen Haut- und Herztransplantation konnten durch Donor-spezifische Transfusion (DST) in Kombination mit Kostimulationsblockade zum Beispiel mit dem anti-CD4-Antikörper erzielt werden (Karim 2004; Francis 2011). Grundlage hierfür ist die begründete Annahme, dass die Entstehung von Regulation durch Tregs stark abhängig von deren TCR-Stimulation ist (Walker 2003). Deshalb wird vor der Transplantation donorspezifisches Antigen in Form von DST appliziert, um dadurch donorspezifische Tregs entstehen zu lassen, die das Transplantat sodann entsprechend schützen können (Saitovitch 1996). Im lymphopenen Mausmodell wurde demonstriert, dass antigenspezifische Regulatoren mittels DST und depletierendem anti-CD4-Antikörper vor einer Organtransplantation induzierbar sind und diese daraufhin die Abstoßung eines allogenen Hauttransplantats zu verhindern vermögen (Kingsley 2002).

Die Rolle von Tregs in der Allotoleranz

Experimentelle und klinische Untersuchungen von Tregs im Zusammenhang mit Allotoleranz nach Transplantation lassen ein starkes Potenzial in der klinischen Applikation vermuten. Studien zufolge gibt es einen positiven Zusammenhang zwischen zirkulierenden Tregs und guter Transplantatfunktion in der

Lunge (Meloni 2004), Leber (Demirkiran 2006) und auch Niere (Salama 2003; Bestard 2008) nach Allotransplantation. Diese Beobachtung wurde auch bei Patienten gemacht, bei denen eine spontane Toleranz auftrat (VanBuskirk 2000; Yoshizawa 2005). In einer anderen Studie wurde peripheres Blut von Prätransplant-Patienten zu besseren und individuellen Therapiezielen bezüglich Immunsuppression überprüft. Dabei zeigte sich in Patienten, in denen keine Abstoßungsanzeichen nach der Transplantation zu finden waren eine verminderte Alloreaktivität und erhöhte Treg-Anzahl im Vergleich zu Patienten, die eine akute Abstoßung erlitten (Vondran 2010).

Studien im Mausmodell haben bereits zeigen können, dass durch eine Erhöhung der Treg-Anzahl in einem Rezipienten, die Akzeptanz eines Allotransplantats zumindest verlängert werden kann. Die akute GvHD (Graft versus Host Disease) nach Knochenmarktransplantation stellt z.B. in der Klinik nach wie vor eine Hürde dar. In Experimenten mit isolierten Donor-nTregs, die *ex vivo* expandiert und zusammen mit einer definierten Anzahl (1:1 Verhältnis) naiver T-Zellen aus dem Knochenmark in bestrahlte Rezipienten gespritzt wurden, konnte aber eine akute GvHD nach Knochenmarktransplantation abgewendet werden (Hoffmann 2002; Taylor 2002; Trenado, Charlotte et al. 2003; Fukui 2007). In anderen Studien konnten polyklonale Rezipienten-Tregs, die zusammen mit allogenen Donorknochenmark (vollständiger MHC-*mismatch*) und einer kurzfristigen Dosis Kostimulationsblockade und Rapamycin einen stabilen Makrochimärismus induzieren. Zusätzlich konnte in diesen Experimenten langfristige Allotoleranz gegen ein solides Organ (Haut) erzeugt werden, aber nur in Zusammenhang mit einem hämatopoetischen Chimärismus nach Knochenmarktransplantation (Pilat 2010). Denn dabei werden alle potenziell alloaggressiven Zellen durch periphere und wahrscheinlich auch zentrale Toleranzmechanismen inaktiviert. Dass Tregs eventuell in einer alloantigen-spezifischen Weise agieren zeigte eine Studie, in der der Transfer von nTregs, die mit allogenen APC stimuliert wurden, langfristig Toleranz gegen (*minor* und auch *major mismatch*) allogenes Knochenmark in bestrahlten Rezipienten zu induzieren in der Lage waren, Drittspender-Knochenmark aber sofort abgestoßen hatten (Joffre 2004).

Andere Studien an lymphopenen Mausmodellen zeigten, dass *ex vivo* expandierte Tregs zusammen mit nicht depletierender anti-CD4-Antikörpergabe eine Vaskulopathie und Arteriosklerose nach Aortentransplantation effektiv reduzierten und diese noch weiter dezimiert werden konnte, wenn die Tregs, durch DST *in vivo* induziert, alloantigenreaktiv waren (Warnecke, Bushell et al. 2007; Warnecke 2007; Nadig 2010). Durch die zuvor beschriebene DST-Methode und die dadurch entstehenden Tregs kann Toleranz im lymphopenen Modell auch gegenüber Hauttransplantaten erwirkt werden (Kingsley, Karim et al. 2002), bei der Transplantation von Herzen sogar im immunologisch intakten Rezipienten (Saitovitch, Bushell et al. 1996). In der Therapie von Autoimmunerkrankungen sind polyspezifische Tregs wirkungslos und eine effektive Immunregulation kann nur durch antigenspezifische Tregs erreicht werden (Tang 2004; Jaeckel 2005; Tarbell 2006). Es gibt ebenfalls Hinweise, dass antigenspezifische Tregs in der Transplantatabstoßung effizienter sein können als polyspezifische Tregs. Die Arbeitsgruppe um Robert Lechler zeigte z.B. in Mäusen, die zuvor thymektomiert und T-Zell depletiert wurden, dass alloantigen-spezifische Tregs donorspezifische Toleranz bei der Hauttransplantation erreichen konnten (Jiang 2006). Die Aktivierung kann über den direkten Erkennungsweg über Donor-APC erfolgen (Warrens 1994). Alternativ findet sie aber auch über den indirekten Weg via Rezipienten-APC statt, die aufgenommenes Fremdpeptid präsentieren (Lechler und Batchelor 1982). Da der indirekte Erkennungsweg mit der chronischen Transplantatabstoßung in Zusammenhang gebracht wird (Hornick und Lechler 1997), entwickelten Lechler *et al.* in

einer Studie TCR-transgene Tregs, die dadurch indirekte Spezifität erhielten. Der Transfer dieser Tregs konnte, kombiniert mit anti-CD8 Antikörpergabe und Rapamycin, eine Toleranz gegenüber semi und vollständigen MHC-*mismatch* Herztransplantaten erwirken (Tsang 2008). Bei entsprechenden Hauttransplantaten konnten die gleichen Tregs allerdings kaum eine Verlängerung bewirken. VanMeerveijk *et al.* zeigte durch einen anderen Ansatz allerdings, dass nTregs, die *in vitro* mit F1(Donor x Rezipient)-APC aktiviert worden waren und damit sowohl direkte als auch indirekte Alloantigen-spezifität besaßen, zusammen mit allogener Knochenmarktransplantation die akute und chronische Abstoßung von Herz- und auch Hauttransplantaten verhindern konnten (Joffre 2008). Der Mechanismus der Toleranz beruhte allerdings auf der Induktion eines gemischten hämatopoetischen Chimärismus.

Tregs in der Stammzelltransplantation beim Menschen

Die allogene Stammzelltransplantation stellt eine kurative Therapieoption für verschiedene ererbte oder erworbene hämatologische Krankheiten und maligne hämatologische Erkrankungen, wie z.B. Leukämien oder Lymphome dar. Donor-T-Zellen erkennen Rezipienten-Antigen jedoch als fremd und können deswegen Rezipientenzellen und -gewebe attackieren, aus der dann eine „*Graft-versus-Host*“-Erkrankung (GvHD) resultiert. Der Fokus der momentanen wissenschaftlichen Untersuchungen bezüglich der Stammzelltransplantation liegt somit darauf, die lebensbedrohliche GvHD zu verhindern, ohne die nutzbringenden Effekte der Donor-T-Zellen gegen die Leukämie („*Graft-versus-Leukemia*“ GvL) zu unterbinden. So gaben die präklinischen Modelle Anlass zu ersten Versuchen, Stammzelltransplantations-Patienten isolierte Tregs aus gesunden Donoren zur Prävention von GvHD zu verabreichen. Die *in vitro* expandierten Tregs, die zuvor aus Drittspender-Nabelschnurblut gewonnen und zusammen mit Nabelschnurblutzellen transplantiert wurden, konnten aber leider keine GvHD abwenden. Jedoch zeigte sich auch keine Treg bezogene Toxizität (Brunstein 2011). An der Universität Regensburg erhielten Patienten mit hoher Gefahr eines Leukämie-Rückfalls nach Stammzelltransplantation ein Jahr nach der Transplantation frisch isolierte Donor-Tregs. Später wurden diesen Patienten zusätzlich naive T-Zellen injiziert, um die GvL-Aktivität zu fördern. Diese Patienten entwickelten ohne Zugabe von immunsupprimierenden Medikamenten keine GvHD und auch keine anderen opportunistischen Infektionen (Edinger und Hoffmann 2011). Eine andere Arbeitsgruppe wagte einen ähnlichen, aber mutigeren Ansatz, in dem Donor-Tregs gleichzeitig mit haploidentischen Stammzellen (50% HLA-*mismatch*) sowie naiven T-Zellen zur Induktion der GvL-Aktivität und Stärkung des Immunsystems gegen Infektionen transplantiert wurden. Dabei erlitten nur 2 von 26 Patienten eine akute GvHD, während die Mehrheit klinisch gesund blieb und auch keine chronische Erkrankung entwickelte (Di Ianni 2011; Di Ianni 2011).

Tregs in der soliden Organtransplantation beim Menschen

Wie oben beschrieben sind Tregs in murinen Modellen in der Induktion von Allotoleranz entscheidend involviert. Dennoch ist es selbst in Tiermodellen bislang nicht gelungen, eine Allotoleranz durch den Transfer von Tregs des natürlichen T-Zellrepertoires zu erreichen. Dementsprechend gibt es bislang keine klinischen Studien zum Einsatz von Tregs in der soliden Organtransplantation. Es gibt aber Medikamente und Mechanismen, die für eine Anreicherung und Funktion natürlicher und *in vivo* induzierter

Tregs sorgen. Ein dominierendes Mittel, das die Expansion von Tregs begünstigt, ist Rapamycin (Sirolimus). In den letzten fünf Jahren ist deutlich geworden, dass Sirolimus und sein Derivat Everolimus selektiv die Apoptose von murinen und humanen effektorischen, aber nicht regulatorischen T-Zellen *in vitro* und *in vivo* induzieren (Battaglia 2005; Game 2005; Coenen 2006). Der genaue Wirkmechanismus von Rapamycin wird noch erforscht, es gibt aber Hinweise, dass die Expression von PTEN und/oder Pim2 in Tregs mit verantwortlich ist. Denn diese beiden Proteine scheinen sie im Gegensatz zu Teffs vor der Rapamycin-induzierten Inhibition des mTOR-Signalwegs zu schützen (Basu 2008; Zeiser 2008). Die bereits erwähnten Kortikosteroide erhöhen bewiesenermaßen zumindest *in vitro* die Treg-Zellzahl und präferenziell die Apoptose von murinen Teffs (Chen 2004; Chen 2006). Andere Immunsuppressiva zeigen ebenfalls positive Effekte auf Treg-Zellzahl und -funktion, wie beispielsweise das polyklonale ATG (anti-Thymozyten Globulin), eine gereinigte IgG-Fraktion, die T-Zellen durch entweder komplementabhängige Lyse oder aktivierungsinduzierte Apoptose depletiert. Dabei begünstigt diese Substanz *in vitro* und *in vivo* ebenso die Expansion und Konversion von murinen und humanen Tregs (Lopez 2006; Feng 2008).

Fragen, Probleme und Perspektiven

Die solide Organtransplantation ist eines der riesigen medizinischen Erfolge der letzten 50 Jahre und die effektivste in der Therapie von terminalem Organversagen. Die kurzfristigen Überlebensraten der Transplantate in Patienten sind bedeutend gestiegen, die längerfristigen aber nach wie vor suboptimal. Oft kann nur die akute Abstoßung effektiv verhindert werden. Zurzeit werden diverse immunsupprimierende Medikamente verabreicht, die aber nicht spezifisch wirken und meist ein Leben lang verabreicht werden müssen. Ferner begünstigen Immunsuppressiva die Entstehung von Infektionen und Tumoren (Taylor 2005). Der Einsatz von regulatorischen Zellen scheint somit vielversprechend, aber Gegenstand der heutigen und zukünftigen Forschung ist nach wie vor, deren Isolation, Spezifität und Stabilität zu optimieren. Bislang konnte nämlich die allospezifische Toleranzinduktion mit vollständigem MHC-*mismatch* durch Treg-Infusion in einem immunkompetenten, unmanipulierten Rezipienten noch nicht demonstriert werden. Grund dafür kann u.a. die hohe Präkursorfrequenz alloreaktiver pathogener T-Zellen sein, die auf 5-10% bei komplett allogenen Kombinationen geschätzt wird (Suchin 2001). Wenige der Toleranzmechanismen aus den Nagetiermodellen konnten bislang in die Transplantationsmedizin übertragen werden. Viel höhere Treg-Zellzahlen und maximale Reinheit z.B. sind bei der Behandlung von Autoimmun- und Transplantationspatienten gefragt, diese aber schwierig zu generieren, da in der Peripherie eines Menschen lediglich 1-5% nTregs zu finden sind und sich die *in vitro* Expansion als zeitintensiv und anspruchsvoll gestaltet. An diesem Punkt sollten die Untersuchungen dieser Arbeit ansetzen, da die *in vitro de novo* Erzeugung von Tregs dieses Problem umgehen würde.

In einer lymphopenen Situation, wie sie in verschiedenen Mausmodellen, wie z.B. transgenen Mäusen, durch Bestrahlung, RAG^{-/-} oder Scid-Mäusen vorkommt, kann eine Lymphopenie-induzierte Proliferation hervorgerufen werden, womit die Versuche mit der klinischen Situation nicht mehr vergleichbar sind. In vielen der zuvor beschriebenen Experimente sind meist aktivierte nTregs mit polyspezifischem Repertoire zur Toleranzinduktion eingesetzt worden. Antigenspezifität könnte aber möglicherweise bei der Allotoleranz von Vorteil sein. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, Tregs unterschiedlicher Spezifität voneinander

differenzierbar zu machen. In der Peripherie induzierte Tregs sind dagegen eventuell instabiler und daher ihr Einsatz in der Klinik fragwürdig. Um antigenspezifische Tregs zu generieren, wurden in anderen Studien dafür TCR-Transgene hergestellt, was zwar mechanistisch interessante Beobachtungen ergab, aber für die klinische Anwendung keine Relevanz hat. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit zur Erzeugung von Tregs ein polyklonales Repertoire an T-Zellen genutzt werden, um der klinischen Situation ähnlich zu sein.

In vielen der Experimente am Mausmodell wurde zwar durch unterschiedliche Ansätze das Potenzial von Tregs erfolgreich demonstriert, aber in den meisten Fällen handelte es sich lediglich um Toleranzinduktion gegen nicht solide Organe, Herz- oder Inselzelltransplantate, die weitaus weniger immunogen sind, als beispielsweise die Haut, die in Nagetiermodellen als schwierigstes Organ für Allotoleranz gilt. Aus diesem Grund wurde für die vorliegenden Modelle dieser Arbeit auf die Hauttransplantation zurückgegriffen, da eine Immunantwort gegen die Haut am schwersten zu kontrollieren bzw. Toleranz am schwierigsten zu induzieren ist.

Die ersten Erfolge in der Herz- und Hauttransplantation gelangen dafür wiederum nur mit allogenen Organen mit unvollständigem MHC-*mismatch*, weswegen hier die Stammkombination mit dem höchsten bekannten *mismatch* bzw. stärksten Abstoßungsgrad gewählt wurde, nämlich C57BL/6 und BALB/c.

Murine Tregs exprimieren exklusiv Foxp3, während dieser Transkriptionsfaktor im humanen System auch in manchen aktivierten Nichtregulatoren zu finden ist. Da man sich bei der Isolation von Tregs bislang vornehmlich auf die Foxp3-positiven Zellen beschränkt, ist der Transfer in die Klinik daher erschwert. Foxp3 ist nach gegenwärtigem Stand der Forschung der Haupttranskriptionsfaktor, der die Entwicklung und Funktion von Tregs kontrolliert und vor allem in der Maus Tregs von anderen T-Zellen unterscheidbar macht. Dieser Transkriptionsfaktor ist aber im Nukleus lokalisiert und dadurch experimentell nicht zur Isolierung von Tregs geeignet. In der bio-medizinischen Wissenschaft wird daher beständig nach potenziellen Oberflächenmarkern gesucht, die eine bessere Unterscheidung möglich machen. Grundsätzliche Mechanismen zur supprimierenden Wirkung von Tregs sind bereits erforscht, wenige Erkenntnisse gibt es jedoch bisher zu Überlebensraten, Lokalisation und genauen Toleranzmechanismen (dominant oder deletional) dieser Zellen bei der allogenen Organtransplantation.

Diese Probleme, Fragen und Überlegungen im Zusammenhang mit Tregs bei der Toleranzinduktion und -erhaltung nach Organtransplantation wurden in dieser Arbeit adressiert und analysiert. Denn die Induktion gewebsspezifischer Toleranz gegenüber potenten Immunantworten bei Erhalt der generellen Immunkompetenz, ohne die Notwendigkeit pharmakologischer Immunsuppression, ist das große Ziel im Transplantationsfeld.

In dieser Arbeit wurden dazu aktivierte T-Zellen nach Transduktion mit Foxp3 zu antigenspezifischen Tregs konvertiert. Diese sollten sowohl in ihrer Reinheit als auch Stabilität sowie Funktion, auch nach Expansion, nicht beeinträchtigt sein. Die generierten transduzierten Tregs sollten außerdem eine stabile Treg-Zelllinie darstellen, die sich *in vitro* und auch *in vivo* äußert. Durch genetische Markierung mit einem nicht immunogenen Oberflächenmarker wurden das *In Vivo*-Verhalten und mögliche Toleranzmechanismen in der Induktions- aber auch Erhaltungsphase untersucht. Überdies wurden mögliche Unterschiede der Effizienz von poly- und allospezifischen Tregs gegenübergestellt, da in der Literatur Hinweise auf diesen Sachverhalt existieren. Die Eignung und Unterschiede der transduzierten Tregs wurde zunächst

im lymphopenen Transplantationsmodell getestet. Im weiteren Verlauf wurden verschiedene Induktionsprotokolle entwickelt, die den Einsatz von Tregs auch im immunkompetenten Modell ermöglichen sollten. Außerdem war der Einfluss der Foxp3-Transduktion auf den endogenen Locus von Interesse und wurde dahingehend untersucht. Es stellte sich auch die Frage der Beeinflussung der adoptiven Treg-Therapie auf die iTreg-Entstehung und die infektiöse Toleranz und wurde in diesem Rahmen bearbeitet.

Kapitel 2 Material & Methoden

Material

Allgemeines Laborzubehör

Aceton	J.T. Baker, Deventer, NL, Deventer, NL
Agarose Multi-Purpose	Bioline, Luckenwalde, D
Ammoniumchlorid NH_4Cl_2	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumchlorid NH_4Cl_2	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bacillol® AF	Bode
D ⁺ -Glucose monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
D ⁺ Saccharose	Riedel-de-Haen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Eppendorfggefäße (1.5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Ethanol Absolut	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg, D
Falcon 15ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D/ Sarstedt
Falcon 50ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D / Sarstedt
Glycin	Fluka - Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
HCl	J.T. Baker, Deventer, NL
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, NL
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
KCl	J.T. Baker, Deventer, NL
Latex-Handschuhe	Digital PF
LB-Agar	Kapseln, MP Biomedicals, LLC
LB-Medium	Kapseln, MP Biomedicals, LLC
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
MgCl_2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt, D
NaCl Isotonische Kochsalzlösung 1000ml Plasti- pur®	Fresenius Kabi
Pipettenspitzen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Polyethylenglycol (PEG)	Fluka – Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

PP-Röhrchen, 14ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
Purple Nitrile Handschuhe	Kimberly-Clark
Tris Hydrochlorid	Calbiochem, LaJolla, CA, USA
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Sarstedt, D

Molekularbiologische und Proteinbiochemische Komponenten

1kb DANN-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Agarose Multi-Purpose	Bioline, Luckenwalde, D
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs, Ipswich, MA US.
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
dNTP mix	Promega, Mannheim, D
Go Taq Flexi Puffer 5x	Promega
HiTrap™ Protein G HP	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Pfu Polymerase Puffer (10x)	Stratagene, Amsterdam, NL
Pfu-Turbo-Polymerase	Stratagene, Amsterdam, NL
Proteinase-Inhibitor-Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Red Taq Polymerase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Sepharose-Protein-G-Säule	Amersham Biosciences, Freiburg, D
T4 Quick Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA US.
T4 Ligase Puffer	New England Biolabs, Ipswich, MA US.
Taq Polymerase Puffer (10x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Zellkultur

12well Zellkulturplatte	Nunc Thermo Scientific, Roskilde, DK
48well Zellkulturplatte	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
6well Zellkulturplatte	Sarstedt, Sarstedt, D
96well Zellkulturplatte flach	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
96well Zellkulturplatte rund	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
96well Zellkulturplatte V-Form	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
CFSE 5mM	Molecular Probes
Chloroquin-Diphosphat-Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ciprobay 200mg/100ml Infusionslsg.	Bayer, Leverkusen, D
CpG	Cooley Pharmaceuticals
DMEM 500ml	Biochrom AG, Berlin, D
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

DPBS 1x –CaCl ₂ –MgCl ₂	GIBCO Invitrogen, Auckland, NZ, Auckland, NZ
EDTA	Merck, Darmstadt, D
Far Red DDAO-SE	Cell Trace
FCS	Biochrom AG, Berlin, D
Ficoll/Percoll	Invitrogen, Karlsruhe, D / GE Healthcare
Ficol-Paque	GE
Filter 0.45µm	Filtropur S, Sarstedt, Sarstedt, D
GlutaMAX TM 1 100x	GIBCO Invitrogen, Auckland, NZ, Karlsruhe, D
Golgi Plug	BD Biotec, Heidelberg, D
HEPES 1M	PAA Laboratories
HL-1 500ml	Lonza BioWhittaker TM
Hybridoma-Medium DIF 1000 500ml	Biochrom AG, Berlin, D
Ionomycin	Fermentek Biotechnology
LS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
MEM NEAA 100x	GIBCO Invitrogen, Auckland, NZ, Karlsruhe, D
Meropenem 3H ₂ O 1000mg	Astra Zeneca, Wedel, D
MS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Natrium-Pyruvat 100mM	GIBCO Invitrogen, Auckland, NZ, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin	10.000U/ml 10.000µ/ml Biochrom AG
PMA	Fermentek Biotechnology
Protaminsulfat 4mg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Rapamycin zum InVitro Gebrauch	Selleck, Houston Tx, US.
RPMI 1640 500ml	GIBCO Invitrogen, Auckland, NZ, Karlsruhe, D
SA-Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Sarstedt, D
β-Mercaptoethanol 50mM	GIBCO Invitrogen, Auckland, NZ, Karlsruhe, D
T175cm ² Zellkultur-Flasche	Sarstedt, Sarstedt, D
T25cm ² Zellkultur-Flasche	Sarstedt, Sarstedt, D
T75cm ² Zellkultur-Flasche	Sarstedt, Sarstedt, D
Thymidine, (methyl-3H)	PerkinElmer, Boston, USA
TrypanBlue 0.5% (w/v)	Biochrom AG, Berlin, D / Fluka
Trypsin/EDTA Solution 10x	Biochrom AG, Berlin, D
Zellschaber 25cm, 17mm	Sarstedt, Sarstedt, D
Zellsieb 40µm	BD Biotec, Heidelberg, D
Zellsieb 70µm	BD Biotec, Heidelberg, D

Mausarbeit und Zubehör

Augen und Nasensalbe	Bepanthen
BrdU 5g	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Einmal-Injektionsnadel 1ml U100	BD Biotec, Heidelberg, D
Einmal-Injektionsnadel 1ml U40	BD Biotec, Heidelberg, D
Einmalspritzen 25, 10, 5, 1ml	Braun, Melsungen, D
Elastische Fixierbinde	Rancolast® Lohmann&Rauscher
Freund´s Adjuvants complete	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm®
Ketamin 100mg/ml	Gräub Albrecht 10ml
Klebeband	Leukopor®
Klebeband Tape	Blenderm™ 3M
Rapamycin zum <i>In Vivo</i> -Gebrauch	LC Laboratories
Rompun 2%	Bayer Health Care 25ml
Salbenkomresse	Brandolind® Hartmann
Skalpell	No. 21 FEATHER
Tier-Rasiermaschine	POCKET PRO® WAHL®

Immunhistochemie

DAPI 10mg	Invitrogen, Darmstadt, D
Gelatine powder from fish skin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Hämalaun Lösung, Meyer´s	Merck, Darmstadt, D
Mowiol	Calbiochem
Normales Maus-Serum	Invitrogen, Karlsruhe, D
Normales Ratten-Serum	CaltqaInvitrogen, Karlsruhe, D
Normales Ziegen-Serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Paraffin	Paraplast
Tissue-Tek®	O.C.T. Compound, Sakura
Xylol	J.T. Baker, Deventer, NL

FACS

Fix/Perm	eBioscience
Fix-Perm Solution Diluent	eBioscience
Paraformaldehyd (PFA)	Fischar, Saarbrücken, D

Antikörper**Primäre Antikörper**

Name	Klon	Hersteller
B220-APC	RA3-6B2	BD Biosciences, Heidelberg, D
BrdU-V450	3D4	BD Biosciences, Heidelberg, D
Caspase-3-AF647	C92-605	BD Biosciences, Heidelberg, D
CCR7-PE		BD Biosciences, Heidelberg, D
CD11c-APC	HL3	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD11c-Biotin	HL3	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD11c-PE	HL3	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD25-APC	PC61	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD25-Biotin	7D4	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD25-FITC	7D4	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD25-PE	PC61	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD3-APC	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD45RB-Biotin	16A	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD45RB-PE	16A	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD4-APC	RM4-5	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD4-APC	RM4-5	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD4-Biotin	GK1.5	FPLC, eigene Herstellung
CD4-Cy3	RMCD4-2	FPLC, eigene Herstellung
CD4-Cy5	RMCD4-2	FPLC, eigene Herstellung
CD4-FITC	GK1.5	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD4-Pacific-Blue/V450	RM4-5	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD4-PE	GK1.5	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD62L-Biotin	MEL-14	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD62L-PE	MEL-14	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD69-Biotin	H1-2T3	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD69-PE	H1-2T3	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD8-Biotin	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD8-Cy3	RMCD8-2	FPLC, eigene Herstellung
CD8-Cy5	RMCD8-2	FPLC, eigene Herstellung
CD8-FITC	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD8-PE	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD8-PerCp-Cy5.5	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg, D
CTLA-4-PE	UC10-4B9	BD Biosciences, Heidelberg, D
Foxp3-AF647	FJK-16s	eBioscience
Foxp3-Biotin	FJK-16s	eBioscience
Foxp3-PE	FJK-16s	eBioscience
GITR-APC	DTA-1	eBioscience

GITR-PE	DTA-1	eBioscience
H2Kb-Biotin	AF6-88.5	BD Biosciences, Heidelberg, D
H2Kb-PE	AF6-88.5	BD Biosciences, Heidelberg, D
H2Kd-Biotin	SF1-1.1	BD Biosciences, Heidelberg, D
IFN- γ - Biotin	R4-6A2	eBioscience
IFN- γ - PB	XMG1.2	Biolegend
IFN- γ -PE	XMG1.2	BD Biosciences, Heidelberg, D
IL-10-PB	JES5-16E	Biolegend
IL-10-PE	JES5-16E	Biolegend
IL-17-PE-Cy7	TC11-18H10.1	Biolegend
TCR- β -PE	H57-597	BD Biosciences, Heidelberg, D
Thy1.1(CD90.1)-AF488	OX-7	BD Biosciences, Heidelberg, D
Thy1.1(CD90.1)-Biotin	HIS51	BD Biosciences, Heidelberg, D
Thy1.1(CD90.1)-FITC	HIS51	BD Biosciences, Heidelberg, D
Thy1.1(CD90.1)-PE	OX-7	BD Biosciences, Heidelberg, D
Thy1.2(CD90.2)-APC	53.2-1	BD Biosciences, Heidelberg, D
Thy1.2(CD90.2)-Cy3	30H12	Eigene Herstellung aus Hybridoma
Thy1.2(CD90.2)-Cy5	30H12	Eigene Herstellung aus Hybridoma
Thy1.2(CD90.2)-PE	53.2-1	BD Biosciences, Heidelberg, D

Sekundäre Antikörper

Name	Hersteller
Rat IgG-FITC	Jackson Immunoresearch Laboratories, US.
Rat IgG-Cy5	Jackson Immunoresearch Laboratories, US.
Rat IgG- Biotin	BD Biosciences, Heidelberg, D
SA – PE-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg, D
SA-Alexa488	Molecular Probes
SA-APC	BD Biosciences, Heidelberg, D
SA-Cy3	Jackson Immunoresearch Laboratories, US.
SA-Cy5	BD Biosciences, Heidelberg, D
SA-FITC	Jackson Immunoresearch Laboratories, US.
SA-PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
SA-PE-Cy5.5	BD Biosciences, Heidelberg, D
SA-PerCp	BD Biosciences, Heidelberg, D

Zytokine (rekombinante Antikörper)

Name	Klon	Hersteller
GM-CSF		Eigene Herstellung aus Hybridomazelllinie
IL-2	143.	Eigene Herstellung aus Hybridomazelllinie
IL-4		Eigene Herstellung aus Hybridomazelllinie
IL-7		PeptoTech, Hamburg, D
α Sca1	ACK2	Eigene Herstellung aus Hybridomazelllinie
humanes TGF- β -1		PeptoTech, Hamburg, D
α CD25	PC61	Eigene Herstellung aus Hybridomazelllinie
α CD28	37.51	Eigene Herstellung Hybridomazelllinie
α CD3	145-2C11	Eigene Herstellung Hybridomazelllinie
α CD3 F(ab) ²	145-2C11 F(ab') ²	BioXCell, West Lebanon, NH
α Thy1.1	19E12	Eigene Herstellung aus Hybridomazelllinie
α Thy1.2	30H12	Eigene Herstellung aus Hybridomazelllinie

Restriktionsenzyme

Name	Hersteller
BamHI	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
BglII	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
EcoRI	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
HindIII	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
NdeI	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
NotI	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
PacI	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
PstI	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
SalI	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
Scal	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
XbaI	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.
XhoI	New England Biolabs, Ipswich, MA, US.

Plasmide

Name	Abkürzung	Herkunft
pEcoEnv IRES puro	K73	Prof. Baum, Dr. Schambach
pcDNA3.MLVg/p	Mlv gag/pol	Prof. Baum, Dr. Schambach
pCMMP IRESeGFP	GFP	Elmar Jäckel (Jaeckel, von Boehmer et al. 2005)
pCMMP IRESeGFP Foxp3	GFPFox	Elmar Jäckel (Jaeckel, von Boehmer et al. 2005)
pJET	pJET	
pMD2G	Mut gag/pol	Prof. Baum, Dr. Schambach (Galla 2008)
LentiSh+SFFV Fox	Lenti FoxThy	Jäckel, Mpofu

pRSF91 IRES Thy1.1	Thy	Nonsikelelo Mpofu und (Schambach 2006)
pRSF91 IRES Foxp3 Thy1.1	FoxThy	Nonsikelelo Mpofu und (Schambach 2006)
pRSF91 IRES GARP Thy1.1	GARPThy	Nonsikelelo Mpofu, Nadja Seltrecht

Sequenzierungen wurden 2008 bei der Firma GATC-Biotech (Konstanz, D) eingereicht, 2009/2010 von der Firma mwg biotech (Ebersberg, D) bearbeitet.

Mausstämme

Name	Abkürzung	Herkunft
BALB/cJ	BALB/c	Charles River oder Tierlabor-Zucht MHH
BALB/cJ x C57BL/6 (F1)	F1	Eigene Zucht aus C57BL/6 x BALB/c (Charles River)
BALB/c-RAG2 ^{tm1Fwa}	BALB/c-RAG2	HZI Braunschweig, Prof. Dunja Bruder
C.129S7(B6)-RAG1 ^{tm1Mom/J}	BALB/c-RAG1	The Jackson Laboratory (Mombaerts 1992)
C.Cg-Foxp3 ^{tm2Tch/J}	BALB/c-Fox GFP	The Jackson Laboratory (Haribhai 2007)
C.Cg-Tg(DEREG)	DEREG	Prof. Tim Sparwasser (Lahl 2007)
C3H/He	C3H	Tierlabor-Zucht MHH
C57BL/6J	B6	Charles River oder Tierlabor-Zucht MHH
C57BL/6-dsRed	B6-dsRed	Prof. Martin Sauer
C57BL/6-RAG	B6-RAG	Prof. Tim Sparwasser
CBy.PL(B6)-Thy1a/ScrJ	Thy1a	The Jackson Laboratory (Reif und Allen 1966)
TCR/HA6.5	6.5	Prof. Kubicka (Kirberg 1994)

Anmerkungen zu Mausstämmen:

Die beiden Maus-Stämme C.129S7(B6)-RAG1^{tm1Mom/J} und BALB/c-RAG2^{tm1Fwa} sind immundefizient durch den Knockout von jeweils einem der beiden „Recombination activating genes“ (RAG) (Mombaerts, Iacomini et al. 1992). Die RAG-Gene codieren für zwei Enzyme, die eine große Rolle im rearrangieren und der VDJ-Rekombination der Immunglobuline und T Zell-Rezeptoren spielen. Die beiden RAG-Gene 1 und 2 werden ausschließlich während der Entwicklung und Reifung der B und T- Lymphozyten exprimiert. Die Mäuse sind daher recht empfindlich und benötigen zusätzliche Pflege in Form von weicherem Futter, zur besseren Verpaarung Zuchtfutter und, falls vorhanden, kleine Pappkartonhäuschen als Rückzugsmöglichkeit.

Alle Mäuse wurden in einem Alter zwischen sechs und zwölf Wochen in Versuchen eingesetzt.

Alle Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien (SPF) Bedingungen im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover gehalten.

Ethische Erklärung:

Die Tierpflege und Experimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Instituts des unternehmen. Die Experimente wurden außerdem nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes der Medizinischen Hochschule Hannover und den lokal geltenden Bestimmungen des Niedersächsischen Lan-

desamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES, Oldenburg) durchgeführt. Die Genehmigungsidentifikationsnummern für die Experimente lauten 04/0789, 04/894 und 10/0071.

Zelllinien

Name	Beschreibung & Herkunft	Kulturbedingungen
293T	HEK Nierenzellkarzinoma	DMEM, 37°C
A549	Lungenkarzinoma Zellen,	DMEM, 37°C
Phoenix-gp	HEK Nierenzellkarzinoma,	DMEM, 37°C
SC1	Fibroblasten,	DMEM, 37°C
XI-10 Gold	<i>E. coli</i> kompetente Zellen	LB, -80°C (Aufbewahrung)

Geräte

Bezeichnung	Hersteller
-80°C Gefrierschrank	Sanyo-Biomedical, Bad Nenndorf, D
Analysewaagen	Sartorius, Göttingen, D
Bestrahlungsgerät GammaCell 2000	Molsgaard Medical Denmark
Bio Imaging System (Agarosegelfoto)	Gene Genius
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Blockheater	Stuart Scientific
CO ₂ -Inkubator	Sanyo-Biomedical, Bad Nenndorf, D
Cryo Freezing Container	Nalgene, US.
Cryotom CM3050S	Leica, Solms, D
Elektrophorese-Kammer für Agarosegele	Biorad, München, D
epgradient Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, D
FACSAria CellSorter	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
Handstückzähler	Roth, Karlsruhe, D
Infrarot-Leuchte	Roth, Karlsruhe, D
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D
LSRII	BD Biosciences, Heidelberg, D
MACS-Multistand octo/quadro	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Mäusezwangbox	MHH Werkstatt
Megafuge 1.OR	Thermo Scientific
Menzel - Deckgläser 24x50mm	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Menzelgläser - Objektträger	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Menzelgläser - Objektträger Superfrost®Plus	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Mikroskop AxioCam MRm	Zeiss, Jena, D
Mikrotom RM 2255	Leica, Solms, D
Milli-Q	Millipore
MoFlo CellSorter	BD Biosciences, Heidelberg, D
Multifuge 3 S-R	Heraeus

Neubauer-Zählkammer 0.0025mm ² , 0.1mm Tiefe	Roth, Karlsruhe, D
Pipetten	Gilson, Limburg-Offheim, D
Power-Supply Station	Biorad, München, D
Scantainer für Mausekäfige	Scanbur.BK
Schüttler für Bakterienkultur, Multitron	INFORS, Bottmingen, CH
Sterilbank Herasafe KS	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, D
Ultraschallgerät	Prof. Brunner
UV-Tisch	lab-fish
Vortexer MS2 Minishaker	IKA
Wasserbad	GFL

Kits

Bezeichnung	Hersteller
Gelextraktion	Qiagen, Hilden, D / Macherey-Nagel, Düren, D
MACS Magnetic cell sorting	Miltenyi Biotec
Maxi-Plasmid-Isolation/ Endofree	Qiagen, Hilden, D
Mini-Plasmid-Isolation	Qiagen, Hilden, D
Mouse CD4 T Lymphocyte Enrichment	BD IMAGTM, Heidelberg, D
NucleoBond Maxi EF	Macherey-Nagel, Düren, D
NucleoBond Mini	Macherey-Nagel, Düren, D
PCR-Aufreinigung	Qiagen, Hilden, D / Macherey-Nagel, Düren, D
PKH26, MINI26-1KT Membrane labeling Kit	Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Puffer und Lösungen:

CFSE-Puffer:

1x PBS 0.1% BSA

DC-Medium:

500mL	RPMI
10%	FCS
1mM	L-Glutamin
20mM	HEPES

Einfrier-Medium:

50%	FCS
40%	RPMI
10%	DMSO

FACS-Färbepuffer:

1x PBS
2% FCS
0.5mM EDTA

Fixierlösung für Zellen:

1% PFA in PBS

2xHBS Puffer:

280mM	NaCl
10mM	KCl
1.5mM	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
12mM	Dextrose (D ⁺ Glucose)
50mM	HEPES

Wichtig: pH 7.05, Lagerung bei -20°C, selten auftauen

MACS-Puffer:

1x PBS
2mM EDTA
2% FCS

Rapamycin-Löse-Puffer für die In vivo-Applikation:

90mg Rapamycin:
→ 250mL deionized H₂O
→ 0.5g Natriumcarboxymethylcellulose
→ 0.625g Tween 80

Das Rapamycin wurde in diesem speziellen Puffer mit einem Ultraschallgerät gelöst. Der Lösungsvorgang musste vor jeder Applikation wiederholt werden.

RBC-Lyse-Puffer:

NH ₄ Cl:	0.15M =	8.29g
KHCO ₃	10mM =	1g
EDTA	0.1mM =	0.037g
H ₂ O bidest auffüllen auf	=	1L

Steril-filtriert mit 0.45µm Filter, Lagerung bei RT

RPMI Spezial für T-Zellen:

500mL	RPMI
10%	FCS
50nM	β -Mercaptoethanol
20mM	HEPES
1mM	L-Glutamin (GlutaMAX™)
1mM	Natrium-Pyruvat
1mM	Non-essential aminoacids (nEAA)

Methoden

Methoden der Molekularbiologie

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte unter Verwendung von 500µl Quarzküvetten (1cm Schichtdicke) in einem Spektralphotometer. Dazu wurde jeweils ein Aliquot der zu untersuchenden Lösung mit einfach destilliertem Wasser verdünnt und die Absorption bei 260nm (A260) gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei 1cm Proben-Schichtdicke etwa einer Konzentration von 50µg/ml bei doppelsträngiger DNA, 40µg/ml bei RNA, langer einzelsträngiger sowie Plasmid-DNA und 30µg/ml bei kurzkettigen Oligonukleotiden. Eventuelle Verunreinigungen der DNA oder RNA durch Proteine wurden durch eine zusätzliche Messung der Absorption bei 280nm (A280) und der anschließenden Berechnung des Quotienten aus A260 und A280 ermittelt. Dieser liegt bei sehr reinen DNA-Lösungen zwischen 1.8 und 1.95, bei reinen RNA-Lösungen zwischen 1.9 und 2.0. Niedrigere Werte sind ein Hinweis auf die Anwesenheit von Proteinen oder Verunreinigungen mit z.B. mit Phenol, während höhere Werte anzeigen, dass die Nukleinsäure denaturiert ist.

