

# Identifikation neuer Oberflächenmarker humaner regulatorischer T-Zellen

---

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Steinhauser, Jakob Sebastian

aus Lindau am Bodensee

Gießen 2024

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Institut für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie

Gutachter: Prof. Dr. Hackstein, Holger

Gutachter: Prof. Dr. Berghoff, Martin

Tag der Disputation: 23.09.2025

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Regulation als wesentlicher Faktor für das menschliche Immunsystem.....	1
1.1.1	Überblick über das menschliche Immunsystem, Grundbegriffe.....	1
1.1.2	Das angeborene Immunsystem.....	2
1.1.3	Das erworbene Immunsystem.....	2
1.1.4	Zusammenspiel angeborener und erworbener Immunität.....	3
1.1.5	Prinzipien der Toleranz.....	4
1.2	Geschichte und Bedeutung regulatorischer T-Lymphozyten ( $T_{reg}$ ).....	5
1.3	T-Lymphozyten.....	6
1.3.1	Entstehung.....	6
1.3.2	Einteilung und Funktion.....	7
1.3.3	T-Helferzellen.....	9
1.4	Entstehung, Charakteristika und Funktion regulatorischer T-Zellen.....	10
1.4.1	Entstehung, Heterogenität und Plastizität regulatorischer T-Lymphozyten.....	11
1.4.2	Definition über Oberflächenmoleküle.....	13
1.4.3	Definition über intrazelluläre Moleküle – Genetische und epigenetische Faktoren.....	18
1.4.4	Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen.....	21
1.4.5	Einfluss metabolischer Faktoren auf Entstehung, Stabilität und Funktion regulatorischer T-Lymphozyten.....	24
1.4.6	Die Rolle regulatorischer T-Zellen in physiologischer und pathologischer Immunität.....	28
1.5	Ansatzpunkte für neue Therapien auf Grundlage der $T_{reg}$ -Biologie.....	31
1.5.1	Adoptive Zelltherapie oder Expansionsinduktion regulatorischer T-Zellen zur Verstärkung ihrer suppressiven Funktion.....	33
1.5.2	Depletion oder Hemmung regulatorischer T-Lymphozyten zur Stärkung antitumoröser oder antiinfektiöser Immunität.....	35

1.6	Fragestellung .....	36
2	Material und Methoden.....	37
2.1	Herkunft der Proben .....	40
2.2	Isolierung von PBMC aus <i>Buffy Coats</i> mittels Dichtegradienten-Zentrifugation.....	40
2.3	Anreicherung von CD4 <sup>+</sup> Zellen mittels magnetischer Negativselektion.....	42
2.4	Durchflusszytometrie.....	42
2.4.1	Multiparameteranalyse und Kompensation.....	46
2.4.2	Fluorescence activated cell sorting (FACS).....	48
2.5	Färbung von Oberflächenmolekülen und Multiparameterscreening .....	49
2.6	Intrazellulärfärbung .....	51
2.7	Suppressionsassay .....	51
2.8	Zytokinanalyse.....	56
2.9	Statistik .....	57
3	Ergebnisse .....	58
3.1	Vergleich des Oberflächenphänotyps CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> mit Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 .....	58
3.2	Differentielle Expression von 10 Oberflächenmolekülen auf T <sub>reg</sub> im Vergleich zu CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> .....	59
3.3	Validierung der identifizierten Marker über Intrazellulärfärbung mit FoxP3 .....	62
3.4	Neu definierte T <sub>reg</sub> - Populationen supprimieren die Expansion von PBMC im CFSE-basierten in vitro Proliferationsassay .....	67
3.5	Zytokinanalyse der Überstände aus Suppressionsassays.....	69
4	Diskussion.....	71
4.1	Methodendiskussion .....	71
4.2	Ergebnisdiskussion .....	72
4.3	Neue Negativmarker.....	74
4.3.1	CD197 .....	74
4.3.2	CD200R.....	76

4.3.3	BTLA (CD272) .....	77
4.4	Ausblick, weiterer Forschungsbedarf .....	79
5	Zusammenfassung .....	81
6	Abstract .....	82
7	Abkürzungsverzeichnis .....	83
8	Abbildungsverzeichnis .....	90
9	Tabellenverzeichnis .....	92
10	Literatur .....	93
11	Anhang .....	117
11.1	Übersicht über Inhalt und Anordnung des Biolegend LegendSCREEN .....	117
11.2	Vollständige Ergebnisse des Oberflächenscreenings .....	126
12	Publikationsverzeichnis .....	130
13	Ehrenwörtliche Erklärung .....	131
14	Danksagung .....	132

# 1 Einleitung

Regulatorische T-Lymphozyten ( $T_{reg}$ ) spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts des Abwehrsystems (Immunhomöostase) zwischen dem Angriff auf fremde und der Toleranz körpereigener Strukturen. Dies macht sie zu aussichtsreichen Kandidaten für die Erforschung von Immun-, Infektions- und Tumorerkrankungen sowie die Entwicklung neuer Therapieansätze. Unter den vielen Herausforderungen innerhalb dieses Forschungsfeldes stellt die zuverlässige Charakterisierung der  $T_{reg}$  anhand von Oberflächenmolekülen eine grundlegende Voraussetzung dar, zu welcher diese Arbeit einen Beitrag leisten soll.

## 1.1 Regulation als wesentlicher Faktor für das menschliche Immunsystem

Innerhalb des Immunsystems müssen sich die grundverschiedenen Prinzipien der Zerstörung potenziell schädlicher Faktoren einerseits und der Verschonung körpereigener Strukturen und physiologischer Vorgänge andererseits gegenseitig die Waage halten. Dieses Gleichgewicht ist an bestimmten Grenzflächen besonders empfindlich, wie etwa im Magen-Darmtrakt, wo ständige Austauschprozesse mit körperfremden Substanzen und Organismen stattfinden [172]. Nicht nur die Aufnahme von Nährstoffen muss hier gewährleistet werden, sondern auch die Auseinandersetzung mit einer Vielzahl kommensaler Bakterien, welche ihrerseits für den menschlichen Gesamtorganismus unersetzliche Aufgaben übernehmen. Dieses Miteinander und Nebeneinander fremder Gewebe stellt eine besondere Herausforderung für das Immunsystem dar und wird nicht zuletzt als ein entscheidender Faktor in der Entstehung verschiedener Krankheitsbilder diskutiert. Ein hemmungsloser Angriff gegen alle fremden Mikroorganismen würde ebenso eine Gefährdung der Gesundheit darstellen wie ein Unterlassen jeglicher Abwehr. Daher haben sich verschiedene Mechanismen entwickelt, welche dieses Gleichgewicht regulieren [230].

### 1.1.1 Überblick über das menschliche Immunsystem, Grundbegriffe

Das Immunsystem ist ein komplexes Gefüge von Organen, Geweben, Zellen und Molekülen, welches im Zusammenwirken der Abwehr von schädigenden biologischen Einflüssen dient. Zu diesem Zweck muss es mehrere Grundbedingungen erfüllen;

1. Es muss überall dort vorhanden sein, wo der Körper mit fremden Strukturen in Kontakt tritt, beispielsweise in der Haut und in den Schleimhäuten des Atmungs- und Verdauungstraktes;
2. Es muss zwischen körpereigenen und fremden Bestandteilen unterscheiden können;
3. Es muss in der Lage sein, Informationen über den ganzen Körper verteilt zu übermitteln, zu vervielfachen und zu speichern;
4. Es benötigt vielfältige Mechanismen, um verschiedenste Gefahren für den Körper zu bekämpfen und
5. muss es ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Angriff und Toleranz aufrechterhalten.

Das Immunsystem kann in zwei Anteilen betrachtet werden, die sich durch einige Eigenschaften unterscheiden, sich ergänzen und zur Erfüllung der oben genannten Bedingungen zusammenarbeiten. Beide Teile verfügen über zelluläre (weiße Blutkörperchen – Leukozyten) und humorale (lösliche Botenstoffe) Wirkungsträger [152].

### **1.1.2 Das angeborene Immunsystem**

Als angeborenes Immunsystem wird eine Reihe physikalischer und chemischer Barrieren wie etwa die Haut oder die Magensäure, sowie Zellen und Moleküle bezeichnet, welche ein genetisch bestimmtes Repertoire an Erkennungs- und Reaktionsmechanismen aufweisen [126]. Die Makrophagen, Granulozyten, sowie Natürliche Killer- (NK-) Zellen, die hierzu gerechnet werden, können beispielsweise durch membrangebundene Rezeptoren typische Muster pathogener Bakterien (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) erkennen und Erreger durch Phagozytose (Umschlingung, Einverleibung und enzymatischer Abbau) eliminieren [172]. Mithilfe des Komplementsystems als humoralem Anteil wird eine klassische Entzündungsreaktion ausgelöst, die durch Temperaturerhöhung, Verlangsamung des Blutflusses und Heranlockung (Chemotaxis) weiterer Abwehrzellen eine Ausbreitung der Infektion verhindert und den Erreger ausschaltet [230].

### **1.1.3 Das erworbene Immunsystem**

Das erworbene Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, dass es sich erst nach der Geburt entwickelt und durch die Kombination variabler Genabschnitte über eine immense Anzahl hochspezifischer Rezeptoren verfügt. Diese Vielfalt entsteht in einem aufwendig kontrollierten Prozess, der sicherstellen soll, dass die neu gebildeten einzigartigen

Erkennungsmoleküle nicht gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind, da es sonst zu Autoimmunerkrankungen kommen kann [172]. Seine zellulären Bestandteile sind die T- (im Thymus heranreifenden) und B- (im Knochenmark (von engl. *bone marrow*) gebildeten) Lymphozyten. Eine wichtige Funktion ist die Bildung löslicher Immunglobuline (Antikörper), die jeweils ein ganz bestimmtes, als krankheitsauslösend erkanntes molekulares Muster (Antigen; Epitop) erkennen und eine hochspezifische Reaktion ermöglichen, die auch in großen zeitlichen Abständen erneut eingeleitet werden kann [152]. Dieses immunologische Gedächtnis ist auch die Grundvoraussetzung für Impfungen.

#### **1.1.4 Zusammenspiel angeborener und erworbener Immunität**

Zwischen angeborener und erworbener Immunität gibt es vielfältige Schnittstellen und überlappende Funktionen, welche die erfolgreiche Erregerabwehr durch sich verstärkende, synergistische Mechanismen zum Ziel haben. Auf zellulärer Ebene haben in diesem Zusammenhang die Dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC) eine herausragende Bedeutung. Sie werden formal zum angeborenen Immunsystem gerechnet, haben als professionelle Antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cells*, APC) aber vermittelnde Aufgaben in der Zusammenarbeit mit Lymphozyten [230]. DC finden sich sowohl im Blut als auch in lymphatischen und nichtlymphatischen Geweben. Je nach Lokalisation verfügen sie über stark spezialisierte Morphologie und Funktion – in der Haut etwa in Gestalt der Langerhanszellen [230]. Bei einem Kontakt mit potentiell pathogenen Antigenen sind DC in der Lage, diese intrazellulär aufzubereiten und mittels Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC, beim Menschen auch als *human leucocyte antigen*, HLA bezeichnet) den Lymphozyten zu präsentieren, sowie in Abhängigkeit des Kontaktes ein Mikromilieu zu erzeugen, welches eine Antwort des erworbenen Immunsystems aktiviert, moduliert oder inhibiert, sowie die Art einer spezifischen Reaktion zu beeinflussen [126].

Im humoralen Kompartiment des Immunsystems bestehen etliche Mechanismen, die sowohl angeborene als auch erworbene Abwehrreaktionen beeinflussen. Das Komplementsystem beschreibt ähnlich wie die Gerinnungskaskade das Zusammenspiel von Plasmaproteinen, welche durch limitierte Proteolyse aktiviert werden und dadurch selbst als Proteasenenzyme andere Vorstufen von Wirkungsträgern umsetzen. Ergebnisse dieses Prozesses sind neben einem direkt erregertötenden Membran-Angriffskomplex (*membrane attack complex*, MAC) die Heranlockung von Leukozyten (Chemotaxis durch sog.

Chemokine) und die Markierung der pathogenen Zielstruktur für phagozytierende Zellen (Opsonisierung durch sog. Opsonine) [126]. Anstoß der Komplementaktivierung können molekulare Erregerbestandteile oder Antikörper-Antigen-Komplexe sein, welche auf die Wirkung von B-Lymphozyten zurückgehen. Werden diese aktiviert, entwickeln sie sich zu Plasmazellen, die verschiedene Arten von Antikörpern produzieren können, welche sich hochspezifisch gegen das Muster richten, das die B-Zelle erkannt hat [152]. Darüber hinaus produzieren aktivierte Zellen beider Bestandteile lösliche Moleküle, die auf verschiedene Weise andere Zellen beeinflussen. Sie werden als Gewebshormone oder Entzündungsmediatoren bezeichnet und bilden ein Mikromilieu, welches je nach der dominanten Komponente das komplexe Wechselspiel der Immunzellen in eine bestimmte Richtung lenken kann. Diese heterogene Gruppe der Zytokine besteht aus Interleukinen, Interferonen, koloniestimulierenden Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokinen [172].

Zur Beschreibung von (Immun)zellen mittels einer einheitlichen Terminologie wird die CD-Nomenklatur (*cluster of differentiation*) eingesetzt, anhand derer Oberflächenmoleküle systematisch fortlaufend benannt werden.

### **1.1.5 Prinzipien der Toleranz**

Für ein funktionierendes Immunsystem ist es enorm wichtig, ein Gleichgewicht zwischen Angriff und Nichtangriff auf Strukturen aufrechtzuerhalten. Insbesondere sollen molekulare Muster des eigenen Organismus verschont werden. Aber auch die physiologische Reaktion auf krankheitsauslösende Trigger muss in Grenzen gehalten werden, damit das eigene Gewebe nicht in Mitleidenschaft gezogen wird. Für diese lebenswichtige Toleranz spielen drei Mechanismen eine wichtige Rolle:

1. Negative Selektion selbstreaktiver Zellen durch induzierten Zelltod (Zentrale Toleranz)
2. Inaktivierung / induzierte Anergie (Periphere Toleranz)
3. Suppression (Periphere Toleranz)

Als zentrale Toleranz werden hierbei Mechanismen bezeichnet, welche bei der Reifung der Abwehrzellen in primären lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus) eine fehl gerichtete Aktivität des Immunsystems gegen den eigenen Organismus verhindern; periphere Toleranz beschreibt Vorgänge in den sekundären lymphatischen Organen und

Gewebe (Lymphknoten, Milz, Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe etc.), durch welche proinflammatorische Effektorzellen und –moleküle eingeschränkt werden [230]. Von entscheidender Bedeutung für das immunologische Gleichgewicht ist die Suppression der Abwehrreaktion durch eine kleine Untergruppe der T-Zellen, die sogenannten regulatorischen T-Lymphozyten ( $T_{reg}$ ) [172].

## 1.2 Geschichte und Bedeutung regulatorischer T-Lymphozyten ( $T_{reg}$ )

Seit ihrer (Wieder)entdeckung Ende des 20. Jahrhunderts sind die regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen [196]. Große Hoffnungen richten sich auf diese kleine Population, was das Verständnis von immunologischen Prozessen gegen infektiöse Erreger und Tumoren, sowie Autoimmunerkrankungen angeht. Möglichkeiten für bahnbrechende Anwendungen als Zelltherapie oder antikörpervermittelte immunmodulatorische Interventionen werden diskutiert [214, 218].

Bereits in den 1970er Jahren stand die Theorie im Raum, dass eine Gruppe von T-Lymphozyten entscheidend an der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz beteiligt ist [91]. Diesen „Suppressor-T-Zellen“ wurden bereits ähnliche Eigenschaften zugeschrieben, wie sie momentan auch im Zusammenhang mit der  $T_{reg}$ -Biologie diskutiert werden. Da zentrale Hypothesen nicht bestätigt werden konnten, wandte sich die Forschungsgemeinde zunächst wieder von dem Konzept ab [96, 235, 125].

Das Wiederaufleben der  $T_{reg}$ -Forschung mit einem großen Boom um die Jahrtausendwende herum verdankt sich mehreren parallelen Entwicklungen. Zum Einen identifizierte eine Forschergruppe in Japan um Shimon Sakaguchi eine Population muriner T-Zellen, die suppressive Eigenschaften aufwies [219, 216, 246]. Zum Anderen gelang es im Rahmen der intensiven Bemühungen um die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, eine monogenetische Autoimmunerkrankung auf den Ausfall eines zellulären Regulationsmechanismus zurückzuführen [23, 49, 196]. Zusammengenommen konnte durch diese wissenschaftlichen Durchbrüche die regulatorische T-Zelle definiert werden, die sich durch charakteristische extra- und intrazelluläre Moleküle näherungsweise beschreiben lässt und in der Lage ist, eine überschießende oder fehl gerichtete Immunreaktion zu hemmen.

### 1.3 T-Lymphozyten

Um die herausragende Rolle und die Besonderheiten der regulatorischen T-Lymphozyten besser verstehen und einordnen zu können, wird zunächst ihre Geschwisterreihe der „konventionellen“ T-Zellen, insbesondere der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen beschrieben.

#### 1.3.1 Entstehung

T-Lymphozyten sind Abkömmlinge von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die ihre wesentlichen Entwicklungsschritte allerdings im Thymus durchlaufen. Dies unterscheidet sie grundsätzlich von den anderen Zellen der lymphoiden Reihe; den B-Zellen und den natürlichen Killerzellen (NK), welche im Knochenmark heranreifen (Abb. 1.1).

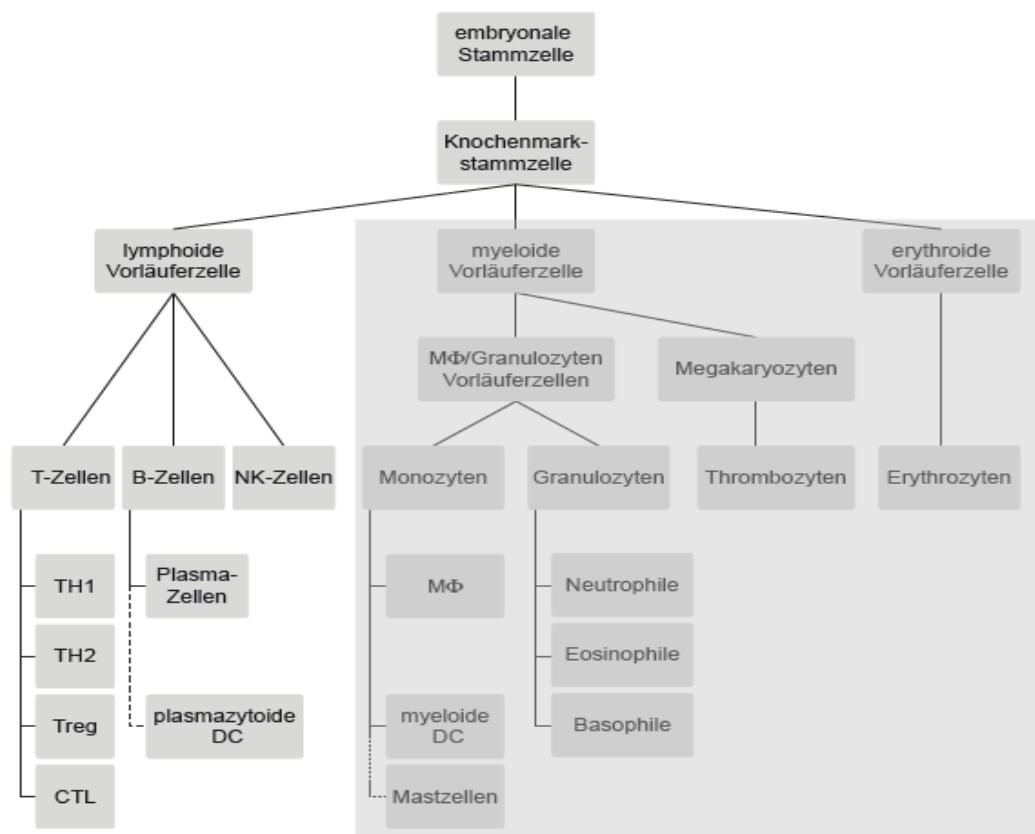


Abbildung 1.1: Lymphopoese ist ein Teil der Blutbildung und bringt neben B- und NK-Zellen alle T-Zellen hervor. TH: T-Helferzellen, Treg: Regulatorische T-Zellen, CTL: Cytotoxische T-Lymphozyten, DC: Dendritische Zellen, NK-Zellen: Natürliche Killer-Zellen, MΦ: Makrophagen. Abbildung modifiziert aus [230], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Grundwissen Immunologie von Christine Schütt, Barbara Bröker © Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2011.

Im Thymus werden die T-Zellvorstufen durch ein spezialisiertes Gewebe aus antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC) in ihrer Entwicklung hin zu

immunkompetenten Zellen durch Bereitstellung von Wachstumsreizen unterstützt. Gleichzeitig wird die Ausbildung ihrer typischen Rezeptoren streng überwacht, um der Entwicklung inaktiver oder autoreaktiver Zellen vorzubeugen. Als positive Selektion wird die Auswahl derjenigen T-Zellen bezeichnet, die mit ihren membranständigen Rezeptoren MHC:Peptid-Komplexe erkennen können, welche ihnen von APC präsentiert werden. Die Art dieser Interaktion entspricht dabei der Situation, in welcher reife T-Lymphozyten später in den peripheren Geweben durch die gleichen Zellen aktiviert werden. Nur diejenigen T-Zellen erhalten adäquate Überlebenssignale, welche zuverlässig den Antigenpräsentationskomplex binden [128]. Ziel dieses aufwendigen Prozesses ist die Ausbildung des T-Zell-Rezeptors (*T cell receptor*, TCR), über den jede T-Zelle ein einziges individuelles Antigen hochspezifisch erkennen kann. Die Vielfalt der möglichen Rezeptorkonfigurationen wird durch somatische Rekombination variabler Genabschnitte erreicht, was rechnerisch zu  $10^{18}$  einzigartigen Spezifitäten führt, von denen Schätzungen zufolge etwa  $10^8$  in einem Individuum umgesetzt werden [152]. Da ein Teil dieser Epitope jedoch auch auf körpereigenen Strukturen vorhanden ist, müssen Zellen mit daran bindenden Rezeptoren aussortiert werden. Dieser Prozess wird negative Selektion genannt und umfasst die Induktion der Apoptose in der betreffenden Zelle und die anschließende Phagozytose durch thymusständige Makrophagen [158]. Laut der Affinitäts-Hypothese werden ebenso Zellen mit Rezeptoren eliminiert, die ihr Antigen zu schwach oder zu stark binden (s. auch Abb. 1.2) [13]. Weniger als 5% der im Thymus entstehenden Lymphozyten überleben diese strenge Auslese und machen sich auf den Weg über das Blut in die peripheren lymphatischen Gewebe [152].

Der T-Zell-Rezeptorkomplex ist eine funktionelle Einheit, welche aus mehreren Transmembranmolekülen besteht und eine extrazelluläre Rezeptorfunktion mit intrazellulären Signalwegen verbindet. Das TCR-Molekül selbst ist ein Heterodimer, das bei der Mehrheit der T-Zellen aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette besteht. Eine kleine Subpopulation verfügt über abweichende  $\gamma\delta$ -TCR. Komplettiert wird der Komplex durch CD3 – zwei Heterodimere aus je einer  $\epsilon$ -Kette mit einer  $\gamma$ - oder einer  $\delta$ -Kette - sowie einem Homodimer aus  $\zeta$ -Ketten [172].

### **1.3.2 Einteilung und Funktion**

Neben der Ausbildung des TCR entstehen bei der Lymphopoese der T-Zellen verschiedene Zelltypen, welche sich durch weitere membranständige Moleküle unterscheiden und

so eine Veranlagung zu speziellen Reaktionsmechanismen tragen. Die zwei größten Gruppen sind CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (T<sub>C</sub>). Ihre definierenden Rezeptoren bestimmen die Art, wie und mit welchen Zellen sie kommunizieren können, sowie die Aufgaben, die sie innerhalb des Immunsystems erfüllen. So binden T<sub>H</sub> mittels CD4 nur Antigene, welche ihnen von Zellen mit MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, während T<sub>C</sub> über CD8 Komplexe aus Antigen und MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen können. T<sub>H</sub> übernehmen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Einleitung einer humoralen Immunantwort, indem sie die Aktivierung von B-Zellen unterstützen, welche sich dadurch zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen entwickeln. Im Gegensatz hierzu haben T<sub>C</sub> hauptsächlich eine direkte Effektorfunktion, welche die Beseitigung virusinfizierter Zellen beinhaltet [126].

Bei der Entwicklung zu immunkompetenten T<sub>H</sub> bzw. T<sub>C</sub> durchlaufen die Vorläuferzellen charakteristische Zwischenstufen, die anhand ihrer Membranmoleküle voneinander abgegrenzt werden können. Mehrere Schritte finden als „doppelt negative“ Vorstufen statt, die weder CD4 noch CD8 exprimieren. Nach einem „doppelt positiven“ Zustand folgt dann die Differenzierung in die beiden Hauptzellreihen [172].

T-Lymphozyten sind zur Aktivierung von APC, insbesondere Dendritischen Zellen (DC) abhängig. Im Gegensatz zum eng verwandten B-Zell-Rezeptor, bei dem es sich um membranständige Antikörper handelt und welcher Antigene unabhängig jeglicher Hilfestellung erkennen kann, sind T-Zell-Rezeptoren so strukturiert, dass nur an MHC-Moleküle gekoppelte antigene Peptide gebunden werden können. Hierbei ist die Assoziation des TCR mit CD4 bzw. CD8 entscheidend. Ausnahmen dieser MHC-Restriktion sind noch nicht lange bekannt und beinhalten die Erkennung von Glykolipiden durch einige T-Zellen mittels CD1, sowie die Stimulation humaner  $\gamma\delta$ -T-Zellen durch Alkylderivate [126].

Weiterhin bedarf es zur Aktivierung zusätzlicher costimulatorischer Signale durch die APC. Die wichtigsten Moleküle sind CD40 oder Vertreter der B7-Familie wie CD80/86. Die Interaktion mit CD40L (CD154) bzw. CD28 auf den T-Zellen führt zu einer verstärkten Aktivierung. Andere Membranproteine bewirken dagegen eine Hemmung der Zielzelle. Solche coinhibitorischen Rezeptoren sind etwa CTLA-4 (CD152, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), welches B7-Moleküle bindet oder PD-1 (CD279, *programmed cell death protein 1*) mit Bindung an den PD1-Liganden (CD274). Durch

sezernierte Zytokine sind DC darüber hinaus in der Lage, die Art der T-Zell-Aktivierung in verschiedene Richtungen zu lenken [126].

### 1.3.3 T-Helferzellen

Innerhalb der T<sub>H</sub>-Population können Untergruppen unterschieden werden, die sich durch spezielle Fähigkeiten auszeichnen.

Die T<sub>H1</sub>-Zellen werden durch ein Zytokinprofil definiert, welches sie als Antwort auf einen Stimulationsreiz ausschütten und damit eine typische Immunreaktion auslösen. Der adäquate Reiz hierfür sind Partikel intrazellulärer Erreger wie Mykobakterien, Protozoen oder Viren, die von Makrophagen phagozytiert wurden, aber deren Abbaumechanismen entgehen konnten. Durch APC wird nun ein Mikromilieu mit hohen Konzentrationen von Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin 12 (IL-12) aufgebaut, welches über intrazelluläre Signaltransduktion in der T-Helferzelle die Transkriptionsfaktoren STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) und STAT4, sowie T-bet (*T-box expressed in T cells*) aktiviert und den T<sub>H1</sub>-Phänotyp auslöst. Die T<sub>H1</sub>-Reaktion wird im Wesentlichen von stark proinflammatorischen Botenstoffen, insbesondere IFN- $\gamma$  getragen. Das Ergebnis ist eine ausgeprägte Aktivierung der beteiligten Abwehrzellen [172].

Die Spezialität der T<sub>H2</sub>-Zellen ist die Abwehr extrazellulärer parasitärer Erreger wie Helminthen durch die Aktivierung eosinophiler Granulozyten und Mastzellen. Von APC sezerniertes IL-4 führt über STAT6 zur Expression von GATA-3 (GATA-bindender Transkriptionsfaktor 3) und der T<sub>H2</sub>-Differenzierung. Typische T<sub>H2</sub>-Zytokine sind die Interleukine (IL-) 4, 5 und 13, welche Plasmazellen dazu veranlassen, IgE anstelle anderer Antikörper zu produzieren (*isotype switch*). Da dieser Immunglobulin-Isotyp bei Atopikern erhöht ist, wird eine Überaktivität der T<sub>H2</sub>-Zellen als ein Pathomechanismus allergischer Erkrankungen angesehen [172].

T<sub>H17</sub>-Zellen werden durch extrazelluläre Bakterien und Pilze aktiviert. Sie produzieren die namengebenden Interleukine 17A und 17F, sowie IL-22 und verstärken die Immunantwort durch neutrophile Granulozyten und die Produktion mikrobizider Stoffe durch Epithelzellen. Ihre Entstehung wird induziert durch IL-6 und IL-23 aus APC, was zur Aktivierung von STAT3 und ROR $\gamma$ t (*retinoic-acid-receptor-related orphan receptor gamma*, thymusspezifische Isoform) führt [172].

Follikuläre T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ) sind spezialisiert auf die Unterstützung der B-Zell-aktivierenden Keimzentrumsreaktion. Sie zeichnen sich aus durch die Oberflächenmarker CXCR5 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5, CD185) und PD-1 (CD279) und ihren Aufenthaltsort in Lymphfollikeln. Die Induktionsmechanismen dieses Zelltyps sind noch nicht vollständig erforscht, beinhalten aber die IL-6-abhängige Aktivierung von STAT3 und Bcl-6 (*B-cell lymphoma protein 6*) [172].

Ein weiterer, relativ neuer Typ T-Helferzellen sind  $T_{H22}$ , welche sich durch die charakteristische Produktion von IL-22 auszeichnen. Der Forschungsstand hierzu ist noch nicht weit fortgeschritten; es gibt sowohl Hinweise auf proinflammatorische, den  $T_{H17}$ -Zellen ähnelnde, als auch auf immunregulierende Eigenschaften [198].

IL-9 wurde lange als  $T_{H2}$ -Zytokin betrachtet, nun wird deutlich, dass es hauptsächlich von einer spezialisierten Subpopulation, den  $T_{H9}$ -Zellen produziert wird. Ihre Entstehung wird durch TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) und IL-4 gefördert und ihnen wird eine entscheidende Rolle in der Entstehung allergischer und autoimmunologischer Erkrankungen zugesprochen. Andererseits produzieren  $T_{H9}$ -Zellen auch das antiinflammatorische IL-10 [198].

#### **1.4 Entstehung, Charakteristika und Funktion regulatorischer T-Zellen**

Die Vielzahl der Publikationen zum Thema  $T_{reg}$ , welche in den letzten 25 Jahren erschienen, liefert eine große Menge an Theorien und Aussagen über Eigenschaften und Funktion dieser Zellen. Viele wegweisende Erkenntnisse wurden durch nähere Untersuchung relativiert, so dass sich das Bild der Regulatorzellen ständig anpasst und weiterentwickelt. Im Folgenden wird versucht, die wesentlichen Aspekte des  $T_{reg}$ -Konzeptes in seiner gegenwärtigen Form darzustellen und einen Überblick über die konsensfähigen und die kontroversen Punkte zu verschaffen.

Die Entdeckung der  $T_{reg}$  war insofern bahnbrechend, als sie eine Antwort auf die Frage versprach, die Immunologen seit langer Zeit beschäftigte; wie kann das erworbene Immunsystem gewährleisten, dass aus der zufällig entstehenden immensen Vielfalt hochspezifischer Erkennungsrezeptoren kein ungerichteter Angriff der Abwehrzellen auf körpereigene Strukturen folgt? Auf der Suche nach einer Antwort wurden mehrere Mechanismen beschrieben, die jeweils einen Teil zu diesem Gleichgewicht beitragen. Neben den Selektionsprozessen der Zentralen Toleranz, den sich gegenseitig regulierenden

Richtungen der T-Zell-Antwort ( $T_H1/T_H2$ -Paradigma) und der APC-abhängigen Modulation durch Costimulation/Coinhibition bzw. induzierte Anergie stellen die  $T_{reg}$  ein vorerst letztes, unentbehrliches Teil im Mosaik der Immunhomöostase dar. Sie sind in der Lage, aktiv andere Abwehrzellen zu hemmen und tragen somit einen dominanten Toleranzmechanismus, welcher bei Einleitung einer Immunantwort einer Fehl- oder Überreaktion Einhalt gebieten kann.