Neben der Bestimmung der Menge von Nukleinsäuren durch eine photometrische Messung erfolgte in einigen Fällen lediglich eine ungefähre Quantifizierung mittels Agarose-Gelelektrophorese und Vergleich der durch Ethidiumbromid-Färbung detektierten Banden mit denen eines DNA-Molekulargewichtsmarkers bekannter Konzentration.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *In vitro* Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Segmenten (Saiki 1988). Die bei der PCR eingesetzten DNA-Polymerasen verwenden einzelsträngige DNA als Matrize („*Template*“) für die Synthese eines neuen, komplementären DNA-Stranges. Als Template eignen sich Oligonukleotide, doppelsträngige DNA oder auch RNA-DNA-Hybride, wie sie bei der reversen Transkription entstehen. Durch Erhitzen der doppelsträngigen Nukleinsäure auf 95°C denaturiert diese und liegt als einzelsträngige Matrize vor. Anschließendes Abkühlen ermöglicht die Hybridisierung („*Annealing*“) zweier im Überschuss vorliegender, sequenzspezifischer Oligonukleotide („*Primer*“) an die Matrize, welche zu dieser komplementär sind und den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Die für das Annealing notwendige Temperatur ist in erster Linie von der Primersequenz und -länge abhängig und sollte zwischen 55°C und 65°C liegen, um eine spezifische Amplifikation zu erreichen. Nach dem Annealing erfolgt durch Erhitzen auf 70°C bis 75°C die Verlängerung der Primer in 5'→3'-Richtung („*Elongation*“) durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, die in diesem Temperaturbereich optimal arbeitet. Die bei der Elongation entstandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle werden anschließend erneut auf 94°C erhitzt und weiteren Zyklen aus Annealing, Elongation und Denaturierung unterzogen, so dass eine exponentielle Anreicherung erfolgt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die PCR-Reaktionen in einem autoklavierten 0.5ml Eppendorf-Safelock-Gefäß angesetzt.

Ein 50µl-Einfachansatz enthielt:

0.5µl DNA- bzw. cDNA-Template

1.5µl Desoxyribonukleotid-Gemisch (2mM)

1.5µl Primer f (10µM)

1.5µl Primer r (10µM)

5µl 10x Taq-Reaktionspuffer (10x)

Mix mit 50µl autoklaviertem ddH₂O auffüllen.

Der so zusammengestellte Ansatz wurde in einen Thermocycler (Eppendorf) überführt. Zur Vermeidung von unspezifischen Amplifikationen während der Aufheizphase erfolgte erst beim Erreichen der ersten Denaturierungstemperatur von 94°C die Zugabe von 1.5Units Taq-Polymerase in 5µl ddH₂O („Hot Start“).

Um sicher zu sein, dass entstandene PCR-Produkte spezifisch waren und nicht von der Amplifikation einer DNA-Kontamination in einem oder mehreren der verwendeten Reagenzien herrührten, wurde bei jedem PCR-Lauf eine sogenannte „Wasserkontrolle“ mitgeführt, in der kein Template enthalten war.

Wenn nicht anders angegeben, wurde bei allen PCR-Reaktionen das folgende Temperaturprogramm verwendet:

Denaturierung: 2min 94°C

30 Zyklen:

15sec 94°C

Annealing: 2min 56°C (GC-Gehalt-abhängig)

Elongation: 2min 72°C (pro kb 1min)

Elongation: 10 min 72°C (bei Produktgrößen kleiner als 4kb, sonst 68°C)

Nach Beendigung der Reaktion wurden die entstandenen Amplifikate durch Auftrennen eines Aliquots des jeweiligen PCR-Ansatzes in einem Agarosegel detektiert.

Restriktion von Plasmiden

In der Molekularbiologie macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass natürliche bakterielle Restriktionsenzyme existieren, die ganz bestimmte Basen-Sequenzen erkennen und DNA an dieser bestimmten Stelle spalten. Nach ihren Eigenschaften unterscheidet man drei Typen. Typ I schneidet die DNA an einer zufälligen Stelle weit von der Erkennungssequenz entfernt, benötigt ATP und transferiert eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin. Typ II schneidet die DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz, benötigt kein ATP und hat keine Methyltransferase-Aktivität. Typ III schneidet die DNA etwa 20 bis 25 Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt, benötigt dabei ATP und transferiert eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin. In der Molekularbiologie finden in der Regel die Restriktionsendonukleasen vom TypII Verwendung und erkennen meist palindromische Sequenzen. Dabei ist noch zu unterscheiden zwischen „blunt ends“ (stumpfe oder glatte Enden) und „sticky ends“ (kleb-

rige Enden). Die verschiedenen Restriktionsendonukleasen werden aus diversen Bakterienstämmen isoliert. Ein Verdau sieht folgendermaßen aus:

20µl-Ansatz:

2µg = xµl DNA

2µl passender Puffer (je nach Enzym) NEB

10U = xµl Restriktionsenzym NEB

Auf 20µl mit autoklaviertem ddH₂O auffüllen.

1h 37°C, bei Doppelverdau (zwei Enzyme gleichzeitig) 2h 37°C

Dephosphoylierung

Bei der Dephosphorylierung werden die 5' und 3'-Phosphat-Gruppen von der DNA abgespalten, damit die mithilfe von Restriktionsenzymen geschnittenen Enden nicht wieder religieren. Denn zwischen das geschnittene Stück DNA soll im nächsten Schritt, bei der Ligation (s.unten), ein neues DNA-Fragment hinein ligiert werden. Diesen enzymatischen Schritt katalysiert die Alkalische Phosphatase, die aus Kälberdarm isoliert wird.

Wenn nicht anders beschrieben wurde die Dephosphorylierung folgendermaßen durchgeführt:

20µl Restriktionsansatz

5µl 10x Dephosphorylierungspuffer

1µl Alkalische Phosphatase

Auf 50µl mit autoklaviertem ddH₂O auffüllen

30min 37°C

15min 65°C

Ligation

Die Ligation ist die enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNA- oder RNA-Segmente an ihren Enden. Dabei wird das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nucleinsäuresegmente mit Hilfe des Enzyms Ligase durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden. Dieses findet nach der Linearisierung und Dephosphorylierung vom Vektor statt, der in diesem Schritt mit dem Fragment (Insert) verschmelzen soll.

25ng = xµl Vektor

40ng = xµl Fragment (Insert)

2µl Ligasepuffer

1µl T4-Ligase

Den Ansatz auf 20µl mit autoklaviertem ddH₂O auffüllen. Das Gemisch 1h bis unN bei 16°C-RT inkubieren.

Transformation in *E.coli*

Unter der Transformation versteht man die natürlich vorkommende Fähigkeit von bestimmten Bakterien, freie DNA aufnehmen zu können. Die Wissenschaft macht sich dieses Phänomen zu Nutze, in dem rekombinante DNA nach Klonierung in einen Vektor in kompetenten Bakterien vervielfältigt wird. Dazu werden *E.coli*-Stämme benutzt, die aber erst durch Elektroporation oder Hitzeschock DNA-Stücke aufnehmen können. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Hitzeschock gearbeitet, wobei die Poren in der Membran geöffnet werden, durch die die DNA gelangen kann. Pro Plasmid wurde ein 100µl-Aliquot eines gefrorenen kompetenten *E.coli*-Stamms (z.B. XL-10 Gold) auf Eis aufgetaut. 1-7µl der DNA wurden dazu gegeben, durch Schnippen gemixt und eine halbe Stunde auf Eis zusammen inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock bei 42°C für 1min, an die sich eine 2-minütige Inkubation auf Eis schloss. Das Gemisch wurde dann mit 900µl LB-Medium aufgefüllt und 1h bei 37°C geschüttelt. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit abzentrifugiert, das Pellet mit der restlichen Flüssigkeit auf einer LB-Agarplatte ausplattiert, die ein dem Plasmid entsprechendes Antibiotikum enthielt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 16 Stunden konnten Kolonien gezählt, in Kultur genommen und auf Richtigkeit überprüft werden.

Mini-Plasmidpräparationen aus Bakterien

Um mit einem Plasmid-Konstrukt weitere Experimente durchführen zu können, muss dieses in damit transformierten Bakterien vermehrt und anschließend isoliert werden. Zuerst wurden die pelletierten Bakterien durch eine alkalische SDS-Lösung aufgeschlossen und anschließend die genomische DNA, Proteine sowie Membranreste durch eine neutralisierende Salzlösung ausgefällt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus dem Überstand erfolgte durch Bindung an Glasmilchpartikel und nachfolgende Elution mit Hilfe spezieller Ionenaustausch-Säulen und Isopropanol-Präzipitation. (Qiagen oder Macherey&Nagel Kit)

Endotoxin-freie (EF) Maxipräparation

Für die Transfektion von eukaryontischen Zellen waren große Mengen hochreiner und vor allem endotoxinfreier Plasmid-DNA erforderlich. Dazu wurden 250ml LB-Amp-Medium mit Bakterien, die das gewünschte Plasmid-Konstrukt enthielten, angeimpft, kultiviert und abzentrifugiert. Das dabei erhaltene Bakterienpellet wurde anschließend unter Verwendung des QIAGEN-EndotoxFree-Plasmid-Prep-Kits nach den Angaben des Herstellers isoliert (QIAGEN® Plasmid Purification Handbook 07/1999, QIAGEN, Hilden, oder Macherey & Nagel). Die getrocknete DNA wurde in 500µl endotoxinfreiem ddH₂O aufgenommen.

Kryokonservierung von Bakterien

Wenn ein Plasmid-Konstrukt erfolgreich in Bakterien transformiert werden konnte, wurde ein sogenannter „Glycerolstock“ angelegt, aus dem sich neue Flüssigkulturen animpfen und damit gewünschte Plasmid-Konstrukte in beliebig großer Menge gewinnen ließen. Zum Erhalt eines Glycerolstocks wurden 800µl

einer über Nacht kultivierten 5 ml Bakterienkultur in ein autoklaviertes 1.5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200µl sterilem Glycerol versetzt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C.

Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld voneinander getrennt werden. Sie erfolgt in pH-neutralen Gelen aus Agarose, deren Konzentration je nach Größe der zu trennenden DNA-Moleküle zwischen 0.3% und 2.0% liegt. Für analytische Zwecke wurden 1x TBE-Gele und für präparative Zwecke 1x TAE-Gele eingesetzt. Um die Gele leichter beladen und außerdem die eigentlichen Gelläufe verfolgen zu können, wurden die Proben mit 6x DNA-Beladungspuffer versetzt. Zur Bestimmung von Größe und ungefähre Menge einzelner Nukleinsäure-Fragmente wurden jeweils 500ng DNA-Molekulargewichtsmarker (100bp plus, 100bp- bzw. 1kb-Leiter) mit auf das Gel aufgetragen. Die Visualisierung der aufgetrennten Moleküle erfolgte durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid, welcher den Gelen zugesetzt wurde (Endkonzentration: 0.2µg/ml). Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele in UV-Durchlicht unter Verwendung eines Rotfilters photographiert.

RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte nach der „acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC)“-Methode (Chomczynski und Sacchi 1987), bei der Zellyse, Denaturierung und Phenol-Chloroform-Extraktion in einem Arbeitsschritt stattfinden und vorhandene RNasen sofort inaktiviert werden. Zu diesem Zweck wurde die gebrauchsfertige AGPC-Lösung TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA) unter Verwendung RNase-freier Reagenzien sowie autoklavierter gestopfter Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription handelt es sich um eine Methode, bei der RNA mit Hilfe einer aus Retroviren isolierten DNA-Polymerase, der "Reversen Transkriptase", in komplementäre einzelsträngige DNA ("cDNA") umgeschrieben werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Umschreibung der mRNA aus der präparierten Gesamt-RNA in cDNA unter Verwendung des Enzyms SUPERSRIPT™ II und Oligo(dT)15-Primern, welche mit den Poly(A)-Schwänzen der mRNA-Moleküle hybridisieren können. Dazu wurden 2µg Gesamt-RNA mit 4µl Oligo(dT)15-Primer-Lösung versetzt und auf 12µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Nach zehnmütigem Erhitzen auf 70°C wurde der Ansatz fünf Minuten lang auf Eis abgekühlt und kurz an zentrifugiert. Anschließend wurden 4µl 5x Reaktionspuffer, 0.2µl DTT-Lösung (0.1M) sowie 1µl dNTP-Gemisch (10mM) hinzugefügt und der Ansatz 2min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Unter Hinzufügung von 1µl SUPERSRIPT™ II wurde der Ansatz weitere 60min bei 42°C inkubiert.

biert. Schließlich erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Erhitzen auf 95°C für fünf Minuten. Die so erhaltene cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

Analyse von transgenen Mäusen

Die Untersuchung von transgenen Mäusen ist anhand einer PCR mit genomischer DNA als Template möglich. Dabei werden die verwendeten Primer so gewählt, dass nur bei Anwesenheit eines Transgens ein Amplifikat definierter Größe entsteht. Im Falle der im Materialteil aufgeführten RAG^{-/-}-Mäuse kann eine Genotypisierung durch FACS - Analyse von Blut erfolgen. Dabei wurde das Vorhandensein von T- und B Zellen untersucht.

Methoden der Zellkultur

Allgemeine Bedingungen der Zellkultur und Sterilisation

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen (in RPMI-Medium oder DMEM) wurden in CO₂-Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Labormaterialien aus Kunststoff und Lösungen wurden in feuchter Hitze für 20min bei 135°C und 2-2.2bar autoklaviert. Glas- und Metallgeräte wurden bei 180°C für 3 Stunden sterilisiert. Zur Pelletierung eukaryotischer Zellen wurden diese bei 1200rpm für fünf Minuten (Megafuge 2.0R) zentrifugiert.

Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen können durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff (-196°C) für lange Zeit gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden. Um die Bildung von Eiskristallen in den Zellen zu verhindern, wurde ihnen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam Wasser entzogen. Mindestens 5x10⁶ Zellen und max. 2x10⁷ Zellen wurden auf Eis in 1ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und auf -80°C abgekühlt. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff gestellt und dort gelagert. Nach dem schnellen Auftauen kryokonservierter Zellen bei 37°C müssen diese mit Kulturmedium gewaschen werden.

Zellzählung

Zur Bestimmung der Zahl der lebendigen Zellen wurde der Trypan-Ausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aktiv aus, während tote Zellen blau gefärbt werden. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen an Trypanblau-Lösung versetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

Zelllinien und ihre Kultivierung

T-Zellen wurden in RPMI, alle anderen in DMEM kultiviert. Das Medium für transfizierte Zellen enthielt einen höheren Glucose-Anteil (4mg). Wenn die Kulturflaschen von einem „Monolayer“ bedeckt waren bzw. mehr als 90%ige Konfluenz hatten, wurden die Zellen bei Bedarf gewaschen und aufgeteilt.

Präparation von primären murinen Zellen

Isolation von murinen Milzzellen

Die Milz einer sechs bis acht Wochen alten Maus wurde herauspräpariert und in einer 12-well-Schale in 1ml PBS/FCS mit dem Stempel einer Spritze zerrieben. Die dabei erhaltene Zellsuspension wurde möglichst ohne Bindegewebsreste mit einem Zellsieb (70µm) in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Um störende Erythrozyten zu entfernen, erfolgte anschließend eine fünfminütige Inkubation der Milzzellen in 5ml Erythrozyten-Lysepuffer. Durch Zugabe von 10ml PBS/FCS und Zentrifugation wurde die Lyse gestoppt. Die Zellen wurden schließlich in 10ml RPMI-Vollmedium resuspendiert, gezählt und für Versuche eingesetzt.

Isolation von murinen Zellen aus Lymphknoten

Präpariert wurden inguinale und mesenteriale Lymphknoten. Das weitere Vorgehen entspricht der Präparation von Milzzellen, mit Ausnahme der Erythrozyten-Lyse, die dabei nicht notwendig ist.

Generierung von murinen Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen lassen sich aus murinen Knochenmarkzellen durch die Inkubation mit GM-CSF und IL-4 generieren. Zu diesem Zweck wurden Femur und Tibia einer Maus präpariert und die Knochenmarkzellen mit Hilfe einer Spritze und PBS herausgespült. Die Zellen wurden gezählt, mit DC-Medium auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt und zu je 10ml auf Petrischalen verteilt. Nach dreitägiger Inkubation wurden je Petrischale 10ml DC-Medium hinzugegeben. Nach weiteren drei Tagen wurde 10ml altes DC-Medium gegen frisches ausgetauscht. Ab dem siebten Tag nach Präparation konnten die Dendritischen Zellen entweder als unreife DC verwendet werden oder mit 100ng/ml CpG zur Reifung (Maturierung) gebracht und am achten oder neunten Tag in Versuche eingesetzt werden.

Herstellung von Zelllysaten

Protokoll nach Prof. Sauer:

Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden nach RBC-Lyse in PBS aufgenommen und dreimal alternierend eingefroren und aufgetaut. Danach wurde bei 13.000rpm, 4°C 20min der Zellschrott abzentrifugiert und der Überstand auf die verbleibende Proteinkonzentration überprüft. Das Zelllysate wurde in 1ml-Aliquots mit einer Konzentration von 1mg/ml bei -80°C gelagert.

Protokoll nach Lechler:

(Baker, Hernandez-Fuentes et al. 2001)

Protokoll nach Warnecke:

(Warnecke, Bushell et al. 2007)

Nach Maturation DC (s.o.) wurden diese am achten Tag mit 1mg/6well Zellysat gefüttert.

Färbung von Oberflächenmolekülen für durchflusszytometrische Messungen (FACS)

Um die Expression von Oberflächenmolekülen zu quantifizieren oder die Anteile von positiven Zellen zu bestimmen, wurden durchflusszytometrische Messungen (FACS = Fluorescence activated cell sorting) durchgeführt.

Je Färbung wurden zwischen 2×10^5 und 1×10^7 Zellen in ein FACS-Röhrchen pipettiert und abzentrifugiert. Die FC-Rezeptoren der Zellen wurden je nach Bedarf mit 100 μ l 5% Ratten- oder Mausserum auf Eis für 15min blockiert, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern. Der primäre Antikörper wurde in der jeweils passenden Verdünnung in 100 μ l FACS-Puffer zugegeben und für 20min auf Eis oder 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurde der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper (1 μ l in 100 μ l FACS-Puffer) zugegeben und 15-20min auf Eis oder bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Um das Ausmaß der unspezifischen Bindung des Fluoreszenz-konjugierten Sekundär-Antikörpers beurteilen zu können, wurde stets eine Negativkontrolle ohne Primär-Antikörper durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 500 μ l FACS-PBS aufgenommen und im FACS gemessen. Bei Verwendung direkt markierter Antikörper wurde nach der ersten Inkubation dreimal gewaschen und die Zellen dann für die Messung in FACS-PBS aufgenommen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers (BD FACS-Calibur™ oder LSRII Flow Cytometer) unter Verwendung der dazugehörigen Software (CellQuest oder FlowJo bzw. DIVA, Becton Dickinson, Heidelberg).

Färbung von intrazellulären Markermolekülen für durchflusszytometrische Messungen (FACS)

Nach der Färbung von Oberflächenmolekülen können intrazelluläre Markermoleküle wie Foxp3 und Zytokine gefärbt werden. Dazu wurden die Zellen mithilfe eines Puffers (eBioscience) mindestens eine halbe Stunde maximal aber 16h bei 4°C lichtgeschützt fixiert und permeabilisiert. Danach sollten die Zellen dreimal mit einem speziellen Wasch-Puffer (eBioscience) gewaschen werden. Anschließend erfolgte die intrazelluläre Färbung 30min bei 4°C. Nach einem Waschschrift konnten die Zellen am FACS-Gerät gemessen werden.

Färbung von Zytokinen für durchflusszytometrische Messungen (FACS)

Zur Detektion von Zytokinen muss der Zellkultur 4-6h vor der Färbung ein Protein-Transport-Inhibitor zugegeben werden, damit die zu detektierenden nicht ins Medium abgegeben werden, sondern in der Zelle festgehalten werden. 1µl Brefeldin A-haltige Lösung (GolgiPlug™) der Firma BD wurde zu 1ml Zellkultur beigefügt.

Anreicherung von Zellen über magnetische Zellsortierung (MACS)

Eine besonders geeignete Methode zur schnellen und komfortablen Anreicherung einer großen Menge von Zellen, die ein bestimmtes Oberflächenmolekül exprimieren, ist die magnetische Zellsortierung (magnetic cell sorting = MACS). MACS erlaubt die Markierung der anzureichernden Zellen durch Antikörper, welche entweder direkt an kleine Metallpartikel gebunden sind oder durch einen Sekundär-Antikörper an diese konjugiert werden. Mit Hilfe eines Magneten und unter Verwendung spezieller Säulen lassen sich unmarkierte Zellen durch Waschen entfernen, während die an die Metallpartikel gebundenen Zellen zurückbleiben und anschließend von der Säule eluiert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die magnetische Zellsortierung verwendet, um T-Zellen aus zuvor präparierten murinen Milzzellen zu isolieren. Dazu wurden 1×10^8 Milzzellen nach Angaben des Herstellers mit einem biotinylierten Antikörper-Mix gegen verschiedene „nicht-T-Zellepitope“ und anschließend mit anti-Biotin MicroBeads inkubiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C wurde der Ansatz mit 10ml MACS-Puffer versetzt und zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden vorsichtig in 500µl MACS-Puffer resuspendiert und über eine LS-Separationssäule gegeben, welche zuvor in einen Magneten gehängt und mit 3ml MACS-Puffer gespült worden war. Die Zellen wurden auf die Säule gegeben und mit drei mal 3ml MACS-Puffer gewaschen, danach mit 3ml MACS-Puffer eluiert. In diesem Fall enthält der Durchlauf die gewünschten T-Zellen. Die Menge und Reinheit der angereicherten murinen T-Zellen wurde vor ihrer weiteren Verwendung mittels Zellzählung bzw. Durchflusszytometrie überprüft. (Protokoll der Firma Miltenyi Biotec)

Anreicherung von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Trennung von bestimmten Zellpopulationen kann auch durch verschiedene Durchflusszytometer erfolgen. Dafür wurden entweder ein FACS-Aria II der Firma BD oder das MoFlo-XDP der Firma Beckman Coulter genutzt. Mit dieser Methode können die Zellen nach jedem beliebigen, mit Antikörpern detektierbaren Parameter sortiert werden.

Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE

CFSE (5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher auf Grund seiner lipophilen Beschaffenheit in Zellen diffundieren kann. Dort wird der farb- und fluoreszenzlose Farbstoff durch zelluläre Esterasen gespalten, so dass er in eine starkfluoreszierende und aminoreaktive Form übergeht und an Amine in zellulären Proteinen irreversibel bindet. Bei der Zellteilung wird jeweils die Hälfte des Farbstoffes an die Tochterzellen weitergegeben. Durch die Halbierung der

Fluoreszenz lässt sich die Proliferation von Zellen bis zur ca. siebten Generation im FACS verfolgen. In dieser Arbeit wurden Lymphozyten mit CFSE markiert. Dazu wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und zweimal mit 1ml CFSE-Puffer gewaschen. Der Zugabe von 2µl einer 5mM CFSE-Stammlösung pro 1ml Zellsuspension wurde eine zehnmünütige Inkubationszeit bei 37°C angeschlossen (10µM Endkonzentration). Zur Entfernung von überschüssigem CFSE folgten anschließend drei Waschschrirte mit jeweils 15ml kaltem CFSE-Puffer, nach denen die Zellen in PBS aufgenommen wurden.

Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26

PKH-26 ist ein lipophiler stark roter Farbstoff (Anregung 551nm, Emission 567nm), der irreversibel an Zellmembranen bindet. Die langen aliphatischen Ketten werden in die Lipidregion der Zellmembran stabil eingebaut. Er ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur langfristigen Verfolgung von Zellen verwendbar.

Zur Zellmarkierung wurden 1×10^7 Zellen in 2ml Volumen mit einer Konzentration von 2µM PKH-26 gefärbt. Die Zellen wurden zunächst in einem 15ml-Falcon mit Serum-freiem Medium (DMEM oder RPMI) bei Raumtemperatur gewaschen und 5min bei RT und 1200rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, sodass noch maximal 25µl zurückblieben. Anschließend wurden die Zellen in 1ml Diluent C resuspendiert. Der Diluent C ist eine iso-osmotisch, wässrige Lösung, die gleichzeitig für Zellviabilität und eine gründliche Färbung sorgen soll. Dann wurde eine 2x-Lösung PKH-26 (2µM) angesetzt, zu den Zellen gegeben und schnell durch pipettieren gemischt. Eine 2-5-minütige Inkubation bei RT folgte. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 2ml (ein äquivalentes Volumen) FACS-Puffer gestoppt und eine weitere Minute inkubiert. Dazu wurden weitere 4ml (äquivalentes Volumen) Vollmedium (RPMI Spezial) zugefügt und 10min bei RT zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit 10ml Vollmedium konnten die Zellen im Versuch eingesetzt werden.

Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DDAO

Dimethyldodecylaminoxid (DDAO) ist ebenfalls ein stark rotes Fluorochrom, dessen Succinimidyl-Ester eine starke kovalente Bindung zu primären Aminen von Proteinen und anderen Molekülen irreversibel herstellen. 1×10^7 Zellen wurden in 1ml RPMI Vollmedium gewaschen und 10min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 2µl DDAO-Stocklösung (50µg/200µl, Endkonzentration = 0.5µg) zugegeben und 15min bei 37°C gefärbt. Anschließend sollte sofort 20ml kaltes PBS/FCS zugefügt und zentrifugiert werden, woran sich ein weiterer Waschgang schloss. Schließlich wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen PBS für weitere Versuche aufgenommen.

Messung der Zellproliferation durch den Einbau von radioaktivem ^3H -Thymidin

Das Prinzip dieser Messung beruht darauf, dass eine proliferierende Zelle neue DNA synthetisieren muss. Man stellt der Zelle mit dem radioaktiven Thymidin (^3H -Thymidin) einen Baustein der DNA als radioaktiv markierte Substanz zur Verfügung. Der Einbau des ^3H -Thymidin lässt sich messen, und man erhält einen relativen Wert für die Proliferation der untersuchten Zellen. Je höher die gemessene Radioaktivität,

desto höher ist die Thymidin-Einbaurrate und damit die Proliferation der Zellen. In einer 96-well Platte werden pro well 1µCi ³H-Thymidin aus einer 1mCi-Stammlösung, in 25µl Medium verdünnt, zu 200µl Zellsuspension zugegeben.

Für die Analyse der Proliferation wurden die Zellen mit einem automatischen Zellerntegerät aus den Vertiefungen entnommen, wobei die Zellen mit dest. Wasser lysiert und durch einen Glasfaserfilter gesaugt wurden. Die DNA wird dabei in dem Filter zurückgehalten. Der Filter wurde in einer Mikrowelle getrocknet und danach in einer Plastikhülle verschweißt. Da es nicht möglich ist, β-Strahlung direkt zu messen, wurde der Filter mit 10ml Szintillationsflüssigkeit getränkt, welche die β-Strahlung in Lichtblitze umwandelte und es ermöglichte, die Radioaktivität in einem β-Szintillationszähler zu bestimmen. Die Radioaktivität wurde in Anzahl der Signale pro Minute (counts per minute) angegeben.

Stimulation von murinen T-Zellen

Murine T-Zellen können in der Kulturschale auf verschiedene Art und Weise stimuliert werden. Die polyspezifische Stimulation erfolgte i. d. R. mit 5µg/ml plattengebundenem αCD3-Antikörper und 0.5µg/ml löslichem αCD28-Antikörper. Der αCD3-Ak wurde 2h bei 37°C im Zellkulturinkubator an eine 6-well-Platte gebunden. Die Zellen sind aber auch mit Concanavalin A (2.5-5µg/ml) oder mit PMA (0.35µl/ml) und Ionomycin (0.35µl/ml) stimulierbar.

Immunhistochemische Färbungen

Herstellung von Gewebeschnitten

Mit Hilfe der Herstellung und Anfärbung von Gewebeschnitten lässt sich die Struktur von Organen sowie der Anteil und die Lokalisierung bestimmter Zelltypen innerhalb derselben untersuchen. Um ein Gewebe schneiden zu können, muss es zuvor in ein spezielles Lagerungsmedium (Paraffin) bzw. Einfriermedium (TissueTek) eingebettet werden. Im Fall von Hautproben wurde diese sechs Stunden in 30%ige Succrose-Lösung eingelegt und anschließend über Nacht in 1% PFA fixiert.

Herstellung von Paraffinschnitten

Zur Analyse von einer Gewebsschicht mittels H&E-Färbung eignet sich zum Beispiel die Paraffineinbettung von diversen Organen (z.B. Haut). Hierbei wurde das Organ zunächst in 4% PFA fixiert. Darauf folgte eine Entwässerung bevor das Organ mit heißem Paraffin in eine dafür vorgesehene Kassette eingebettet wurde.

Herstellung von Gefrierschnitten (Kryoschnitte)

Gefrierschnitte haben gegenüber solchen von in Paraffin eingebetteten Geweben den Vorteil, dass sie sich wesentlich besser für immunhistologische Färbungen eignen, da auf Grund der speziellen Schnitt-

und Fixierungsbedingungen sowie der anschließenden Probenlagerung bei -70°C ein Großteil der Antikörper-Epitope erhalten bleibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden von Lymphknoten, Milzen und Haut aus verschiedenen Mäusen Gefrierschnitte angefertigt. Dazu wurde eine halbe Mausmilz, ganze Lymphknoten oder transplantierte Haut in ein Einbettgeschälchen überführt, mit Einbettmedium bedeckt und bei -70°C eingefroren. Von einer solchen Probe wurden anschließend mit Hilfe eines Kryotoms $4\text{-}6\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt und auf einen „Histobond“ Objektträger transferiert. Nach einer Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Schnitte durch zehnmütige Inkubation in Methanol/Aceton fixiert, eine Stunde bei 37°C getrocknet, bei -70°C gelagert oder für Färbungen verwendet.

H&E-Färbung auf Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte mussten zuerst entparaffinisiert werden, indem die Schnitte zweimal 10min in Xylol, dann je 1mal 3min in 100%-, 95%-, 70%igem Ethanol getaucht und zum Schluss 5min in VE-Wasser gelagert wurden. Danach folgte eine 2-minütige Färbung mit gefiltertem Hämalaun, die anschließend 10min mit Hahnwasser und nachfolgend mit VE-Wasser gewaschen wurde. Der zweite Färbeschritt erfolgte mit 1%igem Eosin für 30sek. Gewaschen wurde mit VE-Wasser. Nun wurde mit aufsteigender Ethanolreihe (95%, 100%) je 5min entwässert, um die Schnitte dann dreimal 2min in dem organischen Lösungsmittel Xylol zu lösen, damit der Schnitt zum Schluss mit Entellan (Xylolbasis) eingedeckelt werden konnte. Die Schnitte sollten mindestens über Nacht unterm Abzug getrocknet werden, damit das Xylol verdampfen und das Entellan aushärten kann.

Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten

Das Schneiden eingefrorener Organe erfolgte an einem Kryotom der Fa. Leica. Wenn nicht anders angegeben, wurden Schnitte von $5\mu\text{m}$ Dicke angefertigt. Diese wurden für eine bessere Anheftung an den Objektträger für ca. 1h bei 37°C getrocknet und dann für 5min in eiskaltem Aceton fixiert. Die Aceton-fixierten Gefrierschnitte wurden zur Rehydrierung für 5min in TBS-T inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger auf Plastik-Immunfärbekammern aufgelegt und in eine Plastik-Färbekassette eingesetzt. Alle Schritte der Antikörper-Färbungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden auf jeden Kapillarspalt $150\mu\text{l}$ TBS-T + 5% Serum (MS oder RS oder GS oder ein Gemisch aus MS, RS, GS) gegeben und die Gefrierschnitte durch 15min Inkubation geblockt. Die Antikörper wurden in ihrer jeweiligen Verdünnung in $120\mu\text{l}$ TBS-T /pro Schnitt aufgetragen und 1h inkubiert. Um eine bessere Übersicht über das jeweilige Gewebe zu bekommen, wurde die DNA der Zellkerne hochspezifisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) angefärbt ($2 \times 150\mu\text{l}$, je 2min). Nach einem abschließenden Waschschriff (zweimal 2 ml TBS-T) zur Beseitigung von Resten der DAPI-Lösung, wurden die Immunfluoreszenz-gefärbten Gefrierschnitte in Mowiol eingebettet. Die Auswertung der Immunhistologie erfolgte am Zeiss M Fluoreszenzmikroskop. Die Bildbearbeitung erfolgte über die Mikroskop-Software Axiovision Rel. 4.8.

Transfektion eukaryontischer Zellen

Bei diesem Vorgang der Virusproduktion wurde die Methode der Calcium-Phosphat-Präzipitation angewandt. In einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat (HEPES) bindet sich die zu übertragende DNA an ausfallendes Calciumphosphat. Die ausgefallenen Kristalle werden der Zellkultur zugegeben und von den Zellen durch Endocytose aufgenommen. In dieser Arbeit wurden als produzierende Zelllinie i. d. R. 293T-Zellen verwendet. 293 Zellen sind HEK (human embryonic kidney cells = humane embryonale Nierenzellen). 293T-Zellen sind eine spezielle Variante, die das „SV40 large T-Antigen“ exprimieren, welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem "SV40 origin of replication" ermöglicht. Damit lassen sich bestimmte Retroviren, wie beispielsweise Lentiviren besser vermehren. Die in dieser Arbeit genutzten retroviralen Gene enthielten das murine (mlv) gag/pol- und das ecotrope Verpackungsgen. Zur optimalen Virusproduktion wurden die Zellen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu etwa 70% konfluent waren.

Bei der Calcium-Phosphat-Präzipitation wurden die DNA-Stücke (pro 10cm-Kulturschale 5µg Vektor, 10µg gag/pol, 3µg K73ecoenv) in 450µl Wasser gemischt und das 50µl 2.5M Calciumchlorid zugegeben. Dieser Mix wurde nun mithilfe der „bubble“-Methode in den 500ml HBS-Puffer getropft, um eine größtmögliche Verteilung zu erreichen. Nach 20-30min Inkubation bei Raumtemperatur ist die Präzipitation abgeschlossen. Die Kristalle konnten sodann tröpfchenweise auf die Zellen gegeben werden, die anschließend mit 9ml frischem DMEM gefüttert und mit 100mM Chloroquin zur Erhöhung der Transfektionseffizienz versetzt wurden. Nach 6-12h wurde das Medium durch frisches ersetzt. Der Überstand mit dem produzierten Virus wurde 36-48h nach Transfektion abgenommen, gefiltert (2µm) und bei -20°C in 1.5ml-Aliquots eingefroren.

Transduktion eukaryontischer Zellen- Titerbestimmung

Zur Ermittlung der Menge an Viruspartikeln im Überstand wurden SC-1 Zellen mit diesem infiziert. Die Zellen wurden am Abend in 24well-Platten zu je 50.000 Zellen ausgesät. Am folgenden Morgen wurde der Virusüberstand in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellen verteilt. Um die Transduktionseffizienz zu steigern, wurden 4µg/ml Protaminsulfat zugegeben. Dessen positive Ladung neutralisiert die negativ geladenen Zellmembranen und führt daher zur besseren Anheftung der Viruspartikel an die Zellen. Nach 12h wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht. Nach weiteren 36h wurden die SC-1 Zellen gewaschen, abtrypsiniert und für die FACS-Analyse gefärbt. Die MOI (multiplicity of infection) wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Zellzahl} * 2 * \% \text{ infizierte Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} = \text{MOI}$$

Transduktion muriner T-Zellen

Die Transduktion muriner T-Zellen erfolgte über die sogenannte Spin Infection. Dazu wurde der Virusüberstand mit 4µg/ml Protaminsulfat, 1000U/ml IL-2 auf die Zellen gegeben und 1.5h bei 31°C und 2.800rpm zentrifugiert. Nach 20h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, das 1000U/ml IL-2 enthielt. Nach weiteren 72h konnten mithilfe von MACS die erfolgreich infizierten Thy1.1-positiven Zellen isoliert werden.

Intravenöse Injektion bei der Maus

Die intravenöse Injektion von Maus-Splenozyten erfolgte mit einer 1ml U-40 Spritze der Firma BD mit einem maximalen Volumen von 250µl. Injiziert wurde in die obere Schwanzvene.

Intraperitoneale Injektion bei der Maus

Bei intraperitonealer Injektion wurde mit einer 1ml U-100 Spritze der Firma BD mit maximalem Volumen von 1ml injiziert. Die Injektion erfolgte in den unteren Bauchraum im Leistenbereich.

Adoptiver Transfer von Maus-Splenozyten

Mit Hilfe von adoptivem Zelltransfer kann *in vivo* eine spezifische Zellpopulation verfolgt und untersucht werden. Hierzu können die Zellen entweder durch die Detektion ihres transgenen Rezeptors mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern detektiert werden oder durch eine farbliche Markierung mit z.B. CFSE. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, kongene Tiere zu verwenden und hierdurch die transferierte Population in dem Empfängertier detektieren zu können. Bei Mäusen existieren zwei Isoformen des CD90-Gens, CD90.1 und CD90.2 (Thy1.1 und Thy1.2), welche in zwei unterschiedlichen Inzuchtlinien der Mäuse exprimiert werden. CD90 bzw. Thy1 ist ein kleines Oberflächenprotein, zu der Immunglobulin-Superfamilie gehörend, das ursprünglich als Thymozyten-Antigen identifiziert worden ist. Nützlich dabei ist, dass sich alle Leukozyten der einen Linie mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen die jeweilige CD90-Isoform von der anderen Linie unterscheiden lassen.

Bei den Versuchen dieser Arbeit wurden i. d. R. Thy1.2-Empfängertiere und Thy1.1-Donorzellen intravenös injiziert.

Anästhesie bei der Maus

Eine Maus wird mit einem Gemisch aus Rompun, Ketanest und NaCl in Narkose versetzt. Der Wirkstoff Xylazin wird in der Tiermedizin als Xylazinhydrochlorid eingesetzt. Rompun, der Handelsname, erzeugt muskelrelaxierende Wirkung. Es ist ein zentraler und peripherer α 2-Adrenozeptor-Agonist. Ketamin ist ein Cyclohexanderivat und wird als Arzneistoff in der Human- und Tiermedizin zur Behandlung von Schmerzen, zur Einleitung einer Narkose eingesetzt. Es dient der Erzeugung von Schlaf und Schmerzfreiheit. Das Gemisch wird intraperitoneal verabreicht. Da eine Maus keinen Lidreflex besitzt, wurden die Augen während der Narkose mit Bepanthen Augensalbe (Bayer) vor dem Austrocknen geschützt.

2% Rompun (Bayer Health Care)	→ 500µl
Ketanest 100mg/ml (Albrecht)	→ 500µl
NaCl (Plastipur)	→ 4.5ml

Von diesem Gemisch werden 10µl/g Maus injiziert.

Haut-Transplantation bei der Maus

Die Schwanzhaut einer getöteten Donor-Maus wurde im Ganzen Stück vom Knochen gezogen, in kaltem PBS gelagert und zeitgleich eine Rezipienten-Maus narkotisiert. Die linke Rückenflanke wurde dann mit einem Rasierer (Tiermaschine POCKET PRO® von WAHL®) vom Fell befreit. Anschließend wurde mit einem Tropfen Sterillium die Hautpartie zunächst desinfiziert und dann ein ca. 1cm² großes Stück Rückenhaut herausgeschnitten. Auf die nackte Stelle wurde dann ein passendes Stück Schwanzhaut gelegt, die Wunde mit einer Salbenkompressen geschützt und zunächst mit einer elastischen Fixierbinde (Rancolast® Lohmann&Rauscher), dann mit einem weichen Tape (Leukopor®) und schließlich mit Klebeband Tape (Blenderm™) umwickelt. Der Verband wurde nach 8-10 Tagen vorsichtig gelöst. Das Transplantat wurde anschließend alle 2 Tage auf Abstoßungszeichen kontrolliert.

Statistik

Statistische Signifikanzen wurden durch den ungepaarten, zweiseitigen Studentischen t Test ermittelt. P-werte unter 0.05 wurden als statistisch signifikant bezeichnet.

Kapitel 3 Ergebnisse

Dieser Teil der Arbeit präsentiert die Generierung und Charakterisierung von Foxp3 transduzierten antigenspezifischen Tregs. Dazu wurden funktionelle Analysen in der allospezifischen Immunreaktion *in vitro* und *in vivo* in lymphopenen Mäusen durchgeführt. Schließlich wurden Bedingungen für den klinischen Einsatz in nicht lymphopenen, stark immunogenen Mausmodellen untersucht. Der zweite Teil fokussiert auf Untersuchungen der Mechanismen der Toleranzinduktion.