#### 1.4.1 Entstehung, Heterogenität und Plastizität regulatorischer T-Lymphozyten

$T_{reg}$  machen etwa 5-10% der zirkulierenden  $CD4^+$  T-Zellen aus [172]. Dies beinhaltet wiederum mehrere Untergruppen, denn eine Eigenschaft der  $T_{reg}$ , welche ihre Erforschung und Anwendung erschwert, ist ihre Heterogenität und Plastizität [238]. Viele Subpopulationen wurden beschrieben und diskutiert, die über biologische Marker oder ihr Verhalten unterschieden werden können, welche teilweise ineinander oder in Phänotypen anderer T-Zellen übergehen, wobei definitive Antworten noch nicht gefunden sind [237]. Eine grundlegende Unterscheidung wird gemacht zwischen T-Zellen, die bereits bei ihrer Heranreifung im Thymus einen  $T_{reg}$ -Phänotyp (insbesondere durch Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3) aufweisen – sogenannte „thymus-derivierte“  $tT_{reg}$  (manchmal auch als „natürliche“  $nT_{reg}$  bezeichnet) – und solchen, welche erst im weiteren Verlauf ihres Lebenszyklus in peripheren lymphatischen Organen durch stimulierende Faktoren aus naiven T-Zellen entstehen; „Peripherie-derivierte“  $pT_{reg}$  (manchmal auch adaptive oder induzierte  $T_{reg}$ ). Davon abzugrenzen sind  $T_{reg}$ , die *ex vivo* durch gezielte Stimulation generiert und als „*in vitro*-induzierte“  $iT_{reg}$  bezeichnet werden [1].

Weitere Subpopulationen beinhalten die  $T_{R1}$ -Zellen, welche kaum FoxP3 exprimieren, aber immunsuppressive Eigenschaften aufweisen, die insbesondere über IL-10 vermittelt werden [99, 85]. Da auch andere  $T_H$ -Zellen unter bestimmten Bedingungen IL-10 produzieren können, ist noch nicht geklärt, ob es sich bei  $T_{R1}$  um eine echte eigenständige Zellgruppe handelt [172].  $T_{H3}$ -Zellen wurden ursprünglich im Zusammenhang mit Beobachtungen zu oraler Toleranz beschrieben. Die Aufnahme bestimmter Antigene führt in der Darmmukosa zur Entstehung TGF- $\beta$ -produzierender  $T_H$ -Zellen, die eine Immunantwort auf diese Antigene hemmen und so zu ihrer Toleranz führen [55].

$tT_{reg}$  entstehen wie konventionelle T-Zellen bei der Lymphopoese aus doppelt positiven ( $CD4^+CD8^+$ ) Thymozyten (vgl. Abb. 1.1) [172]. Entscheidend sind hierbei die Ausbildung  $T_{reg}$ -spezifischer demethylierter Regionen (TSDR) der DNA [170] und die

Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3. Im Gegensatz zu anderen T-Zellen benötigen sie in ihrer Entwicklung Signale über den IL-2-Rezeptor [172]. Die Selektionsprozesse bei der Entstehung im Thymus führen vermutlich dazu, dass das TCR-Repertoire der  $tT_{reg}$  eine starke Neigung zur Spezifität für Selbst-Protein:MHC aufweist und diese mit erhöhter Affinität gegenüber konventionellen T-Zellen bindet [186] (Abb. 1.2).

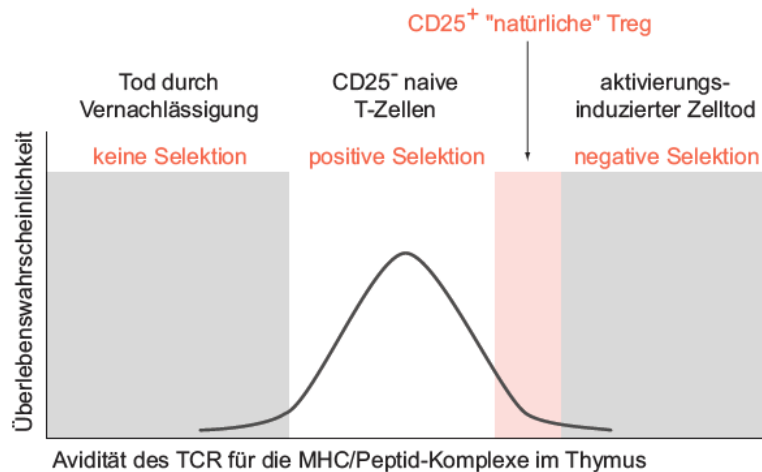


Abbildung 1.2: Aviditätstheorie der TCR-Diversität. Bindet ein Rezeptor den angebotenen MHC:Peptid-Komplex zu stark oder zu schwach, wird die entsprechende Zelle durch induzierte Apoptose oder Vernachlässigung eliminiert. nTreg-Rezeptoren zeichnen sich durch hohe Avidität zu Selbst-Antigenen aus. Abbildung aus [230], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Grundwissen Immunologie von Christine Schütt, Barbara Bröker © Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2011.

Abweichend hiervon können  $pT_{reg}$  in der Peripherie aus naiven  $CD4^+$  T-Zellen generiert werden. Ihre Entstehung wird begünstigt durch TGF- $\beta$  und den Vitamin-A-Metaboliten Tretinoin (*all-trans retinoic acid*, at-RA), welche von spezialisierten Dendritischen Zellen (DC) produziert werden, sowie die Abwesenheit von IL-6 und anderer proinflammatorischer Zytokine bei der Aktivierung über den TCR [138]. Dies findet insbesondere in Mucosa-assoziierten lymphatischen Geweben (*mucosa-associated lymphatic tissue*, MALT) des Verdauungs- und des Respirationstraktes statt, wo das Immunsystem ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Wirtsverteidigung und Toleranz gegenüber dem Mikrobiom aufrechterhalten muss [172, 11].

$iT_{reg}$  können *in vitro* unter Stimulation mit TGF- $\beta$  aus naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen gewonnen werden. Ihre funktionelle Suppressivität als heterologe Zellgabe konnte experimentell gezeigt werden, indem sie etwa eine allergische Lungenschädigung im murinen Asthmodell verhinderten [52].

Die Stabilität des  $T_{reg}$ -Phänotyps ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, da sie entscheidend für die Rolle der Regulatorzellen in Autoimmunität und für ihre therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten ist.  $T_{reg}$  zeigen ein hohes Maß an Plastizität; unter gegebenen Umständen sind sie in der Lage, den Phänotyp derjenigen T-Helferzellen teilweise zu imitieren, deren Aktivität sie hemmen. So übernehmen  $T_{reg}$ , welche eine starke  $T_H1$ -Antwort supprimieren, Teile deren Transkriptoms wie STAT1 und T-bet [134]. Inwiefern  $tT_{reg}$  und  $pT_{reg}$  stabile und verlässliche Suppressorzellen sind oder ob es sich jeweils um vorübergehende Zustände handelt, ist weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen [90, 189]. So können insbesondere  $pT_{reg}$  in der inflammatorischen Umgebung einer Autoimmunerkrankung ihre regulatorische Aktivität verlieren [135]. Diese Instabilität scheint nur einen kleinen Teil der  $T_{reg}$  zu betreffen, wobei Umstände wie Lymphopenie oder starke inflammatorische bzw. autoimmune Aktivität verstärkend wirken. Möglicherweise können solche „ $exT_{reg}$ “ die Abwehr bestimmter Erreger als Reserve unterstützen. Andere Hinweise legen nahe, dass die Konversion von  $T_{reg}$  mit Spezifität für Selbst-Antigene zu selbstreaktiven Effektorzellen ein Mechanismus in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen sein könnte [19]. Die Stabilität des  $T_{reg}$ -Phänotyps und dessen spezifischer Funktion wird wesentlich durch epigenetische Faktoren *upstream* von FoxP3 vermittelt [90, 209] (vgl. Kapitel 1.4.3).

#### 1.4.2 Definition über Oberflächenmoleküle

Wie alle T-Lymphozyten weisen auch  $T_{reg}$  den Oberflächenmarker CD3 auf, der eine wichtige Rolle bei der Signalkaskade im Rahmen der T-Zell-Aktivierung bei Antigenkontakt des T-Zell-Rezeptors (TCR) spielt. CD3 besteht aus vier extrazellulären Untereinheiten (eine  $\gamma$ -, eine  $\delta$ - und zwei  $\epsilon$ -Ketten) sowie je einer zytoplasmatischen Domäne und bildet zusammen mit den  $\zeta$ -Ketten und dem TCR (bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sowie variablen Abschnitten) den hochspezifischen Antigenerkennungskomplex der T-Zelle. Bei Kontakt mit dem entsprechenden molekularen Muster wird ein aktivierender Signalweg (ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) initiiert. Weitere costimulatorische und inhibitorische Signale modulieren in Abhängigkeit des Mikromilieus und der anwesenden Zellen die T-Zell-Antwort. Da sonst fast keine Zellen des menschlichen Organismus dieses Protein exprimieren, eignet sich CD3 hervorragend als Erkennungsmerkmal aller T-Zellen sowie als immunmodulatorischer Angriffspunkt zur Beeinflussung der T-Zell-Aktivierung [57].

CD4 ist das Erkennungsmolekül der T-Helferzellen ( $T_H$ ) (s. Kapitel 1.3.3). Es ist essenziell an der Aktivierung beteiligt, da nur solche Antigene eine spezifische Immunreaktion auslösen, welche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) mithilfe von MHC präsentiert werden. CD4 ist dabei verantwortlich für die MHCII-Restriktion der  $T_H$  [172].

Bei CD25 handelt es sich um die hochaffine  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2-Rezeptors.  $T_{reg}$  sind auf IL-2 als externes Überlebens- und Aktivierungs-Signal angewiesen, da sie selbst nicht in der Lage sind, es zu produzieren [172]. Andere Immunzellen, insbesondere proinflammatorische T-Effektorzellen ( $T_{eff}$ ) erhöhen erst auf eine Stimulation hin die Dichte dieses Rezeptors auf ihrer Oberfläche und konkurrieren dann mit  $T_{reg}$  um das vorhandene IL-2 [215, 88]. Im Ruhezustand sind in der CD25-hochpositiven Population ( $CD25^{hi}$ )  $FoxP3^+$   $T_{reg}$  angereichert, sodass es als  $T_{reg}$ -Marker herangezogen werden kann [16].

CD127 bezeichnet die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-7-Rezeptors.  $T_{reg}$  zeichnen sich durch eine konstitutiv niedrige Expression dieses Proteins aus, wodurch es als Negativmarker interessant ist [142]. Allerdings regeln auch  $T_{eff}$  nach Aktivierung dieses Molekül herunter [155, 3].

Über die Reifemarker der CD45-Gruppe können  $T_{reg}$  analog zu anderen T-Lymphozyten in naive  $CD45RA^+$  und reife  $CD45RO^+$  „*memory*“-Subpopulationen eingeteilt werden. Anhand der Expression weiterer typischer Oberflächenmoleküle, welche vor allem bestimmen, in welche Gewebe die jeweilige Zelle migriert, können drei Typen oder Zustandsformen der *memory*-T-Zellen unterschieden werden. Zentrale *memory*-T-Zellen ( $T_{CM}$ ) exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7 (CC-Motiv-Chemokinrezeptor 7, CD197), welcher eine Migrationsroute ermöglicht, die jener der naiven T-Zellen gleicht; vom Blut über sekundäre lymphatische Organe in die Lymphgefäße und zurück ins Blut. *Effector memory* T-Zellen ( $T_{EM}$ ) exprimieren kein CCR7, sondern  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine, worüber sie aus dem Blut schnell in entzündete Gewebe gelangen können. Gewebespezifische *memory* T-Zellen (*tissue-resident memory T cells*,  $T_{RM}$ ) hingegen lassen sich mithilfe der Chemokinrezeptoren CXCR3 (CD183) und CCR9 (CDw199) in peripheren nichtlymphatischen Geweben nieder. Alle Gedächtniszellen können auch weiterhin Charakteristika der Effektor-T-Zell-Linien  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H17}$  oder  $T_{FH}$  aufweisen [172]. Hinweise darauf, dass auch unter immunsuppressiven Regulatorzellen eine Gruppe Gedächtnisträger generiert wird, gab es schon in den 1970er Jahren [144].

**Tabelle 1.1: Weitere T<sub>reg</sub>-Marker. Auf Grundlage von [53] und [228], mit freundlicher Genehmigung durch Elsevier und John Wiley and Sons.**

Molekül	Anmerkung	Quellen
CTLA-4 (CD152)	Das Protein <i>Cytotoxic-T-Lymphocyte-Associated 4</i> wird von T <sub>reg</sub> intrazellulär konstitutiv hoch exprimiert, nach Stimulation auf die Oberfläche transportiert und spielt eine wichtige funktionelle Rolle bei der T <sub>reg</sub> -medierten Suppression. Der coinhibitorische B7-Rezeptor ist auch auf aktivierten T <sub>eff</sub> zu finden und stellt einen sogenannten Immuncheckpoint dar. Die Expression auf T <sub>reg</sub> führt zur Herabregulation der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf APC. CTLA-4-Defizienz in T <sub>reg</sub> führt im Mausmodell zu fataler Lymphoproliferation und ausgeprägter Auto- und Tumormunität.	[122, 247, 271]
GITR (CD357, TNFRSF18)	Der Glukokortikoid-induzierbare TNF-Rezeptor ist selektiv auf murinen T <sub>reg</sub> exprimiert. Auf Stimulation wird er von allen T-Zellen verstärkt in die Membran eingebaut. Menschliche T <sub>reg</sub> weisen nur eine kleine GITR <sup>+</sup> Population auf.	[157, 25, 202]
CD62L	Das CD62L <sup>+</sup> T <sub>reg</sub> -Subset zeigt eine effektivere Suppression von Inflammation im Tiermodell. Die überwiegende Mehrheit humaner T <sub>reg</sub> exprimiert den Lymphknoten-Homing-Rezeptor auf der Oberfläche.	[76, 82, 245, 109]
PD-1 (CD279)	Aktivierte T-Zellen exprimieren PD-1 ( <i>programmed death receptor 1</i> ) sowie teilweise die Liganden PD-L1 (CD274) und PD-L2 (CD273). Ruhende T <sub>reg</sub> sind auf der Oberfläche PD-1-negativ, wodurch sie sich von aktivierten T-Zellen unterscheiden. Aktivierte T <sub>reg</sub> exprimieren sowohl PD-1 als auch PD-L. PD-1-Ligation fördert T <sub>reg</sub> -Entwicklung und Stabilität. Der PD-1-Signalweg ist essenziell für T <sub>reg</sub> -vermittelte Suppression.	[194, 81, 129]
CD39	Die Ectonucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase-1 (ENTPD1) hydrolysiert proinflammatorisches extrazelluläres ATP und ADP zu AMP. Auf murinen T <sub>reg</sub> ubiquitär exprimiert, trägt beim Menschen nur ein Teil der T <sub>reg</sub> das Ektoenzym auf der Oberfläche. Diese T <sub>reg</sub> -Subpopulation ist bei Patienten mit rrMS vermindert.	[33, 69]
CD73	Die Ecto-5'-Nucleotidase (5'-NT/NT5E) katalysiert die Dephosphorylierung von AMP und erhöht so die Adenosinkonzentration im Interzellulärraum. Über A <sub>2A</sub> -Rezeptoren wirkt diese antiinflammatorisch. Somit stellt das Ektoenzym im Verbund mit CD39 einen Suppressionsmechanismus dar. Es wird bevorzugt, aber nicht ausschließlich von T <sub>reg</sub> exprimiert und nach Stimulation von allen T-Zellen hochreguliert.	[199, 69, 133, 5]
CD44	Der Hyaluronsäure-Rezeptor kennzeichnet ein IL-10-produzierendes Subset muriner T <sub>reg</sub> .	[141]
MHCII/HLA-DR	Wird von einem T <sub>reg</sub> -Subset exprimiert. HLA-DR -positive bzw. -negative T <sub>reg</sub> unterscheiden sich in der Suppressionsweise.	[16, 18]

LAP	Als Teil des latent-TGF- $\beta$ -Moleküls zeichnet das <i>latency associated peptide</i> ein T <sub>reg</sub> -Subset mit TGF- $\beta$ -abhängiger Suppression aus. Gemeinsam mit IL-1-Rezeptor I/II (CD121a / CD121b) differenziert es aktivierte T <sub>reg</sub> von T <sub>eff</sub> aus Expansionskulturen.	[51, 256]
CD103	Hoch exprimiert auf TGF- $\beta$ -induzierten T <sub>reg</sub> und MALT-ständigen T <sub>reg</sub> .	[197, 6, 284, 207]
CCR6 (CD196)	Hohe Expression auf <i>effector memory like</i> (CD45RO <sup>+</sup> ) T <sub>reg</sub> . Das CCR6 -positive Subset produziert auf bestimmte Stimulationsreize teilweise IL-17.	[131, 276, 14, 24, 264]
LAG-3 (CD223)	Das MHCII-bindende CD4-Homolog <i>lymphocyte activating gene 3</i> wird von einem kleinen T <sub>reg</sub> -Subset exprimiert, dessen Frequenz in Tumorpatienten erhöht ist.	[114, 43]
GARP (LRRC32)	<i>Glycoprotein A Repetitions Predominant</i> wird nach TCR-Stimulation auf T <sub>reg</sub> exprimiert und ist ein Rezeptor für <i>latent/pro-TGF-<math>\beta</math></i> .	[268, 190, 243, 257, 267]
Galectin-1	Nucleär und zytoplasmatisch bei aktivierten T <sub>reg</sub> höher exprimiert als bei CD25 <sup>-</sup> T-Zellen.	[86]
Galectin-10	Intrazellulär differentiell höher in T <sub>reg</sub> als in T <sub>eff</sub> exprimiert.	[137]
Helios	Der Transkriptionsfaktor der Ikarusfamilie (Ikzf2) ist hoch exprimiert in tT <sub>reg</sub> und ca. 70% peripherer T <sub>reg</sub> und wird in T <sub>eff</sub> nicht durch Stimulation hochreguliert. Er bindet an den FoxP3-Promoter.	[253, 244, 106, 92]
Neuropilin-1	Nrp-1 ist ein Marker muriner T <sub>reg</sub> . Von humanen T <sub>reg</sub> wird Nrp-1 kaum exprimiert, ist jedoch auf intratumoralen T <sub>reg</sub> verschiedener Krebsarten erhöht.	[36, 275, 161, 183]
TNFRSF25 (DR3)	Im Tiermodell erhöhte T <sub>reg</sub> -Frequenz durch Agonismus des <i>death receptor 3</i> – abhängigen Signalweges. Auf stimulierten humanen T <sub>reg</sub> exprimiert, Aktivierung des Rezeptors verstärkt T <sub>reg</sub> -Expansion.	[229, 27]
TNFR2 (CD120b)	Differentiell exprimiert auf CD25 <sup>+</sup> Thymozyten. Expression korreliert mit CD25 und FoxP3. Nach Stimulation kommt es zu TNFR2-Shedding, wodurch die TNF-Wirkung vermindert wird. TNFR2-Blockade hemmt T <sub>reg</sub> -Funktion.	[8, 260, 54, 130, 173]
CD49d	Korreliert negativ mit FoxP3-Expression. Entfernung CD49 <sup>+</sup> Zellen beseitigt IFN $\gamma$ -/IL17-produzierende Zellen.	[132]
ICOS (CD278)	<i>Inducible T-Cell costimulator</i> aus der CD28-Superfamilie teilt T <sub>reg</sub> in zwei Subsets mit verschiedenem Zytokinprofil.	[117]

Die Möglichkeit eines T<sub>reg</sub>-Gedächtnisses mit „*memory*“-Zellreihen analog der T<sub>H</sub>-Gedächtniszellen scheint plausibel [206]. Ein Subset CD45RO<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> mit Rezeptorspezifität gegenüber experimentellen induzierbaren gewebstreingierten Selbst-Antigenen

persistiert über längere Zeiträume ohne Antigenkontakt und kann eine sekundäre Immunantwort wirkungsvoll hemmen [205]. Ähnliche Gedächtniseffekte konnten für Infektionsmodelle [222] und fetomaternal Toleranz beschrieben werden [208].

Eine Vielzahl weiterer Oberflächenmoleküle wurde als T<sub>reg</sub>-Marker oder Determinante bestimmter T<sub>reg</sub>-Funktionen oder -Subpopulationen beschrieben, welche jeweils Vor- und Nachteile bieten. Die wichtigsten sind zusammen mit intrazellulären Markern in der Tabelle 1.1 zusammengefasst und in Abb. 1.3 dargestellt. Als derzeitiger Kompromiss für die Definition von T<sub>reg</sub> hat sich die Kombination von CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo</sup> als Gatingstrategie für reine Oberflächenfärbung etabliert, welcher um zusätzliche Subpopulationsmarker wie CD45 ergänzt werden kann [223].

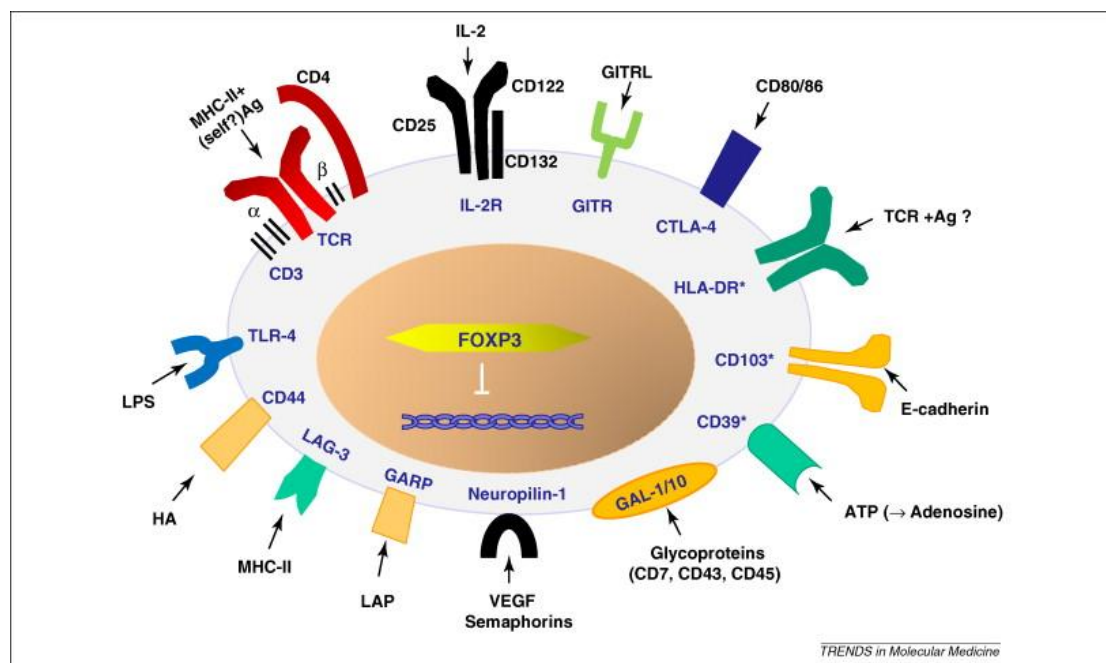


Abbildung 1.3: T<sub>reg</sub>-Phänotyp. Ag: Antigen, ATP: Adenosintriphosphat, CD: cluster of differentiation, CTLA-4: cytotoxic t-lymphocyte associated protein 4, FOXP3: forkhead box protein 3, GAL: Galectin, GARP: glycoprotein A repetitions predominant, GITR: glucocorticoid-induced TNFR-related protein, HA: hyaluronic acid, HLA: human leucocyte antigen, IL: Interleukin, LAG-3: lymphocyte activation gene 3, LAP: latency-associated peptide, LPS: Lypopolysaccharid, MHC: major histocompatibility complex, TCR: t-cell receptor, TLR: toll-like receptor, VEGF: vascular endothelial growth factor. Abbildung aus [261], mit freundlicher Genehmigung durch Elsevier: Trends in Molecular Medicine, Volume 16, Issue 2, Koen Venken, Niels Hellings, Roland Liblau, Piet Stinissen, Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis, 58-68, © 2010.

### 1.4.3 Definition über intrazelluläre Moleküle – Genetische und epigenetische Faktoren

Etlliche intrazelluläre und intranukleäre Moleküle werden als T<sub>reg</sub>-spezifisch oder essenziell für T<sub>reg</sub>-Funktionen beschrieben (s. auch Tab. 1.1). Das mit Abstand bedeutendste darunter ist FoxP3.

Forkhead Box Protein P3 (FoxP3) ist ein Transkriptionsfaktor aus der *forkhead-winged-helix* Familie, welcher von T<sub>reg</sub> konstitutiv exprimiert wird, entscheidend für die Entstehung und Funktion ihres Phänotyps ist und als zuverlässigster Marker für ihre Definition gilt [111]. Fehlt FoxP3 oder ist seine Wirkung in einem Organismus aufgrund von Mutationen eingeschränkt, entwickelt sich bei der Maus die *scurfy*-Krankheit, welche durch systemische autoimmune Dysregulation zum Multiorganversagen führt [37]. Beim Mensch entsteht bei Verlust von funktionstüchtigem FoxP3 das IPEX-Syndrom (*Immun-dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*) [23]. Entsprechend zeigen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen von Individuen mit *loss-of-function*-Mutationen im FoxP3-Gen keine regulatorische Aktivität [15].

In stimulierten Zellpopulationen kommt es jedoch auch bei T<sub>eff</sub> zu einer verstärkten Expression von FoxP3 [215, 88, 189]. Die Expression findet nach TCR-Stimulation statt, ist vorübergehend und führt nicht zu einer anhaltenden suppressiven Aktivität; ein Teil der zirkulierenden FoxP3<sup>+</sup> Zellen im Menschen produziert vielmehr proinflammatorische Zytokine [7, 258, 266, 166, 167] (Zitat nach [170]).

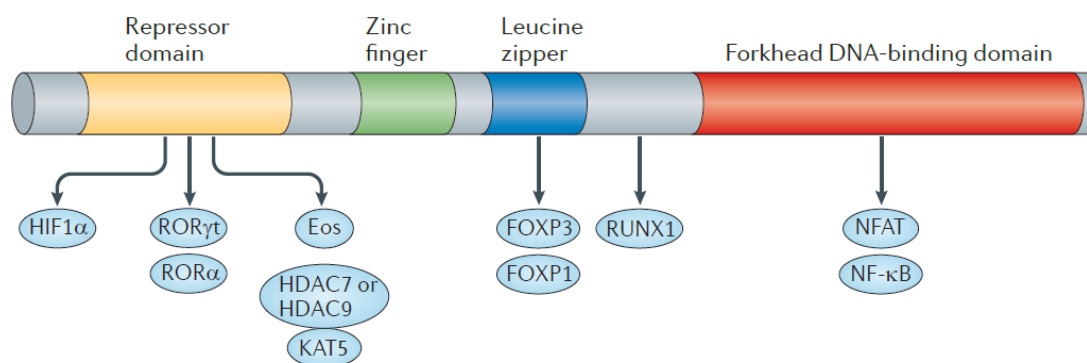


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen von FoxP3 und ihren Interaktionspartnern. FOXP: *forkhead box protein*, HDAC: Histon-Deacetylase, HIF1α: *hypoxia-inducible factor 1α*, KAT5: Histon-Acetyltransferase KAT5, NFAT: *nuclear factor of activated T cells*, NF-κB: *nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells*, ROR: *RAR related orphan receptor*, RUNX1: *Runt-related transcription factor 1*. Abbildung aus [196]. Mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Nature Reviews Immunology. FOXP3 and *scurfy*: how it all began, Fred Ramsdell et al. © 2014.

Das Protein besteht aus drei Domänen; einer N-terminalen Repressordomäne, die ihre Wirkung über Bindung mit anderen Transkriptionsfaktoren, nicht mit DNA selbst entfaltet; einer mittleren Domäne mit Zinkfinger- und Leucin-Zipper-Abschnitt, welche wichtig für die Homodimerisation ist und der C-terminalen Forkhead-Domäne zur DNA-Bindung [145] (s. Abb. 1.4).

Das FoxP3-Gen befindet sich auf dem p-Arm von Chromosom X und enthält 11 Exone [37, 23]. Aktiviert wird die Transkription zum Einen durch Bindung von AP-1 (*activator protein 1*) und NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) am FoxP3-Promoter nach TCR- und Costimulation, zum Anderen wird die FoxP3-Expression entscheidend durch die konservierten Enhancer-Regionen CNS (*conserved non-coding sequence*) 1-3 reguliert, an denen ebenfalls Transkriptionsfaktoren binden können [123]. Dabei ist CNS1 wichtig für die Entstehung von pT<sub>reg</sub> als Zielpunkt TGF- $\beta$ -induzierter SMAD-Signalwege. Bei CNS2 handelt es sich um eine T<sub>reg</sub>-spezifische demethylierte Region, die entscheidend für die Aufrechterhaltung des T<sub>reg</sub>-Phänotyps ist. CNS3 ist essenziell für die FoxP3-Induktion [287] (Abb. 1.5).

Ein wesentlicher Faktor für Entstehung, Funktion und Stabilität der T<sub>reg</sub> ist eine typische epigenetische Prägung, insbesondere der Methylierungsstatus bestimmter DNA-Abschnitte. Dieser ist zwar nicht in der Lage, unabhängig von FoxP3- oder CD25-Expression eine hemmende Aktivität hervorzurufen, wirkt aber synergistisch und stabilisierend [170, 179]. So ist insbesondere die Demethylierung einer nicht-codierenden Sequenz im FoxP3-Gen (*conserved non-coding sequence 2*, CNS2) entscheidend für eine dauerhafte Expression des Transkriptionsfaktors [287]. Tatsächlich ist der Nachweis T<sub>reg</sub>-spezifischer demethylierter Regionen (TSDR) ein zuverlässigerer Marker für eine suppressorisch aktive Zelle als die FoxP3-Expression. Insgesamt machen TSDR ca. 0,19% der DNA-Methylierungsstellen aus. Darunter befinden sich Genabschnitte, welche mit T<sub>reg</sub>-Funktionen assoziiert sind wie Foxp3, Ctla4, Il2ra, Tnfrsf18, Ikzf2 und Ikzf4 [169]. Die funktionell wichtige Blockade der Transkription von Genen wie Il2 oder Ifng wird durch Interaktion von FoxP3 mit dem TSDR-abhängigen Faktor Eos erreicht [187].

Umfangreiche posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Aktivität von FoxP3 in einer Zelle. So stabilisiert die Acetylierung von Lysinresten das Molekül und verhindert seine Ubiquitylierung. Eine Phosphorylierung am C-Terminus erhöht die DNA-Bindfähigkeit, in der N-terminalen Domäne behindert sie die FoxP3-Funktion. Polyubiquitylierung führt zum Abbau in Proteasomen [145].



Gene), an welche es direkt bindet um ein Vielfaches [288, 151, 213, 221]. Dies wird durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren erreicht, mit denen FoxP3 400-800 kDa große Komplexe bildet [211, 110]. Verschiedene weitere Transkriptionsfaktoren der Fox-Familie spielen entscheidende Rollen in der genetischen Prägung der  $T_{reg}$  [90]. Zusammen mit Vertretern anderer Klassen von Transkriptionsfaktoren wie Helios, Eos, Irf4 oder Gata1 entsteht in der Entwicklung zum  $T_{reg}$ -Phänotyp ein redundanter molekularer Schalter, welcher der suppressiven Zellsignatur Stabilität verleiht [83]. Neben direkter Promoter-Bindung erfolgt die Transkriptionskontrolle häufig über Histonmodifikation, z.B. als H3-Deacetylierung der Il2- und Ifng-Gene oder als Histonacetylierung der Gitr-, Cd25- und Ctla4-Promoter [50].

#### **1.4.4 Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen**

Über die verschiedenen Mechanismen, welche  $T_{reg}$  benutzen, um eine Immunantwort zu hemmen, herrscht noch einige Unklarheit. Einige aus *in vitro* Experimenten abgeleitete Vorgänge lassen sich wohl nicht im lebendigen Organismus nachvollziehen oder spielen dort nur eine untergeordnete Rolle [236]. Die postulierten Wege der Suppression lassen sich einteilen in Zellkontakt-abhängige und –unabhängige oder danach, welche Zellen von der Intervention betroffen sind. Beide Einteilungen sind unscharf und allein zur Vereinfachung der Darstellung zulässig.

##### **Zellkontakt-abhängige Suppressionsmechanismen**

Eine Suppression von Effektorzellen kann durch direkte zelluläre Interaktion oder über eine Modulation der Stimulation durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) erreicht werden. Entscheidende Werkzeuge dabei sind Oberflächenmoleküle, welche im Kontakt mit Rezeptoren der Zielzelle ihre Wirkung entfalten.