Teil I

Alloantigen-spezifische Aktivierung von murinen CD4⁺ T-Zellen über den direkten Erkennungsweg

Um regulatorische T-Zellen zu erhalten, können die in der Peripherie befindlichen natürlichen Tregs isoliert und *in vitro* expandiert werden. Es ist jedoch schwer, antigenspezifische Tregs zu identifizieren und ihre Anzahl für eine gegebene Antigen-spezifität ist gering. Daneben können Tregs während einer *In vitro*-Expansion deutlich an Reinheit verlieren. Schließlich ist unklar, ob Tregs, welche über längere Zeit *in vitro* aktiviert wurden, noch eine lange Überlebenszeit *in vivo* nach adoptivem Transfer haben. Effektor T-Zellen verlieren zumindest durch eine *In vitro*-Expansion deutlich an *In vivo*-Effektivität. Die Induktion von iTregs durch Antigenstimulation in Anwesenheit von TGF- β *in vitro* liefert hingegen nur Tregs mit eingeschränkter Stabilität und fehlender Demethylierung der TSDR Region (Floess 2007). Da es zudem vermehrt Hinweise über eine eingeschränkte Stabilität von nTregs unter inflammatorischen oder lymphopenen Bedingungen gibt, wurden in dieser Arbeit antigenspezifische T-Zellen durch retrovirale Transduktion mit dem Transkriptionsfaktor Foxp3 zu stabilen antigenspezifischen Tregs konvertiert.

Die meisten Studien im Zusammenhang mit Treg-vermittelter Toleranzinduktion befassen sich mit nTregs polyklonaler Spezifität. Relativ wenige Arbeiten sind bisher vorgestellt worden zu allospezifischen Tregs, die wahrscheinlich in diesem Kontext von großer Bedeutung sind, aber bislang wenige Mittel und Strategien zu deren Identifikation und Isolierung bekannt sind. Ferner sind die Details bezüglich ihrer Stabilität noch ungeklärt. Um die besten Bedingungen für die alloantigen-spezifische Aktivierung von murinen naiven T-Zellen zu ermitteln, wurden verschiedene Versuchsansätze ausgearbeitet. Zunächst wurden Splenozyten, mesenteriale, inguinale und axiale Lymphozyten aus einer BALB/c-Maus isoliert. Aus diesen wurden per *Magnetic associated cell sorting* (MACS) die CD4-positiven Zellen gewonnen und mit dem Farbstoff CFSE markiert. Zusammen mit bestrahlten C57BL/6-Splenozyten wurden sie in einem Mischungsverhältnis von 2:1 in einer 96-Loch-Zellkulturplatte unterschiedlich lange inkubiert, um die Proliferation und den Aktivierungsgrad zu untersuchen. Die Bestrahlungsdosis der C57BL/6 Splenozyten wurde auf 20Gy beschränkt, um die Proliferationsfähigkeit zu unterbinden, ohne den APC ihre antigenpräsentierende Wirkung zu nehmen. Da die T-Zellaktivierung frühestens nach 24h erkennbar wird, erfolgte die erste FACS-Analyse nach 48 Stunden, die weiteren nach 72h und 96h und die letzte nach 168h. Dazu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD25 und CD69, einem weiteren Aktivierungsmarker, gefärbt. Nach 48h war eine leichte Proliferation und Expression von CD25 und CD69 feststellbar (Abb. 4).

Nach 72h und 96h war diese schon merklich erhöht und zeigte nach 168h ein sehr starkes Aktivierungsprofil.

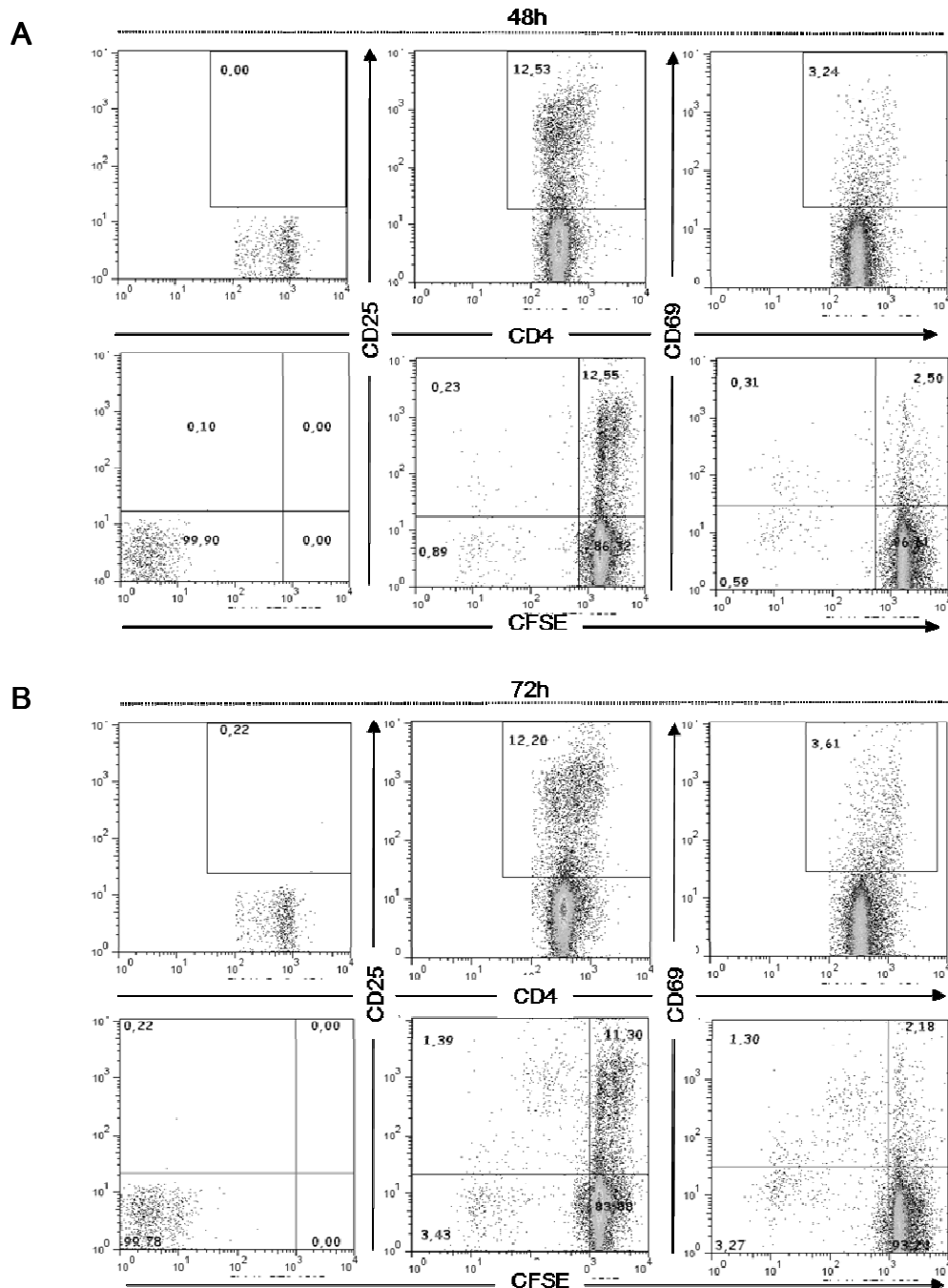
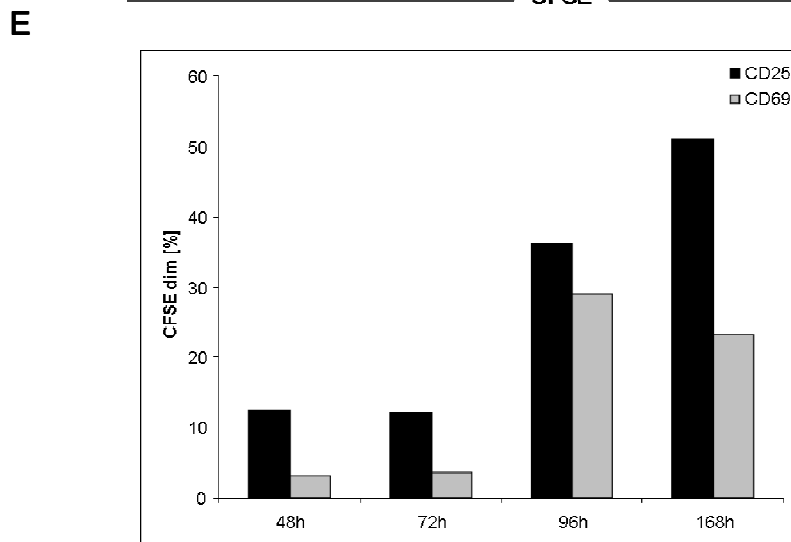
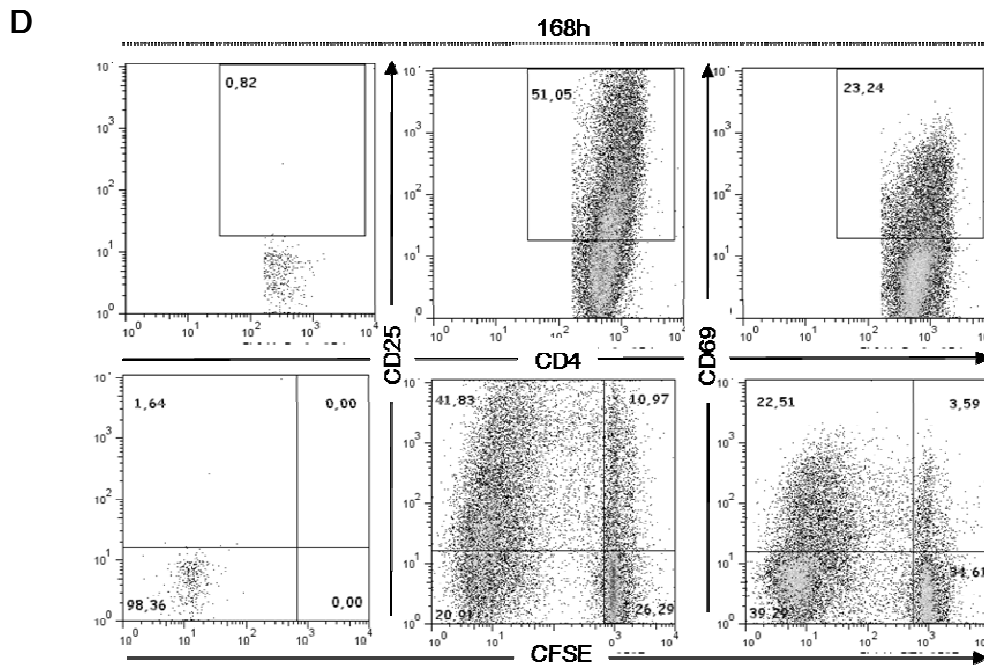
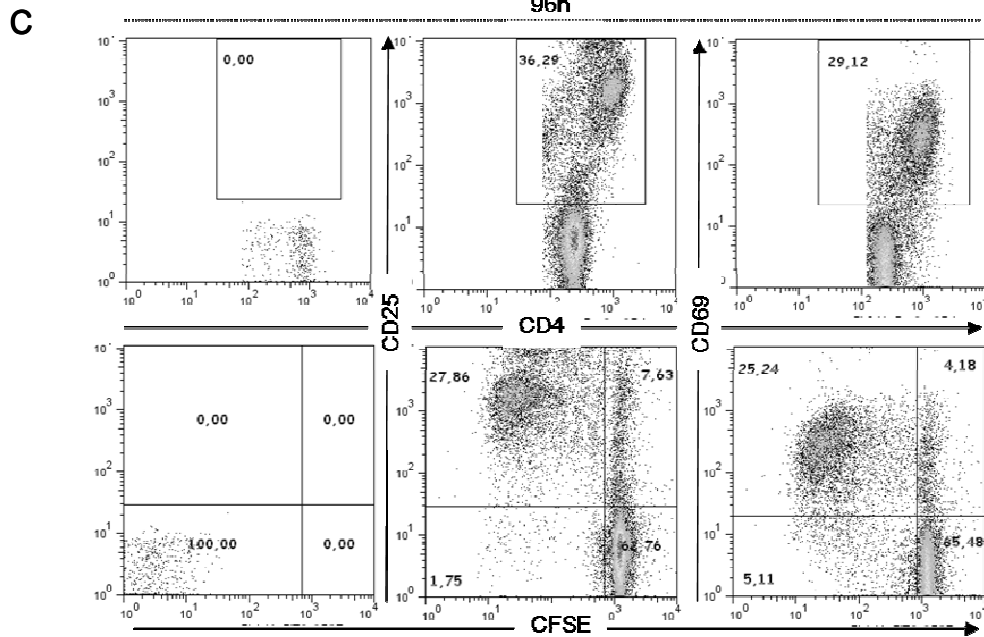


Abb. 4: Allospesifische Aktivierung muriner CD4⁺ T-Zellen. Als Stimulatoren dienten mit 20Gy bestrahlte C57BL/6-Splenozyten. Mit 10 μ M CFSE markierte BALB/c-CD4⁺ T-Zellen stellten die *Responder*-Zellen dar. Die Zellen wurden in einem Mischungsverhältnis von 2:1 (Stimulatoren 4 \cdot 10⁵, Responder 2 \cdot 10⁵) in einer 96-Loch-Zellkulturplatte inkubiert. Die FACS-Analyse erfolgte nach A) 48h, B) 72h und C) 96h D) 168h. Dabei wurden die Zellen auf Expression von CD4, CD25, CD69 und CFSE untersucht. E) zeigt die Daten in komprimierter Form als Säulendiagramm.



Anreicherung von allospezifisch aktivierten CD4⁺CD25⁺CD69⁺ T-Zellen

Ziel ist es, eine möglichst hohe Reinheit an alloreaktiven Zellen zu erhalten, um daraus Tregs zu generieren. Um das Ausmaß der Antigenspezifität zu untersuchen, wurden *Recall*-Experimente durchgeführt. In einem weiteren Experiment sollte die Reaktion der aktivierten Zellen auf erneute Stimulation analysiert werden. Dazu wurden BALB/c-CD4⁺ Zellen mit bestrahlten C57BL/6-Splenozyten 72h aktiviert. Daraufhin wurden die CD25⁺CD69⁺ von den negativen Zellen per MACS voneinander getrennt. Jede Fraktion wurde mit CFSE markiert und 24h kultiviert. Darauf folgte eine erneute dreitägige Stimulation mit bestrahlten C57BL/6-Splenozyten, ein sogenannter *Recall-Assay*. Per FACS wurde schließlich die CFSE-Verminderung und damit die Proliferationsrate der positiven und negativen Population ermittelt (Abb. 5). Bei einer erstmaligen Stimulation proliferierten 28% der BALB/c-CD4⁺ Zellen nach 72h. Wurden isolierte CD25⁺CD69⁺ Zellen erneut drei Tage reaktiviert (Recall) proliferierten von diesen 86%, während nur 18% der CD25⁻CD69⁻-Fraktion auf Restimulation reagierten. Das heißt, dass CD25⁺CD69⁺ T-Zellen zu fast 90% stark allospezifisch reagieren und somit eine geeignete Population zur Generierung von allospezifischen Regulatoren darstellen.

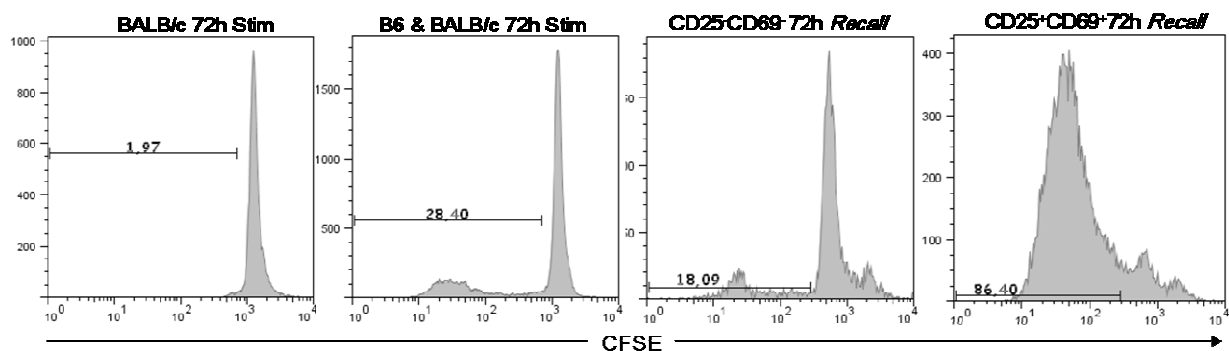


Abb. 5: Anreicherung allospezifisch aktivierter BALB/c-CD4⁺ T-Zellen. Recall-Assay: BALB/c-CD4⁺ Zellen wurden mit bestrahlten C57BL/6-Splenozyten 72h aktiviert. CD25⁺CD69⁺ wurden per MACS sortiert und mit CFSE markiert (5 μ M). Nach 24h wurden die Zellen erneut mit bestrahlten C57BL/6-Splenozyten 72h reaktiviert (Recall). Die Proliferationsraten der BALB/c-CD4⁺ Zellen wurden per FACS analysiert.

Alloantigen-spezifische Aktivierung von murinen CD4⁺ T-Zellen über den indirekten Erkennungsweg

Es gibt Hinweise darauf, dass Transplantate im murinen sowie humanen System besser akzeptiert werden, wenn Tregs mit indirekter Alloantigen-spezifität transferiert werden (Hornick 2000; Jiang 2006; Tsang, Tanriver et al. 2008). Allerdings konnte dies nur mit TCR-transgenen Mausmodellen gezeigt werden. Daran anknüpfend wurden verschiedene Ansätze für die Aktivierung und Isolierung von CD4 T-Zellen mit indirekter Alloantigen-spezifität aus dem natürlichen T-Zellrepertoire getestet. Um indirekt

präsentierende APC zu erhalten, wurden nach Knochenmarkentnahme aus BALB/c-Mäusen DC generiert und mit unterschiedlich erzeugten Zelllysaten koinkubiert und mittels Zugabe von CpG maturiert. Diese sollten auf Empfänger-MHC allogene Peptide präsentieren. Die Zelllysate wurden aus BALB/c (syngen) oder allogenen (C57BL/6) Milzzellen auf unterschiedliche Weise angefertigt. Das Protokoll nach Prof. Martin Sauer sah zur Zelllyse einen 3-fachen Einfrier-Auftau-Zyklus in PBS mit nachfolgender Zentrifugation vor, wovon der Überstand im Experiment eingesetzt wurde. In Prof. Warneckes Protokoll erhielten die Milzzellen nach dem Einfrier-Auftau-Zyklus zusätzlich 5-6 Ultraschall-Impulse (Warnecke, Bushell et al. 2007). Nach Prof. Lechler erfolgte die Milzzell-Lyse durch Einfrier-Auftau-Serien in einem Spezialpuffer, der Protease-, Trypsin- und Serinproteaseinhibitoren, sowie Nonidet enthielt. Überstand 1 wurde nach der ersten anschließenden Zentrifugation entnommen, nach einem weiteren Ultrazentrifugationsschritt wurden Überstand 2 und das Pellet geerntet (Baker, Hernandez-Fuentes et al. 2001). Zur Untersuchung, ob und wie gut BALB/c CD4⁺ T-Zellen auf die mit C57BL/6-Zelllysate geladenen DC reagieren, wurden sie mit CFSE markiert und vier Tage zusammen kultiviert. Per FACS-Analyse wurden dann die Proliferationsraten im Vergleich zur direkten Stimulation ermittelt. Dabei zeigte die direkte Alloantigenstimulation die höchste Proliferationsrate mit 27%. Bei der indirekten Stimulation erzielten die generierten allogenen Zelllysate unterschiedliche Ergebnisse. Die allogenen Ansätze nach den Protokollen von Sauer (DC 2) und Warnecke (DC 3) ergaben nur Proliferationsraten von etwa 4 bzw. 5%, während die beiden Überstände (DC 4, 5) und das Zellpellet (DC 6) nach dem Protokoll Lechler 16, 11.5 bzw. 18.5 % Proliferation zeigten (Abb. 6 A, B). Zur Kontrolle und zum Vergleich wurde die Proliferation von nicht stimulierten, aber kultivierten BALB/c CD4⁺ T-Zellen gemessen. Da auch nach Stimulation mit syngenem Zelllysate 8.2% der Zellen proliferierten, zeigte die Stimulation mit allogenen Lysaten keine wesentlich höhere Proliferation. Auch ein Versuch der Amplifizierung indirekter allospezifischer Immunantworten durch mehrfache Stimulation gelang nicht (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der geringen Zahl von T-Zellen mit vermeintlich indirekter Allospezifität gelang es nicht, eine ausreichende Anzahl für die anschließende retrovirale Transduktion zu isolieren. Als Konsequenz daraus wurden Splenozyten zur Stimulation herangezogen, die aus der F1-Generation einer Kreuzung zwischen C57BL/6 und BALB/c stammten. Denn die APC dieser Tiere exprimieren beide MHC-Haplotypen, nämlich H-2K^b von C57BL/6 und H-2K^d von BALB/c und können sowohl über den direkten als auch indirekten Weg Antigen zu präsentieren (Abb. 7).

A

Beschriftung	Ansatz	Protokoll Mizzell-Lysat	nach
DC1	syngen indirekt	Einfrieren/Auftauen, Zentrifugation, Überstand	Sauer
DC 2	allogen indirekt	Einfrieren/Auftauen, Zentrifugation, Überstand	Sauer
DC 3	allogen indirekt	Einfrieren/Auftauen, Ultraeschall, Zentrifugation, Überstand	Warnecke
DC 4	allogen indirekt	Einfrieren/Auftauen, Spezialpuffer, kurze Zentrifugation, Überstand 1	Lechler
DC 5	allogen indirekt	Zentrifugation 2, Überstand 2	Lechler
DC 6	allogen indirekt	Pellet 2	Lechler

B

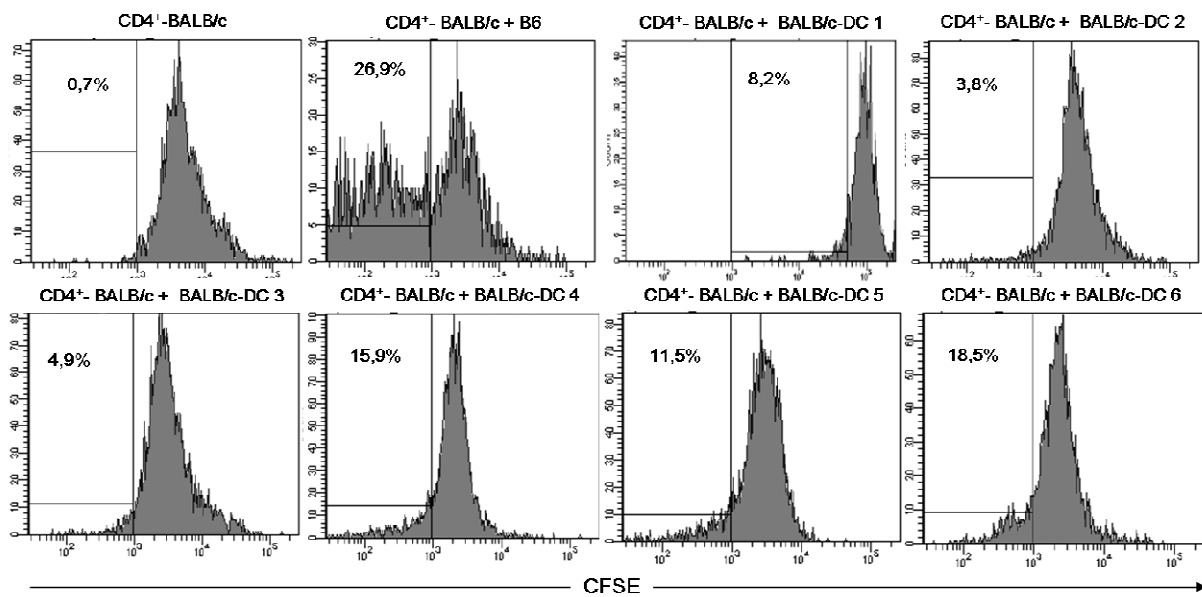


Abb. 6: Vergleich indirekter mit direkter Alloantigenstimulation A) Beschriftung und Protokoll der unterschiedlichen Zelllysate B) CD4⁺BALB/c T-Zellen wurden mit CFSE markiert und für die direkte Antigen-Stimulation entweder zur Kontrolle alleine oder mit bestrahlten C57BL/6-Splenozyten vier Tage kultiviert. Für die indirekte Stimulation wurden BALB/c-DC generiert, die mit unterschiedlich erzeugten Zelllysaten inkubiert worden waren und vier Tage mit CFSE-markierten BALB/c-CD4⁺ T-Zellen kultiviert. Der Stimulationsgrad ist über die Proliferation, dargestellt durch die CFSE-Reduktion der CD4⁺ T-Zellen per FACS-Analyse erkennbar. (Zelllysate Martin Sauer (nicht publiziert), Gregor Warnecke (Warnecke 2007), Robert Lechler SN1, SN2, P2: (Baker 2001; Trenado 2003))

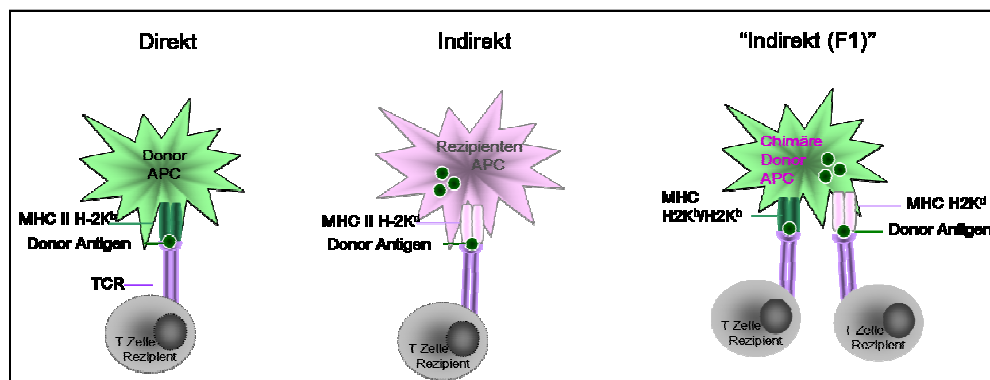


Abb. 7: Schema zur Veranschaulichung der Unterschiede zwischen direkter, indirekter und kombinierter Alloantigen-Erkennung. Bei der Kreuzung zweier Tiere, von denen eines den MHC H-2K^b, das andere den MHC H-2K^d exprimiert, resultieren in der F1-Generation Chimären, die beide tragen.

Das retrovirale System und Vektorkonstruktion

Das retrovirale Vektorsystem stellt ein effizientes Hilfsmittel für den stabilen Gentransfer dar. In dieser Arbeit wurden allospezifische CD4⁺ Effektoren über die ektopische Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 durch retroviral vermittelten Gentransfer zum regulatorischen Geno- und Phänotyp umgestaltet (Hori, Nomura et al. 2003; Jaeckel, von Boehmer et al. 2005). Zwei retrovirale Vektoren wurden hergestellt, die replikationsinkompetent sind. Es wurden SIN (self inactivating=selbstinaktivierend) retrovirale Vektoren entwickelt, denen die Enhancer/Promotor-Elemente der LTRs fehlen. Damit bleibt die Expression der Transgene in den Zielzellen von endogenen Promotoren abhängig (Yu 1986). Es wurden zwei retrovirale Vektoren verwendet, welche das Gen für den Transkriptionsfaktor Foxp3 zusammen mit dem Oberflächenmarker Thy1.1 (CD90.1) exprimieren. Der Kontrollvektor enthält nur Thy1.1. Die Gene werden durch eine IRES (*internal ribosomal entry site* = interne ribosomale Eingangsstelle) getrennt, um eine unabhängige und unmittelbare Synthese der Proteine zu erleichtern (Abb. 8). Thy1 (CD90) ist ein nicht immunogener Oberflächenmarker, der vor allem auf T-Zellen der Maus exprimiert wird (Raff 1971), jedoch kein Signal weiterleitet. Die meisten Mausstämme exprimieren ausschließlich Thy1.2, eine spezielle Mauslinie das Isomer Thy1.1 (Reif und Allen 1966).



Abb. 8: Grafische Darstellung der verwendeten Konstrukte RSF91 IRES-Thy1.1 und RSF91 Foxp3-IRES-Thy1.1. Foxp3 und Thy1.1 cDNA wurden in das RSF91 Vektorsystem (Schambach 2006) kloniert. Foxp3 und Thy1.1 werden gleichzeitig durch die interne ribosomale entry site (IRES) exprimiert. Dem Kontrollvektor fehlt Foxp3.

Virusproduktion Foxp3-Thy1.1 und Thy1.1 und Titerbestimmung

Mithilfe des beschriebenen Vektorsystems wurden 293T-Zellen via Calcium-Chlorid-Präzipitation transfiziert, um eine möglichst große Anzahl Foxp3-Thy1.1 bzw. Thy1.1 tragender Viruspartikel zu produzieren. Zur Überprüfung des Titers wurden SC1-Fibroblasten mit Virusüberstand infiziert und nach drei Tagen die Transduktionseffizienz per FACS-Analyse ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Thy1.1 und das intrazellulär vorliegende Foxp3 gefärbt. Im Falle des Foxp3-Thy1.1 Vektors exprimierten 76% Foxp3 und Thy1.1, der Thy1.1 Kontrollvektor erzeugte fast 98% Thy1.1 aber keine Foxp3-Expression (Abb. 9). Die Kalkulation der MOI (*Multiplicity of Infection*), die das zahlenmäßige Verhältnis von Viruspartikeln zu deren Zielzellen beschreibt, ergab in diesem Fall bei dem Kontrollvirus einen Wert von $1.54 \cdot 10^8$ und bei dem Foxp3Thy1.1 Virus $9.11 \cdot 10^7$. Die FACS-Färbung und Werte der MOI sind eine repräsentative Darstellung für zahlreiche Experimente derselben Art.

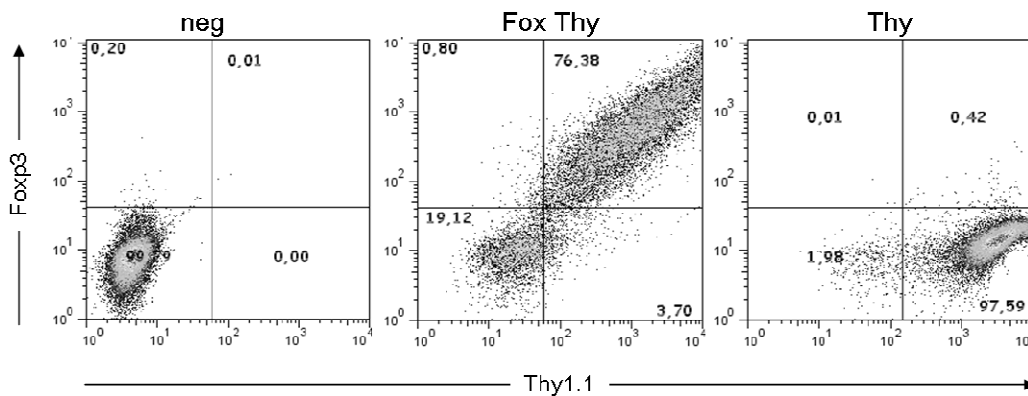


Abb. 9: Repräsentative Darstellung der Foxp3- und Thy1.1-Expression nach Transduktion mit retroviralen Vektoren in SC1-Zellen per FACS-Analyse. SC1-Zellen wurden mit den zuvor produzierten Virusüberständen transduziert. Nach 3 Tagen konnten die Expression von Thy1.1 und im Falle des Foxp3-Thy1.1-Vektors auch Foxp3 nachgewiesen werden.

Effizienz der Transduktion muriner T-Zellen

Das eigentliche Ziel der Virusproduktion in dieser Arbeit besteht in der Transduktion muriner, aktivierter CD4⁺ T-Zellen, um diesen regulatorischen Geno- und Phänotyp zu verleihen. Dazu wurden Vorversuche mit durchgeführt, um die Bedingungen für eine höchstmögliche Transduktion zu optimieren. Es wurden je $1 \cdot 10^6$ aktivierte CD4⁺CD25⁺ Zellen mit Foxp3-Thy1.1 Virusüberstand und einer MOI 5 einmal durch *Spin Infection* transduziert und drei Tage kultiviert. Die unterschiedlichen Zytokinzugaben sind auch der Abb. 10 zu entnehmen. Die Zellen wurden entweder ohne IL-2 kultiviert oder mit 100U/mL bzw. 1000U/mL IL-2 oder mit 1000 U/mL IL-2 und 100ng/mL IL-7 oder zweifach transduziert mit zusätzlich 100 U/ml IL-2. Per FACS-Analyse wurden die Thy1.1-positiven Zellen gemessen und manuell mit einem Zellzähler und Trypanblau-Färbung die Lebendzellzahl ermittelt. Die unterschiedlichen Bedingungen hatten keine Auswirkung auf die Transduktionseffizienz, da alle Ansätze eine Thy1.1-Expression zwischen 90 und 95% aufwiesen. In der Anzahl lebender Zellen waren aber gravierende Unterschiede feststellbar. So war im Ansatz, der kein IL-2 erhalten hatte, mit 330.000 die geringste Anzahl lebender Zellen zu finden, während die zweimalige Transduktion mit 100U/ml knapp $1.2 \cdot 10^6$ lebende Zellen ergaben, was einer geringen Vermehrung entspricht (Abb. 10).

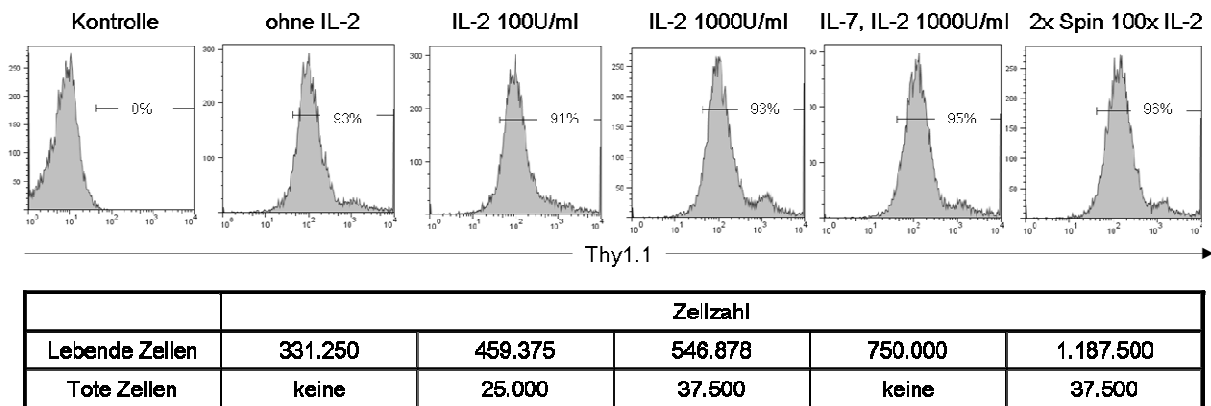


Abb. 10 : Transduktionseffizienz muriner CD4+ T-Zellen. Alloaktivierte CD4+CD25+CD69+ BALB/c Splenozyten wurden auf unterschiedliche Weise mit Virus transduziert. In der Regel wurde eine Spin-Infektion vorgenommen ohne IL-2, mit 100U/mL, 1000U/mL, 1000U/mL und IL-7. In einem Fall wurde an eine Spin-Infektion eine zweite Runde angeschlossen und 100U/mL IL-2 zugegeben. Die Transduktionseffizienz wurde ermittelt über die Thy1.1-Expression per FACS-Analyse.

Expansion transduzierter T-Zellen

Humane regulatorische T-Zellen lassen sich außerordentlich effizient *in vitro* expandieren (Hoffmann 2004). Die Expansion muriner natürlicher und induzierter Tregs ist vergleichsweise schwer. Um die Expansionsfähigkeit der mit Foxp3-Thy1.1 Virus oder Thy1.1 Kontroll-Virus transduzierten Zellen zu prüfen, wurden die Thy1.1 positiven Zellen per MACS isoliert und zusammen mindestens 20 Tage kultiviert. IL-2 wurde alle 2 Tage erneuert (1000 U/mL). Die Anzahl lebender Zellen wurde an den Tagen 0, 12 und 20 manuell ermittelt. Nach 12 Tagen hatte sich die Anzahl Foxp3+Thy1.1+ Zellen um den Faktor 11.8 vergrößert, die der Kontrollzellen um 18.8 (Abb. 11). Nach 20 Tagen hatten sich die Foxp3+Thy1.1+ 27fach und die Thy1.1+ Zellen 17.1fach vermehrt. Anhand der nach 20 Tagen per FACS-Analyse gemessenen Thy1.1 Expression, die bei den Kontrollzellen bei 95% und den Foxp3+Thy1.1+ Tregs noch bei 92% lag, bewiesen letztere einen sehr stabilen Treg-Phänotyp nach *In vitro*-Expansion.

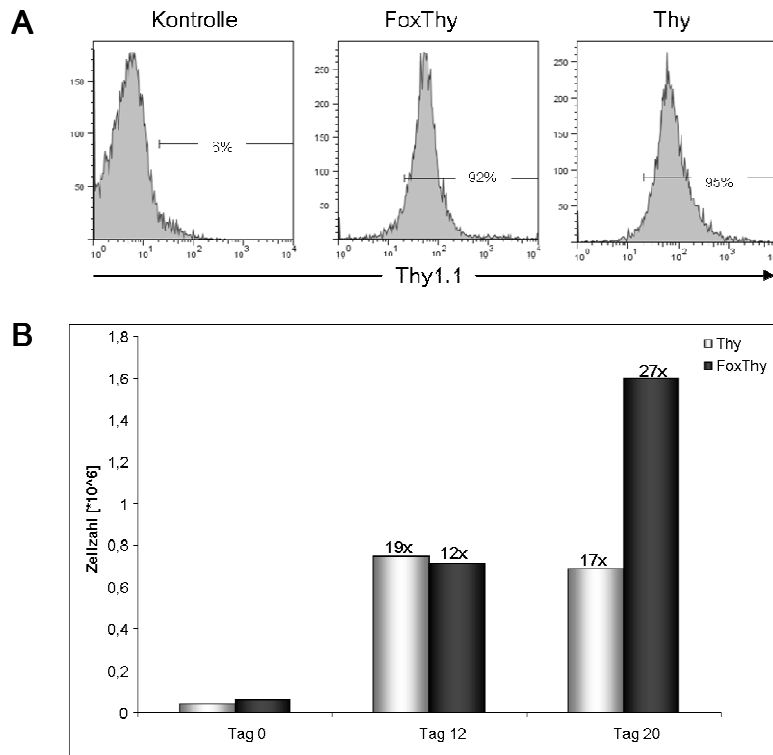


Abb. 11: Expansion transduzierter T-Zellen. Nach erfolgreicher Transduktion konnten die Foxp3-Thy1.1 transduzierten Tregs innerhalb von 20 Tagen bis zu 27fach expandiert werden. Ihre Stabilität konnte über die Thy1.1-Expression per FACS-Analyse nachgewiesen werden. (Tregs: Foxp3 Thy1.1, Kontrollzellen: Thy1.1) A) Darstellung der Thy1.1 Expression als Histogramm B) Darstellung der Zellzahlen als Säulendiagramm.

Regulatorischer T-Zellphänotyp von transduzierten Tregs

Die natürlichen und induzierten Tregs im Immunsystem der Maus lassen sich durch eine relativ charakteristische Expression diverser Oberflächen- und Intrazellulärmarker von anderen Zellen unterscheiden. Der wichtigste Marker ist der Transkriptionsfaktor Foxp3, den in der Maus nahezu ausschließlich Regulatoren exprimieren (Hori 2003). Daneben exprimieren Tregs konstitutiv CTLA-4, ein negativer Kostimulator, welcher Effektorfunktionen von Tregs vermittelt (Wing 2008). GITR ist an der Oberfläche von Tregs aber auch aktivierten T-Zellen zu finden (McHugh 2002; Ronchetti 2004). Eine mögliche suppressorische Rolle wird allerdings noch kontrovers diskutiert (Shimizu 2002; Shevach 2006). CD62L (L-Selectin), ein *Homingmarker* oder Zelladhäsionsrezeptor. Er wird auf naiven und frisch aktivierten T-Zellen exprimiert und ist dafür verantwortlich, dass diese in sekundäres, lymphoides Gewebe migrieren können. CCR7 ist ein Chemokinrezeptor, der ebenfalls auf aktivierten T-Zellen zu finden ist und als *Homingmarker* gilt, da er die Migration in lymphoides Gewebe unterstützt (Sallusto 1999).

Zur Typisierung der durch retroviralen Gentransfer *in vitro* induzierten Tregs im Vergleich zu den Merkmalen natürlich vorkommender Tregs wurden diese per FACS-Analyse auf die Expression obengenannter Marker überprüft. Selbst nach zwanzigtägiger Expansion waren die Zellen zu 96% CD4⁺CD25⁺, exprimierten zu 89% Foxp3 und CTLA-4. Außerdem wiesen 95% eine besonders hohe Expression von GITR auf. Die *Homingmarker* CD62L und CCR7 waren auch nach 20-tägiger *In vitro*-Expansion nur in einem Teil der Zellen herunterreguliert, so dass ein *Homing* in sekundäre lymphatische Organe noch möglich ist (Abb. 12).