Experimente mit Cokulturen sortierter  $T_{reg}$  ( $CD4^+CD25^+$ ) mit Dendritischen Zellen (DC) zeigen eine Herabregulierung der Produktion costimulatorischer Moleküle, auch wenn die DC zuvor stimuliert wurden. Der Effekt tritt nicht auf, wenn die Zellen während des Versuches keinen direkten Kontakt haben [165]. Diese kontaktabhängige Suppression wird auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt. Eine Möglichkeit besteht in einer stereotaktischen Kompetition durch Aggregation von  $T_{reg}$  um DC, sodass Effektorzellen der räumliche Zugang zu Stimulationssignalen erschwert wird [46]. Das von  $T_{reg}$  nach Stimulation in großen Mengen in die Zellmembran eingebaute Inhibitormolekül CTLA-

4 bindet B7-Moleküle auf APC, wodurch deren costimulatorisches Signal  $T_{\text{eff}}$  (T-Effektorzellen) nicht mehr erreicht [172]. Die Expression von CD80/CD86 durch DC wird nach Interaktion mit CTLA-4 herabreguliert [181]. Es kann gezeigt werden, dass nach Bindung von CTLA-4 mit B7-Molekülen diese per Transendozytose von der Membran der APC entfernt werden [193]. Diese „Trogozytose“ behindert die Bindung der B7-Moleküle mit CD28 auf Effektorzellen und das damit verbundene costimulatorische Signal [121, 112] und kann in  $iT_{\text{reg}}$  auch CTLA-4-unabhängig gezeigt werden [100].  $T_{\text{reg}}$  sind auch in der Lage, spezifische Peptid:MHC-Komplexe von der Oberfläche der DC zu entfernen [4]. Die CTLA4-B7-Interaktion führt über Aktivierung des Enzyms IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase) zudem zum verstärkten Abbau von Tryptophan zu proapoptotischem Kynurenin [97]. Naive DC können in ihrer Reifung durch Bindung von LAG-3 an MHC über einen ITAM-induzierten Signalweg beeinträchtigt werden [139, 114].

### **Zellkontakt-unabhängige Suppressionsmechanismen**

Durch sezernierte Moleküle und Veränderung des Mikromilieus können  $T_{\text{reg}}$  auf verschiedenen Wegen eine Immunaktivierung hemmen. Dabei können die Effekte wiederum durch direkten Angriff auf Effektorzellen oder durch Hemmung der APC-abhängigen Stimulation hervorgerufen werden.

Die auf  $T_{\text{reg}}$  stark exprimierten Ectoenzyme CD39 und CD73 führen zum Abbau extrazellulären ATPs, ADPs und AMPs zu Adenosin. Dadurch wird die aktivierende Wirkung einer hohen ATP-Konzentration im Interzellularraum unterbrochen. Das vermehrt anfallende Adenosin hat seinerseits immunsupprimierende Eigenschaften, die über  $A_2A$ -Rezeptoren auf  $T_{\text{eff}}$  vermittelt werden [33, 69].

Ein viel diskutierter Hemmungsmechanismus ist die IL-2-Deprivation proinflammatorischer Zellen, welche durch die hohe CD25-Expression auf  $T_{\text{reg}}$  und durch ihre Unfähigkeit, selbst IL-2 zu produzieren, entsteht [172, 217]. Konzeptuell bindet extrazelluläres IL-2 bevorzugt an die hochaffinen  $T_{\text{reg}}$ -Rezeptoren und steht dann nicht mehr als Aktivierungssignal für APC und  $T_{\text{eff}}$  zur Verfügung. Inwiefern dahingehende Beobachtungen auch durch  $T_{\text{reg}}$ -vermittelte Herabregulierung der IL-2-Produktion in Effektorzellen erklärt werden können, ist schwer zu differenzieren [236].

Einige von  $T_{\text{reg}}$  sezernierte Moleküle spielen ebenfalls eine Rolle für die Entfaltung der  $T_{\text{reg}}$ -spezifischen Immunregulation. Die am häufigsten genannten und am besten untersuchten dieser Zytokine sind TGF- $\beta$ , IL-10 und IL-35.

TGF- $\beta$  stellt nicht nur einen essenziellen Co-Faktor bei der Entstehung von pT<sub>reg</sub> dar, sondern auch ein wichtiges Effektormolekül. Es hemmt die Proliferation und Differenzierung naiver T-Zellen zu proinflammatorischen Subtypen und fördert die T<sub>reg</sub>-Entwicklung [172]. Wie groß die Rolle T<sub>reg</sub>-derivierten TGF- $\beta$  für deren Suppressivität ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden, da verschiedene Studien hierzu diskrepante Hinweise geben [138].

IL-10 hemmt die Expression von MHC und costimulatorischen Molekülen auf APCs und die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch APCs (IL-12, IL-23) [172]. T<sub>reg</sub>-deriviertes IL-10 ist nicht essentiell für deren Hemmung experimenteller systemischer Autoimmunität, aber unverzichtbar für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase im MALT [210].

IL-35, ein Zytokin aus der IL-12-Familie, besteht aus den Untereinheiten EBI3 und p35, wird hauptsächlich von murinen T<sub>reg</sub> exprimiert und ist essenziell für deren suppressive Aktivität [63]. Von ruhenden humanen T<sub>reg</sub> wird es nicht exprimiert [282]. In Anwesenheit von IL-35 aktivierte humane T<sub>reg</sub> produzieren *in vitro* IL-35 und hemmen die Proliferation von T-Responderzellen in Cokultur IL-35-abhängig [62].

Die drei von T<sub>reg</sub> sezernierten Mediatoren IL-10, TGF- $\beta$ , and IL-35 behindern die Heranreifung der betroffenen DC [170].

Galectin-1, welches ebenfalls von T<sub>reg</sub> vermehrt produziert wird, wirkt möglicherweise ebenfalls als lösliches Effektormolekül, indem es die Zytokinproduktion und Proliferation der Responderzellen hemmt [236, 86].

Eine direkte Attackierung durch Zytolyse mittels Granzym A/B und Perforin ist ein weiterer Mechanismus, mit welchem T<sub>reg</sub> überschießende oder fehl gerichtete Immunaktivität unterbinden können [98, 95, 285].

*In vitro*-Experimente weisen darauf hin, dass T<sub>reg</sub> die stärkste und nachhaltigste Suppressivität aufweisen, wenn die Stimulationssignale schwach sind. Komplementär hierzu sind kokultivierte T<sub>eff</sub> bei schwacher Aktivierung am empfänglichsten für T<sub>reg</sub>-vermittelte Inhibition, während sehr starke Reize sie dafür resistent machen [17].

Inwiefern die dargestellten Mechanismen (zusammengefasst in Abb. 1.6) von T<sub>reg</sub> universell eingesetzt werden oder ob sie situations- bzw. lokalisationsabhängig sind, ist noch nicht abschließend geklärt.

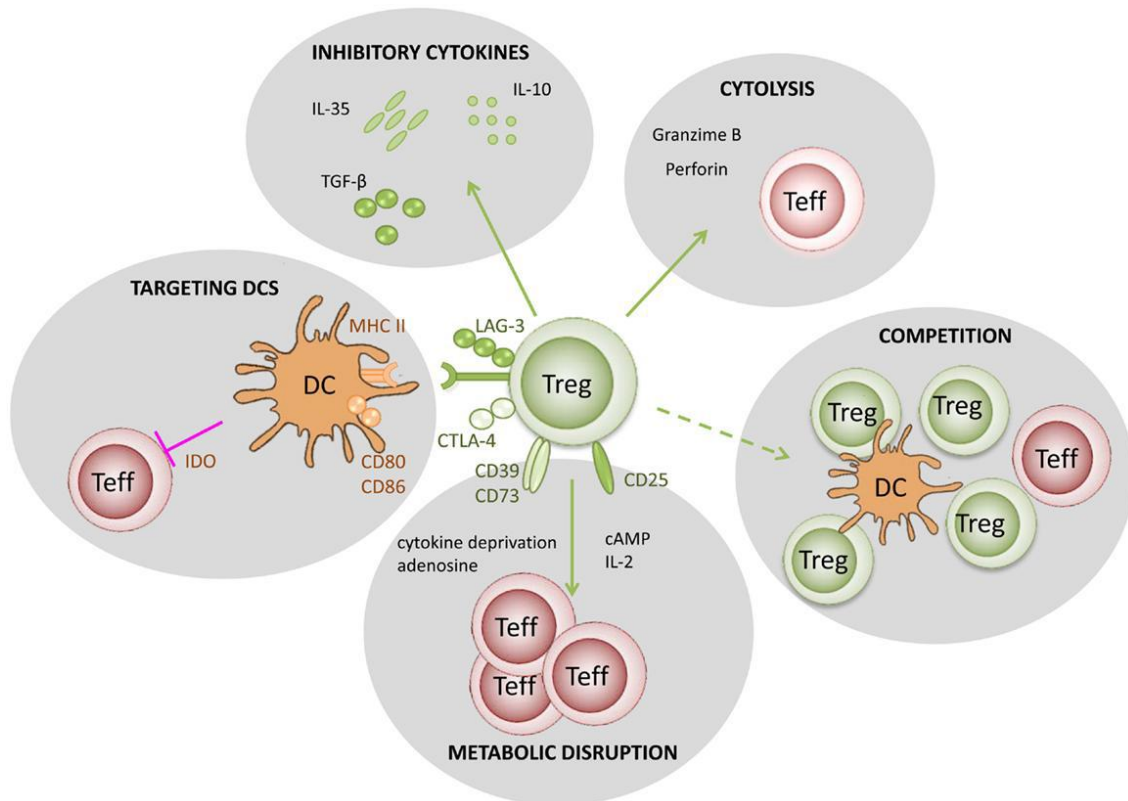


Abbildung 1.6: Mechanismen T<sub>reg</sub>-vermittelter Suppression. cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, CD: cluster of differentiation, CTLA-4: cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4, DC: dendritic cell, IDO: Indolamin-2,3-dioxygenase, IL: Interleukin, LAG-3: lymphocyte activation gene 3, MHC: major histocompatibility complex, Teff: effector t cell, TGF-β: transforming growth factor β, Treg: regulatory t cell. Abbildung aus [46], Verwendung unter Creative Commons Attribution License (CC BY). Frontiers Media: Frontiers in immunology. Mechanisms underlying CD4<sup>+</sup> Treg immune regulation in the adult: from experiments to models. Caridade M, Graca L and Ribeiro RM. © 2013 Caridade, Graca and Ribeiro.

#### 1.4.5 Einfluss metabolischer Faktoren auf Entstehung, Stabilität und Funktion regulatorischer T-Lymphozyten

Das Angebot an Nährstoffen für den Bedarf der Abwehrzellen in Ruhe und in Aktivierung sowie deren Ausstattung und Prägung zu bestimmten Stoffwechselprozessen sind kritische Faktoren für ein funktionierendes Immunsystem im Gleichgewicht. Wie alle Zellen verfügen auch T-Lymphozyten über die Möglichkeit verschiedener metabolischer Wege zur Energiegewinnung und Substratbereitstellung, welche zwischen den Subpopulationen in unterschiedlicher Ausprägung abgerufen werden. Während T-Helferzellen im ruhenden Zustand ihren bescheidenen Energiebedarf über oxidative Phosphorylierung decken und kaum Protein- oder Lipidbiosynthese betreiben, wird bei Aktivierung über den TCR in Abhängigkeit costimulatorischer oder coinhibitorischer Signale über PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und Akt (Proteinkinase B) der *mammalian/mechanisitic Target of*

Rapamycin (mTOR)-Komplex 1 aktiviert, was zu erhöhter Glykolyse, Glutaminolyse und Biosynthese führt. Dadurch wird der gestiegene Bedarf an ATP sowie Struktur- und Effektormolekülen gedeckt [61].

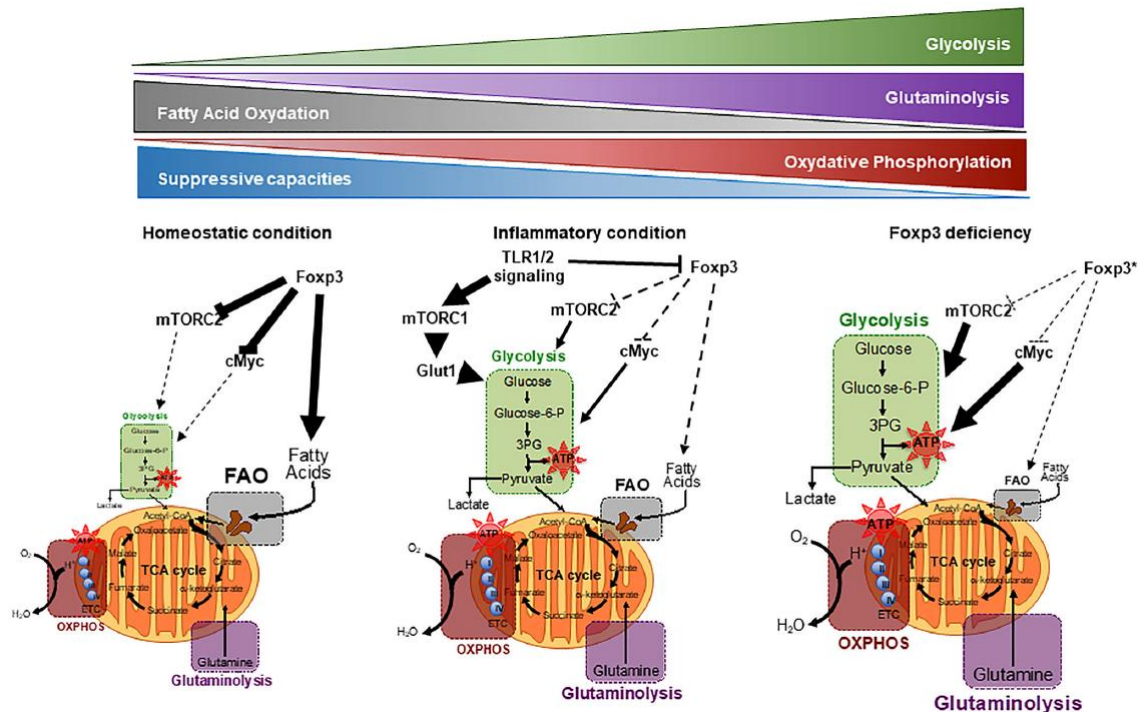


Abbildung 1.7: Metabolische Faktoren beeinflussen die Immunhomöostase. cMyc: *cellular Myelocytomatosis* Transkriptionsfaktor, FAO: *fatty acid oxidation*, Glut1: Glukosetransporter 1, mTORC1/2: *mechanistic Target of Rapamycin complex 1/2*, OXPHOS: *Oxidative Phosphorylierung*, TCA cycle: *tricarboxylic acid cycle* (Citratzyklus), TLR 1/2: *toll-like receptor 1/2*. Abbildung aus [90], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. *Journal of Clinical Immunology, Regulatory T Cells: the Many Faces of FoXP3*, Peter Georgiev et al. © 2019.

In ruhenden  $T_{reg}$  dagegen finden sich eine konstitutiv erhöhte mTOR-Aktivität sowie eine deutliche Bevorzugung der Fettsäureoxidation als primäre Energiequelle [159, 279, 281]. Dies zeigt sich auch an der niedrigeren Anzahl an membranständigen Glut1-Glukosetransportern im Vergleich zu  $T_{eff}$ . Durch Blockade von mTOR mittels Rapamycin wird allerdings die Proliferation der T-Effektorzellen eingeschränkt, während sich  $T_{reg}$  stärker vermehren [191]. Bei klassischer mTOR-Aktivierung über PI3K-Akt wird der Transkriptionsfaktor HIF1 $\alpha$  induziert, welcher die  $T_{reg}$ -Entstehung hemmt und  $T_{H17}$  verstärkt [280, 20]. Ebenso hat die Verfügbarkeit freier Aminosäuren entscheidenden Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung; während ein hohes Angebot die Entstehung proinflammatorischer Effektorzellen begünstigt, wirkt ein Mangel förderlich auf  $T_{reg}$ -Expansion. Die  $T_{reg}$ -vermittelte Induktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) führt zum Abbau der

essenziellen Aminosäure Tryptophan und hemmt damit die T-Zell-Aktivierung. Extrazelluläres Adenosin, dessen Konzentration durch Ectoenzyme aktiv von  $T_{reg}$  beeinflusst werden kann, ist ein weiterer immunsuppressiver Metabolit [113]. So tragen verschiedene Stoffwechselwege entscheidend dazu bei, die Immunantwort in die eine oder die andere Richtung zu lenken (s. Abb. 1.7).

Vielfache Wechselwirkungen ergeben sich im Verdauungstrakt zwischen Makro- und Mikronutrienten und dem lokalen Immunsystem (s. Abb. 1.8). Die durch harmlose mit der Nahrung aufgenommene Antigene getriggerte Entstehung von  $pT_{reg}$  im Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (*mucosa-associated lymphatic tissue*, MALT) spielt eine wichtige Rolle beim Phänomen der oralen Toleranz, also einer Immunreaktion, die nach Erkennen eines Antigens keine Entzündung als Abwehr einleitet [270, 230, 200].