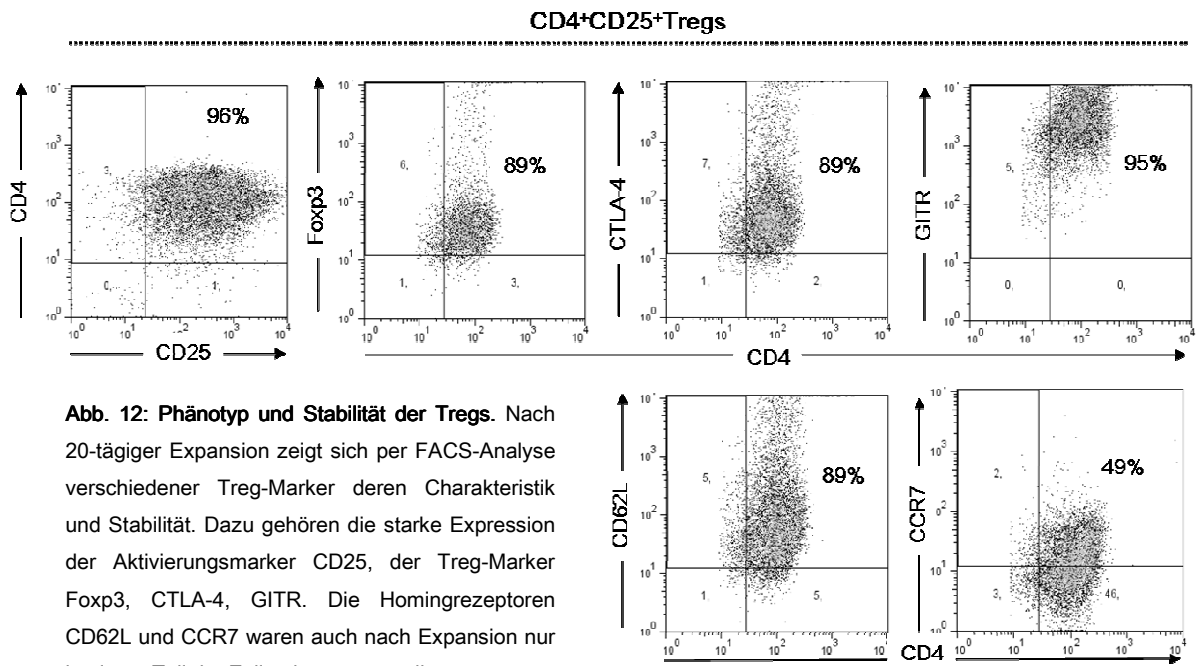


Abb. 12: Phänotyp und Stabilität der Tregs. Nach 20-tägiger Expansion zeigt sich per FACS-Analyse verschiedener Treg-Marker deren Charakteristik und Stabilität. Dazu gehören die starke Expression der Aktivierungsmarker CD25, der Treg-Marker Foxp3, CTLA-4, GITR. Die Homingrezeptoren CD62L und CCR7 waren auch nach Expansion nur in einem Teil der Zellen herunterreguliert.

Suppressions-Assay - *In Vitro*

Im folgenden Experiment wurden die suppressorischen Fähigkeiten der durch retroviralen Gentransfer generierten Tregs im Vergleich zu kontrolltransduzierten Zellen *in vitro* untersucht. Dazu wurden in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) CD4⁺-sortierte BALB/c T-Zellen mit bestrahlten C57BL/6 Splenozyten allogenen stimuliert. Zu einer solchen MLR wurden entweder Foxp3Thy1.1-transduzierte BALB/c Tregs oder zum Vergleich Thy1.1⁺ kontrolltransduzierte BALB/c CD4⁺CD25⁺ Zellen gegeben. Nach drei Tagen Stimulation wurden die Zellen mit radioaktiv markiertem Thymidin markiert und nach weiteren 18h der Einbau des radioaktiven Materials gemessen. Die Tregs waren in der Lage, die Proliferation der naiven CD4⁺ T-Zellen signifikant zu inhibieren (p=0.0042), während der Einfluss der Kontrollzellen unwesentlich war. Die Tregs selbst waren anerg, wenn sie erneut nur mit allogenen Stimulatorzellen in Kontakt kamen (Abb. 13).

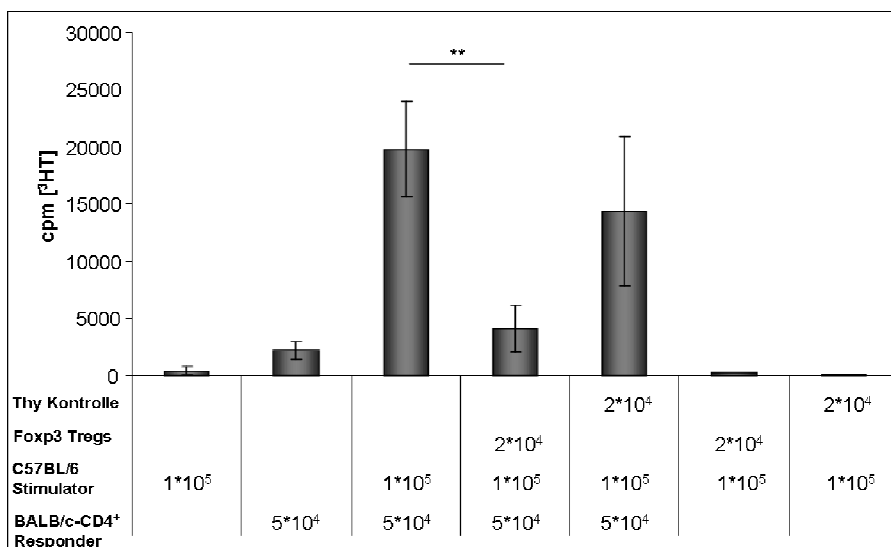


Abb. 13: Tregs inhibieren signifikant eine MLR. 5*10⁴ naive BALB/c-CD4⁺ T-Zellen wurden mit 1*10⁵ bestrahlten C57BL/6-Splenozyten mit 2*10⁴ oder ohne Tregs (Foxp3) oder Transduktionskontrolle (Thy1.1) in einer MLR drei Tage kultiviert. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der Thymidininkorporation von dem in Triplikaten durchgeführten

Hauttransplantation im lymphopenen Mausmodell

Nachdem die per Virustransduktion hergestellten Tregs *in vitro* eine durch Alloantigen stimulierte MLR inhibieren konnten, wurde anschließend deren Kompetenz *in vivo* untersucht. Um die translationale Bedeutung der Experimente zu erhöhen, wurde das immunogenste Allotransplantationsmodell untersucht. Die Haut ist deutlich immunogener als das Herz. Nierentransplantate werden zwischen einigen Mausstämmen spontan toleriert und allogene Lebertransplantate werden in der Regel in Mäusen nicht abgestoßen. Daneben verwenden viele Transplantationsexperimente nur einen partiellen MHC-*mismatch* oder Empfängermäuse, welche nur zu einer geringen Abstoßung führen (z.B. C3H). In dieser Arbeit wurde bewusst ein kompletter MHC-*mismatch* (H-2K^b→H-2K^d) in einer immunogenen Donor/Spenderkombination gewählt (C57BL/6→BALB/c). Toleranzinduzierende Protokolle in diesem Setting sollten möglicherweise auch Translationspotenzial besitzen. Um über ein möglichst definiertes Umfeld im lebenden Organismus zu verfügen und den experimentellen Aufbau kalkulierbarer zu machen, wurden zunächst lymphopene, d.h. nicht immunkompetente, Mäuse eingesetzt. Dazu eignen sich die sogenannten RAG1-defizienten (*recombination activating gene*) Mäuse. Ihnen fehlt das *rag1*-Gen. Der *knock-out* hat zur Folge, dass keine reifen B- und T-Zellen generiert werden können und damit keine adaptive Immunantwort zustande kommt (Bories 1991).

Im nachfolgend beschriebenen Modell (Abb. 14) modifiziert nach Kathryn Wood (Kingsley, Karim et al. 2002) dienten BALB/c-RAG1^{-/-}-Mäuse als Rezipienten. Kontrollmäuse erhielten zur immunologischen Rekonstitution 5*10⁵ naive, sortierte CD4⁺CD45RB^{hi} T-Zellen. Versuchsmäusen wurden am Tag -1 je 5*10⁵ naive CD4⁺CD45RB^{hi} T-Zellen und entweder transduzierte CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs unterschiedlicher Spezifität, *in vitro* aktivierte nTregs oder Thy1.1-transduzierte Kontrollzellen intravenös injiziert. Am nächsten Tag bekamen eine Kontrollgruppe syngene (BALB/c), alle anderen allogene (C57BL/6) Hauttransplantate. Zwischen acht und zehn Tagen später wurde der Verband abgenommen und die Transplantate täglich auf Anzeichen von Abstoßungsreaktionen in Form nekrotischen Gewebes untersucht. Abb. 15 veranschaulicht die Fähigkeit der transduzierten Tregs, das Transplantatüberleben nach Hauttransplantation signifikant zu verlängern. Ein allogenes Transplantat ohne Zugabe von Tregs wurde im Schnitt nach 10.5 Tagen abgestoßen. Wenn kontrolltransduzierte Thy1.1 Zellen injiziert wurden, war eine komplette Abstoßung durchschnittlich an Tag 13 feststellbar. Polyspezifisch aktivierte, nTregs konnten die Abstoßung immerhin signifikant 33.5 Tage verhindern (p=0.0039). Hingegen zeigten 40% der Mäuse mit polyspezifisch und allospezifisch aktivierten, transduzierten Tregs eine Toleranz ohne Abstoßung der Transplantate (>100 Tage, p<0.0001, Abb. 15 A). Hatten die Tregs eine Kombination aus indirekter und direkter Spezifität (allo F1), konnten sie in über 80% der Versuchstiere eine Langzeit-Toleranz induzieren (p=0.0001, Abb. 15 B) und waren dabei sogar signifikant besser geeignet als nTregs (p=0.0121). Syngene Transplantate wurden in keinem der Fälle abgestoßen und mindestens 100 Tage akzeptiert. Alloantigen-spezifische Tregs mit direkter und indirekter Antigenerkennung waren deutlich effektiver als polyspezifische Tregs und Tregs mit rein direkter Antigenerkennung. Es ist das erste Mal, dass dieser Vorteil antigenspezifischer Tregs in der Allotoleranz mit Tregs des natürlichen Repertoires gezeigt wurde.

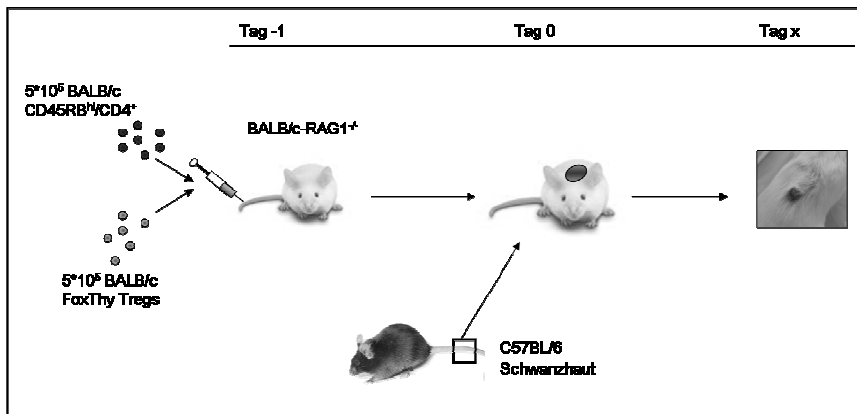


Abb. 14: Lymphopenes Hauttransplantationsmodell: $5 \cdot 10^5$ Teffs und $5 \cdot 10^5$ Tregs wurden den Rezipienten (BALB/c-RAG1^{-/-}) i.v. an Tag -1 gespritzt. An Tag 0 erhielten diese Mäuse ein Stück Schwanzhaut der Donormaus (C57BL/6). Der Verband wurde an Tag 10 gelöst. Die Begutachtung des Transplantats erfolgte alle zwei Tage.

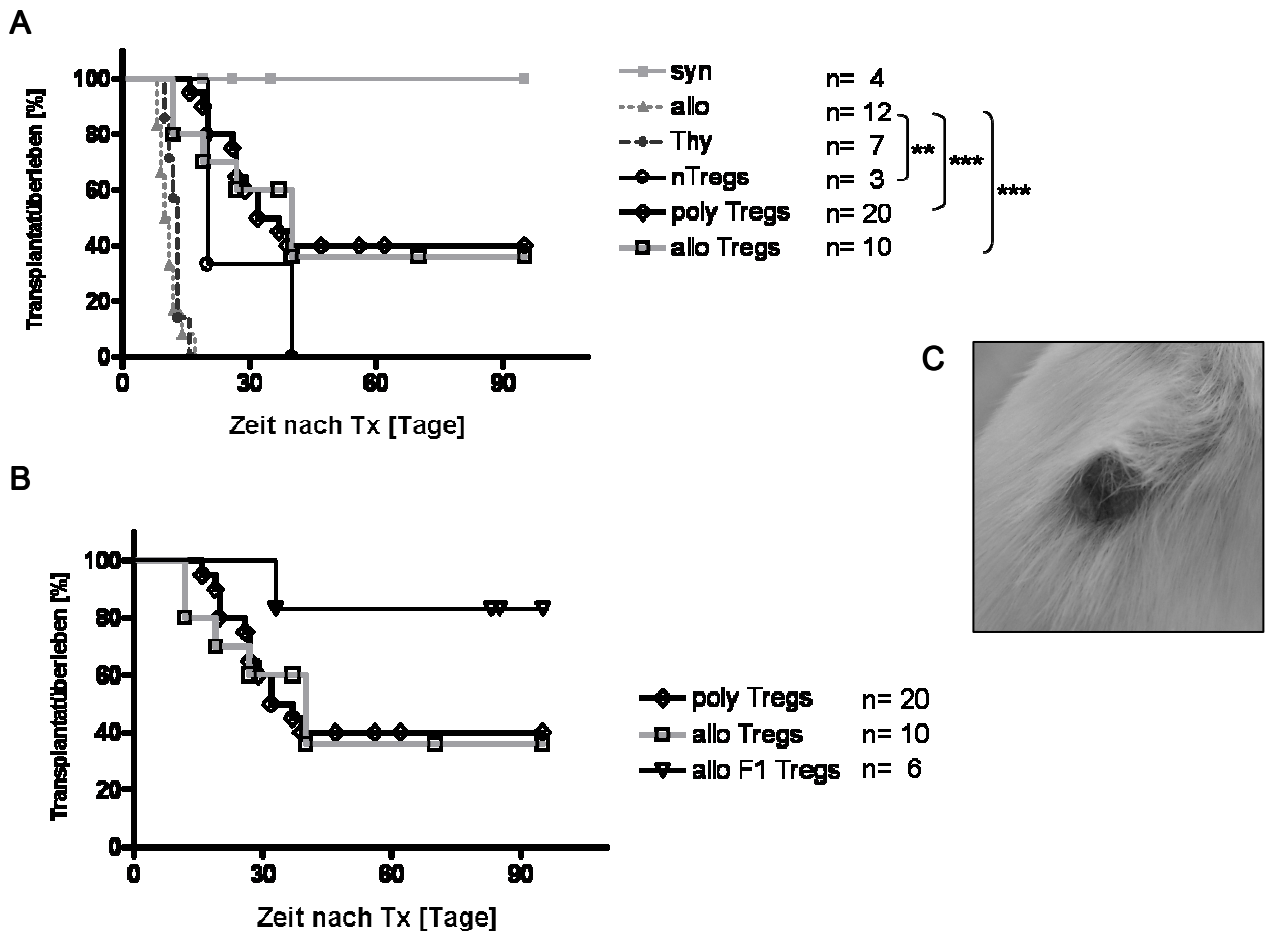


Abb. 15: Tregs mit indirekter Alloantigen-Spezifität sind effektiver bei der Toleranzinduktion als polyspezifische Tregs. Die Transplantation erfolgte wie oben angegeben. Vergleichend sind zu sehen Versuchstiere, die natürliche Tregs (nTregs), polyspezifisch (poly Tregs), direkt allospezifisch (allo Tregs) (A), direkt/indirekt allospezifisch (allo F1 Tregs, B) aktivierte, keine Tregs (allo) oder Thy1.1-Kontrollzellen (Thy) und ein allogenes Transplantat erhalten hatten. 4 Tiere hatten eine syngenes Transplantation bekommen (syn). C) Fotografie eines tolerogenen Transplantats.

Nicht lymphopene Transplantationsmodelle

Um der klinischen Situation bezüglich der Transplantation etwas näher zu kommen ist es erforderlich, das Potenzial der transduzierten Tregs in einem nicht lymphopenen Mausmodell zu testen. Der alleinige Einsatz von Tregs zur erfolgreichen Toleranz eines allogenen Hauttransplantats mit vollem MHC-*mismatch* in einem immunkompetenten Modell war nicht ausreichend, wie die ersten Versuche bewiesen ($p= 0.157$) (Abb. 16).

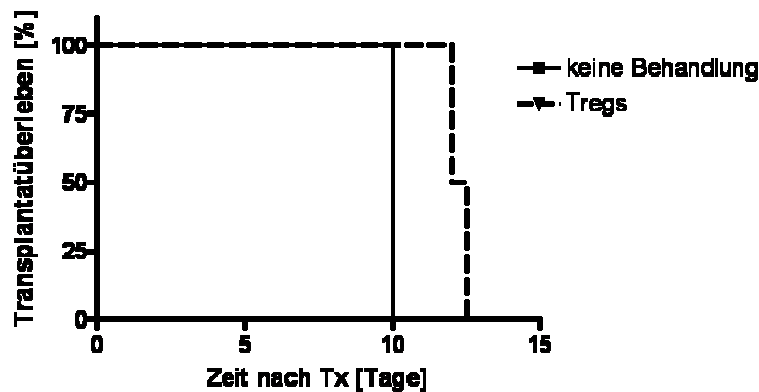


Abb. 16: Tregs alleine können die allogene Transplantatabstoßung im immunkompetenten Modell nicht verzögern. BALB/c-Mäuse erhielten an Tag -1 allo- bzw. polyspezifische Tregs i.v. und an Tag 0 ein allogenes Hauttransplantat. Die Überlebenskurven der Hauttransplantate sind hier dargestellt.

Die Tregs alleine zeigten keine ausreichende Regulation. Dies könnte entweder an einer zu geringen Anzahl transferierter Tregs oder an einer zu hohen Präkursorfrequenz alloreaktiver Effektorzellen liegen. Da bereits $1 \cdot 10^6$ Tregs appliziert wurden ($5 \cdot 10^7/\text{kg}$), wäre eine Erhöhung der Zellzahl unphysiologisch und nicht translational bedeutsam gewesen. Geht man von 10^8 T Zellen in einer Maus aus, von denen ca. 10% alloreaktiv sind, wäre das Treg/Teff-Verhältnis immer noch 1:10. Daher wurden Protokolle getestet, welche Effektor-T-Zellen in moderatem Maß reduzieren und deren Expansion über einen kurzen Zeitraum inhibieren, ohne die Aktivität und Expansion der adoptiv transferierten Tregs zu beeinflussen. Letzteres sollte durch eine zeitlich eng limitierte Gabe von Rapamycin erfolgen. Bezüglich der T-Zelldepletion war es wichtig, nur eine moderate Depletion zu erzeugen, da eine zu starke Depletion eine verstärkte Bildung von *Memory* T-Zellen bewirken kann. Geeignet sind dafür Protokolle, die eine transiente und partielle T-Zelldepletion verursachen. Depletierende Antikörper wie ATG, anti-CD3 (OKT3) und CAMPATH-1H gehören bereits zu vielen klinischen Transplantationsprotokollen. Ein solches Mittel stellt der depletierende monoklonale anti-Thy1.2 Antikörper in der Maus dar, der zur transienten Eliminierung Thy1.2 exprimierender Wildtyp-BALB/c-Zellen führt. Die Funktionalität dieses Antikörpers wurde an Wildtyp BALB/c Mäusen überprüft, indem $250\mu\text{g}$ anti-Thy1.2-Antikörper injiziert wurden und am fünften Tag die verbleibende Menge an CD4, Foxp3 und CD8 exprimierenden T-Zellen per FACS ermittelt wurde. In der Milz fiel die Gesamtzellzahl der CD4 exprimierenden Population im Vergleich zu einer Wildtyp-Kontrollmaus von $3.3 \cdot 10^7$ auf $4 \cdot 10^6$ Zellen, in den Lymphknoten von $5.2 \cdot 10^6$ auf $9 \cdot 10^5$ Zellen (Abb. 17 A). Auch der Anteil Foxp3 positiver Zellen reduzierte sich um mehr als die Hälfte. Die CD8⁺ Zellzahl war in der Milz von $1.6 \cdot 10^7$ auf $1.5 \cdot 10^5$, in den Lymphknoten von $1.8 \cdot 10^6$ auf $2 \cdot 10^5$ dezimiert (Abb. 17 B).

Durch eine Zeitkinetik wurde dann der Nadir der Depletion untersucht, da Tregs erst nach Erreichen des Nadirs gegeben werden sollten, um eine Depletion transferierter Tregs durch anti-Thy1.2 Antikörper zu verhindern. Dazu wurde BALB/c-Mäusen 250µg Thy1.2 Antikörper intravenös injiziert. Milz, Lymphknoten und peripheres Blut (PB) wurden nach drei, fünf und sieben Tagen entnommen und per FACS auf CD4⁺ und CD8⁺ Zellen untersucht. Der Wert „Tag Null“ ist dargestellt durch eine BALB/c-Kontrollmaus, die keine Antikörper-Injektion erhalten hatte. Drei Tage nach Antikörpergabe waren nur noch 7% des ursprünglichen 20% CD4-Anteils in der Milz vorhanden (Abb. 18 A). Dieser Wert halbierte sich am fünften Tag auf 3%. In den Lymphknoten reduzierte sich der Anteil von 53% auf 16% und 7%, im peripheren Blut von 24% auf 0.5%. Am siebten Tag stiegen die Werte wieder leicht an, in der Milz auf 63%, in den Lymphknoten auf 11% und die des Bluts auf 8%. In der CD8-exprimierenden Population entstand eine ähnliche Kurve mit einem Nadir am Tag 5 (Abb. 18 B).

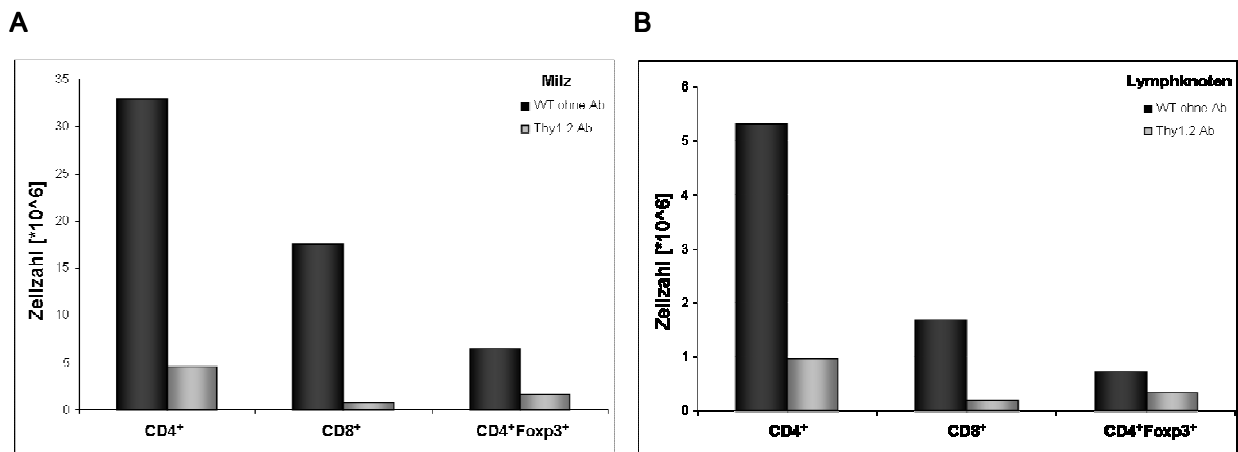


Abb. 17: T-Zell-Depletion mit αThy1.2-Ab *in vivo*. Wildtyp BALB/c-Mäuse erhielten entweder 250µg oder keinen αThy1.2-Ab. Die Analyse erfolgte per FACS an Tag 5 nach Injektion A) Säulendiagramm zeigt die Gesamtzellzahlen der CD4, CD8 und Foxp3 Populationen in der Milz B) und den Lymphknoten.

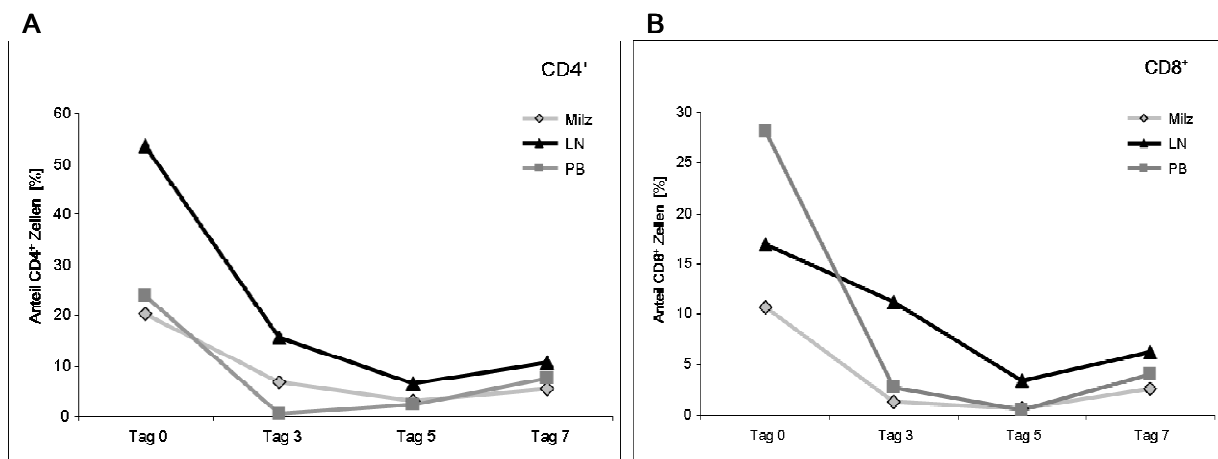


Abb. 18: T-Zell-Depletion mit αThy1.2-Ab im Zeitverlauf. Pro Analysetag wurde eine Maus mit 250µg αThy1.2- Ab injiziert. Der prozentuale Anteil verbleibender CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) Zellen in Milz, Lymphknoten und peripherem Blut (PB) wurde per FACS-Analyse ermittelt und erfolgte an den Tagen 0, 3, 5 und 7.

Der Effekt dieses und des depletierenden anti-Thy1.2 Antikörpers wurde in Kombination mit und ohne Rapamycin im folgenden Hauttransplantationsexperiment an immunkompetenten Wildtyp-Mäusen getestet. Denn wie in der Einleitung beschrieben, ist bei der Wirkungsweise für Rapamycin eine präferentielle Apoptoseinduktion der effektorischen T-Zellen beschrieben worden, während Tregs weiterhin expandieren können. Die Versuchsgruppen erhielten an drei Tagen Rapamycin entweder zu einem frühen (Tag -1, 0 und 2) oder späten Zeitpunkt (Tag 6, 7 und 8) mit oder ohne anti-Thy1.2 Antikörper, wie in Abb. 19 (A) schematisch dargestellt. Aufgrund der Vorarbeiten zur Wirkungsweise des α Thy1.2-Antikörpers wurden den Mäusen 250 μ g an Tag -4 intraperitoneal verabreicht. Allogene Haut wurde an Tag 0 transplantiert, 90 μ g Rapamycin erhielten die Tiere zum frühen oder späten Zeitpunkt. Aus den Überlebenskurven der Transplantate in Abb. 19 (B) wird deutlich, dass die T-Zelldepletion alleine nicht in der Lage war, eine Prolongation des Transplantatüberlebens zu erreichen. Die Verabreichung des anti-Thy1.2 Antikörpers führte zu einer Abstoßung nach durchschnittlich 10 Tagen. Wurde Rapamycin zum frühen oder späten Zeitpunkt injiziert (Rapa früh, Rapa spät) fand die Abstoßung der Haut im Mittel nach 13.5 Tagen statt ($p=0.0246$ bzw. 0.01). Vergleichend hierzu betrug die mittlere Überlebenszeit eines allogenen Transplantats ohne Zugabe von Medikamenten 10 Tage (ohne). Wurde aber eine Kombination der Antikörper zusammen mit Rapamycin gespritzt, konnte die Abstoßung um bis zu 25 Tage (α Thy1.2 Rapa früh) verzögert werden ($p<0.0001$). Dies sollte somit ein Fenster öffnen, in welchem Toleranzinduktion nur durch den Transfer von alloantigen-spezifischen Tregs möglich sein könnte.

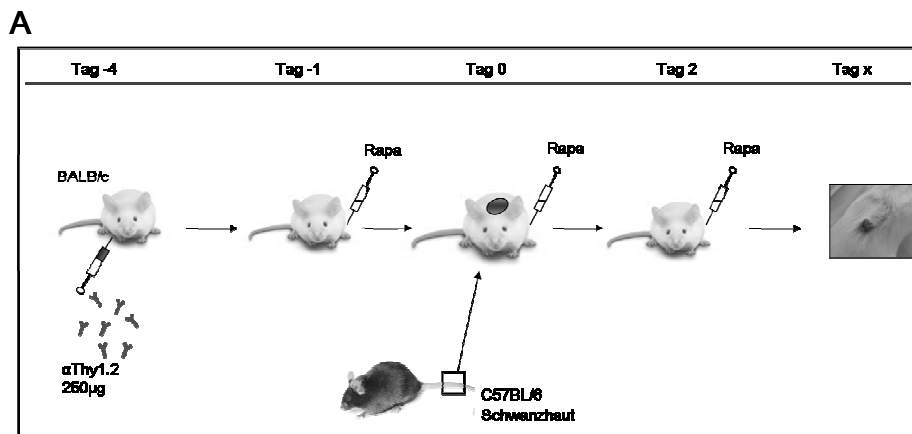
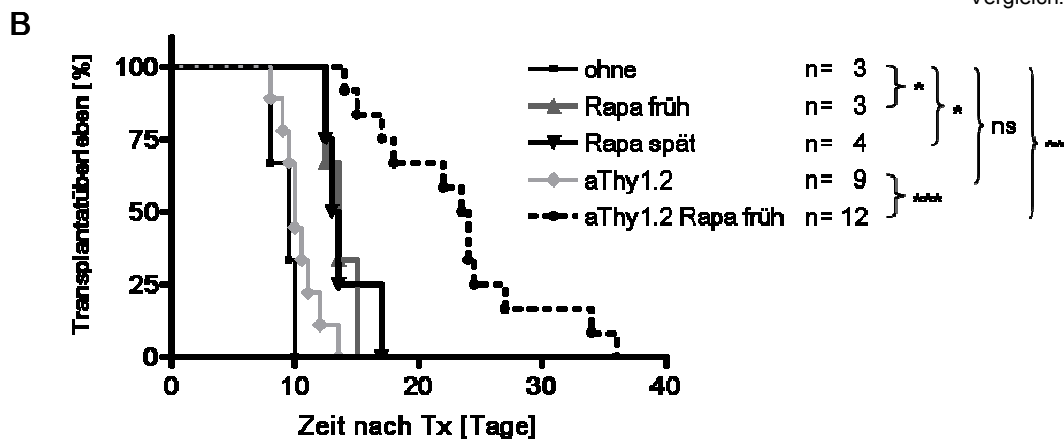


Abb. 19: α Thy1.2 und Rapamycin verlängern allogenes Transplantatüberleben. A) Modell: BALB/c-Mäuse erhielten an Tag -4 250 μ g α Thy1.2-Ab, dreimalig 90 μ g Rapamycin i.v. zum frühen Zeitpunkt und ein allogenes Hauttransplantat. B) Überlebenskurven der Haut-transplantate im Vergleich.



Ein weiteres therapeutisches Mittel zur vorübergehenden Unterdrückung einiger Immunzellen zur klinischen Behandlung von Transplantationspatienten ist Muronomab (Orthoclone), ein humanisierter monoklonaler anti-CD3 Antikörper (Cosimi 1981). Aufgrund des starken Zytokinfreisetzungssyndroms nach anti-CD3-Gabe wird derzeit präklinisch eine Variante getestet, welche keine Fc-Rezeptorbindung (Teplizumab) mehr zulässt. Das murine anti-CD3 F(ab')₂ Fragment des anti-CD3 Antikörpers stellt eine Alternative dar, ebenfalls ohne FcRezeptorbindung. Es erzeugt nicht nur eine milde Lymphopenie, sondern vielmehr eine CD3/TCR-Komplex-Modulation in T-Zellen, welche Autoimmunantworten verhindert (Jenkins 1990). Die Verabreichung dieses Antikörpers konnte eine lang anhaltende Remission von Diabetes in NOD-Mäusen verhindern (Chatenoud 1994) und Immunsuppression und Toleranz induzieren (Chatenoud 2003). Aufgrund dieser Resultate wurden humanisierte Antikörper wie der OKT3γ1 Ala-Ala hergestellt (Bolt 1993), um damit auch in Patienten mit autoimmuner Diabetes Selbst-Toleranz zu induzieren (Herold 2005).

Auch dieser Antikörper wurde zusammen mit einer limitierten Rapamycin-Gabe kombiniert, um ein Fenster für die Verabreichung von Tregs zu erhalten. BALB/c-Mäusen wurde, wie im Modell (Abb. 20) beschrieben, fünf Tage einmal täglich je 20µg αCD3 F(ab')₂-Antikörper injiziert. Nach weiteren 24h wurde die Expression diverser T-Zellmarker in der Milz per FACS analysiert. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Gesamtzellzahl von 1.25*10⁸ Zellen in einer unbehandelten Maus (Abb. 20 WT) auf 8*10⁷ Splenozyten in einer mit αCD3F(ab')₂ behandelten Maus. Die CD3⁺, TCRβ⁺, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellpopulationen waren im Vergleich zur Wildtypmaus halbiert. Die Anzahl Foxp3 exprimierender Zellen war allerdings, verglichen zum Wildtyp, stark erhöht (1.6 zu 2.5*10⁷ Zellen/Milz).

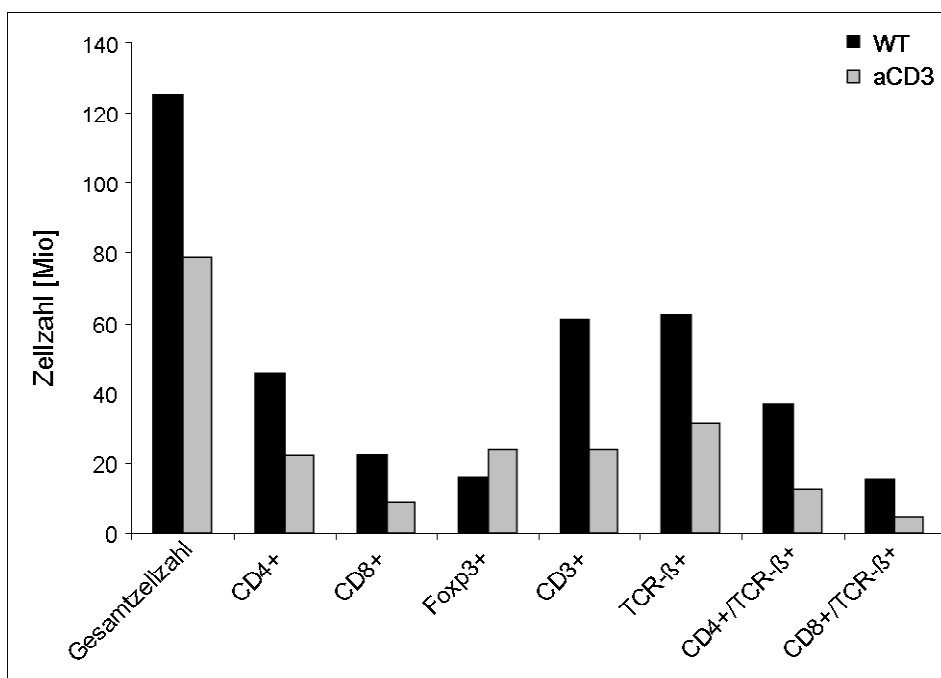


Abb. 20: Wirkung des anti-CD3-F(ab')₂-Antikörpers auf die Anzahl der T-Zellen in der Milz *in vivo*. BALB/c-Mäusen wurden an 5 aufeinander folgenden Tagen 20µg αCD3-Ab injiziert. 24h nach der letzten Injektion wurden die Milzzellen (αCD3) per FACS auf verschiedene T-Zellmarker im Vergleich zu einer unbehandelten Milz (WT) untersucht.

Die Eignung des α CD3F(ab')₂-Fragments wurde daraufhin in der Hauttransplantation getestet. Dazu erhielten BALB/c-Mäuse an fünf aufeinander folgenden Tagen je 20 μ g dieses Antikörpers mit oder ohne Rapamycin zum späten Zeitpunkt (Abb. 21 A). Bei α CD3-Gabe wurden die Transplantate durchschnittlich nach 13 Tagen abgestoßen, während die Kombination aus Rapamycin und α CD3F(ab')₂ (α CD3 Rapa spät) zu einer signifikanten ($p=0.0018$) Prolongation des Transplantatüberlebens im Durchschnitt auf 26 Tage führte (Abb. 21 B).

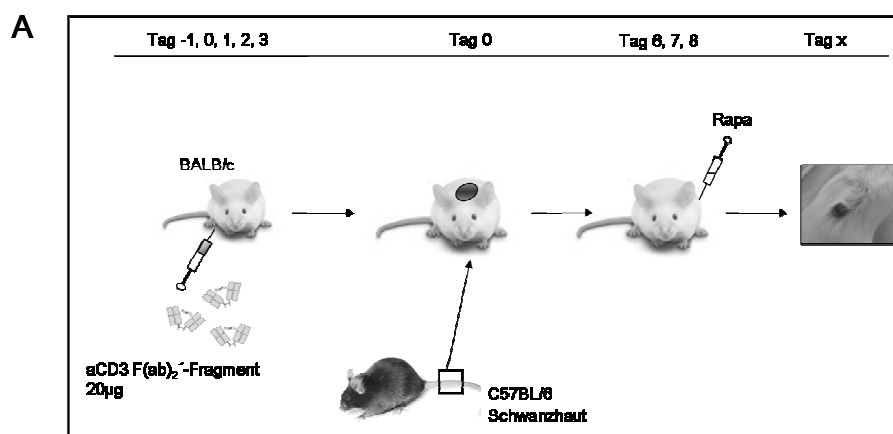
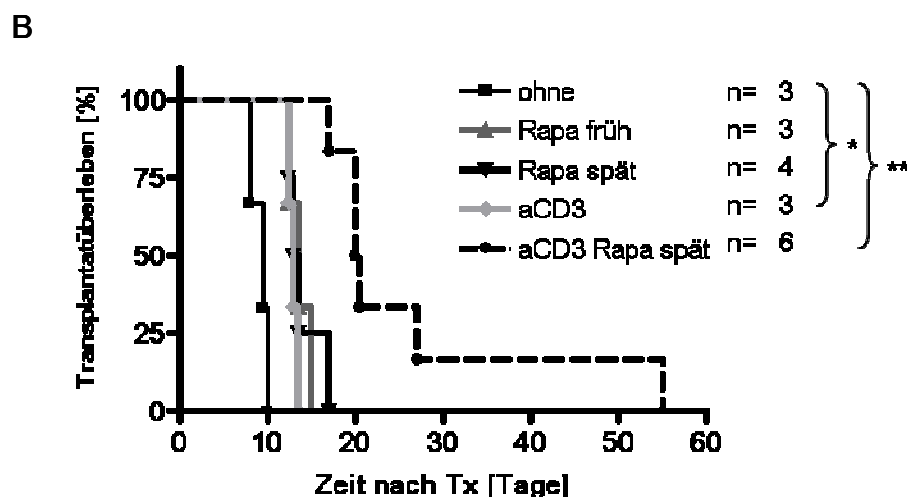


Abb. 21: α CD3-F(ab')₂ verlängert allogenes Transplantatüberleben. A) Modell: BALB/c-Mäuse erhielten an den fünf aufeinander folgenden Tagen 250 μ g α CD3 F(ab')₂-Antikörper und dreimalig 90 μ g Rapamycin i.v. zum frühen Zeitpunkt und ein allogenes Hauttransplantat. B) Überlebenskurven der Transplantate im Vergleich.