Aus der Nahrung aufgenommene Vorstufen von Vitamin A werden durch  $CD103^+$  DC als Tretinoin (*all-trans retinoic acid*, at-RA) abgegeben, was im Zusammenspiel mit TGF- $\beta$  zu einer FoxP3-Induktion in naiven T-Zellen führt [64]. Für die Vitamine B3 (Niacin) und B9 (Folat) konnten ebenfalls regulative Effekte auf das MALT gezeigt werden. Vitamin D bewirkt über Bindung an ein *Vitamin D Response Element* (VDRE) einer CNS des FoxP3-Gens eine verstärkte Expression [124]. Eine Hemmung der Aktivität und Proliferation von T-Effektorzellen ist die Folge [119]. Andererseits führt eine VDRE-Defizienz nicht zu relevanter Immundysregulation; die Rolle für Vitamin D in der Feinjustierung der Immunhomöostase erscheint vielschichtig und kann noch nicht abschließend bewertet werden [280].

Die Gewebeshormone Leptin und Adiponektin, welche von Adipozyten sezerniert werden, beeinflussen das Immunsystem differentiell. Leptin wird auch von  $T_{reg}$  selbst produziert und aktiviert über Leptinrezeptoren mTOR, was zur Hemmung der  $T_{reg}$ -Proliferation führt [204]. Adiponektin bewirkt eine Induktion der FoxP3-Expression und eine vermehrte Entstehung regulatorischer T-Zellen. Das viszerale Fettgewebe beherbergt eine spezialisierte  $T_{reg}$ -Subpopulation, welche sich durch Expression des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  (*peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) auszeichnet und die chronische Entzündungsaktivität hemmt, welche eine wichtige Rolle in der Pathogenese des metabolischen Syndroms spielt [59, 80].

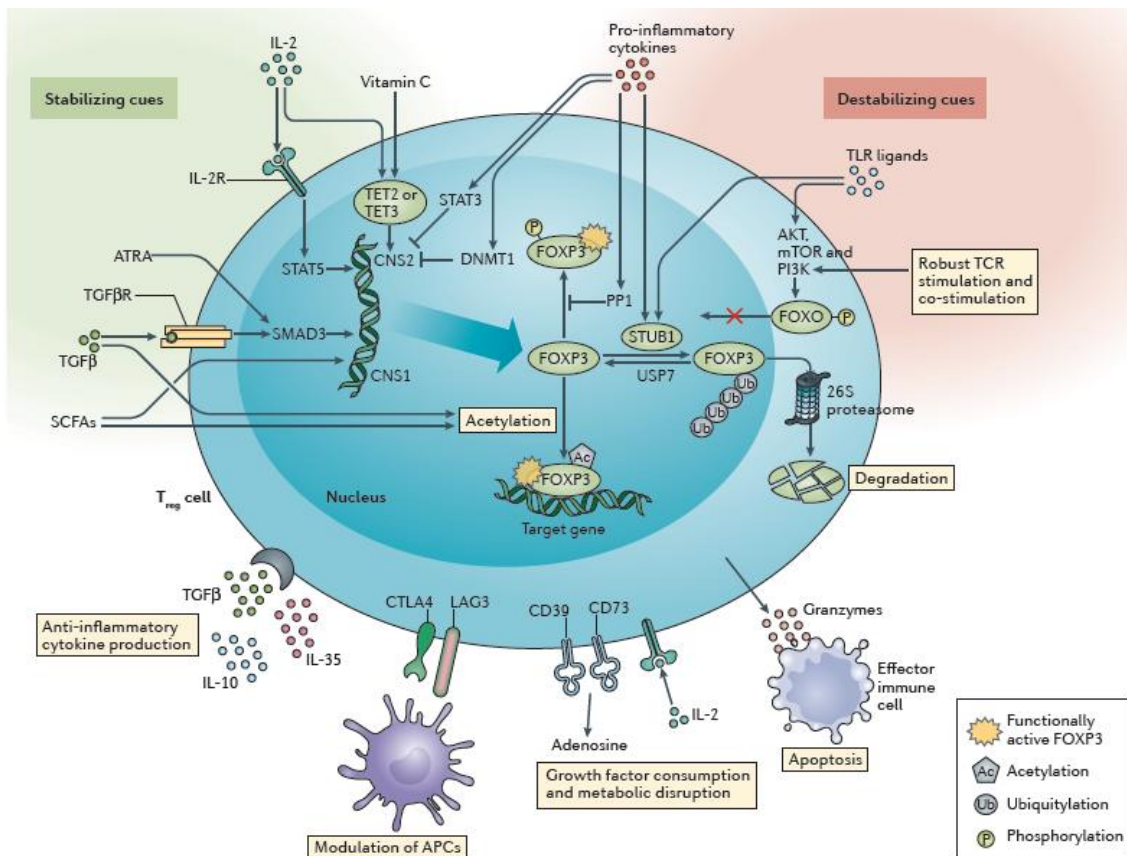


Abbildung 1.8: Das lokale Mikromilieu beeinflusst Stabilität und Funktion der regulatorischen T-Zellen. APC: *antigen-presenting cell*, ATRA: *all-trans retinoic acid*, CD39: Ectonucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1, CD73: Ecto-5'-Nucleotidase, CNS: *conserved non-coding sequence*, CTLA4: *cytotoxic t-lymphocyte antigen 4*, DNMT1: *DNA methyltransferase 1*, IL-2/IL-2R: Interleukin 2/-Rezeptor, IL-10: Interleukin 10, IL-35: Interleukin 35, FOXP3: *forkhead box protein P3*, LAG3: *lymphocyte activation gene 3 protein*, mTOR: *mechanistic target of Rapamycin*, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PP1: Proteinphosphatase 1, SCFA: *short chain fatty acid*, SMAD: Signalprotein homolog zu SMA („small“) aus *Caenorhabditis elegans* und MAD („Mothers Against Decapentaplegic“) aus *Drosophila*, STAT: *signal transducer and activator of transcription*, TET 2/3: *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2/3*, TCR: *T-cell receptor*, TGFβ/R: *transforming growth factor β/receptor*, TLR: *toll-like receptor*, USP7: *ubiquitin-specific peptidase 7*. Abbildung aus [145], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Nature Reviews Immunology. The regulation of immune tolerance by FOXP3, Ling Lu et al. © 2017.

Auch das Wechselspiel mit dem Mikrobiom des Gastrointestinaltraktes hat eine ganz entscheidende Wirkung auf das Gleichgewicht im MALT [93]. So haben etwa kurzkettige Fettsäuren (*short chain fatty acids*, SCFA) wie Butyrat, Propionat und Acetat, welche von kommensalen Mikroorganismen produziert werden, einen begünstigenden Effekt auf die Entstehung von pT<sub>reg</sub> [172, 9, 84, 241, 11]. Für spezifische Bakterienstämme wie Vertreter einiger Clostridien-Cluster und *Bacteroides fragilis* konnten direkte T<sub>reg</sub>-fördernde Mechanismen beschrieben werden. Clostridien induzieren eine verstärkte Sekretion von

TGF- $\beta$  durch Epithelzellen, während von *B. fragilis* produziertes Polysaccharid A über TLR2 (*Toll-like receptor 2*)-Bindung die Differenzierung naiver T-Zellen zu T<sub>reg</sub> und vermehrte IL-10-Sekretion bewirkt [280]. Andere mikrobielle Kommensalen wie *segmented filamentous bacteria* (SFB) führen wiederum zur Entstehung proinflammatorischer Th17-Zellen [188].

#### **1.4.6 Die Rolle regulatorischer T-Zellen in physiologischer und pathologischer Immunität**

T<sub>reg</sub> sind essenziell für die Aufrechterhaltung einer Immunhomöostase. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass es bei Fehlen oder Funktionsstörung der T<sub>reg</sub> zu schweren und im Verlauf tödlichen Autoimmunkrankheiten kommt [172, 12]. Bei der *scurfy* Maus führt eine Mutation zum Ausfall der DNA-bindenden Domäne von FoxP3 oder zum vollständigen Knockout des FoxP3-Gens. Das dadurch bedingte Fehlen FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> führt zur Entwicklung einer rasch tödlichen Multiorgan-Autoimmunkrankheit [37].

Die Ausschaltung des Genes für CD25 führt zu verminderter Zahl und Funktion der T<sub>reg</sub> und hat ähnliche Auswirkungen für den Organismus. Zusätzlich entsteht hierbei auch eine erhöhte Infektanfälligkeit, da CD25 ebenso wichtig für die Funktion aktivierter Effektor-T-Zellen ist [172].

Beim Menschen sind Mutationen im FoxP3-Gen der Pathomechanismus der seltenen Autoimmunerkrankung IPEX (*Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*) [23]. Die Betroffenen entwickeln schwere allergische Entzündung, autoimmune Polyendokrinopathie, sekretorische Diarrhö, hämolytische Anämie und Thrombozytopenie, was häufig zu einem frühen Tod führt. Die Anzahl FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> ist hierbei nicht erniedrigt, jedoch weisen sie eine eingeschränkte suppressive Funktion auf [172]. Weitere „Tregopathien“, die durch Ausfall eines Schlüsseligens zur spezifischen Senkung der T<sub>reg</sub>-Anzahl oder -Funktion und damit zu einem Zusammenbruch der Immunregulation führen, unterstreichen die Bedeutung der zellulären Suppression für eine ausgewogene Immunität [47].

Im physiologischen „*steady-state*“ eines gesunden Immunsystems halten sich Vigilanz und ständige Aktivierungsbereitschaft proinflammatorischer Zellen mit der Moderation durch suppressive Regulatorzellen die Waage. Die herausragende Bedeutung von T<sub>reg</sub> für dieses Gleichgewicht wird auch in der immunologischen Sondersituation der

Schwangerschaft deutlich. Hierbei wird der ohnehin fallstrickreiche Balanceakt der Immunhomöostase zur delikaten Gratwanderung der Fetomaternalen Toleranz, welche von den Abwehrzellen die Akzeptanz eines heranwachsenden neuen Organismus mit einer Vielzahl fremder Antigene innerhalb des Körpers verlangt, dessen Schutz ihre Aufgabe ist. Der daraus resultierende Mehrbedarf an Suppression überschießender Immunantworten spiegelt sich in der erhöhten  $T_{reg}$ -Frequenz während der Schwangerschaft wider. Insbesondere reichern sich  $pT_{reg}$  in der Plazenta an. Von den beteiligten Schleimhäuten wird die Bildung eines hemmenden Mikromilieus unterstützt; so sezernieren Uterusepithel und Trophoblast IL-10 und TGF- $\beta$  [172].

$T_{reg}$  kontrollieren allergische Reaktionen [172]. PBMC aus dem Blut atopischer Spender reagieren auf Stimulation, indem sie  $T_H2$ -Zytokine produzieren und ihre  $CD4^+CD25^+$   $T_{reg}$  weisen eine erniedrigte Suppressivität auf. Eine mögliche Erklärung für diese Funktionsminderung liefert die Hygienehypothese; Individuen, welche häufige und vielfältige Kontakte zu mikrobiellen Antigenen aus der Umwelt haben, bilden verstärkt  $T_H1/2$ -hemmendes IL-10 und TGF- $\beta$  und generieren im Zusammenhang mit der Mikrobiom-Schleimhaut-Interaktion  $T_{reg}$ . Fehlen derartige Kontakte in der Kindheit, könnte die veränderte Schleimhautflora eine effektive  $T_{reg}$ -Bildung erschweren und somit eine allergische Hyperreaktivität begünstigen [153]. Die Induktion IL-10- und TGF- $\beta$ -produzierender  $T_{reg}$  spielt auch eine Rolle bei der Spezifischen Immuntherapie [172]. In einigen Studien konnte eine verminderte Anzahl von  $T_{reg}$  in Blut und Atemwegsschleimhäuten von Asthmapatienten im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen werden [286]. Andererseits gibt es auch Hinweise auf eine krankheitsverstärkende Aktivität unprogrammierter  $T_{reg}$ , sodass deren Rolle in Entstehung und Verlauf allergischer Erkrankungen vielschichtig erscheint [177].

Bei verschiedenen chronisch entzündlichen und Autoimmunkrankheiten kann eine verminderte Anzahl oder gestörte Funktion der  $T_{reg}$  nachgewiesen werden [40]. Die Messung von  $T_{reg}$  in einer chronisch inflammatorischen bzw. immunaktiven Umgebung wird allerdings dadurch erschwert, dass ihre derzeit definierten Marker, welche unter physiologischen Bedingungen ausreichend spezifisch sind, auch von aktivierten Effektorzellen exprimiert werden [3]. So können in Studien zu Psoriasis nicht durchgängig erniedrigte  $T_{reg}$ -Frequenzen gemessen werden, wenngleich funktionelle Untersuchungen eine eingeschränkte Suppressivität darstellen können sowie eine Normalisierung unter immunmodulatorischer Therapie [184]. Auch eine Metaanalyse zur Messung von  $T_{reg}$  im Blut von

Patienten mit Systemischem Lupus erythematosus (SLE) zeigte eine weite Streuung der Ergebnisse in Abhängigkeit von der verwendeten Definition [283]. In der Synovialflüssigkeit befallener Gelenke von Patienten mit Rheumatoider Arthritis können hohe Anteile CD25<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden, die *in vitro* eine intakte Suppressivität zeigen [45]. Bei Multiple Sklerose-Patienten kann eine verminderte Suppressivität der T<sub>reg</sub> bei unveränderter Anzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden [65, 263]. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Diabetes mellitus Typ 1 gemacht [140]. Entstehungsmodelle für Morbus Crohn beinhalten eine dysregulierte Schleimhautimmunität, wodurch es zu verstärktem Kontakt kommensaler Mikroorganismen mit Immunzellen kommt, welcher physiologischerweise durch verschiedene Mechanismen wie Mukusproduktion und antimikrobielle Peptide aus Epithel- und Panethzellen eingeschränkt wird, eine Überreaktivität proinflammatorischer T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen, sowie fehlende Aktivität lokaler T<sub>reg</sub>, welche unter homöostatischen Umständen eine Immunantwort gegen Elemente der Darmflora unterdrücken [172, 265]. Die T<sub>reg</sub>-Frequenz ist bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung erniedrigt [75].

Experimentelle Studien konnten darstellen, dass die Depletion CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> zu beschleunigter *Graft-versus-Host disease* (GvHD) und Tod führte. Die gleichzeitige Gabe expandierter T<sub>reg</sub> hingegen konnte das Einsetzen der Krankheit und den Tod verzögern oder verhindern. Erste klinische Studien können diese Effekte beim Menschen bestätigen [259]. Auch bei der Transplantation solider Organe kann eine T<sub>reg</sub>-Therapie die Abstoßungsreaktion verzögern [172].

Unter den Tumordinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) bei verschiedenen Krebserkrankungen findet sich eine erheblich größere Frequenz an T<sub>reg</sub> als im restlichen Organismus, was konzeptionell als Hinweis darauf verstanden werden kann, dass Tumorzellen aktiv T<sub>reg</sub> rekrutieren, um sich vor dem Zugriff der Tumormunität zu schützen [248, 227, 143, 272, 182, 116, 225, 107, 66, 226, 176]. Das TCR-Repertoire der T<sub>reg</sub> im TME (*Tumor Microenvironment*) zeigt erhöhte Spezifität für Tumorantigene, welche sich auch systemisch nachweisen lässt [180]. Eine Metastudie konnte eine signifikante Verschlechterung der Überlebenswahrscheinlichkeit durch erhöhte Frequenzen tumorinfiltrierender FoxP3<sup>+</sup> Zellen über alle eingeschlossenen Studien zu verschiedenen Krebserkrankungen darstellen, wobei sich starke Diskrepanzen zwischen den einzelnen Entitäten und Tumorstadien zeigten, was mitunter auch auf die Heterogenität von T<sub>reg</sub> zurückzuführen sein könnte [234]. Bei Brustkrebs, der Tumorerkrankung mit der besten Studienlage, zeigen sich

ebenso widersprüchliche Aussagen, welche unter anderem je nach molekularem Subtyp variieren, sodass man derzeit insgesamt von einer komplexeren Lage ausgehen muss und die FoxP3<sup>+</sup>-Frequenz im Tumordinfiltrat als alleiniger prognostischer Marker abzulehnen ist.

Bei akuten und chronischen Infektionen bewirken T<sub>reg</sub> eine Dämpfung der Immunreaktion zum Schutz vor Schädigung des eigenen Gewebes [233, 172, 10]. In einigen Fällen können Erreger pT<sub>reg</sub> induzieren, bzw. sorgen über Erhöhung der Konzentration von TGF-β für die optimalen Voraussetzungen dafür [118]. So ergibt sich eine ambivalente Rolle für T<sub>reg</sub> zwischen der Eindämmung überschießender Immunantwort und der Möglichkeit zur Chronifizierung einer Infektion, wenn pathogene Erreger von der regulatorischen Aktivität profitieren und sich im Wirtsorganismus etablieren [102, 149, 22]. Bei Infektionen mit SARS-CoV-2 (*coronavirus disease 2019*, COVID-19) korreliert die T<sub>reg</sub>-Frequenz im Blut invers mit der Schwere der Erkrankung, möglicherweise aufgrund einer Rekrutierung in Lungengewebe zur Regulierung der Schädigung [242, 10, 67, 58].

## 1.5 Ansatzpunkte für neue Therapien auf Grundlage der T<sub>reg</sub>-Biologie

Aus der Entdeckung und fortschreitenden Erforschung der T<sub>reg</sub> ergeben sich einige Ansatzpunkte für neue Therapien bei Autoimmun-, Infektions-, und Tumorerkrankungen. In Frage kommen die Gabe von T<sub>reg</sub> als Zelltherapie oder die pharmakologische Manipulation ihrer Entstehung, Stabilität und Funktion.

Grundsätzlich können hier zwei Richtungen für Interventionen überlegt werden; zum einen die Bestärkung bzw. Wiederherstellung der T<sub>reg</sub>-Funktionalität bei Erkrankungen, die eine inadäquate Toleranz aufweisen, sodass autoreaktive Zellen nicht genügend gehemmt werden, wie es etwa bei Rheumatoider Arthritis (RA) oder Multipler Sklerose (MS) als Teil der Pathogenese beschrieben wird. Zum anderen können T<sub>reg</sub>-Funktionsmechanismen dort beschränkt werden, wo sie einer angemessenen Infektionsabwehr oder Tumormunität im Wege stehen (s. Abb. 1.9).

Einige dieser Ansätze sind über die konzeptionelle Phase bereits weit hinaus und werden in ersten klinischen Studien erprobt.

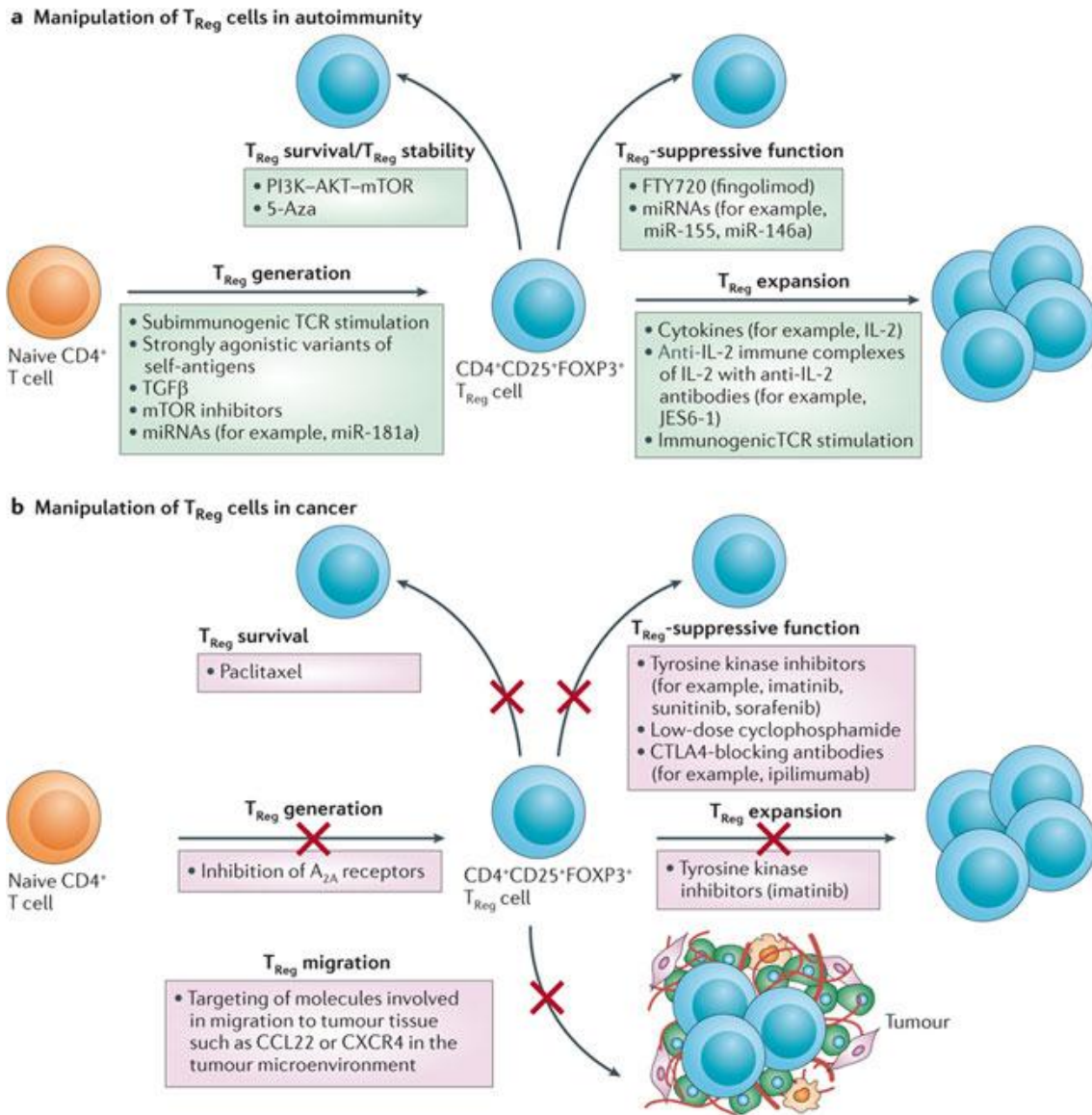


Abbildung 1.9: Therapeutische Ansätze der T<sub>Reg</sub>-Biologie. a stellt die Möglichkeiten zur Stärkung von Entstehung, Funktion, und Stabilität der T<sub>Reg</sub> dar, um Autoimmunität einzuschränken, b zeigt Angriffspunkte zur T<sub>Reg</sub>-Hemmung mit dem Ziel einer stärkeren Tumorimmunität. Abbildung aus [30], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Nature Reviews Drug Discovery, Therapeutic opportunities for manipulating TReg cells in autoimmunity and cancer, Harald von Boehmer et al. © 2012.

### 1.5.1 Adoptive Zelltherapie oder Expansionsinduktion regulatorischer T-Zellen zur Verstärkung ihrer suppressiven Funktion

Die Gabe von T<sub>reg</sub> als Zelltherapie (*adoptive cell therapy*, ACT) bei der Transplantation solider Organe wurde in experimentellen Modellen erfolgreich angewendet, um langfristige Toleranz zu erreichen und gleichzeitig die Anwendung immunsuppressiver Medikamente mit ihren gefährlichen Nebenwirkungen zu vermindern [250]. Erste Berichte geben Hinweise auf Effektivität und Sicherheit in der Anwendung bei Menschen [255, 154, 203], obwohl rare Studien an Primaten widersprüchliche Ergebnisse liefern.

Die Anwendung von T<sub>reg</sub> zur Prophylaxe bzw. Therapie akuter und chronischer *Graft-versus-Host disease* (GvHD) zeigte in Tierexperimenten bereits vielversprechende Ergebnisse [104, 201]. Pilotstudien bei Menschen konnten ebenfalls eine Wirksamkeit in der Vorbeugung der akuten GvHD unter Reduktion bzw. Verzicht traditioneller immunsuppressiver Therapien nachweisen [72, 38, 39]. Herausforderungen auf dem Weg in die klinische Routine betreffen die optimale Wahl, Amplifikation und Kultivierung der T<sub>reg</sub> [195].

Die klinisch bereits lange Zeit angewandte und erprobte spezifische Immuntherapie als „Impfung“ gegen Allergien verdankt ihre Wirksamkeit unter anderem der Ausschüttung von IL-10 und TGF- $\beta$  sowie der damit verbundenen Verstärkung der T<sub>reg</sub>-Wirkung [42].

Tierexperimentelle Daten weisen darauf hin, dass unter bestimmten Umständen erzeugte T<sub>reg</sub> die Entstehung von Diabetes im NOD (*nonobese diabetic mouse*) - Modell und von MS-ähnlicher Neurodegeneration im EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) - Modell verhindern können [31, 278, 156, 68, 224]. T<sub>reg</sub>-Zelltherapie zur Behandlung von Typ-1-Diabetes wird ebenfalls in klinischen Vorstudien untersucht und zeigt eine gute Sicherheit und Verträglichkeit [28]. Die Anwendung T<sub>reg</sub>-basierter Zelltherapie bei Krankheiten mit eng umschriebenen autoantigenen Triggern erfordert möglicherweise die Selektion oder Genmanipulation der eingesetzten Zellen, um eine antigenspezifische Aktivität zu erreichen [29]. Ausgehend von dem Erfolg der 2017 von der FDA (*food and drug administration* der USA) zugelassenen CAR-T (*chimeric antigen receptor T cell*)-Therapie gegen Leukämie [175] bestehen derzeit etliche Bestrebungen und vielversprechende Ansätze, die Fortschritte in der Erkenntnis über T<sub>reg</sub> und die Durchbrüche in molekularbiologischen Methoden wie CRISPR-basiertes Genediting zu vereinen, um krankheitsspezifische Suppressorzellen zu kreieren [79, 164, 56, 231]. So vermindern CAR-

T<sub>reg</sub> mit Spezifität für Lungenepithel in experimentellen Studien die Krankheitsaktivität des Asthma-Modells EAAI (*experimental allergic airway inflammation*) [239, 77].

Auch für chronisch entzündliche Erkrankungen werden T<sub>reg</sub>-basierte Therapieansätze untersucht. Tierversuche konnten die Wirksamkeit einer Gabe von T<sub>reg</sub> zur Reduktion von Darmentzündung nachweisen [171, 178]. Die adoptive Zelltherapie mit Ovalbumin-spezifischen T<sub>reg</sub> zeigt in klinischen Studien eine gute Verträglichkeit und vielversprechende Wirkung in der Behandlung refraktärer chronisch entzündlicher Colitis (Morbus Crohn) [71]. Bei der TRIBUTE-Studie werden T<sub>reg</sub> vor der Gabe mittels RAR $\alpha$  (*retinoic acid receptor  $\alpha$* ) - Agonismus zur Expression von Integrin  $\alpha 4\beta 7$  angeregt, um die Anreicherung der therapeutischen Zellen mittels MAdCAM-1 (*mucosal vascular adressin cell adhesion molecule 1*) in den intestinalen Schleimhäuten zu erreichen [60].

In einer Pilotstudie bei einigen Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS) zeigte die T<sub>reg</sub>-Zelltherapie gute Verträglichkeit und Hinweise auf Wirksamkeit in Form einer Progressionsverlangsamung [252].

Bei einzelnen Patienten mit kritischer COVID-19-Erkrankung wurde neben maximalen intensivmedizinischen Anstrengungen auch die Gabe eines T<sub>reg</sub>-Produktes eingesetzt, welche möglicherweise entscheidend an der klinischen Besserung beteiligt war, sodass entsprechende Studien angeregt wurden [2, 94, 242].

Neben dem Einsatz von T<sub>reg</sub> als Zelltherapie besteht die Möglichkeit der selektiven pharmakologischen Stimulation. Erfolg versprechend ist der Ansatz, über niedrig dosiertes IL-2 die Anzahl der zirkulierenden T<sub>reg</sub> zu erhöhen [103]. Die Ausnutzung der Mechanismen der oralen Toleranz zur T<sub>reg</sub>-Induktion als Therapieansatz wurde in Tierversuchen bereits für verschiedene Autoimmunkrankheiten und Allergien erfolgreich demonstriert [270, 78, 41]. Diese aufgrund ihrer Einfachheit, Sicherheit und Kosteneffektivität attraktive Methode zeigt auch in einigen klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse, wobei Auswahl der Kandidaten für eine Intervention, der optimale Zeitpunkt und das genaue Protokoll große Herausforderungen darstellen [34, 150, 200].

Bei aller Euphorie über erste Erfolge bestehen jedoch weiterhin grundlegende Limitationen für die Anwendung T<sub>reg</sub>-basierter Therapien, insbesondere im Hinblick auf die vorliegende Arbeit der Bedarf an Oberflächenmarkern zur zuverlässigen (Sub-) Typisierung stabiler regulatorischer T-Lymphozyten [237].

### **1.5.2 Depletion oder Hemmung regulatorischer T-Lymphozyten zur Stärkung antitumoröser oder antiinfektiöser Immunität**

Da die Antitumorimmunität eines Organismus der Hemmung tumorinfiltrierender  $T_{reg}$  unterliegt, muss eine effektive immunmodulatorische Krebstherapie diese Aktivität unterbinden oder umlenken. Die vollständige Entfernung aller  $T_{reg}$  führt im Mausmodell zwar zu erhöhter Tumorimmunität bis hin zur Heilung, birgt beim Menschen jedoch unter anderem das Risiko der Auslösung verheerender Autoimmunität [249].

Einige bereits erprobte und angewandte Therapien bestimmter Neoplasien beinhalten eine gegen  $T_{reg}$  gerichtete Komponente, wie etwa CD25- oder CTLA-4-Antikörper, welche die Frequenz regulatorischer T-Zellen im Tumordinfiltrat senken [127]. Andere Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI), insbesondere PD-1-Antikörper führen bei einem Teil der behandelten Patienten zu einer beschleunigten Tumorrogression, welche möglicherweise auf einen stimulierenden Effekt auf  $T_{reg}$  zurückzuführen ist [249].

Für etablierte und bereits lange Zeit verwendete Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid oder Tyrosin-Kinase-Inhibitoren kann eine hemmende Wirkung auf  $T_{reg}$  gezeigt werden. Weiterhin kann durch Aktivierung einiger Signalwege die Resistenz von Effektor-T-Zellen gegen die Hemmung durch  $T_{reg}$  erhöht werden [101]. Vielversprechend ist der Ansatz, das Verhältnis zwischen Zellen, welche aktiv Krebszellen angreifen und solchen, die diese Immunität hemmen, durch Botenstoffe günstig zu beeinflussen. So fördert eine hochdosierte IL-2-Gabe in einem präklinischen Versuch die Aktivität tumorinfiltrierender  $CD8^+$  T-Zellen, während sie die Expansion der  $T_{reg}$  hemmt [48].

Im Gegensatz zum ausgeprägten Interesse der Forschungsgemeinschaft an der therapeutischen Blockade regulatorischer T-Zellen im Rahmen von Krebs-Immuntherapien gibt es nur wenige Untersuchungen zur Behandlung von Infektionskrankheiten durch Modulation oder Unterbrechung der  $T_{reg}$ -Aktivität [74]. Ausgehend von den Erfahrungen mit  $T_{reg}$ -Blockade bei Tumorthérapien gibt es Ansätze zur Verwendung von ICI zur Verbesserung der Impfwirksamkeit durch Hemmung der  $T_{reg}$ -basierten Einschränkung einer erwünschten Immunantwort [174, 168]. In einem Modell chronischer retroviraler Infektion konnte die Verbindung von  $T_{reg}$ -Depletion und ICI die Aktivität  $CD8^+$  T-Zellen erhöhen und die Viruslast reduzieren [73].

Zusammenfassend lassen sich viele neue Ansatzpunkte für bahnbrechende Therapien aus den Möglichkeiten der  $T_{reg}$  ableiten. Parallel zur beginnenden klinischen Anwendung sind

weiterhin viele grundlegende Fragen zu Beschaffenheit und Verhalten der  $T_{reg}$  zu beantworten.

## 1.6 Fragestellung

Aus den dargestellten Erkenntnissen und Fragestellungen entwickelten sich auf der Suche nach neuen Einblicken in Charakterisierung und Heterogenität der  $T_{reg}$  folgende konkrete Fragen;

- Können mittels eines systematischen Screenings weitere Oberflächenmoleküle identifiziert werden, die eine neue Definition von  $T_{reg}$  ermöglichen?
- Welche  $T_{reg}$ -Subpopulationen können im Screening dargestellt werden?
- Ergeben sich aus genauerer Phänotypisierung neue funktionelle Ansätze?