Um einen weiteren Kandidaten zur Depletion von Effektorzellen und Kreation einer Nische für die Tregs zu testen, wurde ein weiterer häufig verwendeter Antikörper der Transplantationsmedizin gewählt, der CD25-exprimierende aktivierte T-Zellen depletieren und die IL-2 vermittelte T-Zellaktivierung hemmen sollte (Basiliximab). PC61 ist ein anti-CD25-Antikörper, von dem man zunächst annahm, er depletiere alle CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach Injektion (McHugh und Shevach 2002). Eine andere Forschergruppe konnte aber zeigen, dass die Injektion des Antikörpers keine physikalische Depletion dieser Zellen auslöst, sondern eher eine Herabregulation des Rezeptors von der Zelloberfläche verursacht. Die Versuche zeigen somit eine Verminderung an CD25⁺ Zellen, ohne die Dezimierung von Foxp3⁺ Zellen. Dies entspricht einer Herabregulation an CD25 auf Foxp3⁺ Zellen (Kohm 2006).

Auch dieser Antikörper wurde zusammen mit Rapamycin im Rahmen der Hauttransplantation getestet. BALB/c-Mäusen wurden dazu zweimalig jeweils 250 μ g oder 500 μ g α CD25-Antikörper (Klon PC61) verab-

reicht und nach 0, 6 und 20 Tagen die Gesamtlymphozytenzahlen der Milz und Lymphknoten und die darin enthaltenen CD4⁺, Foxp3⁺ und CD25⁺ (Klon 7D4) exprimierenden Zellen berechnet. In der Milz zeigte sich eine Reduktion der Gesamtlymphozytenzahl, aber keine nennenswerte Veränderung der Anzahl CD4⁺, CD25⁺ und Foxp3⁺ exprimierender Zellen (Abb. 22). Während in den inguinalen Lymphknoten die Gesamtlymphozytenzahl und auch die Menge an CD4⁺, CD25⁺ und Foxp3⁺ Zellen zwischen Tag 6 und 20 deutlich reduziert war, war vor allem an Tag 6 in den mesenterischen Lymphknoten der umgekehrte Fall erkennbar.

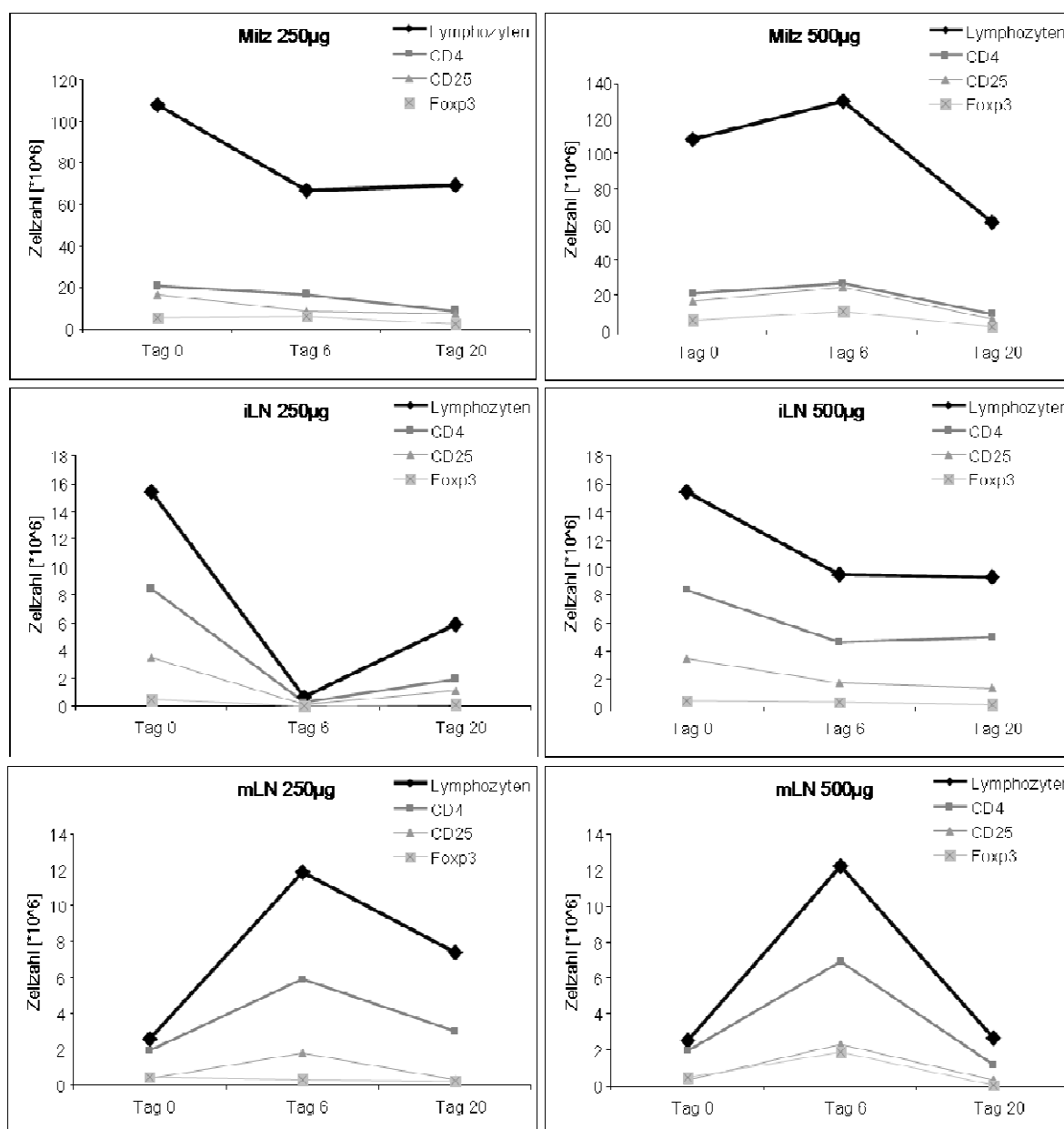


Abb. 22: Wirkung des α CD25-Antikörpers (PC61) auf die T-Zellzahl in Milz und Lymphknoten *in vivo*. BALB/c-Mäusen wurden zweimalig 250 μ g oder 500 μ g α CD25-Ab injiziert. Nach 0, 6 und 20 Tagen wurden die Gesamtzellzahl und der Anteil CD4, Foxp3 und CD25 (7D4) exprimierender Milzzellen durch FACS-Analyse ermittelt.

Im Folgenden wurde der Effekt des α CD25-Antikörpers bei der Hauttransplantation getestet. Dazu erhielten BALB/c-Mäuse zweimalig 250 μ g des Antikörpers mit oder ohne Rapamycin zum frühen und späten Zeitpunkt (Abb. 23 A). Das Transplantatüberleben konnte durch die Kombination aus Rapamycin und Antikörper im Schnitt von 13 auf 20 Tage signifikant ($p=0.0246$) verlängert werden (Abb. 23 B). Dabei hatte die Verabreichung des Rapamycins zum frühen oder zum späten Zeitpunkt den gleichen Effekt. Es ist anzunehmen, dass auch durch dieses Protokoll ein Fenster zur Induktion von Allotoleranz durch Treg-Transfer bestehen könnte.

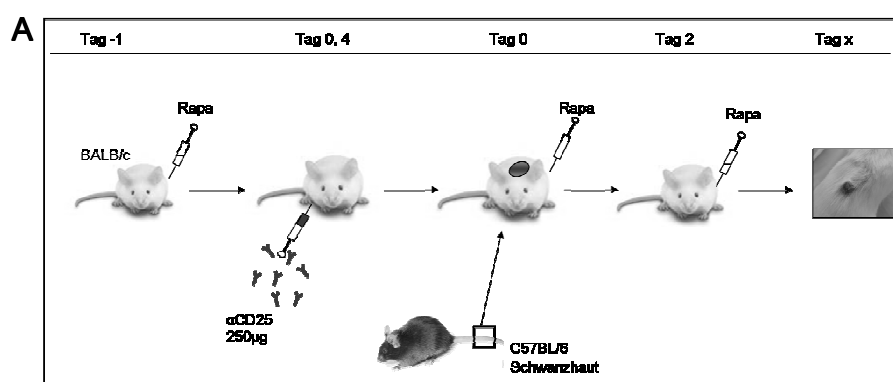
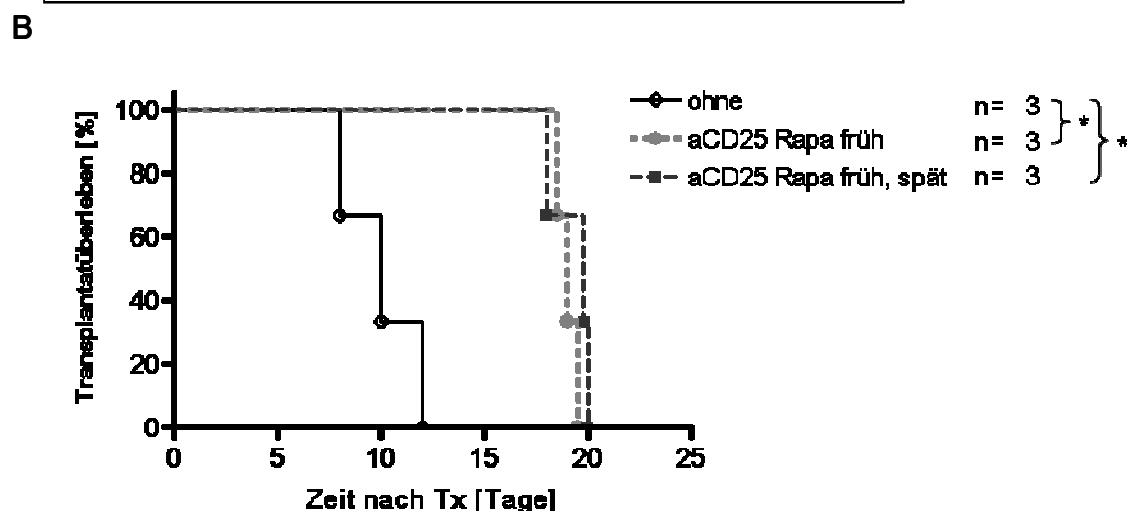


Abb. 23: α CD25 verlängert allogenes Transplantatüberleben A) Modell: BALB/c-Mäuse erhielten an den Tagen 0 und 4 250 μ g α CD25-Ab, dreimalig 90 μ g Rapamycin i.v. zum frühen oder späten Zeitpunkt und ein allogenes Hauttransplantat. B) Überlebenskurven der Transplantate im Vergleich.



Dass Tregs ohne die Unterstützung immunsupprimierender Agenzien oder permanenter Manipulation des Empfängers in normalen immunkompetenten Mäusen langfristig Toleranz gegen ein allogenes Hauttransplantat zu bewirken in der Lage sind, ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden (Golshayan 2007; Joffre, Santolaria et al. 2008; Park 2010). In den Vorversuchen wurde die Wirkung verschiedener temporär wirkender T-Zell-depletierender Antikörper mit und ohne Rapamycin in Wildtypmäusen hinsichtlich allogener Hauttransplantationen getestet. Das anti-Thy1.2-Antikörper-Rapamycin-Modell schien dabei das überzeugendste zu sein. Möglicherweise könnte mit Hilfe dieses Protokolls auch eine Nische für antigenspezifische Tregs kreiert werden, durch deren adoptiven Transfer dann eine deutliche Verlängerung des Transplantatüberlebens erzielbar wäre. Dazu wurden im Folgenden BALB/c-

Mäuse in zuvor beschriebener Weise mit α Thy1.2-Antikörper und Rapamycin behandelt. An Tag -1 erhielten sie zudem $3 \cdot 10^6$ transduzierte Foxp3⁺Thy1.1⁺ Tregs. Während Versuchstiere, die nur Antikörper- und Rapamycin-Therapie erhalten hatten, ihr Transplantat durchschnittlich nach 25 Tagen abgestoßen hatten, waren in insgesamt fünf Versuchstieren, denen Tregs injiziert worden waren, auch nach 100 Tagen noch keine Anzeichen von Abstoßung zu sehen ($p < 0.0001$). Es ist somit erstmalig gelungen, durch den Transfer transduzierter Tregs eine lang anhaltende Toleranz gegen ein allogenes Hauttransplantat in einem immunkompetenten Modell zu erzeugen (Abb. 24).

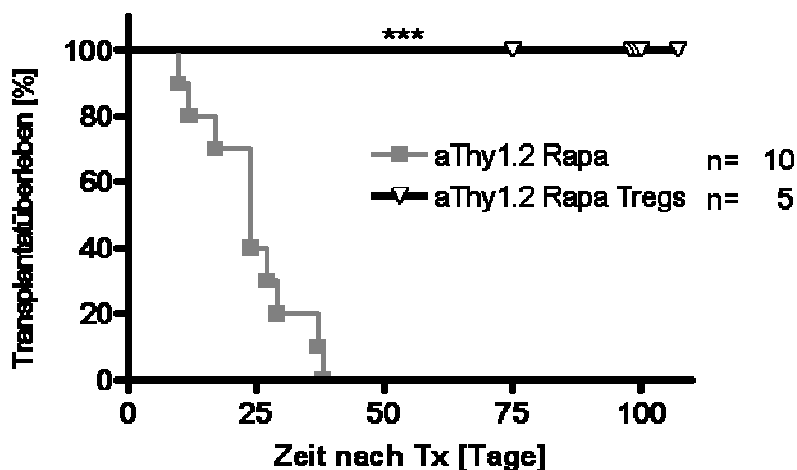


Abb. 24: Prolongation des Transplantatüberlebens im immunkompetenten Mausmodell durch transduzierte Tregs. Überlebenskurven der Hauttransplantate im nicht-lymphopenen Modell mit und ohne transduzierte Tregs.

Teil II Mechanismen der allospezifischen Immunregulation

Langzeit-Überleben der allospezifischen Tregs *in vivo*

Bislang waren Tregs nach adoptivem Transfer immer nur kurzzeitig nachweisbar, so dass der Mechanismus der Toleranzinduktion unklar ist. Ferner ist ungeklärt, ob die Tregs nur in der Anfangs- bzw. Toleranzinduktionsphase oder auch für die Toleranzerhaltung verantwortlich sind.

Um eine Antwort darauf zu erhalten, wie lange die Tregs tatsächlich im transplantierten Organismus zu finden sind, wurden 100 Tage nach Transplantation in den verschiedenen lymphatischen Organen der Mäuse die transduzierten Tregs nachverfolgt. Dazu wurden Milz, inguinale und mesenterische Lymphknoten entnommen und auf Thy1.1 und Foxp3 exprimierende Zellen per FACS untersucht. Dabei fanden sich in allen drei Organen die transferierten Tregs in Form Thy1.1⁺Foxp3⁺ doppelt positiver Zellen wieder. In der Milz waren dies immerhin noch 8% der CD4-positiven Fraktion, in den Lymphknoten noch etwa 5%. Aber auch ein hoher Prozentsatz anderer CD4⁺Foxp3⁺ Zellen zeigte sich in Milz und mesenterischen Lymphknoten mit 22%, den inguinalen Lymphknoten mit 18% (Abb. 25).

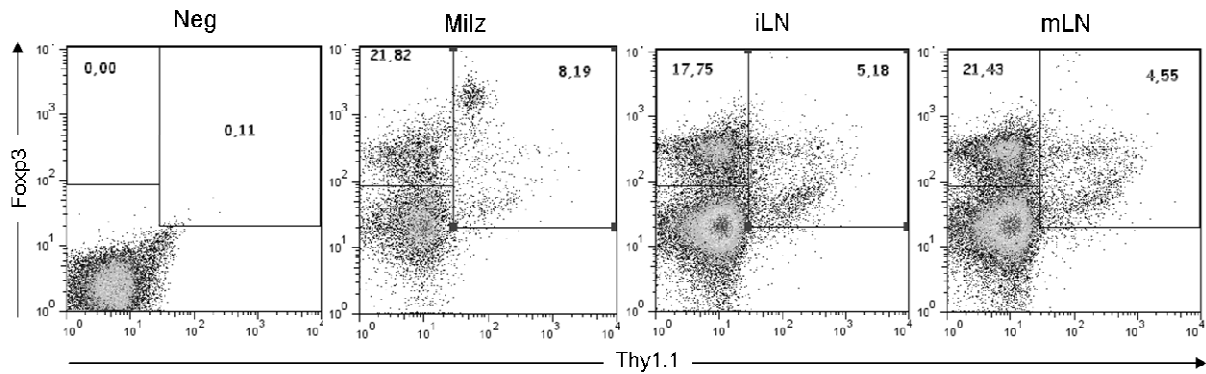


Abb. 25: Langzeit-Überleben allospezifischer Tregs *in vivo*. 100 Tage nach Transplantation wurden Milz, inguinale und mesenterische Lymphknoten einer toleranten BALB/c-RAG1^{-/-}-Maus entnommen und per FACS analysiert.

Alloantigen-spezifische Toleranzinduktion

Die Resultate des ersten Teils deuten darauf hin, dass transduzierte Tregs Allotoleranz gegenüber immunogenen Hauttransplantaten induzieren können. Ihre Spezifität ist dabei von ausschlaggebender Bedeutung. Toleranz kann nachweislich durch donorspezifische Sensibilisierung erreicht werden (Bushell 1994; Francis 2011), die aber nicht gleichzeitig gegen Drittpenderantigen wirksam ist, was einen weiteren Hinweis auf die Relevanz der Alloantigen-spezifität liefert (Kingsley, Karim et al. 2002; Pilat, Baranyi et al. 2010). Deshalb wurde hier die Spezifität der Toleranz durch Transplantation von MHC-ungleichen Drittpendertransplantaten untersucht. Dazu erhielten die lymphopenen Versuchstiere, in denen eine langfristige Toleranz gegen ein allogenes Hauttransplantat vorlag, ein Hauttransplantat einer Drittpendermaus (3rd party, C3H), deren MHC-Haplotyp sich sowohl vom Rezipienten als auch vom primären Donor unterscheidet (C3H=H-2K^k). Diese wurden wie normale allogene Transplantate sehr schnell nach 13 Tagen abgestoßen ($p=0.212$) (Abb. 26). Die zuvor induzierte Toleranz gegen Donorantigen scheint somit nicht auf Drittpenderantigen übertragbar zu sein.

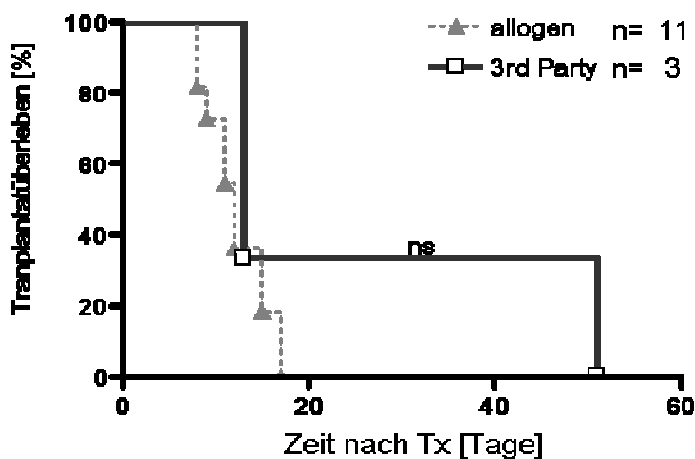


Abb. 26: Drittpender-Transplantate werden von langzeit-toleranten Tieren abgestoßen. Von Tieren mit langzeit-toleranten allogenen Transplantaten, wurden diese nach 100 Tagen vom Tier entfernt. Stattdessen erhielten sie Drittpender-Haut von C3H-Mäusen.

Systemische Toleranz

Im Anschluss sollte geklärt werden, ob alloantigen-spezifische Tregs nur im Transplantat eine Abstoßung verhindern können oder ob diese Toleranz in sekundären lymphatischen Organen nach Transfer von allogenen Zielzellen besteht. Dazu wurde ein *in vivo Killing-Assay* in den langzeit-tolerogenen BALB/c-RAG^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Dabei sollte verglichen werden, ob und wie schnell Splenozyten unterschiedlicher Antigenherkunft (syngen, allogen, Drittspender) nach Transfer vom Immunsystem unterschiedlich geprimter Empfänger attackiert werden. Im folgenden Experiment wurden pro Maus je $5 \cdot 10^6$ naive Splenozyten einer syngenen H-2k^d (BALB/c), allogenen H-2k^b (C57BL/6) und einer Drittspender-Maus (C3H, H-2k^k) mit jeweils einer speziellen Konzentration CFSE markiert (BALB/c 4nM, C57BL/6 0.2µM, C3H 10µM), so dass sie sich für die spätere Analyse deutlich voneinander unterschieden. Danach wurden sie parallel mit einem weiteren Farbstoff (PKH-26) gefärbt, um sie insgesamt von den nichttransferierten eigenen Zellen unterscheidbar zu machen. Diese Zellen wurden anschließend in eine naive, in eine durch eine vorhergegangene allogene Hauttransplantation C57BL/6-geprimte BALB/c-RAG1^{-/-}-Maus und in eine mehr als 100 Tage langfristig tolerante BALB/c-RAG1^{-/-}, die entweder durch allospezifische oder polyspezifische Tregs induziert worden war, intravenös injiziert. Nach drei Stunden wurde den Tieren die Milz entnommen und die Zellen per FACS analysiert (Abb. 27). In der PKH-26-positiven Population (obere Reihe, Dotplots) waren drei unterschiedlich stark fluoreszierende CFSE-Fractionen erkennbar (untere Reihe, Histogramme). Die am schwächsten leuchtenden Zellen, vertreten durch die transferierten, syngenen BALB/c-Splenozyten, waren in allen Versuchstieren gleich stark erhalten geblieben, da Zellen des syngenen Mausstamms nicht angegriffen werden sollten (linke Population in den Histogrammen). Die Drittspendersplenozyten, die für alle Tiere fremd und neuartig waren, stellen die am stärksten fluoreszierende Population dar und blieben zunächst ebenfalls von allen Versuchstieren in etwa gleichem Maß bewahrt, da bislang keine Sensibilisierung gegenüber diesen Antigenen erfolgt war und der Assay präformierte *memory*-Antworten untersucht (rechte Population der Histogramme). Die allogenen C57BL/6-Splenozyten waren in der naiven Maus zu 40% detektierbar, in der geprimten Maus nur noch zu 4%, was die Funktionalität des *Assays* unterstreicht. In den beiden langzeit-tolerogenen Mäusen wurden die allogenen Zielzellen ebenfalls nicht abgestoßen. Dies deutet darauf hin, dass die Treg-vermittelte dominante Toleranz nicht nur im Transplantat, sondern auch in lymphatischen Organen wie der Milz besteht.

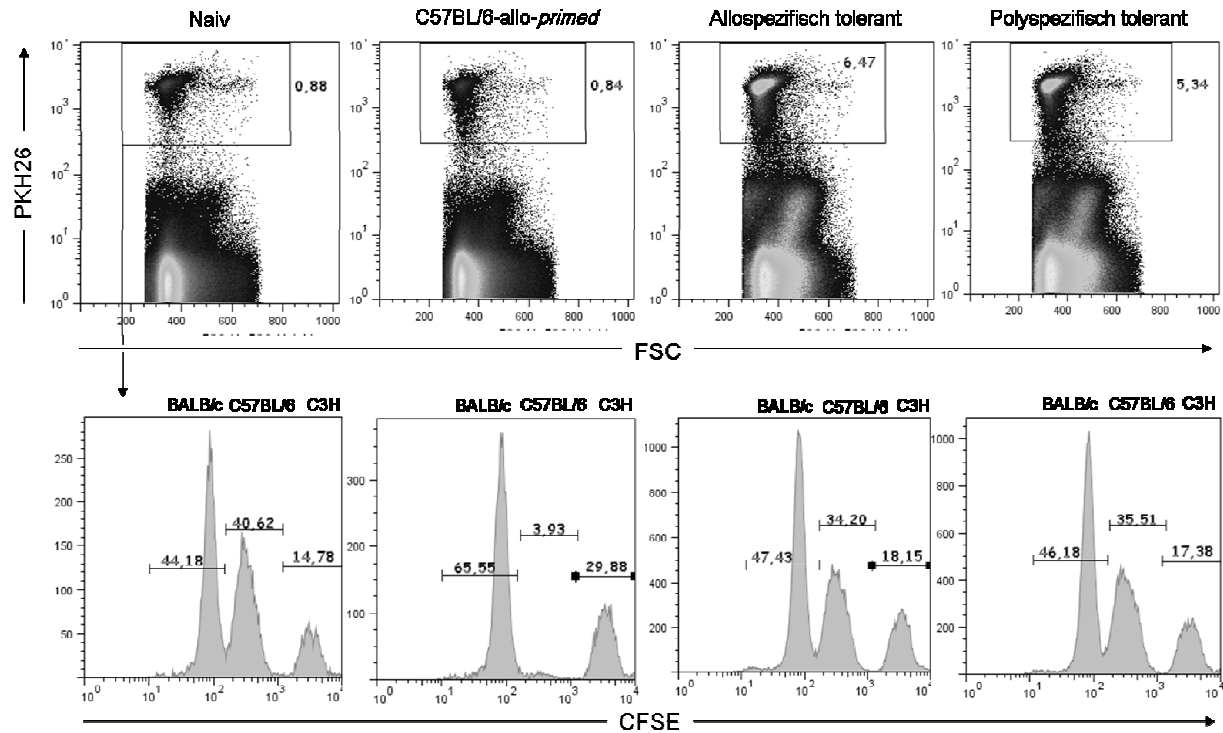


Abb. 27: Die Treg-vermittelte Allotoleranz ist systemisch. Naïve Splenozyten einer syngenen (BALB/c), allogenen (C57BL/6) und Drittpendermaus (C3H) wurden mit dem Farbstoff PKH-26 und unterschiedlichen Konzentrationen CFSE markiert (BALB/c = 4nM, C57BL/6 = 0.2µM, C3H = 10µM). Je 5*10⁶ markierte T-Zellen wurden i.v. in je eine naive, C57BL/6-allo-geprimte, eine durch allospezifische und eine durch polyspezifische Tregs tolerante BALB/c-RAG1^{-/-}-Maus injiziert. Nach 3 Stunden erfolgte die Analyse per FACS. Die CFSE-Histogramme (untere Reihe) gehen aus der PKH26-positiven Fraktion hervor (Dotplots, obere Reihe).

Transfer tolerogener Splenozyten

Es blieb aber unklar, ob die Toleranz nur dominant war oder ob es im Verlauf auch zu einer deletionalen Toleranz alloreaktiver Effektorzellen gekommen war. Deshalb wurden die Splenozyten aus den tolerogenen Tieren isoliert in neue BALB/c-RAG1^{-/-}-Mäuse gespritzt. Kontrolltieren wurden 5*10⁵ naive T-Zellen (Teff) injiziert. Am darauffolgenden Tag erhielten die Mäuse je ein allogenes Hauttransplantat. Diese wurden jedoch, vergleichbar mit dem Kontrolltier, das nur Effektorzellen bekommen hatte, frühzeitig an Tag 13 abgestoßen (Abb. 28). Die tolerogenen Splenozyten waren offensichtlich nicht in der Lage, die zuvor erwirkte Toleranz in einem neuen Tier fortzuführen, so dass nicht von einer deletionalen Toleranz auszugehen ist.

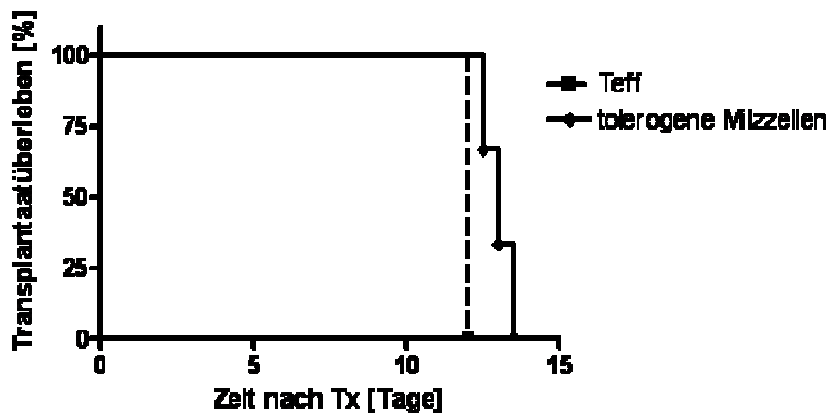


Abb. 28: Der Transfer tolerogener Splenozyten in neue Rezipienten kann die Allotoleranz nicht erhalten. Je $5 \cdot 10^5$ tolerogene Splenozyten aus zuvor transplantierten BALB/c-RAG1^{-/-}-Mäusen wurden nach 100 Tagen in neue BALB/c-RAG1^{-/-}-Rezipienten transferiert (n=3). Kontrolltiere erhielten $5 \cdot 10^5$ Effektor-T-Zellen. Die Mäuse erhielten am folgenden Tag ein allogenes Hauttransplantat.

Transplantierte Haut in der Histologie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Toleranz in sekundären lymphatischen Organen wirksam ist, war es wichtig zu untersuchen, ob es auch im Transplantat eine lokale Immunregulation gibt. In der H&E-Färbung zeigten sich deutliche Unterschiede im Infiltrationsgrad zwischen den Versuchstieren, die eine syngene Transplantation erhalten hatten und denen, die ein allogenes Transplantat mit oder ohne Tregs bekommen hatten. Die syngene Haut (BALB/c→BALB/c) wurde 40 Tage nach Transplantation herausgeschnitten und nach Fixierung in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden freundlicherweise im Pathologischen Institut des Nordstadtkrankenhauses Hannover von Dr. Voelker angefertigt und verblindet beurteilt. Trotz des syngen Ansatzes sind eine milde Infiltration und fibrotisches Gewebe erkennbar. Außerdem ist eine akantothische Verbreiterung der Epidermis mit einer Orthohyperkeratose festzustellen (Abb. 29 A). Im allogenen Ansatz (C57BL/6→BALB/c) ist eine massive lymphohistiozytäre und neutrophilenreiche Infiltration zu sehen. Das Gewebe unterhalb der Epidermis ist stark fibrotisch mit einer Hypergranulose, die gekennzeichnet ist durch eine Verbreiterung der Granularzellschicht der Epidermis als Konsequenz einer größeren Anzahl Keratinozyten mit Keratohyalin granula. Die Epidermis ist bedeutend verdickt mit dichter Orthohyperkeratose. Eine Hyperkeratose beschreibt eine übermäßige Verhornung der obersten Hautschicht. Die wenigen verbliebenen Haarfollikel und Talgdrüsen sind von histiozytären, mehrkernigen Riesenzellen vom Fremdkörpertyp umgeben. Im oberen und mittleren Corium sind Pigment beladene Makrophagen sichtbar, überwiegend Melanophagen, die in der GvHD bekannt sind (Abb. 29 B). Nach allogener Transplantation (C57BL/6→BALB/c) mit Zugabe von Tregs ist, vergleichbar mit der syngenen, lediglich eine milde Infiltration feststellbar. Die Epidermis ist akantothisch verbreitert mit Orthohyperkeratose. Das darunterliegende Gewebe ist fibrotisch mit einer Hypergranulose. Der Schwund von Haarfollikeln und Talgdrüsen taucht nur in der fibrotischen Zone auf (Abb. 29 C). Dennoch blieb die Frage bestehen, ob es sich bei den milden Infiltraten um eine chronische Abstoßungsreaktion handeln könnte.

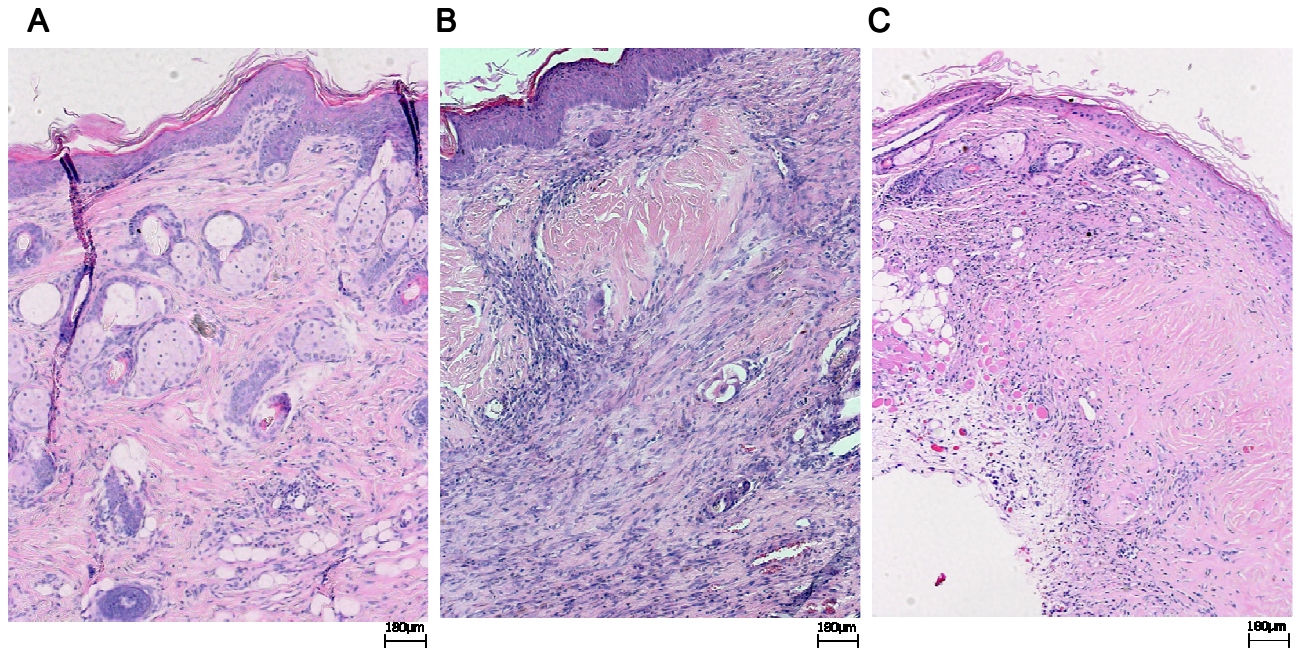


Abb. 29: H&E-Färbung transplantiertes Haut mit und ohne Tregs. A) syngene Transplantation, Analyse nach 40 Tagen B) Allogene Transplantation mit ersten Abstoßungsreaktionen nach 12 Tagen, Analyse nach 20 Tagen C) Hautanalyse 100 Tage nach allogener Transplantation mit allospezifischen, transduzierten Thy1.1⁺Foxp3⁺ Tregs und toleriertem Transplantat. Die Bildausschnitte zeigen eine 10fache Vergrößerung.

Per Immunfluoreszenz wurden die Infiltrate deshalb weiter charakterisiert. BALB/c-RAG1^{-/-}-Tiere erhielten zur Rekonstitution naive BALB/c-CD4⁺CD45RB^{hi} T-Zellen, alloantigenspezifische, transduzierte syngene Tregs und eine allogene Hauttransplantation. Am Tag 40 wurde die gut verheilte, tolerante Haut herausgeschnitten. Die Kryoschnitte wurden auf CD4, Thy1.1 und Foxp3 exprimierende Zellen mikroskopisch analysiert. Durch gleichzeitige DAPI-Färbung konnten Lymphozyten von anderen in der Haut befindlichen Zellen gut unterschieden werden. Die Analyse ergab einen sehr hohen Anteil CD4⁺Thy1.1⁺ exprimierender Zellen. Das Verhältnis natürlicher Tregs (Foxp3⁺, blau) zu transduzierten Tregs lag stark auf Seite Letzterer, gekennzeichnet durch pink fluoreszierende Thy1.1⁺Foxp3⁺ Zellen (B). Die Zellen wurden ausgezählt, dabei die Proportionen prozentual berechnet und in Abb. 30 C als Säulendiagramm dargestellt. Dabei fällt auf, dass fast 50% aller Lymphozyten in der Haut CD4⁺ T-Zellen und davon 83% Foxp3-positiv waren, was 10-15x mehr als den Erwartungen entspricht. Von den Foxp3 positiven Tregs waren sogar 72% die zuvor transferierten Thy1.1⁺Foxp3⁺ Tregs. Es kam also zu einer deutlichen Akkumulation von antigenspezifischen Tregs im Transplantat.

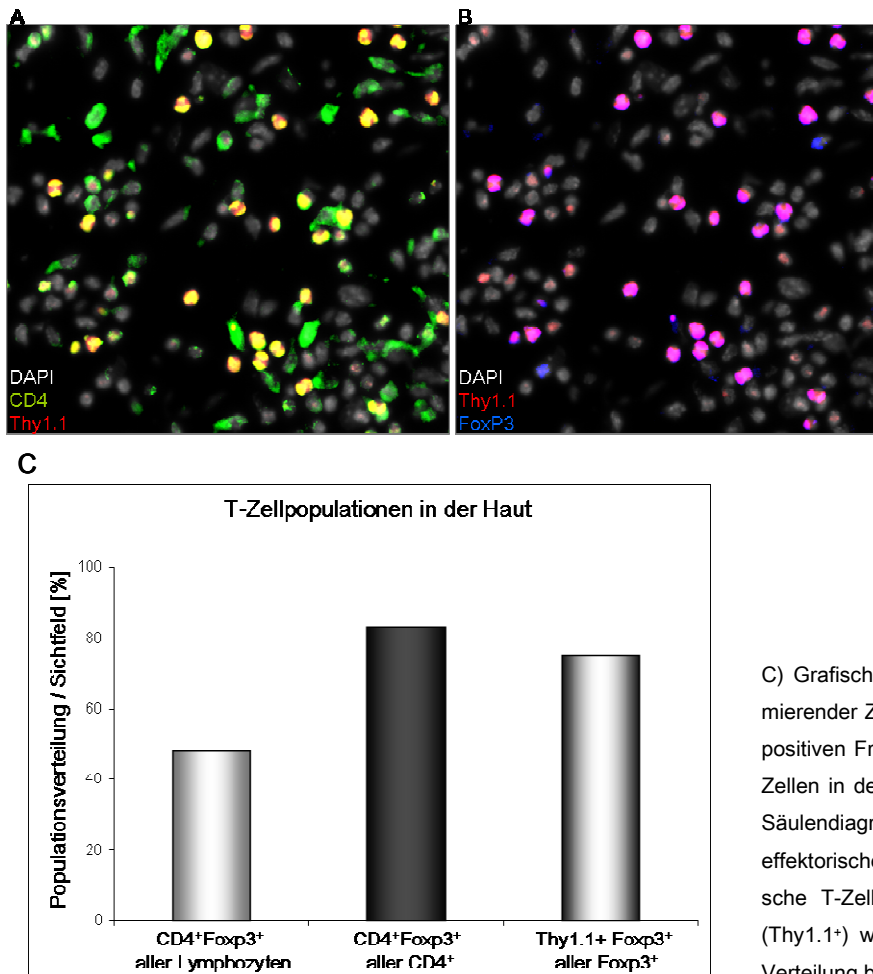


Abb. 30: Akkumulation antigen-spezifischer Tregs im Transplantat. Fluoreszenzfärbung allogren transplantierte tolerogener Haut A) Das hohe Treg/Teff Verhältnis ist gekennzeichnet durch einen hohen Anteil gelb fluoreszierender CD4⁺Thy1.1⁺ Zellen (CD4⁺ grün, Thy1.1⁺ rot) B) Das hohe Foxp3⁺Thy1.1⁺-Treg/nTreg Verhältnis ist gekennzeichnet durch eine hohe Anzahl pink fluoreszierender Thy1.1⁺ Foxp3⁺ Zellen (Thy1.1⁺ rot, Foxp3⁺ blau).

C) Grafische Darstellung des Anteils Foxp3 exprimierender Zellen aller Lymphozyten und der CD4-positiven Fraktion und des Anteils Thy1.1 positiver Zellen in der Foxp3-exprimierenden Population als Säulendiagramm. Gesamtl lymphozytenzahl (DAPI), effektorische T-Zellen (CD4⁺), natürliche regulatorische T-Zellen (Foxp3⁺) und transduzierte Tregs (Thy1.1⁺) wurden ausgezählt und die prozentuale Verteilung berechnet.

Es stellte sich somit die Frage, ob diese starke lokale Anreicherung von antigenspezifischen Tregs ausreichend ist, um lokal eine Allotoleranz aufrecht zu erhalten. Die langzeit-tolerogenen Transplantate wurden deshalb auf neue mit CD4⁺CD45RB^{hi} Zellen rekonstituierte BALB/c-RAG1^{-/-}-Mäuse transplantiert. Tatsächlich wurden die Transplantate in allen Tieren signifikant (p=0.016) weitere 100 Tage akzeptiert, obwohl keine neuen Tregs verabreicht wurden (Abb. 31). Vermutlich wurde die Toleranz also durch das tolerogene Transplantat auf einen neuen Organismus übertragen. Da sich in Lymphknoten und Milz dieser Tiere keine Thy1.1 positiven Zellen fanden, ist davon auszugehen, dass die lokale Kontrolle von Alloimmunantworten zur Aufrechterhaltung einer Toleranz ausreichend ist. Dies wird im Weiteren auch noch durch Depletionsexperimente bestätigt (siehe unten).

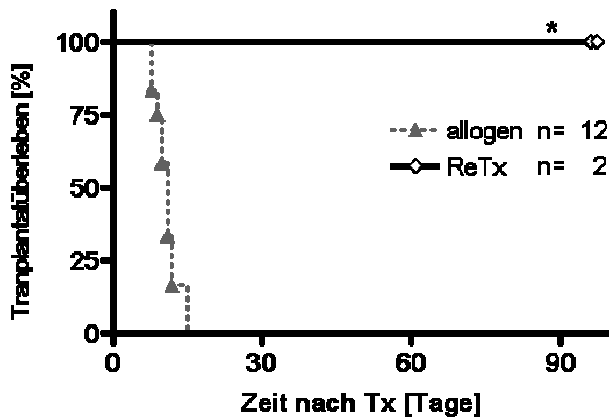


Abb. 31: Tolerogene Haut wird nach Retransplantation in neuen Rezipienten akzeptiert. Tieren mit langzeittoleranten Transplantaten, wurden diese nach 100 Tagen vom Tier entfernt und auf neue Rezipienten (BALB/c-RAG1^{-/-}) übertragen, die gleichzeitig mit CD4⁺CD45RB^{hi} Zellen rekonstituiert wurden.

Treg-Depletion nach Toleranzinduktion *in vivo*

Die Resultate der vorangegangenen Experimente deuten nicht nur auf eine maßgebliche Rolle von Tregs in der Induktion von Toleranz *in vivo* hin, sondern auch auf ihren Einfluss beim Verbleib in der Peripherie (Abb. 25 und Abb. 27) und lokal im transplantierten Organ (Abb. 29 und Abb. 30). Nach erfolgreich induzierter Toleranz durch den Transfer von Tregs müsste demzufolge die Depletion dieser Zellen wiederum zum Abstoßungsprozess führen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde zunächst der T-Zell-depletierende Antikörper anti-Thy1.1 (Klon 19E12) auf seine depletierende Fähigkeit *in vivo* getestet. Dazu wurden 2*10⁷ Milzzellen einer BALB/c-Thy1a-Maus (ausschließlich Thy1.1 exprimierend) in BALB/c-Tiere (Thy1.2 exprimierend) injiziert. 10 Tage später erhielt eine Maus 1mg anti-Thy1.1-Antikörper (19E12), das Kontrolltier nicht. Ob sich zwei Tage später in der Maus, die Antikörper erhalten hatte, noch Thy1a-Zellen befanden, wurde per FACS mit einem anderen Thy1.1-Antikörper (Klon Ox-7) analysiert (Abb. 32). Es zeigte sich, dass die transferierten Thy1.1 positiven Zellen durch Antikörpergabe in Milz und Lymphknoten vollständig deletierbar waren. Eine klonale Konkurrenz zwischen depletierendem und Detektionsantikörper war zuvor ausgeschlossen worden.

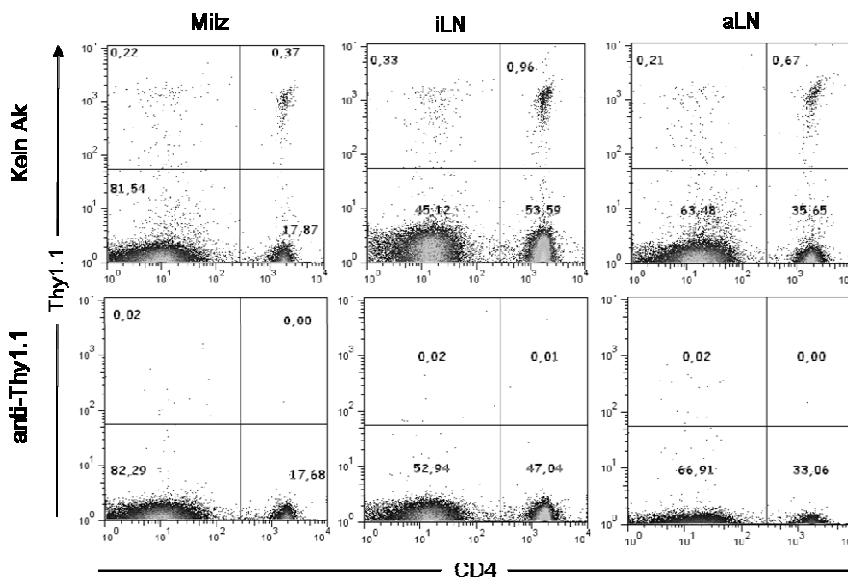


Abb. 32: Vollständige *In vivo*-Depletion mit α Thy1.1-Antikörper.

BALB/c-Mäuse (Thy1.2) erhielten 2*10⁷ Milzzellen einer BALB/c Thy1a-Maus (Thy1.1) i.v.. An Tag 10 wurden 1mg anti-Thy1.1-Antikörper injiziert oder nicht (kein Ak). An Tag 12 wurden Milz, inguinale und axiale Lymphknoten per FACS nach verbleibenden Thy1.1-Zellen analysiert.

Im eigentlichen Versuch wurden BALB/c-RAG1^{-/-}-Mäuse mit allogener Haut transplantiert, mit naiven CD4⁺CD45RB^{hi} Zellen rekonstituiert (Thy1.2⁺) und erhielten transduzierte Thy1.1⁺Foxp3⁺ Tregs. Nach 40 Tagen war die Haut der Mäuse, die Tregs bekommen hatte gut verheilt und die Mäuse somit tolerant. In einer Versuchsreihe wurde 1mg depletierender anti-Thy1.1 Antikörper injiziert, der nur die transduzierten Tregs depletieren kann, weil sie durch den retroviralen Gentransfer außer Foxp3 auch Thy1.1 exprimieren, während die T-Zellen der Empfängertiere nur Thy1.2 auf ihrer Oberfläche tragen. Auch nach 20 Tagen zeigte die Haut keines der Versuchstiere Abstoßungsmerkmale. Daraufhin wurden Milz, Lymphknoten und die Haut entnommen und per FACS auf verbliebene Tregs überprüft (Abb. 33 A). In den Organen des Kontrolltieres, das keinen depletierenden anti-Thy1.1-Antikörper bekommen hatte, waren zwischen 20% und 30% Thy1.1⁺Foxp3⁺ Tregs wieder auffindbar. Zudem fielen in der Milz 31% Foxp3⁺ Tregs auf, die sich erst nach Transfer und Transplantation entwickelt haben können, da transduzierte Foxp3 Tregs Thy1.1 koexprimieren und die CD4⁺CD45RB^{hi}-Zellen zur Rekonstitution reine Effektoren ohne Foxp3-Anteil sind. Hatte das Versuchstier den depletierenden Antikörper erhalten, waren in Milz und Lymphknoten lediglich noch 2% der transferierten Tregs zu finden, in der Haut aber noch 7.4%. Die im Rezipienten induzierten Foxp3-positiven Tregs waren von dem Antikörper erwartungsgemäß verschont geblieben und in der Milz zu 31% vertreten, in den Lymphknoten und der Haut mit 23%. Auch nach wiederholter Injektion von 1mg anti-Thy1.1 Antikörper blieb das Transplantat unverändert und akzeptiert.

Auch im immunkompetenten Transplantationsmodell konnte die Injektion des Treg-depletierenden Antikörpers keinen Toleranzabbruch initiieren, obwohl selbst 140 Tage später in der Milz und den Lymphknoten fast keine (0.1-0.3%) transferierten Tregs detektiert werden konnten. Nur in der Haut befand sich noch ein etwas größerer Anteil transduzierter Tregs von knapp 9% (Abb. 33 B). Auch wenn die Tregs nach Antikörpergabe deutlich reduziert sind, könnten gerade die wenigen Tregs in der Haut zur Aufrechterhaltung der Toleranz beitragen, die selbst durch massive Depletion nicht erreichbar waren. Es bleibt somit ein Stück weit unklar, ob Tregs nur in der Induktionsphase oder kontinuierlich zum Erhalt der Toleranz benötigt werden. Alternativ könnten die antigenspezifischen Tregs nach Transfer andere naive T-Zellen zu Tregs induziert haben. Da die Tregs aus sekundären lymphatischen Organen aber nahezu komplett entfernt wurden, kann im Zusammenhang mit dem Transfer der Toleranz durch das Transplantat davon ausgegangen werden, dass die lokale Anwesenheit von Tregs in hoher Anzahl notwendig und hinreichend ist, um eine Allotoleranz zu induzieren und aufrecht zu erhalten.

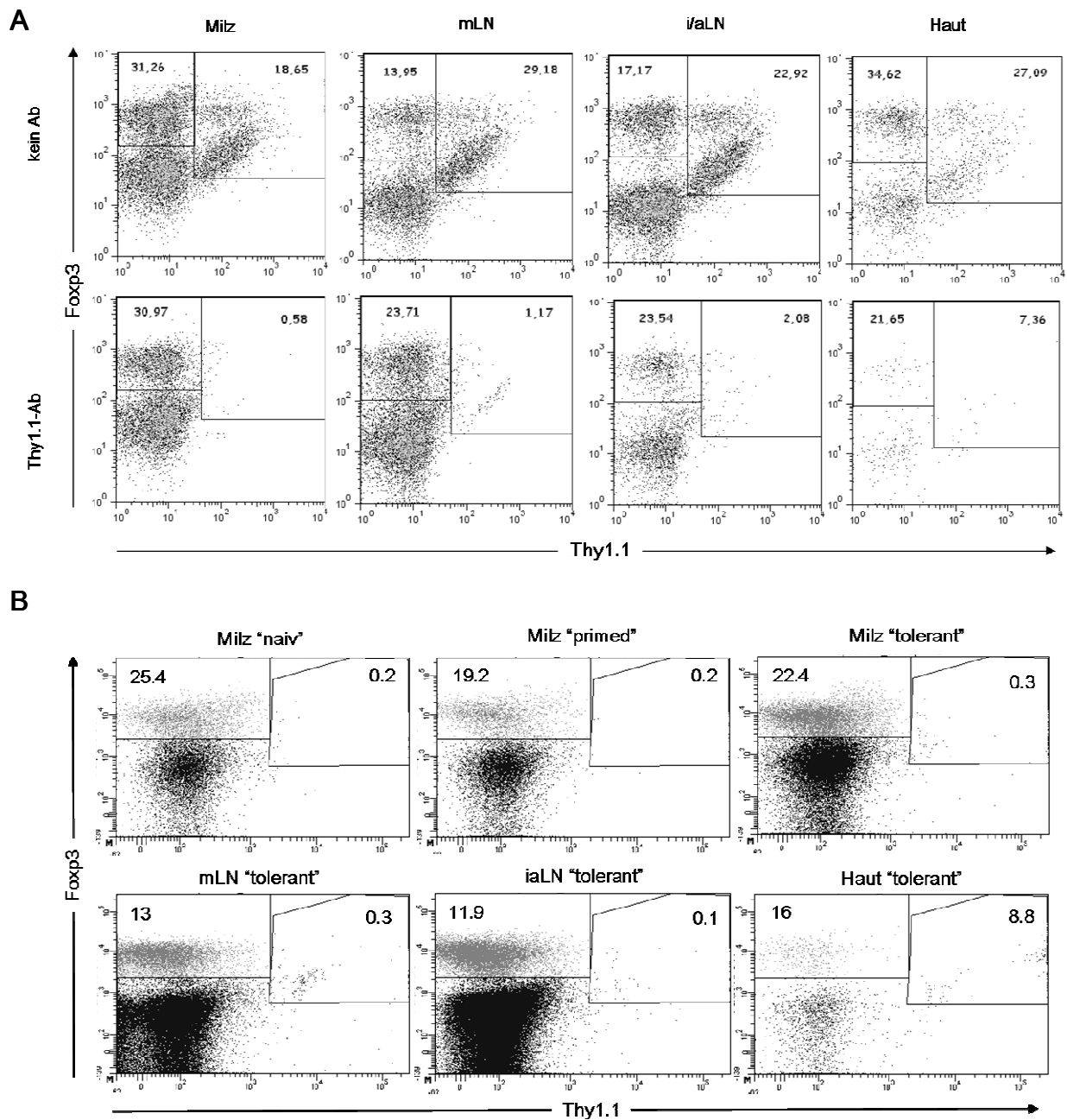


Abb. 33: Der depletierende α Thy1.1-Antikörper induzierte keine Transplantatabstoßung, obwohl die adoptiv transferierten Tregs eliminiert waren. A) BALB/c-RAG1^{-/-}-Mäuse wurden an Tag-1 mit naiven BALB/c-CD4⁺CD45RB^{hi} T-Zellen rekonstituiert, Thy1.1⁺Foxp3⁺ transduzierte Tregs injiziert und an Tag 0 allogene Haut transplantiert. 40 Tage später wurden entweder 1mg oder kein depletierender α Thy1.1-Antikörper intravenös gespritzt. Weitere 20 Tage danach wurden Milz, mesenterische (mLN), inguinale und axiale Lymphknoten (iaLN) und die Haut per FACS-Färbung auf Thy1.1⁺Foxp3⁺ exprimierende Tregs analysiert. B) Nicht lymphopene durch Tregs induzierte tolerante BALB/c-Mäuse 40 Tage nach Transplantation erhielten 1mg α Thy1.1-Antikörper. 100 Tage später wurden die Milz, Lymphknoten (mLN, iaLN) und die Haut per FACS auf verbleibende Tregs analysiert. Zum Vergleich wurden die Milz einer naiven und einer geprimten (C57BL/6=allo) Maus im FACS analysiert.

De novo* induzierte Foxp3-Expression *in vitro* und *in vivo

Das Ergebnis des vorangegangenen Experiments warf die Frage auf, ob die transferierten Foxp3⁺Thy1.1⁺ Tregs in der Lage waren, naive T-Zellen in Tregs zu konvertieren (infektiöse Toleranz). Denn in der FACS-Färbung waren Tregs zu sehen, die nicht zur transferierten Foxp3⁺Thy1.1⁺ Population gehörten, sondern aus den rekonstituierten Zellen hervorgegangen sein müssen. Außerdem existieren in der Literatur diesbezüglich Anhaltspunkte, die darauf hindeuten, dass adoptiv transferierte Tregs während ihrer Tätigkeit weitere Zellen zur Foxp3-Expression veranlassen können, was als „*infectious tolerance*“ bezeichnet wird (Graca 2000). Um diesen Aspekt *in vivo* zu verfolgen, wurden lymphopene BALB/c-RAG1^{-/-} Mäuse mit CD4⁺GFP⁻ gesorteten naiven Zellen aus einer BALB/c-Foxp3-eGFP Reportermaus rekonstituiert. Diese Zellen enthielten keinerlei natürliche Regulatoren und waren dementsprechend Foxp3 negativ, da in dieser transgenen Maus ein eGFP-Protein in die nicht codierende Region des *foxp3*-Locus inseriert wurde, welches unter Kontrolle des normalen Foxp3-Promotors exprimiert wird (Haribhai 2007). Das GFP-Signal korreliert in diesem System also mit der Foxp3-Expression. Ein Versuchstier erhielt zusätzlich transduzierte Foxp3⁺Thy1.1⁺ Tregs, das andere nicht. An beiden Mäusen folgte eine allogene Hauttransplantation. Erwartungsgemäß war das Transplantat der Kontrollmaus nach 13 Tagen komplett abgestoßen, das der Maus, die zusätzlich transduzierte Tregs erhalten hatte, wurde akzeptiert. Ein anderes Kontrolltier bekam lediglich transduzierte Tregs, aber kein Transplantat. An Tag 30 wurden Milz und Lymphknoten aller Versuchstiere entnommen und auf GFP⁺ bzw. Foxp3⁺ innerhalb der CD4⁺ T-Zellen untersucht. In der FACS-Analyse konnten entweder Foxp3 oder GFP gemessen werden. Eine gleichzeitige Färbung ist nicht möglich, da das zytosolische, nicht verankerte GFP nach dem notwendigen Fixierungs-/Permeabilisierungsschritt der Zellen zur Foxp3-Färbung ausgespült wird und nicht mehr detektierbar ist. In der BALB/c-Maus mit adoptiv transferierten, transduzierten Tregs konnten noch zwischen 7% und 13% Foxp3⁺Thy1.1⁺ transduzierte Tregs nachgewiesen werden (Abb. 34 A). Der Foxp3⁺Thy1.1⁻-Anteil in der Milz der Tiere, die Tregs erhalten hatte, war mit 30% fast doppelt so hoch wie der der Milz der Kontrollmaus mit 17%. In den inguinalen Lymphknoten der Kontroll-Maus betrug der Anteil 16%, während in der Maus mit transferierten Tregs 27% zu finden waren. Hatte ein Kontrolltier zwar Tregs, aber kein Transplantat bekommen (Kontrolle Treg, kein Tx), war trotzdem in allen untersuchten Organen ein ähnlich hoher Anteil iTregs wie im Versuchstier (Treg, Tx) zu finden (Abb. 34 B). Auch die Frequenz transduzierter Tregs unterschied sich unwesentlich von dem Versuchstier.

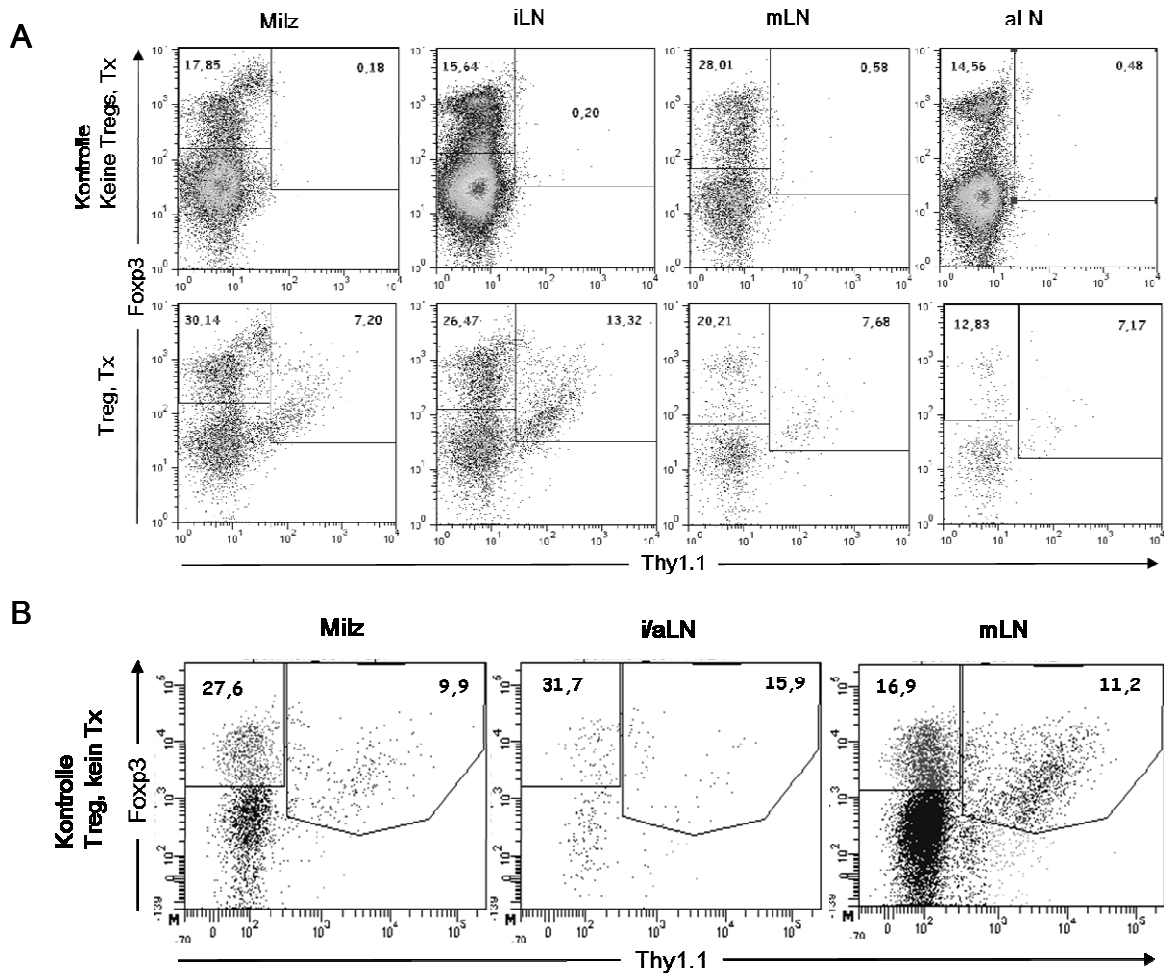


Abb. 34: De novo iTreg-Induktion in vivo. BALB/c-RAG1^{-/-} Mäuse wurden an Tag -1 mit naiven CD4⁺GFP⁻ T-Zellen aus einer BALB/c-Foxp3-eGFP Reportermaus rekonstituiert, mit Thy1.1⁺Foxp3⁺ transduzierten (Treg) oder keinen Tregs (Kontrolle keine Tregs, Tx; Abb. A) injiziert und an Tag 0 mit allogener Haut transplantiert oder nicht (Kontrolle Tregs, keine Tx; Abb. B). Nach 30 Tagen wurden Milz und Lymphknoten entnommen und per FACS der Anteil Foxp3⁺ und Foxp3⁺Thy1.1⁺ Zellen ermittelt.

Im letzten Experiment war eine iTreg-Induktion *in vivo* zu sehen, die zahlenmäßig nicht vom Antigen, sondern nur von der Anwesenheit der Tregs abhängig zu sein scheint. Fraglich ist dementsprechend, ob sich ein ähnliches Phänomen auch *in vitro* zeigen würde. Um das Verhalten induzierter Foxp3-Zellen in Gegenwart transduzierter Tregs zu ergründen, wie und ob sich zunächst CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen durch transduzierte Tregs *in vitro* zur Foxp3-Expression anregen lassen, wurden CD4⁺GFP⁻ T-Zellen aus BALB/c-FoxGFP Reporter-mäusen sortiert, um sicher zu stellen, dass keine natürlichen Regulatoren zugegen sind. Anschließend erfolgte eine polyspezifische Aktivierung mit anti-CD3/CD28 Antikörpern (a) oder nur Kultivierung (na). Nach 36 Stunden folgte eine Transduktion mit Foxp3-Thy1.1-Virus (t) oder nicht (nt). Jeweils nach 2 und 6 Tagen wurde per FACS-Analyse der Anteil GFP⁺ und Thy1.1⁺ Zellen ermittelt. Als GFP-positive Kontrolle wurden sortierte und aktivierte nTregs (CD4⁺GFP⁺) parallel kultiviert. In der Zweitageanalyse zeigte sich eine starke Transduktionseffizienz von 61% bei den aktivierten Zellen (Abb. 35 A). Nur in den aktivierten Kulturen waren einige GFP-positive Zellen erkennbar. Der Prozentsatz GFP⁺ Zellen der aktivierten, nicht transduzierten (a, nt) lag bei 4.55%, während der der zusätzlich Trans-

duzierten (a, t) insgesamt bei 13% lag. Nach 6 Tagen war dieser Anteil in den nicht transduzierten Zellen auf 13.4% angestiegen, in den Transduzierten auf 31%. Fast 50% der transduzierten Thy1.1⁺ Zellen exprimierten dann auch GFP (B). Transduzierte Tregs exprimieren also auch Foxp3 vom endogenen Locus, führen *in vitro* aber kaum zur iTreg-Induktion. Die Aktivierung scheint bei einem Teil der Zellen den endogenen Locus eventuell nur vorübergehend zu öffnen.

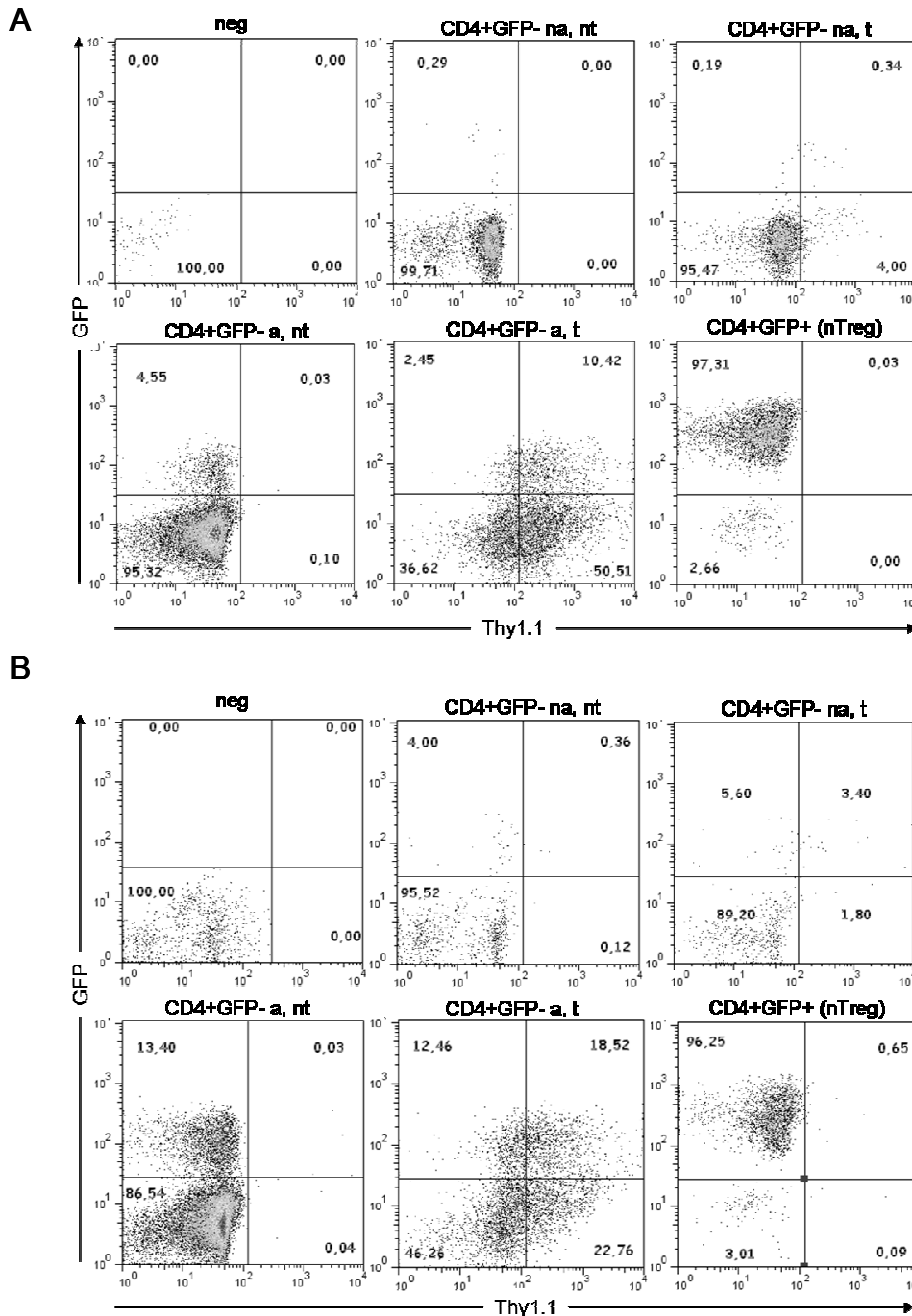


Abb. 35: De novo iTreg-Induktion *in vitro*. CD4⁺GFP⁻ T-Zellen wurden aus einer BALB/c-Foxp3GFP Reportermaus sortiert und entweder mit Antikörper aktiviert (a) oder nur kultiviert (na). Nach 2 Tagen wurden sie entweder mit Foxp3-Thy1.1-Virus transduziert (t) oder nicht (nt). Als Kontrolle dienten sortierte nTregs (CD4⁺GFP⁺), die aktiviert und kultiviert wurden. Jeweils nach 2 (A) und 6 Tagen (B) wurden die jeweiligen Zellen auf Thy1.1 und GFP Expression untersucht.

Im vorangehend beschriebenen Versuch zeigten naive T-Zellen einige Zeit nach Aktivierung im Vergleich zu nicht aktivierten T-Zellen eine erhöhte GFP und damit Foxp3-Expression. Auch in mit Foxp3Thy1.1-Virus transduzierten Tregs war nach einigen Tagen ein beachtlicher Anteil GFP-positiver Zellen detektierbar. Ein wichtiger Aspekt, wenn es sich um Tregs in der Wissenschaft und Medizin handelt, dreht sich um die Stabilität bzw. die mögliche Konversion zu T-Effektoren. Mittlerweile hat man herausgefunden, dass der Demethylierungsgrad einer speziellen Region in der Nähe des Foxp3-Promotors, TSDR (*Treg specific demethylated region*) genannt, mit erhöhter Stabilität korreliert (Huehn 2009). Aufgrund der hier beschriebenen Experimente war von großem Interesse, inwiefern man bei den *de novo* induzierten Tregs von einem stabilen Phänotyp ausgehen kann. Um Auskunft über den Methylierungsgrad dieser verschiedenen Tregs zu erhalten, wurden GFP⁺, Thy1.1⁺ und Thy1.1⁺Foxp3⁺ an Tag 6 nach Transduktion sortiert und jeweils eine DNA-Extraktion vorgenommen. Per quantitativer PCR wurde von diesen Proben der Demethylierungsstatus ihrer TSDR ermittelt (Baron, Turbachova et al. 2006). Während bei den nTregs ein Demethylierungsstatus von 88.4% berechnet wurde, waren die transduzierten Tregs, die Foxp3 ausschließlich aufgrund der Insertion exprimieren (Thy1.1⁺), nur zu 2.2% demethyliert. Aber auch die TSDR der *de novo* induzierten GFP⁺ iTregs, ergab nur einen Wert von 3.2% (Abb. 36). Da eine Transduktion den endogenen *foxp3*-Locus nicht öffnet, war bei der Methylierungsanalyse der Thy1.1-positiven Zellen ein niedriger Prozentsatz zu erwarten. Induzierte GFP⁺ Zellen, deren endogener *foxp3*-Locus transkriptionell allein aktiv ist, sind dem Methylierungsstatus nach zu urteilen nicht stabil. Eventuell ist eine zu geringe Zellzahl nicht in der Lage, stabil zu bleiben. Anscheinend bedarf es für einen stabilen Treg-Phänotyp der dauerhaften Expression des retroviral insertierten Locus, um den Treg-Phänotyp aufrecht zu erhalten. Es bleibt aber festzuhalten, dass die Stabilität der Foxp3-Expression der iTregs auch 100 Tage nach Transplantation in den *In Vivo*-Experimenten unter inflammatorischen und lymphopenen Bedingungen noch nachweisbar war.

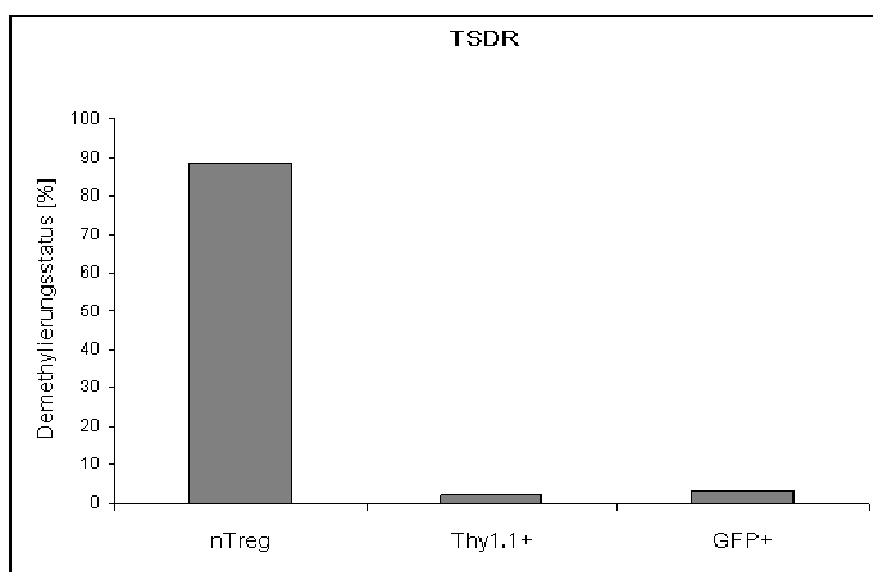


Abb. 36: *De novo* induzierte Tregs zeigen eine vollständig methylierte TSDR. CD4⁺GFP⁺ nTregs und CD4⁺GFP⁻ T-Zellen wurden aus einer BALB/c-Foxp3GFP Reportermaus sortiert und mit Antikörper aktiviert. Nach 2 Tagen wurden die CD4⁺GFP⁻ Zellen mit Foxp3-Thy1.1-Virus transduziert. Nach 6 Tagen wurden die Thy1.1⁺ und GFP⁺ Zellen sortiert, jeweils DNA extrahiert und von der Firma Epiontis per qPCR die TSDR analysiert (Baron 2006).

Wenn auch die Ergebnisse der Methylierungsanalysen bei den induzierten GFP-positiven Tregs keine Stabilität prognostizieren, so sollte in einem *in vivo*-Versuch getestet werden, ob die einzelnen Zellpopulationen Toleranz gegen Hauttransplantate bewirken können. Gemäß dem standardisierten Transplantationsmodell erhielten BALB/c-RAG1^{-/-}-Mäuse effektorische T-Zellen sowie aus dem vorangegangenen Transduktionsexperiment die gleiche Menge von aktivierten und sortierten entweder nTregs, Thy1.1⁺ Tregs oder GFP⁺ iTregs und ein allogenes Hauttransplantat. Die Haut der Tiere, die nTregs und die transduzierten Thy1.1⁺ (Foxp3⁺) Tregs bekommen hatten, wurde mindestens 40 Tage toleriert (Abb. 37). Im Gegensatz dazu wurde das Transplantat der Maus, die lediglich GFP⁺ iTregs erhalten hatte relativ frühzeitig an Tag 16 abgestoßen. Kontrolltiere, die nur Effektoren bekommen hatten, stießen allogene Hauttransplantate in der Regel zwischen Tag 8 und 12 ab. *De novo* induzierte Tregs, die entweder durch transduzierte Tregs oder lediglich aufgrund polyspezifischer Aktivierung entstanden sind, waren tatsächlich nicht in der Lage eine Immunantwort zu regulieren. Eventuell ist die Induktion dieser Tregs nur eine transiente Erscheinung, die Tregs sind also instabil und haben daher *in vivo* keine suppressierende Wirkung mehr.

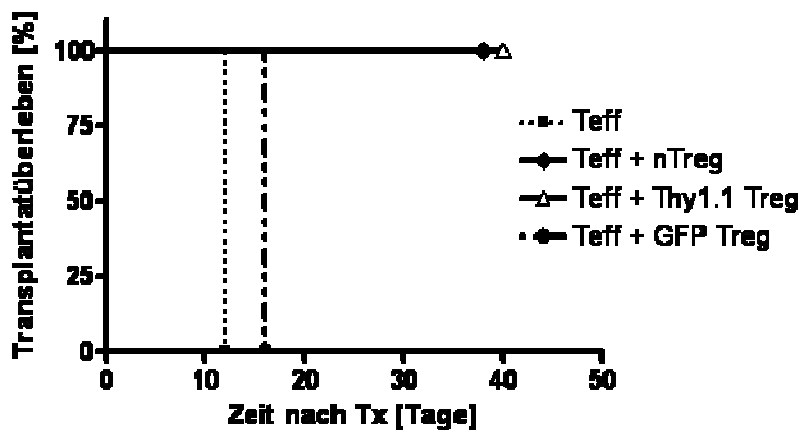


Abb. 37: *De novo* induzierte Tregs können keine allogene Transplantatabstoßung verhindern. BALB/c-RAG1^{-/-}-Mäuse erhielten BALB/c-CD4⁺ CD45RB^{hi} Effektorzellen und aktivierte und sortierte entweder nTregs (5*10⁵), transduzierte Thy1.1⁺ Tregs (2*10⁵), GFP⁺ iTregs (5*10⁵). Am folgenden Tag wurde ihnen allogene Haut transplantiert.

Kapitel 4 Diskussion

Eines der großen Ziele in der Transplantation ist die Toleranzinduktion, folglich das Langzeitüberleben von Transplantaten ohne dauerhafte Immunsuppression. In diesem Zusammenhang sind während der letzten Jahre die regulatorischen T-Zellen in den wissenschaftlichen Fokus geraten. Aufgrund der Stärke der allospezifischen Immunantwort kann eine Toleranz wahrscheinlich nur durch die gleichzeitige Inhibition von Effektorzellen (T_{eff}) und Förderung der Regulatoren (T_{reg}) erreicht werden.

Foxp3-transduzierte Tregs erzeugen Toleranz im klinisch relevanten immunkompetenten Transplantationsmodell

Tregs haben mittlerweile eine unumstrittene physiologische Bedeutung, weshalb ihr Einsatz in der Transplantationsimmunologie naheliegend ist. In immunkompetenten Tieren ist es trotzdem deutlich schwieriger, lang anhaltende Toleranz nach Transplantation solider Organe zu induzieren, als in lymphopenen Modellen. Durch die Gabe von polyspezifischen Tregs kann hämatopoetischer Chimärismus nach Knochenmarktransplantation erreicht werden (Joffre, Gorsse et al. 2004). Auch Autoimmundiabetes kann durch *in vitro* expandierte antigenspezifische Tregs supprimiert werden (Tang, Henriksen et al. 2004; Jaeckel, von Boehmer et al. 2005). Aber bislang hat noch niemand demonstrieren können, dass Tregs allein solide Organe vor der akuten Abstoßung schützen können. Wie in einer Studie deutlich wurde, konnte die Injektion alloantigen-aktivierter Tregs in subletal bestrahlte Empfängertiere das Überleben allogener Hauttransplantate nicht prolongieren (Joffre, Santolaria et al. 2008). Auch der Versuch, durch anti-CD4/DST induzierte Tregs in Wildtypmäusen Toleranz gegen Herztransplantate zu erzeugen schlug fehl (Karim 2005). In Übereinstimmung mit diesen Arbeiten konnte in dieser Arbeit ebenfalls allein durch den Transfer von Tregs in nicht lymphopenen Modellen keine Toleranz induziert werden (Abb. 16). Die Anzahl alloreaktiver T-Zellen ist im Verhältnis zu den transferierten Tregs wahrscheinlich zu groß. Damit die Effektivität der Tregs gesteigert werden kann, muss also vermutlich die Menge alloreaktiver T-Zellen reduziert werden. Um eine klinisch hohe Relevanz der Tregs im Kontext der Toleranzinduktion zu bekräftigen, müssen für die Tiermodelle klinisch realisierbare Protokolle erprobt werden. Dies gilt sowohl für die Reduktion von Effektor-T-Zellen als auch für die Zahlen der adoptiv transferierten Tregs. Daten zur Toleranzinduktion mittels Antikörpern und Treg-Transfer zeigten, dass durch DST generierte alloantigen-spezifische Tregs, zusammen mit Gabe eines toleranzinduzierenden anti-CD4 Antikörpers in nicht lymphopenen Wildtypmäusen eine Toleranz gegen allogene Herztransplantate induzieren konnten (Bushell 1995). Allerdings sind allogene Herztransplantate (Schenk 2005), ebenso wie Leber- (Steger 2006) und Nierentransplantate (Bickerstaff 2001; Wang 2011), in Nagern nur gering immunogen. Um ein klinisch relevantes Modell zu benutzen, wurde deshalb die Hauttransplantation in einer immunogenen Donor/Empfänger-Kombination (C57BL6→BALB/c) gewählt. Dies sollte helfen, die Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen. Gleichsam konnte der Transfer von alloantigen-spezifischen Tregs in Verbindung mit depletierenden anti-CD8 Antikörpern in Kombination mit Rapamycin die Abstoßung von Herz-

transplantaten verhindern (Tsang 2009). Langzeit-Toleranz gegen stark immunogene Hauttransplantate hingegen konnten im identischen experimentellen Setting nicht erzielt werden. In einem anderen Ansatz konnten alloantigen-spezifische Tregs zwar ohne Immunsuppression die Abstoßung von allogenen Hauttransplantaten verhindern, wobei die Donor-Empfänger-Kombination aber nur einen einzigen MHC- und keinen vollständigen MHC-*mismatch* beinhaltete (Golshayan, Jiang et al. 2007). Die Depletion von CD4 und CD8 T-Zellen und Injektion *in vitro* generierter Tregs konnte in einer immunogenen Stammkombination auch keine Toleranz gegen Hauttransplantate bewirken. Wenn die Donormaus aus einer Kreuzung zwischen Donor und Rezipient (F1) bestand (haploidenter *mismatch*), konnte die akute Abstoßung verzögert aber nicht verhindert werden (Park, Koo et al. 2010). Toleranz nach adoptivem Treg-Transfer gegen allogene Hauttransplantate mit komplettem MHC-*mismatch* in immunkompetenten, nicht lymphopenen Mäusen konnte bis jetzt in keiner Studie gezeigt werden.

Toleranz findet vermutlich durch komplementäre Mechanismen der Deletion und Regulation statt (Li 2001). Sinnvoll könnte somit sein, initial alloreaktive Zellen zu minimieren, so dass die regulatorischen Elemente dann die Kontrolle übernehmen können. Aufgrund dieser Überlegungen ist es in dieser Arbeit gelungen, lediglich durch die Injektion Foxp3-transduzierter Tregs, kombiniert mit einer milden T-Zelldepletion und kurzzeitigen Rapamycingabe, langfristig Toleranz in einem immunkompetenten und vollständig allogenen Hauttransplantationsmodell zu erreichen (Abb. 24). Dieses Resultat ist auch deswegen ein enormer Fortschritt, da T-Zell-depletierende Antikörper, wie anti-CD52 (CAMPATH-1H), Anti-Thymozyten Globulin (ATG) oder anti-CD3 (OKT3), in der medizinischen Organtransplantation bereits angewendet werden. Wie die Vorversuche dieser Arbeit zeigen, ist die milde Lymphozytendepletion bereits nach 5-7 Tagen voll reversibel (Abb. 17). Rapamycin wird bereits seit einiger Zeit in der klinischen Transplantationsmedizin eingesetzt. Arbeiten im Mausmodell zeigen, dass Rapamycin mTOR-abhängig Effektor T-Zellen inhibiert, wohingegen Tregs kaum beeinträchtigt werden (Zeiser, Leveson-Gower et al. 2008). Die nur temporäre Verabreichung, um den Tregs einen selektiven Vorsprung zu verschaffen, wäre für die therapeutische Anwendung bei Transplantationspatienten somit ein enormer Vorteil.

Alloantigen-spezifische Tregs sind effektiver bei der Induktion von Toleranz

Tregs müssen zur Aktivierung über ihren TCR aktiviert werden (Thornton und Shevach 2000). Obwohl man noch nicht im Detail über ihre TCR-Liganden Bescheid weiß, gelten nTregs als autoreaktive Zellen, während induzierte Tregs wahrscheinlich unterschiedliche Spezifitäten gegen Antigene besitzen (Hsieh 2006). In der klinischen Transplantation wird die Anzahl an Tregs üblicherweise im Blut und nicht in den betreffenden Organen überprüft. Über die Antigen-spezifität dieser nTregs gibt es bislang keine Daten. Es gibt aber Hinweise darauf, dass alloantigen-spezifische Tregs in der klinischen Induktion von Toleranz gegen Autoimmunerkrankungen effektiver sein könnten (Tang, Henriksen et al. 2004; Jaeckel, von Boehmer et al. 2005). Es ist allerdings schwierig, Tregs mit polyklonalem Repertoire von allospezifischen zu distinguieren. Am Mausmodell konnte demonstriert werden, dass isolierte nTregs, die mit allogenen APC aktiviert worden waren, nach Knochenmarktransplantation sowohl das Anwachsen des Transplantats in bestrahlten Rezipienten fördern, als auch eine GvHD komplett verhindern. Die gleichen Tregs, die mit Drittspender-APC stimuliert wurden, hatten diesen Effekt nicht (Trenado, Charlotte et al. 2003). Obwohl auch polyspezifische Tregs GvHD inhibieren können, ohne den GvL-Effekt zu stören (Edinger

2003), ist die Datenlage bei solider Organtransplantation noch unklar. Mit TCR-transgenen Tregs konnte in der soliden Organtransplantation gezeigt werden, dass alloantigen-spezifische Tregs effektiver die Abstoßung von Herztransplantaten verhindern und das Überleben von Hauttransplantaten zumindest mehr verlängern konnten als polyspezifische nTregs (Sanchez-Fueyo 2006). Allerdings wurden diese Versuche in zuvor entweder thymektomierten und CD25-depletierten oder bestrahlten Rezipienten durchgeführt. Auch wir konnten zeigen, dass aktivierte polyspezifische nTregs im lymphopenen Modell kaum eine Verlängerung des Transplantatüberlebens bewirken. Aber Foxp3-transduzierte Tregs waren in der Lage, ohne zusätzliche Unterstützung, lang anhaltende Toleranz gegen Hauttransplantate in 33% der Fälle zu erzeugen. Dabei waren erstaunlicherweise polyspezifische und alloantigen-spezifische Regulatoren gleichermaßen effektiv (Abb. 15 A). Die durch die Tregs herbeigeführte Allotoleranz war donorspezifisch, da ein Drittpendertransplantat sehr schnell abgestoßen wurde (Abb. 26).

Die chronische Allotransplantatdysfunktion ist der häufigste Grund für die späte allogene Transplantatabstoßung. Dabei ist der direkte Antigen-Erkennungsweg für die akute Abstoßung von großer Relevanz, während in der chronischen Transplantatabstoßung auch indirekte Antigenerkennung bedeutsam ist (Hornick und Lechler 1997). Die direkte Immunreaktion verliert nach einer Transplantation mit der Zeit an Bedeutung, während die indirekte Immunantwort im zeitlichen Abstand nach Transplantation relevanter wird. Das bedeutet demzufolge, dass es wichtig sein könnte, ob therapeutisch eingesetzte Alloantigene ihr Antigen direkt oder indirekt erkennen. Einige Arbeiten belegen bereits, dass Tregs mit indirekter Antigenerkennung in zuvor thymektomierte und CD4/CD8-depletierte Rezipienten eine langanhaltende Toleranz gegenüber Hauttransplantaten mit einem geringen MHC-*mismatch* (ein MHC I *mismatch*) erzeugen können (Golshayan, Jiang et al. 2007). Als weiterer Ansatz wurden aus nTregs Zelllinien hergestellt, die zunächst direkte Alloantigen-Spezifität erhielten und anschließend durch retroviralen Gentransfer einen TCR-Rezeptor exprimieren, der allogene Peptide indirekt erkennen kann (Tsang, Tanriver et al. 2008). Diese Tregs konnten zusammen mit anti-CD8 Antikörper und Rapamycin Toleranz gegen Herztransplantate mit partiellem MHC-*mismatch* induzieren. Tregs mit ausschließlich direkter Spezifität, ohne einen zusätzlichen transduzierten TCR waren weniger effektiv. Demnach scheinen beide Mechanismen der Alloantigenerkennung für die Spezifität von Regulatoren von Bedeutung zu sein. Diese Modelle sind zwar mechanistisch interessant und hilfreich für weitere Studien, aber in die klinische Anwendung nicht übertragbar, da entweder kein vollständiger MHC-*mismatch* involviert ist oder es sich um transgene Zellen handelt. Außerdem konnten die transgenen Tregs keine bemerkenswerte Toleranz gegen Hauttransplantate bewirken. Auch wenn die Haut nicht zu den klassischen Organen im Bereich der Transplantationsmedizin gehört, so stellt sie das am stärksten immunogene Transplantat dar, dessen allogene Transplantation, im Gegensatz zu Leber, Nieren und Herz, in der Regel nicht zu spontaner Toleranz führt. Deshalb ist es in der murinen Transplantationsforschung ein übliches Modell, um Toleranz unter schwierigen und klinik-relevanten Verhältnissen zu demonstrieren. Eine alternative Vorgehensweise, um eine Treg-Population mit direkter und indirekter Antigenerkennung zu schaffen und deren Effektivität zu testen, ist die Aktivierung und Expansion von isolierten nTregs mit F1-APC. Tatsächlich konnten diese Tregs in subletal bestrahlten Rezipienten die Induktion eines gemischten hämatopoetischen Chimärismus bewirken, welcher dann eine Toleranz von allogenen Hauttransplantaten ermöglichte (Joffre, Santolaria et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden direkt sowie indirekt alloantigen-spezifische Tregs generiert, in dem Empfänger CD4⁺ T-Zellen mit F1-APC (Kreuzung zwischen Donor- und Empfängertier) aktiviert und

anschließend mit Foxp3 transduziert wurden. Im lymphopenen Transplantationsmodell konnten diese Tregs in 80% der Fälle eine Langzeit-Toleranz gegen allogene Haut erzeugen und waren damit deutlich effizienter als Tregs mit direkter oder polyklonaler Spezifität (Abb. 15 B). Im Gegensatz zu den vorherigen Modellen kann man mit dieser Methode eine große Anzahl an Tregs mit indirekter Antigenerkennung erhalten, ohne aufwendige *in vitro*-Expansion, da das gesamte CD4⁺ T-Zellrepertoire und die hohe Präkursorfrequenz alloreaktiver Zellen genutzt werden kann.

Alloantigen-spezifische Foxp3-transduzierte Tregs sind funktionell und stabil

Viele natürliche und auch experimentell generierte Tregs sind als Prototyp für die klinische Applikation bereits beschrieben worden (Brusko 2008), wobei die Anzahl der isolierten Tregs nach wie vor limitierend ist. Dieses Problem kann durch die Expansion von nTregs oder retrovirale Insertion eines *foxp3*-Gens in T-Zellen gelöst werden. Da die Anzahl natürlicher Regulatoren sowohl in der Maus als auch im Menschen sehr limitiert ist, ist die Umprogrammierung von CD4⁺ T-Zellen in Tregs durch retroviralen Gentransfer ergiebiger. Dafür wurden CD4⁺ T-Zellen mit Donoralloantigen aktiviert. Die donorreaktiven Zellen waren durch die Isolation mittels der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 erfolgreich angereichert. Durch retroviralen Gentransfer des *foxp3*-Gens wurden sie anschließend zu Tregs umprogrammiert. Dieser Transfer erfolgte auf höchst effizienter Basis (Abb. 10). Phänotypisch glichen die transduzierten Zellen den Tregs natürlicher Herkunft, da sie in hohem Maß die Moleküle CD25 (Sakaguchi 1995) und den Transkriptionsfaktor Foxp3 (Fontenot 2003), CTLA-4 (Takahashi 2000) und die Migrationsmarker CD62L und CCR7 exprimierten, deren Anwesenheit *in vitro* sowie *in vivo* für immunmodulatorische Effekte essentiell sind (Walunas und Bluestone 1998; Kingsley, Karim et al. 2002). Überdies konnten diese Tregs über den genannten Zeitraum effizient expandiert werden, so dass nicht nur aufgrund der hohen Transduktionsrate, sondern auch der Möglichkeit zur Expansion eine große Anzahl Tregs erzeugt werden kann, welche eine Translation ermöglicht. *In vitro* konnten sie, im Gegensatz zu kontrolltransduzierten Effektoren, signifikant eine MLR unterdrücken, während sie selbst anerg auf Restimulation mit Alloantigen reagierten (Abb. 13). Alloantigen-spezifische Foxp3-transduzierte Tregs waren sowohl phänotypisch als auch in ihrer Stabilität von nTregs nicht unterscheidbar und zeigten *in vitro* keine geringeren supprimierenden Eigenschaften.

Foxp3 ist derzeit der verlässlichste Marker zur Identifikation von Tregs (Bennett, Christie et al. 2001; Brunkow, Jeffery et al. 2001). Studien an Foxp3GFP *knock-in* Reportermausen zeigten, dass Foxp3 für das Überleben der Treg-Vorläufer nicht notwendig, aber essentiell für deren Suppressorfunktion ist (Gavin 2007; Lin 2007). Anscheinend ist auch die Menge an vorhandenem Foxp3 für die regulatorische Funktion von großer Bedeutung, wie eine Studie demonstrierte, in der Tregs mit 10-fach dezimierter Foxp3-Proteinexpression keine autoimmune Erkrankung inhibieren konnten (Wan und Flavell 2007). Transkriptionelle Analysen gaben Hinweise darauf, dass der regulatorische Phänotyp durch die Expression von CD25 und CTLA-4 mit abhängt, aber durch Foxp3 gefestigt wird (Gavin, Rasmussen et al. 2007). Die große Sorge beim Einsatz von antigenspezifischen Tregs in der Klinik ist die mögliche Konversion in Effektoren, die infolgedessen alloreaktiv wären. In den letzten Jahren mehren sich Hinweise, dass Foxp3⁺ Tregs nur eine eingeschränkte Stabilität besitzen. Denn es wurde gezeigt, dass nTregs ihre Foxp3-Expression verlieren können, und damit auch ihre inhibitorischen Fähigkeiten einbüßen. Nach Verlust von Foxp3 können sie dann inflammatorische Zytokine wie IFN- γ , IL-4 und IL-17 produzieren und Effektor-

funktionen erhalten (Williams und Rudensky 2007; Yang 2008; Sharma 2010). Auch im diabetischen Mausmodell fand man einen bedeutenden Anteil Tregs, die ihre Foxp3-Expression verloren und Effektorfunktion angenommen hatten (Zhou 2009). Auch Tregs, welche nach Induktion in Gegenwart von TGF- β induziert wurden (iTregs), scheinen nur eine instabile Expression des *foxp3*-Gens zu besitzen (Koenecke 2009). Auf der anderen Seite ergab die Analyse von genetisch markierten Foxp3⁺ Tregs, dass die Mehrzahl der nTregs in gesunden Mäusen stabil bleibt (Rubtsov 2010). Eine andere Studie berichtet von einer sehr stabilen Foxp3-Expression in CD25^{hi}-Tregs, während ein kleiner Anteil Tregs mit geringem CD25-Expressionslevel Foxp3 nach adoptivem Transfer in lymphopene Rezipienten verloren hatte (Komatsu 2009). In jedem Fall hat die Stabilität der Foxp3-Expression und damit des nTreg-Phänotyps bei der Verwendung von antigenspezifischen Zellen eine besondere Bedeutung, da durch den Verlust von Foxp3 effiziente Effektorzellen entstehen würden.

Die Foxp3-transduzierten Tregs, die in dieser Arbeit zur Induktion von Toleranz eingesetzt wurden, bewiesen *in vitro* phänotypisch ein äußerst stabiles Expressionsprofil, wie die FACS-Analysen nach 20-tägiger Zellkultur beweisen (Abb. 12). Wurden diese Zellen *in vivo* im lymphopenen oder immunkompetenten Transplantationsmodell eingesetzt, erzeugten sie dort nicht nur eine lang anhaltende Toleranz gegenüber allogener Haut, sondern waren auch nach 100 Tagen und länger sowohl in der Milz als auch den Lymphknoten und der Haut noch aufzufinden. Auch in den immunhistochemischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die in der Haut befindlichen Tregs dort langfristig persistierten, da nicht nur über 80% der effektorischen T-Zellen Foxp3 exprimierten, sondern diese zu fast 80% aus den transferierten Foxp3Thy1.1 Tregs bestanden. So zeigte sich bei den durch retroviralen Transfer transduzierten Tregs im Gegensatz zu einigen Studien mit nTregs und iTregs eine langfristige Stabilität und Präsenz in Tieren, in denen Toleranz gegen ein allogenes Hauttransplantat induziert worden war. Wichtig ist hier sicherlich auch die Präsenz des Transplantats als konstanter Antigen-Lieferant, der auch zur Stabilität der Tregs und dadurch zur Toleranzerhaltung beiträgt. Die funktionelle und genetische Stabilität der Tregs ist eine weitere Bestätigung, dass sie bei der Toleranzinduktion und -erhaltung eine außerordentlich wichtige Rolle spielt und die transduzierten Tregs im Gegensatz zu induzierten Tregs diese Anforderung erfüllen können.

Einfluss der Foxp3-Transduktion auf den endogenen *foxp3*-Locus

Die Verwendung von Foxp3-Reporterermäusen zeigte, dass retroviral transduzierte Zellen in 50% auch Foxp3 von ihrem endogenen Locus exprimieren (Abb. 35). Da Foxp3 eine zentrale Rolle bei der Treg-Funktion während der Differenzierung und Erhaltung zukommt, werden in letzter Zeit wieder vermehrt die molekularen Mechanismen des *foxp3*-Locus untersucht. Die Analysen von hochkonservierten nicht codierenden Sequenzen (CNS) im *foxp3*-Locus offenbaren eine große Rolle dieser Elemente bei der Kontrolle der Foxp3-Expression (Zheng 2010). Aufgrund der Kontroversen bezüglich Stabilität und regulatorische Wirksamkeit gerade von iTregs bot sich eine Analyse des Demethylierungszustandes ihrer TSDR an, der mit erhöhter Stabilität korreliert. Die Resultate der induzierten Tregs ergaben jedoch eine nahezu komplett methylierte TSDR (Abb. 36). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Studien, in denen mit TGF- β *in vitro* induzierten Tregs ebenfalls zwar eine Foxp3-Expression, aber eine unvollständige Demethylierung des CpG-Motivs detektierbar war (Floess, Freyer et al. 2007). Diese iTregs hatten auch nach erneu-

ter Stimulation keine suppressorische Fähigkeit. Es ist somit davon auszugehen, dass die konstante Expression vom transduzierten Locus dauerhaft für eine stabile Treg-Funktion notwendig ist und es nicht zu einer stabilen Expression des endogenen Locus kommt. Die *de novo* induzierten Tregs dieser Experimente scheinen damit also eine instabile Population zu sein. Im Transplantationsmodell erwiesen sie sich auch nicht erfolgreich in der Toleranzinduktion, da sie eine akute Abstoßung der Haut nicht verhindern konnten (Abb. 37). Die transduzierten Tregs aus dem gleichen experimentellen Ansatz hingegen konnten eine Toleranz gegen die Haut induzieren. Für die Stabilität und die Toleranzinduktion ist also eine dauerhafte Expression des retroviralen Promotors notwendig, da die Expression des endogenen Locus weder einen stabilen Phänotyp noch regulatorisch wirksame Tregs hervorruft. Vielleicht können *de novo* induzierte Tregs das Transplantat deshalb nicht schützen, weil sie aus dem naiven T-Zellpool stammen und ohne Präaktivierung transferiert werden. Die hierbei neu entstandenen Tregs entwickeln offensichtlich zwar zumindest vorübergehend einen regulatorischen Phänotyp, verlieren diesen aber entweder nach Transfer *in vivo* sehr schnell wieder oder sind suppressorisch wirkungslos.

Langzeit-Persistenz der Tregs

Ob ein Kernmechanismus für die supprimierenden Eigenschaften von Tregs verantwortlich ist oder der Toleranzinduktion mehrere komplementäre Strategien zugrunde liegen ist noch ungewiss. Unklar ist auch, ob ein spezieller Mechanismus eine dominante Rolle in bestimmten Situationen spielt, oder verschiedene Mechanismen simultan und synergetisch eingreifen und ob das Ausfallen eines derer zum Versagen der Toleranzinduktion führen kann. Um die Funktionsweise von regulatorischen T-Zellen *in vivo* besser zu verstehen, ist es zunächst auch wichtig zu wissen, wo genau sie wirken und wie lange. Bisher sind aber keine Arbeiten bekannt, die Aufschluss darüber geben, was mit Tregs nach dem adoptiven Transfer passiert.

T-Zellen haben eine begrenzte Lebensdauer. Selbst *memory* T-Zellen, die eigentlich als sehr langlebig gelten, zeigen in einigen Studien eine langsame aber kontinuierliche Reduktion in der Peripherie (Surh 2006). Über die Lebensdauer von Tregs ist bisher wenig bekannt. Unwahrscheinlich aber ist, dass sie immortal sind. Fraglich ist demzufolge, wie Langzeit-Toleranz aufrechterhalten werden kann. Ob Tregs im Kontext der Allotoleranz, solange Alloantigen gegenwärtig ist, überleben und konstant alloreaktive T-Zellen und APC kontrollieren oder ob sie nach einiger Zeit neue alloreaktive Tregs rekrutieren, ist unklar. Wenige Arbeiten haben bisher die Überlebensdauer und -raten von Tregs bei der allogenen Transplantation untersucht. Der Mechanismus der Toleranzinduktion nach adoptivem Treg-Transfer ist also bislang ungewiss, da transferierte Tregs maximal 2 Wochen nach Transfer reisoliert werden konnten. In einigen Arbeiten wurden lediglich kurzfristig die Überlebens- und Proliferationsfähigkeiten überprüft. So fand man beispielsweise, dass *in vitro* expandierte Tregs, die langfristig Toleranz gegen Herztransplantate induzieren konnten, zumindest bis 7 Tage danach spezifisch in der Milz proliferiert hatten (Komatsu, Mariotti-Ferrandiz et al. 2009). Es konnte auch gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in lymphopenen Mäusen Toleranz gegen Hauttransplantate bewirken konnten und nach 100 Tagen noch detektierbar waren (Nishimura 2004). Aber nach heutigen Erkenntnissen bestehen sortierte CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nicht aus einer reinen nTreg-Population, sondern enthalten eine große Anzahl naiver und potenziell effektorischer T-Zellen. Bei den Zellen, die bei den Langzeit-Experimenten gefunden wurden, ist somit nicht klar, ob es

sich um transferierte oder induzierte Tregs handelt. In den Transplantationsversuchen dieser Arbeit konnte erstmals demonstriert werden, dass adoptiv transferierte alloantigen-spezifische Tregs, die Toleranz gegen allogene Hauttransplantate induzieren können, auch in nicht lymphopener Umgebung mindestens 100 Tage überleben. So war sowohl in der Milz, den inguinalen sowie mesenterischen Lymphknoten als auch der Haut noch eine signifikante Anzahl transferierter Foxp3-positiver Tregs auffindbar (Abb. 25). Offensichtlich sind Tregs in der Lage, die kurzfristige Zerstörung allogener Zielzellen zu regulieren. Der Befund der Langzeit-Persistenz von Tregs erklärt auch, warum in einem *In vivo-Killing-Assay*, Mäuse mit dauerhaft akzeptierten Transplantaten frisch injizierte allogene Donorzellen nicht eliminierten. Tiere, die gegen das Alloantigen ohne gleichzeitige Toleranzinduktion durch Tregs bereits gepriemt waren, beseitigten die neuen allogenen Zellen sofort (Abb. 27). Durch die alloantigen-spezifische Treg-vermittelte Toleranz gegen Hauttransplantate waren die Tiere offenbar grundlegend gegen das Alloantigen sensibilisiert. Die Erkenntnis, dass sich durch die Tregs eine systemische Toleranz entwickelt und scheinbar stabilisiert, da sie auch nach langer Zeit wirksam war, ist neu und in der wissenschaftlichen Literatur noch nie beschrieben worden. Das lokale wie systemische Vorhandensein der antigenspezifischen Tregs in unserem Modell lässt den Schluss zu, dass beides für eine stabile Toleranzinduktion notwendig ist. Dass der Transfer tolerogener Splenozyten in neue Rezipienten in dieser Arbeit die Toleranz gegen ein allogenes Hauttransplantat nicht fortführen konnte (Abb. 28), könnte also darin begründet sein, dass keine lokal im Transplantat vorhandenen Tregs zugegen waren. Diese Tatsache scheint zumindest in diesem stark immunogenen Transplantations-Modell von großer Bedeutung, da in der Literatur der serielle Transfer donorspezifischer Toleranz gegen Herztransplantate über tolerogene Splenozyten gezeigt werden konnte (Chen 1996). Ob die lokale und systemische Anwesenheit der Tregs sowohl in der Induktionsphase als auch im späteren Verlauf des Toleranzerhalts benötigt wird, bleibt dabei noch ungeklärt.

Lokale Toleranzinduktion

Tregs haben multiple Effektomechanismen der Regulation der adaptiven und angeborenen Immunantwort, welche entweder kontaktabhängig sind oder durch sezernierte Zytokine vermittelt werden (Tang und Bluestone 2008; Shevach 2009). Experimentelle Modelle *in vivo* haben gezeigt, dass die primäre, initiale Interaktionsstelle zwischen Tregs und naiven T-Zellen das drainierende lymphoide Gewebe ist und die Tregs später erst in das Transplantat wandern (Carvalho-Gaspar 2008). Eine Inflammation zum Zeitpunkt einer Transplantation veranlasst die Migration und Reifung von Donor-APC vom Transplantat in die drainierenden Lymphknoten (Larsen 1990). In Abwesenheit von Tregs werden dabei alloreaktive T-Zellen von Donor-APC gepriemt, wodurch der Abstoßungsprozess initiiert wird. In Anwesenheit von aktivierten Tregs, wird das T-Zell-Priming in den sekundären Lymphknoten verhindert (Carvalho-Gaspar, Jones et al. 2008). Daneben können Tregs auch lokal am Ort der Entzündung aktivierte Immunantworten modulieren. Tregs sind also eventuell in der Lage, zwischen drainierenden Lymphknoten und dem Transplantat hin und her zu wandern, um zunächst die potenzielle Alloantigen-Reaktivität zu verhindern und im Transplantat bereits aktivierte Zellen nachträglich zu kontrollieren. Zusammengefasst deuten Arbeiten mit Modellantigenen darauf hin, dass zur effektiven Kontrolle adaptiver Immunantworten, Tregs am Ort des Entzündungsgeschehens und in den drainierenden Lymphknoten notwendig sind (Huehn und Hamann 2005). In den Histologien der Hauttransplantate war eine starke Inflammation im allogenen Ansatz ohne Tole-

ranzinduktion erkennbar. Einige wenige Infiltrate waren aber auch im syngenen Ansatz zu finden, was wahrscheinlich an dem Wundheilungsprozess nach der Operation liegt. Obwohl die Haut im allogenen Versuch mit Zugabe von Tregs dauerhaft akzeptiert worden war, fanden sich in der Histologie auch hier einige Infiltrate (Abb. 29 C). Entgegen der wahrscheinlichen Annahme handelt es sich bei diesen Infiltraten aber nicht um Zeichen einer chronischen Abstoßung, sondern gegenteilig um eine starke Akkumulation von Tregs. Denn 50% aller CD4⁺ Zellen waren Foxp3 positiv. Die Tatsache, dass von allen Foxp3⁺ Zellen fast 80% auch Thy1.1 exprimierten bewies, dass viele der adoptiv transferierten allospezifischen Tregs speziell in das Transplantat gewandert sind, um dort die alloreaktiven Effektoren unter Kontrolle zu halten. Die allospezifischen Tregs dominieren also die lokale Treg-Nische. Von einer derart starken lokalen Akkumulation alloantigen-spezifischer Tregs ist bislang nicht berichtet worden.

Die funktionelle Bedeutung der Akkumulation alloantigen-spezifischer Tregs war zunächst unklar. Die Versuche dieser Arbeit zur Retransplantation tolerierter Transplantate, gefolgt von einer sofortigen Rekonstitution mit stark alloreaktiven Immunzellen zeigen, dass die durch transduzierte Tregs induzierte Toleranz mit dem transplantierten Organ transferierbar ist (Abb. 31). Die Toleranzinduktion durch akkumulierte Tregs im Transplantat unterstreicht die Bedeutung der lokalen Toleranzinduktion im Vergleich zu systemischen Toleranzmechanismen. Die Versuche stehen im Einklang mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe um H. Waldmann. Auch diese Gruppe konnte Allotoleranz mit Retransplantation des Transplantats übertragen (Graca 2002). Allerdings mussten dazu die Transplantate über 30 Tage vorher auf eine lymphopene Maus transplantiert werden, ehe diese immunrekonstituiert wurde. Somit ist hier nicht sicher eine lokale Kontrolle gegeben, da die transferierten Zellen über die homöostatische Expansion auch die lymphoiden Organe besiedelten, bevor ein alloreaktives Immunsystem gegeben war. Im Gegensatz dazu waren in den Versuchen dieser Arbeit mit sofortiger Immunrekonstitution keine Thy1.1 Tregs in sekundären lymphatischen Organen nachweisbar, was auf eine eher lokale Immunkontrolle schließen lässt. Zudem wurden in den Experimenten von Waldmann und Mitarbeitern nicht eine definierte Treg-Population, sondern tolerogene Splenozyten zur Toleranzinduktion gegeben, so dass die Mediatoren der Allotoleranz eher undurchsichtig blieben (Graca, Cobbold et al. 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten stark darauf hin, dass der Transfer der transduzierten Tregs für die Toleranzinduktion essentiell ist. Die Depletion von Tregs in Tieren, die ein stabiles Hauttransplantat haben, sollte demzufolge eine Abstoßung auslösen. Auch nach wiederholter Injektion des Antikörpers traten aber weder im lymphopenen noch immunkompetenten Modell Abstoßungsanzeichen der Haut ein, obwohl in der FACS-Analyse, im Gegensatz zu Kontrolltieren, die keinen Antikörper erhalten hatten, keine Tregs in der Milz und den Lymphknoten mehr zu finden waren. Auch 100 Tage nach Depletion konnten keine transduzierten Tregs in lymphoiden Organen detektiert werden, ohne dass währenddessen die Transplantate abgestoßen wurden. Dies verdeutlicht, dass die dauerhafte Präsenz in sekundären lymphatischen Organen für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz nicht notwendig ist, obwohl in der Literatur von der unbedingten Notwendigkeit toleranzinduzierender Tregs in den Lymphknoten berichtet wird (Ochando 2005). Es zeigte sich jedoch, dass auch durch wiederholte Gabe depletierenden Antikörpers eine komplette Depletion von transferierten Tregs im Transplantat nicht möglich war (Abb. 33). Es wäre somit möglich, dass die verbliebenen lokalen Tregs für die Aufrechterhaltung der Toleranz verantwortlich sind und die Anwesenheit von Tregs in den anderen Organen nur in der Induktionsphase erforderlich ist.

Alternativ könnten die Ergebnisse durch eine infektiöse Toleranz oder deletionale Toleranzmechanismen erklärt werden.

(1) Als infektiöse Toleranz wird die Induktion neuer alloantigen-spezifischer iTregs durch die initial transferierte Regulatorenpopulation verstanden. So konnte gezeigt werden, dass die supprimierenden Effekte von tolerogenen Splenozyten aus herz-transplantierten Tieren seriell transferiert werden konnten und hierbei eine infektiöse Toleranz involviert war (Chen, Cobbold et al. 1996). Die Rolle solcher *de novo* induzierter Tregs bei der Toleranzinduktion und -erhaltung wurde auch in TCR-transgenen Foxp3-Reporter-mäusen untersucht. Man konnte in lymphopenen Mäusen Toleranz gegen Hauttransplantate induzieren, die mit der Entwicklung von iTregs in der Peripherie assoziiert war (Kendal 2011). Unsere Versuche zeigen jedoch, dass iTregs auch durch polyspezifische Tregs induziert werden, ohne dass hierdurch eine Allotoleranz entsteht. Die iTregs entwickelten sich eher in Abhängigkeit von anwesenden transduzierten Tregs und nicht von Alloantigenen, da sie auch in hoher Anzahl in Kontrolltieren zu finden waren, die kein allogenes Transplantat erhalten hatten (Abb. 34). Obwohl sich die iTregs auch in Tieren entwickelten, die keine transduzierte Tregs erhalten hatten, konnten sie keine Allotoleranz gegen ein Hauttransplantat induzieren.

(2) Es wäre andererseits denkbar, dass die transferierten Tregs nur initial zur Toleranzinduktion benötigt werden und es im Anschluss zu einer deletionalen Toleranz alloreaktiver T-Zellen kommt. Ähnliche Wirkungsweisen von Tregs wurden bei der Induktion von Allotoleranz durch Induktion eines Treg-vermittelnden hämatopoetischen Spenderchimärismus beschrieben (Pilat, Baranyi et al. 2010). In unseren Versuchen führte der Transfer von Splenozyten von toleranten Mäusen in RAG1^{-/-}-Tiere jedoch zur Abstoßung von Donorgewebe. Dies spricht gegen eine deletionale Toleranz, da offensichtlich ausreichend allospezifische Effektorzellen in sekundären lymphatischen Organen vorhanden sind.

Da die Transplantate nicht abgestoßen wurden und eine infektiöse Toleranz und eine deletionale Toleranz ausgeschlossen werden konnten, könnte das bedeuten, dass die wenigen lokal verbliebenen alloantigen-spezifischen Tregs eine Abstoßung dauerhaft verhindern können und damit eher die dominante Toleranz wirksam ist.

Sicherheit in der Anwendung transduzierter Tregs

Wie oben beschrieben zeigten Foxp3 transduzierte Tregs eine hohe Stabilität, waren jedoch auf die stabile Expression vom transduzierten Gen abhängig, da der endogene *foxp3*-Locus keine epigenetischen Veränderungen zeigte. Dies stellt die Umsetzung in die Klinik in Frage, da theoretisch eine Insertionsmutagenese denkbar wäre. Diese war nach Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen gesehen worden und hatte zur Entwicklung von Leukämien geführt (Modlich 2005). In dieser Arbeit hingegen wurde in den Mausmodellen nie die Entwicklung von T-Zelllymphomen gesehen. Dies steht im Einklang mit klinischen Studien, in welchen HIV- oder Krebspatienten genetisch modifizierte T-Zellen erhalten hatten (Levine 2001). Auch in diesen Studien wurde niemals die Entstehung von Lymphomen beobachtet. Offensichtlich ist das transformationelle Potenzial von Gentherapie in differenzierten Zellen deutlich geringer. Selbst durch Transduktion mit milden Onkogenen war hier keine maligne Transformation möglich (Baum 2006; Modlich 2006).

Ausblick

In dieser Arbeit konnte in klinisch relevanten, immunogenen Modellen eindeutig gezeigt werden, dass der Transfer von spenderspezifischen Tregs für die erfolgreiche aber auch schonende Therapie von Abstoßungsreaktionen nach einer Transplantation von großer Bedeutung ist. Ferner wurden Protokolle entwickelt, mit denen eine Toleranzinduktion in nicht lymphopenen Empfängern nur durch einmaligen Transfer einer kleinen Anzahl von antigenspezifischen Tregs mit einer milden, zeitlich limitierten Immunsuppression möglich ist. Um die Entwicklung weiterer, klinisch noch relevanterer Protokolle voranzutreiben, könnten weitere Medikamente in dem hier beschriebenen Modell getestet werden. Darin eingeschlossen wären verschiedene Derivate des bereits zum Teil erprobten α CD3 ϵ (OKT3) Antikörpers, α CD25 (Basiliximab) und das murine ATG (Anti Thymozyten Globulin). Diese Antikörper finden gegenwärtig schon bei Transplantationen zur Toleranzinduktion bzw. Therapie steroidrefraktärer Abstoßungsperioden Verwendung.

Im Gegensatz zu SPF-Mäusen (*specific pathogen free*) existieren in Patienten schon vor der Transplantation donorreaktive T-Zellen (Nather 2006). Diese sind wahrscheinlich für schnellere Abstoßungsreaktionen verantwortlich, da sie bereits sensibilisiert sind. Es gibt Hinweise darauf, dass solche *memory* T-Zellen durch Tregs schwieriger zu kontrollieren sind als normale Effektoren (Le Moine 2009). Um dieser Problematik in dem hier beschriebenen immunkompetenten Transplantationsmodell nachzugehen, könnte man die Rezipienten vor der Transplantation und dem Treg-Transfer mit Donorantigen sensibilisieren.

In dieser Arbeit wurden bei der Toleranzinduktion nach Organtransplantation natürliche mit poly- und alloantigen-stimulierten transduzierten Tregs verglichen. In einem weiteren Schritt könnte man die Fähigkeiten autoantigen-spezifischer Tregs in der Induktion gewebespezifischer Toleranz bei der allogenen Transplantation testen. Dieser Ansatz hätte den klinischen Vorteil, dass solche Tregs schon während der Wartezeiten der Patienten auf das zu transplantierende Organ generiert werden könnten. Um sich der klinischen Relevanz noch weiter anzunähern könnten Tregs, die gegen ein endogenes Selbstantigen von Betazellen gerichtet sind, in der Inselzelltransplantation eingesetzt werden. Um der Limitierung durch MHC-Restriktion der Tregs entgegen zu können, ist es denkbar, die Spezifität von polyspezifischen nTregs durch Transduktion mit einem alloantigen-spezifischen chimären Antigenrezeptor (CAR) zu verändern (Bridgeman 2010).

Zusammengefasst konnte somit zum ersten Mal durch den alleinigen Transfer von Tregs aus dem peripheren Repertoire eine stabile Allotoleranz erzeugt werden. Da hierzu ein immunogenes Allotransplantationsmodell verwendet wurde, besitzen die Ergebnisse ein hohes translationales Potenzial. Die große Bedeutung der lokal akkumulierten Tregs suggeriert dazu, dass die Induktion einer gewebespezifischen Toleranz möglich ist, ohne die Immunkompetenz des Empfängers systemisch zu schwächen und ohne die Notwendigkeit zur dauerhaften Immunsuppression. Die Arbeiten definieren aber auch Kriterien für den erfolgreichen Einsatz von Tregs nach Organtransplantation: Die transferierten Tregs sollten alloantigen-spezifisch sein und eine hohe Stabilität des Treg-Phänotyps besitzen. Die Arbeiten geben somit konkrete Hinweise für die Entwicklung klinischer Studien.

Kapitel 5 Anhang

Literaturverzeichnis

- Adams, A. B., M. A. Williams, et al. (2003). "Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance." *J Clin Invest* **111**(12): 1887-95.
- Afzali, B., G. Lombardi, et al. (2007). "The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease." *Clin Exp Immunol* **148**(1): 32-46.
- Apostolou, I., A. Sarukhan, et al. (2002). "Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen." *Nat Immunol* **3**(8): 756-63.
- Asano, M., M. Toda, et al. (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." *J Exp Med* **184**(2): 387-96.
- Asseman, C., S. Mauze, et al. (1999). "An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation." *J Exp Med* **190**(7): 995-1004.
- Babich, F. R., A. L. Jacobson, et al. (1965). "Cross-species transfer of learning: effect of ribonucleic acid from hamsters on rat behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**(5): 1299-302.
- Baker, R. J., M. P. Hernandez-Fuentes, et al. (2001). "Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy." *J Immunol* **167**(12): 7199-206.
- Baker, R. J., M. P. Hernandez-Fuentes, et al. (2001). "Comparison of the direct and indirect pathways of allorecognition in chronic allograft failure." *Transplant Proc* **33**(1-2): 449.
- Baron, U., I. Turbachova, et al. (2006). "DNA methylation analysis as a tool for cell typing." *Epigenetics* **1**(1): 55-60.
- Basu, S., T. Golovina, et al. (2008). "Cutting edge: Foxp3-mediated induction of p120 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin." *J Immunol* **180**(9): 5794-8.
- Battaglia, M., A. Stabilini, et al. (2005). "Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells." *Blood* **105**(12): 4743-8.
- Baum, C., A. Schambach, et al. (2006). "Retrovirus vectors: toward the plentivirus?" *Mol Ther* **13**(6): 1050-63.
- Bendelac, A., O. Lantz, et al. (1995). "CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes." *Science* **268**(5212): 863-5.
- Bennett, C. L., J. Christie, et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* **27**(1): 20-1.
- Beres, A., R. Komorowski, et al. (2011). "Instability of Foxp3 expression limits the ability of induced regulatory T cells to mitigate graft versus host disease." *Clin Cancer Res* **17**(12): 3969-83.
- Bestard, O., J. M. Cruzado, et al. (2008). "Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts." *J Am Soc Nephrol* **19**(10): 2020-6.
- Bianchi, M. E. (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." *J Leukoc Biol* **81**(1): 1-5.
- Bickerstaff, A. A., J. J. Wang, et al. (2001). "Murine renal allografts: spontaneous acceptance is associated with regulated T cell-mediated immunity." *J Immunol* **167**(9): 4821-7.

- Billingham, R. E., L. Brent, et al. (1953). "Actively acquired tolerance of foreign cells." Nature **172**(4379): 603-6.
- Bluestone, J. A. (2011). "Mechanisms of tolerance." Immunol Rev **241**(1): 5-19.
- Bluestone, J. A. and A. K. Abbas (2003). "Natural versus adaptive regulatory T cells." Nat Rev Immunol **3**(3): 253-7.
- Bluestone, J. A., D. Bruce, et al. (1993). "Immunosuppressive effects of anti-CD3 MAb and soluble co-stimulatory molecules." Transplant Proc **25**(1 Pt 1): 546-7.
- Bolt, S., E. Routledge, et al. (1993). "The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties." Eur J Immunol **23**(2): 403-11.
- Borel, J. F., C. Feurer, et al. (1976). "Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent." Agents Actions **6**(4): 468-75.
- Bories, J. C., J. M. Cayuela, et al. (1991). "Expression of human recombination activating genes (RAG1 and RAG2) in neoplastic lymphoid cells: correlation with cell differentiation and antigen receptor expression." Blood **78**(8): 2053-61.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, et al. (2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." Blood **110**(4): 1225-32.
- Brown, M. G., J. Driscoll, et al. (1991). "Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes." Nature **353**(6342): 355-7.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Brunstein, C. G., J. S. Miller, et al. (2011). "Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics." Blood **117**(3): 1061-70.
- Brusko, T. M., A. L. Putnam, et al. (2008). "Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities." Immunol Rev **223**: 371-90.
- Bushell, A., P. J. Morris, et al. (1994). "Induction of operational tolerance by random blood transfusion combined with anti-CD4 antibody therapy. A protocol with significant clinical potential." Transplantation **58**(2): 133-9.
- Bushell, A., P. J. Morris, et al. (1995). "Transplantation tolerance induced by antigen pretreatment and depleting anti-CD4 antibody depends on CD4+ T cell regulation during the induction phase of the response." Eur J Immunol **25**(9): 2643-9.
- Carvalho-Gaspar, M., N. D. Jones, et al. (2008). "Location and time-dependent control of rejection by regulatory T cells culminates in a failure to generate memory T cells." J Immunol **180**(10): 6640-8.
- Chai, J. G., D. Coe, et al. (2008). "In vitro expansion improves in vivo regulation by CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **180**(2): 858-69.
- Chatenoud, L. (2003). "CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside." Nat Rev Immunol **3**(2): 123-32.
- Chatenoud, L., E. Thervet, et al. (1994). "Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 123-7.
- Chen, X., T. Murakami, et al. (2004). "Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death." Eur J Immunol **34**(3): 859-69.
- Chen, X., J. J. Oppenheim, et al. (2006). "Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)/CD4(+)/CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE." Eur J Immunol **36**(8): 2139-49.
- Chen, Z. K., S. P. Cobbold, et al. (1996). "Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance." Transplantation **62**(9): 1200-6.

- Chinen, T., P. Y. Volchkov, et al. (2010). "A critical role for regulatory T cell-mediated control of inflammation in the absence of commensal microbiota." *J Exp Med* **207**(11): 2323-30.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Clatworthy, M. R., P. J. Friend, et al. (2009). "Alemtuzumab (CAMPATH-1H) for the treatment of acute rejection in kidney transplant recipients: long-term follow-up." *Transplantation* **87**(7): 1092-5.
- Clipstone, N. A. and G. R. Crabtree (1992). "Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation." *Nature* **357**(6380): 695-7.
- Cobbold, S. P., R. Castejon, et al. (2004). "Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants." *J Immunol* **172**(10): 6003-10.
- Cobbold, S. P., G. Martin, et al. (1990). "The induction of skin graft tolerance in major histocompatibility complex-mismatched or primed recipients: primed T cells can be tolerized in the periphery with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies." *Eur J Immunol* **20**(12): 2747-55.
- Coenen, J. J., H. J. Koenen, et al. (2006). "Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells." *Blood* **107**(3): 1018-23.
- Coombes, J. L. and K. J. Maloy (2007). "Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells." *Semin Immunol* **19**(2): 116-26.
- Cosimi, A. B., R. C. Burton, et al. (1981). "Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody." *Transplantation* **32**(6): 535-9.
- Cumberbatch, M. and I. Kimber (1992). "Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration." *Immunology* **75**(2): 257-63.
- Curotto de Lafaille, M. A., N. Kutchukhidze, et al. (2008). "Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation." *Immunity* **29**(1): 114-26.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2009). "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" *Immunity* **30**(5): 626-35.
- de la Rosa, M., S. Rutz, et al. (2004). "Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function." *Eur J Immunol* **34**(9): 2480-8.
- Demirkiran, A., A. Kok, et al. (2006). "Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation." *Liver Transpl* **12**(2): 277-84.
- Di Ianni, M., F. Falzetti, et al. (2011). "Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation." *Blood* **117**(14): 3921-8.
- Di Ianni, M., F. Falzetti, et al. (2011). "Immunoselection and clinical use of T regulatory cells in HLA-haploidentical stem cell transplantation." *Best Pract Res Clin Haematol* **24**(3): 459-66.
- Durham, M. M., A. W. Bingaman, et al. (2000). "Cutting edge: administration of anti-CD40 ligand and donor bone marrow leads to hemopoietic chimerism and donor-specific tolerance without cytoreductive conditioning." *J Immunol* **165**(1): 1-4.
- Edinger, M. and P. Hoffmann (2011). "Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences." *Curr Opin Immunol* **23**(5): 679-84.
- Edinger, M., P. Hoffmann, et al. (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation." *Nat Med* **9**(9): 1144-50.
- Eroukhmanoff, L., C. Oderup, et al. (2009). "T-cell tolerance induced by repeated antigen stimulation: selective loss of Foxp3- conventional CD4 T cells and induction of CD4 T-cell anergy." *Eur J Immunol* **39**(4): 1078-87.

- Falk, K., O. Rotzschke, et al. (1990). "Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules." *Nature* **348**(6298): 248-51.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(12): 1206-12.
- Feng, X., S. Kajigaya, et al. (2008). "Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro." *Blood* **111**(7): 3675-83.
- Floess, S., J. Freyer, et al. (2007). "Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells." *PLoS Biol* **5**(2): e38.
- Fontenot, J. D., J. L. Dooley, et al. (2005). "Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny." *J Exp Med* **202**(7): 901-6.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-6.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, et al. (2005). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3." *Immunity* **22**(3): 329-41.
- Fowlkes, B. J., R. H. Schwartz, et al. (1988). "Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4+8+ precursor stage." *Nature* **334**(6183): 620-3.
- Francis, R. S., G. Feng, et al. (2011). "Induction of transplantation tolerance converts potential effector T cells into graft-protective regulatory T cells." *Eur J Immunol*.
- Francis, R. S., G. Feng, et al. (2011). "Induction of transplantation tolerance converts potential effector T cells into graft-protective regulatory T cells." *Eur J Immunol* **41**(3): 726-38.
- Fu, S., N. Zhang, et al. (2004). "TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors." *Am J Transplant* **4**(10): 1614-27.
- Fukui, J., M. Inaba, et al. (2007). "Prevention of graft-versus-host disease by intra-bone marrow injection of donor T cells." *Stem Cells* **25**(6): 1595-601.
- Galla, M., A. Schambach, et al. (2008). "Cellular restriction of retrovirus particle-mediated mRNA transfer." *J Virol* **82**(6): 3069-77.
- Gallucci, S. and P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." *Curr Opin Immunol* **13**(1): 114-9.
- Game, D. S., M. P. Hernandez-Fuentes, et al. (2005). "Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4+CD25+ cells in vitro." *Am J Transplant* **5**(3): 454-64.
- Garin, M. I., C. C. Chu, et al. (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." *Blood* **109**(5): 2058-65.
- Gavin, M. A., J. P. Rasmussen, et al. (2007). "Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation." *Nature* **445**(7129): 771-5.
- Gimmi, C. D., G. J. Freeman, et al. (1993). "Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14): 6586-90.
- Golshayan, D., S. Jiang, et al. (2007). "In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance." *Blood* **109**(2): 827-35.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, et al. (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." *J Immunol* **174**(4): 1783-6.
- Graca, L., S. P. Cobbold, et al. (2002). "Identification of regulatory T cells in tolerated allografts." *J Exp Med* **195**(12): 1641-6.
- Graca, L., K. Honey, et al. (2000). "Cutting edge: anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance." *J Immunol* **165**(9): 4783-6.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, et al. (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." *Immunity* **21**(4): 589-601.
- Gupta, S. (2008). "Immune homeostasis: regulatory T cells (Treg) and molecules." *J Clin Immunol* **28**(6): 617-8.

- Hadis, U., B. Wahl, et al. (2011). "Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria." *Immunity* **34**(2): 237-46.
- Haribhai, D., W. Lin, et al. (2007). "Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen." *J Immunol* **178**(5): 2961-72.
- Herold, K. C., S. E. Gitelman, et al. (2005). "A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes." *Diabetes* **54**(6): 1763-9.
- Herrera, O. B., D. Golshayan, et al. (2004). "A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells." *J Immunol* **173**(8): 4828-37.
- Hoffmann, P., J. Ermann, et al. (2002). "Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." *J Exp Med* **196**(3): 389-99.
- Hogquist, K. A., T. A. Baldwin, et al. (2005). "Central tolerance: learning self-control in the thymus." *Nat Rev Immunol* **5**(10): 772-82.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-61.
- Hornick, P. and R. Lechler (1997). "Direct and indirect pathways of alloantigen recognition: relevance to acute and chronic allograft rejection." *Nephrol Dial Transplant* **12**(9): 1806-10.
- Hornick, P. I., P. D. Mason, et al. (2000). "Significant frequencies of T cells with indirect anti-donor specificity in heart graft recipients with chronic rejection." *Circulation* **101**(20): 2405-10.
- Horwitz, D. A., S. G. Zheng, et al. (2008). "Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other." *Trends Immunol* **29**(9): 429-35.
- Howard, J. C. and D. B. Wilson (1974). "Specific positive selection of lymphocytes reactive to strong histocompatibility antigens." *J Exp Med* **140**(3): 660-72.
- Hsieh, C. S., Y. Liang, et al. (2004). "Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors." *Immunity* **21**(2): 267-77.
- Hsieh, C. S., Y. Zheng, et al. (2006). "An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires." *Nat Immunol* **7**(4): 401-10.
- Huehn, J. and A. Hamann (2005). "Homing to suppress: address codes for Treg migration." *Trends Immunol* **26**(12): 632-6.
- Huehn, J., J. K. Polansky, et al. (2009). "Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?" *Nat Rev Immunol* **9**(2): 83-9.
- Inaba, K., J. P. Metlay, et al. (1990). "Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ." *J Exp Med* **172**(2): 631-40.
- Issa, F. and K. J. Wood (2010). "CD4⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation." *Curr Opin Organ Transplant*.
- Itoh, M., T. Takahashi, et al. (1999). "Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance." *J Immunol* **162**(9): 5317-26.
- Jaeckel, E., H. von Boehmer, et al. (2005). "Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes." *Diabetes* **54**(2): 306-10.
- Jenkins, M. K., C. A. Chen, et al. (1990). "Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody." *J Immunol* **144**(1): 16-22.
- Jenkins, M. K., P. S. Taylor, et al. (1991). "CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells." *J Immunol* **147**(8): 2461-6.

- Jiang, S., D. Golshayan, et al. (2006). "In vitro expanded alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cell treatment for the induction of donor-specific transplantation tolerance." *Int Immunopharmacol* **6**(13-14): 1879-82.
- Jiang, S., J. Tsang, et al. (2006). "Adoptive cell therapy using in vitro generated human CD4+CD25+ regulatory t cells with indirect allospecificity to promote donor-specific transplantation tolerance." *Transplant Proc* **38**(10): 3199-201.
- Joffre, O., N. Gorsse, et al. (2004). "Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes." *Blood* **103**(11): 4216-21.
- Joffre, O., T. Santolaria, et al. (2008). "Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes." *Nat Med* **14**(1): 88-92.
- Jones, N. D. (2009). "Memory T cells: how might they disrupt the induction of tolerance?" *Transplantation* **87**(9 Suppl): S74-7.
- Jordan, M. S., A. Boesteanu, et al. (2001). "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide." *Nat Immunol* **2**(4): 301-6.
- Josefowicz, S. Z. and A. Rudensky (2009). "Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance." *Immunity* **30**(5): 616-25.
- Kamat, R. and C. S. Henney (1975). "Studies on T cell clonal expansion. I. Suppression of killer T cell production in vivo." *J Immunol* **115**(6): 1592-8.
- Karim, M., G. Feng, et al. (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**(12): 4871-7.
- Karim, M., C. I. Kingsley, et al. (2004). "Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process." *J Immunol* **172**(2): 923-8.
- Kawai, T., A. B. Cosimi, et al. (2008). "HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression." *N Engl J Med* **358**(4): 353-61.
- Kendal, A. R., Y. Chen, et al. (2011). "Sustained suppression by Foxp3+ regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance." *J Exp Med* **208**(10): 2043-53.
- Kim, J. M., J. P. Rasmussen, et al. (2007). "Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice." *Nat Immunol* **8**(2): 191-7.
- King, L. B., M. S. Vacchio, et al. (1994). "To be or not to be: mutually antagonistic death signals regulate thymocyte apoptosis." *Int Arch Allergy Immunol* **105**(4): 355-8.
- Kingsley, C. I., M. Karim, et al. (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses." *J Immunol* **168**(3): 1080-6.
- Kino, T., H. Hatanaka, et al. (1987). "FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics." *J Antibiot (Tokyo)* **40**(9): 1249-55.
- Kirberg, J., A. Baron, et al. (1994). "Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor." *J Exp Med* **180**(1): 25-34.
- Kirk, A. D., L. C. Burkly, et al. (1999). "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates." *Nat Med* **5**(6): 686-93.
- Koenecke, C., N. Czeloth, et al. (2009). "Alloantigen-specific de novo-induced Foxp3+ Treg revert in vivo and do not protect from experimental GVHD." *Eur J Immunol* **39**(11): 3091-6.
- Kohm, A. P., J. S. McMahon, et al. (2006). "Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells." *J Immunol* **176**(6): 3301-5.

- Komatsu, N., M. E. Mariotti-Ferrandiz, et al. (2009). "Heterogeneity of natural Foxp3⁺ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(6): 1903-8.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, et al. (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." *Nat Immunol* **6**(12): 1219-27.
- Kronin, V., D. Vremec, et al. (1997). "Are CD8⁺ dendritic cells (DC) veto cells? The role of CD8 on DC in DC development and in the regulation of CD4 and CD8 T cell responses." *Int Immunol* **9**(7): 1061-4.
- Lal, G., N. Zhang, et al. (2009). "Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation." *J Immunol* **182**(1): 259-73.
- Larsen, C. P., P. J. Morris, et al. (1990). "Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection." *J Exp Med* **171**(1): 307-14.
- Lechler, R. I. and J. R. Batchelor (1982). "Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells." *J Exp Med* **155**(1): 31-41.
- Lechler, R. I., M. Sykes, et al. (2005). "Organ transplantation--how much of the promise has been realized?" *Nat Med* **11**(6): 605-13.
- Lehmann, M., E. Graser, et al. (1997). "Anti-CD4 monoclonal antibody-induced allograft tolerance in rats despite persistence of donor-reactive T cells." *Transplantation* **64**(8): 1181-7.
- Lenschow, D. J., G. H. Su, et al. (1993). "Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23): 11054-8.
- Levine, A. M., D. T. Scadden, et al. (2001). "Hematologic Aspects of HIV/AIDS." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 463-78.
- Li, X. C., T. B. Strom, et al. (2001). "T cell death and transplantation tolerance." *Immunity* **14**(4): 407-16.
- Liang, B., C. Workman, et al. (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." *J Immunol* **180**(9): 5916-26.
- Lin, W., D. Haribhai, et al. (2007). "Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3." *Nat Immunol* **8**(4): 359-68.
- Liu, S., D. R. Breiter, et al. (2007). "Enhanced antitumor responses elicited by combinatorial protein transfer of chemotactic and costimulatory molecules." *J Immunol* **178**(5): 3301-6.
- Liu, W., A. L. Putnam, et al. (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells." *J Exp Med* **203**(7): 1701-11.
- Lopez, M., M. R. Clarkson, et al. (2006). "A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells." *J Am Soc Nephrol* **17**(10): 2844-53.
- Love, P. E., J. Lee, et al. (2000). "Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection." *J Immunol* **165**(6): 3080-7.
- Maier, C. C. and M. I. Greene (1998). "Biochemical features of anergic T cells." *Immunol Res* **17**(1-2): 133-40.
- Mantel, P. Y., N. Ouaked, et al. (2006). "Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells." *J Immunol* **176**(6): 3593-602.
- McHugh, R. S. and E. M. Shevach (2002). "Cutting edge: depletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease." *J Immunol* **168**(12): 5979-83.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." *Immunity* **16**(2): 311-23.

- Mellor, A. L., P. Chandler, et al. (2004). "Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase." *Int Immunol* **16**(10): 1391-401.
- Meloni, F., P. Vitulo, et al. (2004). "Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome." *Transplantation* **77**(5): 762-6.
- Min, W. P., D. Zhou, et al. (2003). "Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance." *J Immunol* **170**(3): 1304-12.
- Modlich, U., J. Bohne, et al. (2006). "Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity." *Blood* **108**(8): 2545-53.
- Modlich, U., O. S. Kustikova, et al. (2005). "Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis." *Blood* **105**(11): 4235-46.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, et al. (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." *Cell* **68**(5): 869-77.
- Mucida, D., N. Kutchukhidze, et al. (2005). "Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs." *J Clin Invest* **115**(7): 1923-33.
- Nadig, S. N., J. Wieckiewicz, et al. (2010). "In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells." *Nat Med* **16**(7): 809-13.
- Nagaeva, O., L. Jonsson, et al. (2002). "Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential." *Am J Reprod Immunol* **48**(1): 9-17.
- Najafian, N., T. Chitnis, et al. (2003). "Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model." *J Clin Invest* **112**(7): 1037-48.
- Nishimura, E., T. Sakihama, et al. (2004). "Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells." *Int Immunol* **16**(8): 1189-201.
- Nossal, G. J., C. M. Austin, et al. (1965). "Antigens in immunity. VII. Analysis of immunological memory." *Immunology* **9**(4): 333-48.
- Ochando, J. C., A. C. Yopp, et al. (2005). "Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells." *J Immunol* **174**(11): 6993-7005.
- Oettgen, H. F., E. A. Carswell, et al. (1980). "Endotoxin-induced tumor necrosis factor." *Recent Results Cancer Res* **75**: 207-12.
- Pacholczyk, R., H. Ignatowicz, et al. (2006). "Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells." *Immunity* **25**(2): 249-59.
- Pandiyani, P., L. Zheng, et al. (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." *Nat Immunol* **8**(12): 1353-62.
- Park, Y. H., S. K. Koo, et al. (2010). "Effect of in vitro expanded CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy combined with lymphodepletion in murine skin allotransplantation." *Clin Immunol* **135**(1): 43-54.
- Paust, S. and H. Cantor (2005). "Regulatory T cells and autoimmune disease." *Immunol Rev* **204**: 195-207.
- Pearl, J. P., J. Parris, et al. (2005). "Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion." *Am J Transplant* **5**(3): 465-74.
- Pilat, N., U. Baranyi, et al. (2010). "Treg-therapy allows mixed chimerism and transplantation tolerance without cytoreductive conditioning." *Am J Transplant* **10**(4): 751-62.
- Polansky, J. K. and J. Huehn (2007). "[To be or not to be a Treg: epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells]." *Z Rheumatol* **66**(5): 417-20.

- Polansky, J. K., K. Kretschmer, et al. (2008). "DNA methylation controls Foxp3 gene expression." *Eur J Immunol* **38**(6): 1654-63.
- Qin, S. X., M. Wise, et al. (1990). "Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies." *Eur J Immunol* **20**(12): 2737-45.
- Quintans, J. and I. Lefkovits (1974). "Clonal expansion of lipopolysaccharide-stimulated B lymphocytes." *J Immunol* **113**(4): 1373-6.
- Radoux, D., C. Kinet-Denoel, et al. (1985). "Retention of immune complexes by Fc receptors on mouse follicular dendritic cells." *Scand J Immunol* **21**(4): 345-53.
- Raff, M. C. (1971). "Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice." *Transplant Rev* **6**: 52-80.
- Reif, A. E. and J. M. Allen (1966). "Mouse thymic iso-antigens." *Nature* **209**(5022): 521-3.
- Ren, X., F. Ye, et al. (2007). "Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." *Cell Death Differ* **14**(12): 2076-84.
- Rock, F. L., G. Hardiman, et al. (1998). "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2): 588-93.
- Rogers, P. R., C. Dubey, et al. (2000). "Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen." *J Immunol* **164**(5): 2338-46.
- Roncarolo, M. G., S. Gregori, et al. (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." *Immunol Rev* **212**: 28-50.
- Ronchetti, S., O. Zollo, et al. (2004). "GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations." *Eur J Immunol* **34**(3): 613-22.
- Roosnek, E., S. Demotz, et al. (1988). "Kinetics of MHC-antigen complex formation on antigen-presenting cells." *J Immunol* **140**(12): 4079-82.
- Rotzschke, O., K. Falk, et al. (1990). "Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells." *Nature* **348**(6298): 252-4.
- Rubtsov, Y. P., R. E. Niec, et al. (2010). "Stability of the regulatory T cell lineage in vivo." *Science* **329**(5999): 1667-71.
- Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, et al. (2008). "Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces." *Immunity* **28**(4): 546-58.
- Rudensky, A. (2005). "Foxp3 and dominant tolerance." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1461): 1645-6.
- Safinia, N., B. Afzali, et al. (2010). "T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction." *Kidney Int* **78 Suppl 119**: S2-12.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
- Saitovitch, D., A. Bushell, et al. (1996). "Kinetics of induction of transplantation tolerance with a nondepleting anti-Cd4 monoclonal antibody and donor-specific transfusion before transplantation. A critical period of time is required for development of immunological unresponsiveness." *Transplantation* **61**(11): 1642-7.
- Sakaguchi, S., M. Ono, et al. (2006). "Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease." *Immunol Rev* **212**: 8-27.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (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**(3): 1151-64.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunol Rev* **182**: 18-32.
- Salama, A. D., N. Najafian, et al. (2003). "Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients." *J Am Soc Nephrol* **14**(6): 1643-51.

- Sallusto, F., M. Cella, et al. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* **182**(2): 389-400.
- Sallusto, F., E. Kremmer, et al. (1999). "Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells." *Eur J Immunol* **29**(6): 2037-45.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* **401**(6754): 708-12.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, et al. (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* **12**(4): 431-40.
- Sanchez-Fueyo, A., S. Sandner, et al. (2006). "Specificity of CD4+CD25+ regulatory T cell function in alloimmunity." *J Immunol* **176**(1): 329-34.
- Schambach, A., J. Bohne, et al. (2006). "Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression." *Gene Ther* **13**(7): 641-5.
- Schenk, A. D., T. Nozaki, et al. (2008). "Donor-reactive CD8 memory T cells infiltrate cardiac allografts within 24-h posttransplant in naive recipients." *Am J Transplant* **8**(8): 1652-61.
- Schmitt, F. O. (1965). "Molecular parameters in memory and learning." *Recent Adv Biol Psychiatry* **8**: 225-33.
- Schubert, L. A., E. Jeffery, et al. (2001). "Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation." *J Biol Chem* **276**(40): 37672-9.
- Schwartz, R. H. (1992). "Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy." *Cell* **71**(7): 1065-8.
- Shalev, I., H. Liu, et al. (2008). "Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis." *J Immunol* **180**(1): 249-60.
- Sharif, S., G. A. Arreaza, et al. (2002). "Regulatory natural killer T cells protect against spontaneous and recurrent type 1 diabetes." *Ann N Y Acad Sci* **958**: 77-88.
- Sharif, S., G. A. Arreaza, et al. (2002). "Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells." *J Mol Med* **80**(5): 290-300.
- Sharma, M. D., D. Y. Hou, et al. (2010). "Reprogrammed foxp3(+) regulatory T cells provide essential help to support cross-presentation and CD8(+) T cell priming in naive mice." *Immunity* **33**(6): 942-54.
- Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression." *Immunity* **30**(5): 636-45.
- Shevach, E. M., R. A. DiPaolo, et al. (2006). "The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells." *Immunol Rev* **212**: 60-73.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." *Nat Immunol* **3**(2): 135-42.
- Smyth, L. A., O. B. Herrera, et al. (2006). "A novel pathway of antigen presentation by dendritic and endothelial cells: Implications for allorecognition and infectious diseases." *Transplantation* **82**(1 Suppl): S15-8.
- Spitzer, T. R., F. Delmonico, et al. (1999). "Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism." *Transplantation* **68**(4): 480-4.
- Steger, U., C. I. Kingsley, et al. (2006). "CD25+CD4+ regulatory T cells develop in mice not only during spontaneous acceptance of liver allografts but also after acute allograft rejection." *Transplantation* **82**(9): 1202-9.

- Stephens, L. A., C. Mottet, et al. (2001). "Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro." *Eur J Immunol* **31**(4): 1247-54.
- Stockinger, B. (1999). "T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms." *Adv Immunol* **71**: 229-65.
- Stockis, J., D. Colau, et al. (2009). "Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg." *Eur J Immunol* **39**(12): 3315-22.
- Suchin, E. J., P. B. Langmuir, et al. (2001). "Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question." *J Immunol* **166**(2): 973-81.
- Sun, J. B., C. Czerkinsky, et al. (2007). "Sublingual 'oral tolerance' induction with antigen conjugated to cholera toxin B subunit generates regulatory T cells that induce apoptosis and depletion of effector T cells." *Scand J Immunol* **66**(2-3): 278-86.
- Surh, C. D., O. Boyman, et al. (2006). "Homeostasis of memory T cells." *Immunol Rev* **211**: 154-63.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, et al. (1998). "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." *J Immunol* **160**(3): 1212-8.
- Sykes, M., G. L. Szot, et al. (1997). "Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning." *Nat Med* **3**(7): 783-7.
- Tai, X., M. Cowan, et al. (2005). "CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2." *Nat Immunol* **6**(2): 152-62.
- Takahashi, T., T. Tagami, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." *J Exp Med* **192**(2): 303-10.
- Tang, Q. and J. A. Bluestone (2008). "The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation." *Nat Immunol* **9**(3): 239-44.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, et al. (2004). "In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes." *J Exp Med* **199**(11): 1455-65.
- Tarbell, K. V., S. Yamazaki, et al. (2006). "The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity." *Semin Immunol* **18**(2): 93-102.
- Taylor, P. A., C. J. Lees, et al. (2002). "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality." *Blood* **99**(10): 3493-9.
- Thornton, A. M., E. E. Donovan, et al. (2004). "Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function." *J Immunol* **172**(11): 6519-23.
- Thornton, A. M., P. E. Korty, et al. (2010). "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells." *J Immunol* **184**(7): 3433-41.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* **188**(2): 287-96.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." *J Immunol* **164**(1): 183-90.
- Tran, D. Q., J. Andersson, et al. (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**(32): 13445-50.
- Trenado, A., F. Charlotte, et al. (2003). "Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia." *J Clin Invest* **112**(11): 1688-96.

- Tsang, J. Y., Y. Tanriver, et al. (2009). "Indefinite mouse heart allograft survival in recipient treated with CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with indirect allospecificity and short term immunosuppression." *Transpl Immunol* **21**(4): 203-9.
- Tsang, J. Y., Y. Tanriver, et al. (2008). "Conferring indirect allospecificity on CD4+CD25+ Tregs by TCR gene transfer favors transplantation tolerance in mice." *J Clin Invest* **118**(11): 3619-28.
- Valujskikh, A., E. Fedoseyeva, et al. (2002). "Development of autoimmunity after skin graft rejection via an indirect alloresponse." *Transplantation* **73**(7): 1130-7.
- VanBuskirk, A. M., W. J. Burlingham, et al. (2000). "Human allograft acceptance is associated with immune regulation." *J Clin Invest* **106**(1): 145-55.
- von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." *Nat Immunol* **6**(4): 338-44.
- Vondran, F. W., K. Timrott, et al. (2010). "Association of high anti-donor alloreactivity and low frequency of FoxP3-expressing cells prior to kidney transplantation with acute graft rejection." *Clin Transplant*.
- Vu, M. D., M. R. Clarkson, et al. (2006). "Critical, but conditional, role of OX40 in memory T cell-mediated rejection." *J Immunol* **176**(3): 1394-401.
- Walker, L. S., A. Chodos, et al. (2003). "Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo." *J Exp Med* **198**(2): 249-58.
- Walunas, T. L. and J. A. Bluestone (1998). "CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo." *J Immunol* **160**(8): 3855-60.
- Wan, Y. Y. and R. A. Flavell (2007). "Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression." *Nature* **445**(7129): 766-70.
- Wang, C., S. Cordoba, et al. (2011). "Spontaneous acceptance of mouse kidney allografts is associated with increased Foxp3 expression and differences in the B and T cell compartments." *Transpl Immunol* **24**(3): 149-56.
- Warnecke, G., A. Bushell, et al. (2007). "Regulation of transplant arteriosclerosis by CD25+CD4+ T cells generated to alloantigen in vivo." *Transplantation* **83**(11): 1459-65.
- Warnecke, G., G. Feng, et al. (2007). "CD4+ regulatory T cells generated in vitro with IFN- γ and allogeneic APC inhibit transplant arteriosclerosis." *Am J Pathol* **177**(1): 464-72.
- Warrens, A. N., G. Lombardi, et al. (1994). "Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens." *Transpl Immunol* **2**(2): 103-7.
- Wekerle, T., J. Kurtz, et al. (2000). "Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment." *Nat Med* **6**(4): 464-9.
- Wells, A. D., X. C. Li, et al. (2001). "The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1409): 617-23.
- Wildin, R. S., S. Smyk-Pearson, et al. (2002). "Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome." *J Med Genet* **39**(8): 537-45.
- Williams, C. B., D. L. Engle, et al. (1999). "A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex." *J Exp Med* **189**(10): 1531-44.
- Williams, L. M. and A. Y. Rudensky (2007). "Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3." *Nat Immunol* **8**(3): 277-84.
- Wing, K., Y. Onishi, et al. (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." *Science* **322**(5899): 271-5.
- Yamagata, M., J. P. Merlie, et al. (1994). "Interspecific comparisons reveal conserved features of the Drosophila Toll protein." *Gene* **139**(2): 223-8.

- Yang, X. O., R. Nurieva, et al. (2008). "Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs." *Immunity* **29**(1): 44-56.
- Yoshizawa, A., A. Ito, et al. (2005). "The roles of CD25+CD4+ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation." *Transplant Proc* **37**(1): 37-9.
- Yu, S. F., T. von Ruden, et al. (1986). "Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10): 3194-8.
- Zeiser, R., D. B. Leveson-Gower, et al. (2008). "Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells." *Blood* **111**(1): 453-62.
- Zhang, Z. X., L. Yang, et al. (2000). "Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression." *Nat Med* **6**(7): 782-9.
- Zheng, S. G., J. Wang, et al. (2008). "Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6." *J Immunol* **180**(11): 7112-6.
- Zheng, S. G., J. H. Wang, et al. (2006). "TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells." *J Immunol* **176**(6): 3321-9.
- Zheng, Y., S. Josefowicz, et al. (2010). "Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate." *Nature* **463**(7282): 808-12.
- Zhou, X., S. L. Bailey-Bucktrout, et al. (2009). "Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo." *Nat Immunol* **10**(9): 1000-7.
- Zou, W. (2006). "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **6**(4): 295-307.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Entwicklung von effektorischen und regulatorischen T-Zellen.....	13
Abbildung 2:	Darstellung der Suppressi-onsmechanismen von Tregs.....	14
Abbildung 3:	Modell zur Darstellung der Unterschiede zwischen direkter, indirekter und semi-direkter Antigenenerkennung.....	17
Abbildung 4:	Allospezifische Aktivierung muriner CD4 ⁺ T-Zellen.....	53
Abbildung 5:	Anreicherung allospezifisch aktivierter BALB/c-CD4 ⁺ T-Zellen.....	55
Abbildung 6:	Vergleich indirekter mit direkter Alloantigenstimulation.....	57
Abbildung 7:	Schema zur Veranschaulichung der Unterschiede zwischen direkter, indirekter und kombinierter Alloantigen-Erkennung.....	57
Abbildung 8:	Grafische Darstellung der verwendeten Konstrukte RSF91 IRES-Thy1.1 und RSF91 Foxp3-IRES-Thy1.1.....	58
Abbildung 9:	Repräsentative Darstellung der Foxp3- und Thy1.1-Expression nach Transduktion mit retroviralen Vektoren in SC1-Zellen per FACS-Analyse.....	59
Abbildung 10:	Transduktionseffizienz muriner CD4 ⁺ T-Zellen.....	60
Abbildung 11:	Expansion transduzierter T-Zellen.....	61
Abbildung 12:	Phänotyp und Stabilität der Tregs.....	62
Abbildung 13:	Tregs inhibieren signifikant eine MLR.....	62
Abbildung 14:	Lymphopenes Hauttransplantationsmodell.....	64
Abbildung 15:	Tregs mit indirekter Antigen-spezifität sind effektiver als polyspezifische Tregs.....	64
Abbildung 16:	Tregs alleine können die allogene Transplantatabstoßung im immunkompetenten Modell nicht verzögern.....	65
Abbildung 17:	T-Zell-Depletion mit α Thy1.2-Ab <i>in vivo</i>	66
Abbildung 18:	T-Zell-Depletion mit α Thy1.2 -Ab im Zeitverlauf.....	66
Abbildung 19:	α Thy1.2 und Rapamycin verlängern allogene.....	67
Abbildung 20:	Wirkung des anti-CD3 F(ab') ₂ -Antikörpers auf die T-Zellzahl in der Milz <i>in vivo</i>	68
Abbildung 21:	α CD3 F(ab') ₂ verlängert allogenes Transplantatüberleben.....	69
Abbildung 22:	Wirkung des α CD25-Antikörpers (PC61) auf die T-Zellzahl in der Milz <i>in vivo</i>	70
Abbildung 23:	α CD25 verlängert allogenes Transplantatüberleben.....	71
Abbildung 24:	Prolongation des Transplantatüberlebens im immunkompetenten Mausmodell durch transduzierte Tregs.....	72
Abbildung 25:	Langzeit-Überleben allospezifischer Tregs <i>in vivo</i>	73
Abbildung 26:	Drittspender-Transplantate werden von langzeit-toleranten Tieren abgestoßen.....	73
Abbildung 27:	Die Treg-vermittelte Allotoleranz ist systemisch.....	75
Abbildung 28:	Der Transfer tolerogener Splenozyten kann die Allotoleranz nicht erhalten.....	76
Abbildung 29:	H&E-Färbung transplantiertes Haut mit und ohne Tregs.....	77
Abbildung 30:	Akkumulation antigen-spezifischer Tregs im Transplantat.....	78
Abbildung 31:	Tolerogene haut wird nach Retransplantation in neuen Rezipienten akzeptiert.....	79
Abbildung 32:	Vollständige <i>In vivo</i> -Depletion mit anti-Thy1.1-Antikörper.....	79
Abbildung 33:	Der depletierende α Thy1.1-Antikörper induzierte keine Transplantatabstoßung, obwohl die adoptiv transferierten Tregs eliminiert waren.....	81
Abbildung 34:	<i>De novo</i> iTreg-Induktion <i>in vivo</i>	83
Abbildung 35:	<i>De novo</i> iTreg-Induktion <i>in vitro</i>	84
Abbildung 36:	<i>De novo</i> induzierte Tregs zeigen eine vollständig methylierte TSDR.....	85
Abbildung 37:	<i>De novo</i> induzierte Tregs können keine Transplantatabstoßung verhindern.....	86

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µCi	Mikrocurie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
³H-T	³ H-Thymidin
Ab	<i>Antibody</i>
AF	Alexa Fluor
Ak	Antikörper
allo	allospezifisch
aLN	<i>Axillary lymphnode</i> = Axialer Lymphknoten
Amp	Ampicillin
APC	<i>Antigen presenting cell</i> = Antigen präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
B6	C57BL/6
Bio	Biotin
BM	<i>Bonemarrow</i> = Knochenmark
bp	<i>basepairs</i> = Basenpaare
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CaCl₂	Calciumchlorid
CCR7	Chemokine Rezeptor 7
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Copy deoxyribonucleic acid</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvants</i>
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
cm	Centimeter
Con A	Concanavalin A
d	<i>day</i> = Tag
DAPI	Diamidinphenylindol
DC	<i>Dendritic cell</i> = Dendritische Zelle
DDAO	Dimethyldodecylaminoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN T Zelle	<i>Double negative T Cell</i> = doppelt negative T Zelle
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
f	<i>Forward</i> = Vorwärts
F1	Filialgeneration 1
FACS	<i>Fluorescence associated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>

FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GARP	<i>Glycoprotein A repetitions predominant</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor</i>
Gy	Gray
h	Stunde
H&E	Hämalaun und Eosin
H₂O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HEK (293T)	<i>Human embryonic kidney</i> = humane embryonische Nieren
HEPES	Hydroxyethyl piperazinyl ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HST	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IC	<i>Intracellular</i> = intrazellulär
IFN-γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iLN	Inguinaler Lymphknoten
IPEX	<i>Dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i> = interne ribosomale Eingangsstelle
iTreg	Induzierte regulatorische T Zelle
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KHCO₃	<i>Potassiumhydrogencarbonat</i> = Kaliumhydrogencarbonat
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LN	<i>Lymphnodes</i> = Lymphknoten
Lsg.	Lösung
LV	Lentivirus
MACS	<i>Magnetic associated cell sorting</i>
mg	milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> = Haupt Histokompatibilitätskomplex
min	Minuten
Mio	Millionen
mL	Milliliter
mLN	Mesenterischer Lymphknoten
MLR	<i>Mixed lymphocyte reaction</i> = gemischte Lymphozyten Reaktion
mlv	<i>Murine leukemia virus</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
Na₂HPO₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN₃	NatriumAzid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm

NH₄Cl	Ammoniumchlorid
NH₄Cl₂	Ammoniumchlorid
NK Zelle	<i>Natural Killer</i> = Natürliche Killer Zelle
nTreg	Natürliche regulatorische T Zelle
OD	Optische Dichte
P	<i>Pellet</i> = Zellabsatz nach Zentrifugation
PB	<i>Pacific blue</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> = Polymerase Ketten Reaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PerCp	Peridinin chlorophyll protein
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
poly	polyspezifisch
PS	Protaminsulfat
R	<i>Responder</i>
r	<i>Reverse</i> = Rückwärts
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
Rapa	Rapamycin (Sirolimus)
RBC	<i>Red blood cell</i> = rotes Blutkörperchen
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RV	Retrovirus
S	Stimulator
SA	Streptavidin
SI	Stimulationsindex
SN	<i>Supernatant</i> = Überstand
Sp	<i>Spleen</i> = Milz
SSC	<i>Sideward scatter</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
syn	syngen
TBS-T	<i>Tris buffered saline-Tween</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> = T Zell Rezeptor
TE	Tris/EDTA-Puffer
T_{eff}	Effektorische T Zelle
TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
Th	T Helfer Zelle
T_m	<i>Memory</i> T Zelle
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
T_{reg}	Regulatorische T Zelle
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TSDR	<i>Treg specific demethylated region</i>
Tx	Transplantation
U	<i>Units</i>
üN	Über Nacht
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser (Demineralisiert)
α	anti

Lebenslauf

Name: Nadja Seltrecht geb. Saal
 Geboren: 07.02.1981 in Wilhelmshaven
 Adresse: Sonnenweg 18
 30171 Hannover
 Familienstand: verheiratet
 Nationalität: Deutsch

Schulbildung

1987-1990 Grundschole Wiesenhof in Wilhelmshaven
 1990-1991 Grundschole St. Joseph in Bonn-Beuel
 1991-1993 Kardinal-Frings-Gymnasium in Bonn-Beuel
 1993-1998 Deutsche Schule Washington in Washington D.C.
 1998-2000 Wolfgang-Borchert-Gymnasium in Halstenbek (Abitur)

Studium

Okt 2000- April 2006 Biologie (Diplom) an der Universität Osnabrück

Diplomarbeit

Aug 2005-April 2006 Universität Osnabrück, SFB Nachwuchsgruppe Zellbiologie, Dr. Anja Lorberg
 „Die Rolle von GAP1 in der Modellhefe *Shizosaccharomyces pombe*“

Promotion

Juli 2006-Juli 2007 Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie an der Medizinischen Hochschule Hannover, Prof. Dr. Karl Lenhard Rudolph
 „Die Rolle von TIN2 und TRF2 bei der Alterung“

Juli 2007-heute Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie an der Medizinischen Hochschule Hannover, Dr. Elmar Jäckel
 „Alloantigen-spezifische regulatorische T-Zellen in der Organtransplantation“

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache)
 Englisch (Fließend)
 Französisch (Gut)
 Italienisch (Basis)

Qualifikationen

Fortbildungslehrgang Gene-Technology, Biosafety and Biosecurity, MHH
 September 2009

Danksagung

Allerbester Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Elmar Jäckel dafür, dass er mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen, mir ein spannendes sowie durchdachtes Thema anvertraut hat, als auch für seine freundliche und sachkundige Beratung und Betreuung.

Außerdem möchte ich mich aufrichtig bedanken bei Dr. Matthias Hardtke-Wolenski und Dr. Fatih Noyan für kompetente Unterstützung, gute Ratschläge und stetige Hilfsbereitschaft.

Meinen Kollegen, die auch Freunde geworden sind, bin ich dankbar für die tolle Zusammenarbeit in jeglicher Hinsicht.

Bei der AG Baum, insbesondere bei Melanie Galla möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir bei der sich oft schwierig gestaltenden Virus-Produktion behilflich sein konnte.

Danken möchte ich auch meinen Freunden, die mir immer wieder zeigen, was eine gute Freundschaft ausmacht.

Spezieller Dank gilt meiner Familie, die mir jegliche Sicherheit und Wärme bietet.

Meinem Ehemann Lars Seltrecht danke ich ganz besonders, dass es ihn gibt, er mir immer zur Seite steht und weil er ein ganz besonderer Mensch ist.