Systematik und Aufbau der Fragestellungen und experimentellen Herangehensweisen können mittels folgenden Schemas verfolgt werden:

1. Schritt: Etablierung einer Gatingstrategie zur Differenzierung von  $T_{reg}$   
Welche Oberflächenmarker korrelieren am stärksten mit FoxP3-Expression?  
⇒ Vergleich gegenwärtiger Gating-Strategien mit FoxP3-Intrazellulärfärbung
2. Schritt: Durchführung eines ergebnisoffenen systematischen Screenings  
Können neue  $T_{reg}$ -Marker oder -Subpopulationen identifiziert werden?  
Bestätigen sich bereits beschriebene Expressionsmuster?  
⇒ Multiparameter-Oberflächenfärbung mit 332 Antikörpern
3. Schritt: Validierung der Kandidaten  
Korreliert die Expression der gefundenen Oberflächenmarker mit FoxP3?  
⇒ Intrazellulärfärbung mit FoxP3
4. Schritt: Funktionelle Untersuchung der Suppressivität  
Eignen sich die neuen Marker zur CD25-unabhängigen Isolierung suppressiver T-Zellen?  
⇒ Zell-Sorting und CFSE-Suppressionsassay
5. Schritt: Hinweise auf sekretorische Aktivität  
Welche Zytokine könnten bei der suppressorischen Aktivität der neu definierten Populationen eine Rolle spielen?  
⇒ Zytokinanalyse der Überstände aus den Suppressionsversuchen

## 2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Reagenzien, Pufferlösungen und Medien

Substanz	Bezugsquelle
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS: Phosphate Buffered Saline) pH 7,2	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), <i>Titriplex®III</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>X-Vivo™ 15</i> , Serum-freies Medium	Lonza, Köln, Deutschland
Fetales Kälberserum FCS Gold	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Hitze-inaktiviertes humanes AB-Serum	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
<i>Ficoll-Paque™ Plus</i> Trennmedium (Dichte: 1.077 g/ml)	GE-Healthcare, Uppsala, Schweden
<i>Biocoll Separating Solution</i> Trennmedium (Dichte: 1.077 g/ml)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
<i>EasySep™ Human CD4+ T Cell Enrichment Kit</i> Antikörper-Set zur negativen Selektion	Stemcell Technologies, Vancouver, Canada
<i>Gamunex® 10% (100mg/ml)</i> Immunglobulin G	Talecris Biotherapeutics, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>True Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set</i> Pufferlösungen für Intrazellulärfärbung	Biolegend, San Diego, CA, USA
<i>CellTrace™</i> CFSE (Carboxyfluoresceindiacetat-succinimidylester)	Invitrogen, Paisley, UK
CD3- und CD28-Antikörper	Biolegend, San Diego, CA, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Sytox® Blue Dead Cell Stain</i>	Invitrogen, Paisley, UK
<i>LegendPlex® Human Th Cytokine Panel</i>	Biolegend, San Diego, CA, USA
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2.2: Fluorochrom-konjugierte Antikörper

Epitop	Konjugat	Klon	Hersteller
CD3	Brilliant Violet 510	UCHT1	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD4	FITC	RPA-T4	BioLegend
CD4	APC-Cy7	RPA-T4	BioLegend
CD8a	APC	RPA-T8	BioLegend
CD25	PE-Cy7	M-A251	BioLegend
CD25	FITC		BD Pharmingen, Heidelberg
CD35	FITC		Beckman Coulter, Krefeld
CD45RO	APC-Cy7	UCHL1	BioLegend
CD49a	PE		BioLegend
CD85a	PE	MKT5.1	BioLegend
CD127	Brilliant Violet 421	A019D5	BioLegend
CD127	PE-Cy7	A019D5	BioLegend
CD197	Brilliant Violet 510	G043H7	BioLegend
CD200R	PE	OX-108	BioLegend
CD272 (BTLA)	Brilliant Violet 421	MIH26	BioLegend
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	L243	BioLegend
Integrin $\beta$ 7	PerCP-Cy5.5	FIB27	BioLegend
FOXP3	Alexa Fluor 647	206D	BioLegend
LEGENDScreen™ (332 Spezifitäten, s. Anhang)	PE		BioLegend
Mouse IgG1	FITC	MOPC-21	BioLegend
Mouse IgG2a	APC-Cy7	MOPC-173	BioLegend
Mouse IgG2a	PerCP-Cy5.5	MOPC-173	BioLegend
Mouse IgG1	Brilliant Violet 421	MOPC-21	BioLegend
Mouse IgG1	PE-Cy7	MOPC-21	BioLegend
Mouse IgG1	Alexa Fluor 647	MOPC-21	BioLegend
Mouse IgG1	APC-Cy7	MOPC-21	BioLegend
Mouse IgG2a	APC	MOPC-173	BioLegend

**Tabelle 2.3: Laborzubehör**

Produkt	Hersteller
Pipettenspitzen: Biosphere® Tip 10µl farblos (REF 70.1130.200) Biosphere® Tip 200µl gelb (REF 70.760.202) Pipettenspitze 1000µl blau (REF 70.762.010) Pipettenspitze 5ml, Typ Eppend. (REF 70.1183.102)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten: MicroOne® 10, MicroOne® 300, ErgoOne® 10, ErgoOne® 200	Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipetten: Research 2,5; 10; 100 Research plus 1000, 5ml, 10ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Stabpipetten 5ml, 10ml, 20ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße: SafeSeal Microcentrifuge Tubes 0,65 ml	Sorenson™ Bioscience, Salt Lake City, UT, USA
Reagiergefaß 2,0 ml SafeSeal	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (1ml; 2,5ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cellstar® Konische Röhrchen, 15 ml, Polypropylen	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Falcon® Konische Röhrchen, 15 ml, Polypropylen, 17x120mm style	Corning Science, Tamaulipas, Mexico
Falcon® Konische Röhrchen, 50ml, Polypropylen, 30x115mm style	Corning Science, Tamaulipas, Mexico
Falcon® Rundbodenröhrchen, 14ml Polystyrol, 17x100mm Style	Corning Science, Tamaulipas, Mexico
FACS-Röhren (5ml, 75 x 12 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Cellstar® 96 well round bottom Kulturplatten	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
“The Big Easy” Silver EASYSEP™ Magnet	Stemcell Technologies, Vancouver, Canada
Wasserbad WNB 10	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Rotina 380	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Sterilbank <i>Hera safe</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brutschrank <i>HERAcell®240 CO<sub>2</sub> Incubator</i>	Kendro, Hanau, Deutschland
Reagenzglasschüttler	VWR, Darmstadt, Deutschland
Neubaukammer	VWR, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.4: Geräte, Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
Automatischer Hämatologie-Analysator KX-21 N	Sysmex, Norderstedt, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCanto II	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer und Zellsorter FACSAria III	Becton Dickinson
FACSDiva Software 8.0.1	Becton Dickinson
Prism 6.01	GraphPad, San Diego, CA, USA
Excel	Microsoft, Albuquerque, NM, USA

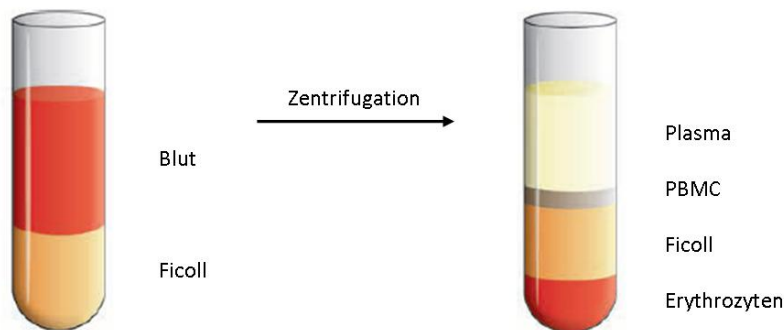
## 2.1 Herkunft der Proben

Zur Probengewinnung wurden Restblutmaterialien (*Buffy Coats*) verwendet, die bei der Verarbeitung von Vollblutspenden in der Blutbank der Universitätsklinik Gießen als Nebenprodukte anfielen. Dabei handelt es sich um den Teil des Blutes, der übrigbleibt, nachdem die roten Blutkörperchen für Erythrozytenkonzentrate einerseits und die flüssigen Bestandteile für Frischplasmapräparate andererseits getrennt wurden. Die Proben stammten ausnahmslos von gesunden, erwachsenen Spendern unter 40 Jahren, die schriftlich der Verwendung ihres Blutes zu Forschungszwecken zugestimmt hatten. Diese Verfahrensweise entspricht dem Votum der Ethikkommission der Universität Gießen (Antrag Nr. 05/00). Die *Buffy Coats* wurden stets am selben Tag für Experimente verwendet, an dem sie gespendet und fraktioniert wurden.

## 2.2 Isolierung von PBMC aus *Buffy Coats* mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Da *Buffy Coats* immer noch beträchtliche Mengen an Plasma, Erythrozyten und Thrombozyten enthalten, kam die Dichtegradienten-Zentrifugation mit dem Trennmedium Ficoll, einem stark verzweigten synthetischen Polysaccharid, zum Einsatz, um die *Buffy Coats* weiter aufzureinigen und die gewünschte Leukozytenfraktion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) zu erhalten. Hierbei macht man sich zunutze, dass sich Blutzellen in ihrer Dichte voneinander unterscheiden, wodurch die dichteren Zellen (Erythrozyten, Granulozyten) bei Zentrifugation

und Sedimentation schneller absinken. Die Sedimentationskoeffizienten der verschiedenen Zellpopulationen des Blutes bewegen sich jedoch in einem sehr engen Variationsbereich, weswegen zu ihrer Auftrennung ein Dichtegradient herangezogen werden muss. Die Trennschärfe der Zentrifugation wird erhöht durch die Anwendung eines Mediums von definierter Dichte (Ficoll-Paque™ Plus (Dichte: 1.077g/ml), GE-Healthcare, Uppsala, Schweden), die zwischen den unerwünschten und den erwünschten Zellen liegt, sodass diese unter- bzw. oberhalb des Mediums zu liegen kommen (siehe Abbildung 2.1) [35]. Zusätzlich wird die Sedimentation der Erythrozyten durch Agglutination bei Kontakt mit Ficoll beschleunigt.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der Dichtegradienten-Zentrifugation. Die erwünschte Zellfraktion der PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) kommt nach Zentrifugation zwischen dem Trennmedium und dem Plasma zu liegen. Abbildung modifiziert aus [89], mit freundlicher Genehmigung durch Cytiva: GE Healthcare. *Isolation of mononuclear cells: Methodology and applications*, S. 7 © 1983–2014 General Electric Company.

Das Blut aus den *Buffy Coats* wurde im Verhältnis 2:3 mit PBS verdünnt und jeweils 35ml in einem 50ml Falcon-Röhrchen vorsichtig auf 15ml Ficoll geschichtet. Nach 30 Minuten Zentrifugation ohne Bremse bei 500RCF und Raumtemperatur wurde der Interphasering zwischen Ficoll und Blutplasma, welcher die PBMC enthält, mittels Pasteurpipette entnommen. Um Thrombozyten und restliche Kontaminationen zu entfernen, wurden ein Waschschriff mit 400RCF für 5 Minuten und zwei Waschschriffe mit 100RCF für jeweils 10 Minuten mit PBS angeschlossen. Die Qualität der Aufreinigung und die Ausbeute an isolierten Zellen wurden am automatischen Zellzähler überprüft.

### **2.3 Anreicherung von CD4<sup>+</sup> Zellen mittels magnetischer Negativselektion**

Bei Experimenten, deren Fragestellung sich auf CD4<sup>+</sup> Zellen beschränkte, wurde eine negative Selektion mit dem „EasySep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit“ vorgenommen. Dieses enthält eine Mischung von Antikörpern, die gegen verschiedene Epitope gerichtet sind, welche nicht von CD4<sup>+</sup> Zellen exprimiert werden. Durch Kopplung an Magnetpartikel können die so markierten Zellen in einem Magnetfeld von den unmarkierten CD4<sup>+</sup> Zellen getrennt werden.

Entsprechend der Angaben im Protokoll des Herstellers wurde eine Zellsuspension von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml in Pufferlösung (PBS + 2%FCS mit 1mM EDTA) in einem 14ml Polystyrol-Röhrchen vorbereitet. Pro 1ml wurden nun 50µl des Antikörper-Cocktails zugegeben, vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die durch ausgiebiges Vortexen homogenisierten Magnetpartikel wurden für weitere 5 Minuten untergemischt. Anschließend wurde die Lösung mit Pufferlösung auf 10ml aufgefüllt und nach mehrmaligem Mischen für 5 Minuten ohne Deckel in einen passenden Magneten gestellt („The Big Easy“ Silver EASYSEP™ Magnet). Daraufhin wurde die ungelabelte Fraktion in ein neues Röhrchen abgeschüttet und ihre Reinheit im Durchflusszytometer nach Anfärbung von CD4 überprüft.

### **2.4 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie hat sich seit der Markteinführung in den 1970er Jahren als eine Standardmethode der quantitativen Messung auf Einzelzellebene etabliert. Sie bietet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten von der simplen Zell-, Bakterien- oder Partikelzählung über die Charakterisierung von molekularen Profilen bis hin zu Zellzyklusanalysen, Proliferations- oder Zytotoxizitätsmessungen [105].

Die grundlegenden Prinzipien der Durchflusszytometrie sind die Herstellung eines Probenstromes, in dem einzelne Zellen hintereinander aufgereiht einen Lichtstrahl passieren (hydrodynamische Fokussierung), die optische Verarbeitung der dadurch entstehenden Brechungs- und Streuungsphänomene und schließlich die Erzeugung proportionaler elektrischer Signale, die digitalisiert am Computer analysiert werden können.

Die hydrodynamische Fokussierung entsteht, indem die Probe unter Druck in eine Messküvette transportiert und von einem Hüllstrom aus Trägerflüssigkeit umgeben wird, der

den sogenannten Probenkern in der Messkammer zentriert (Abb. 2.2). Durch Änderung des Drucks kann beeinflusst werden, ob die Zellen strenger hintereinander eingestellt sind oder zugunsten einer schnelleren Messung teilweise nicht absolut mittig durch den Laserstrahl fließen.

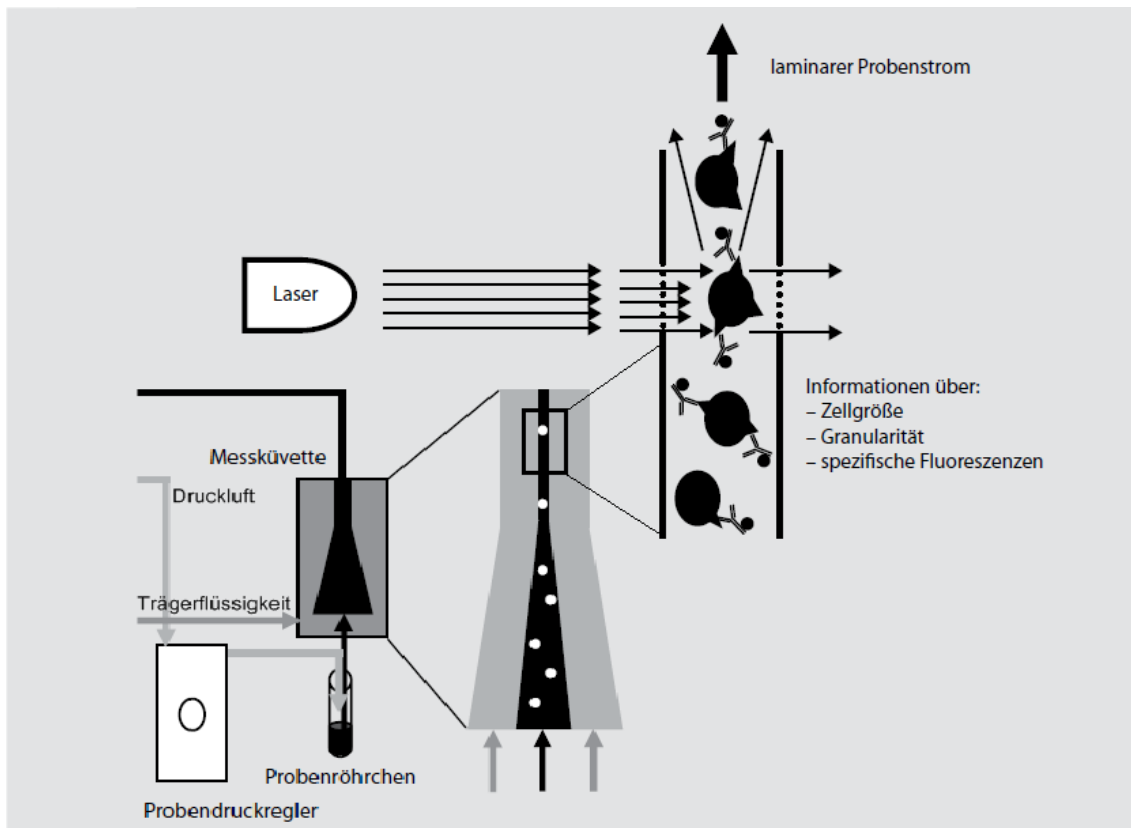


Abbildung 2.2: Grundprinzip der Durchflusszytometrie. Zellen werden durch hydrodynamische Fokussierung im Probenkern zentriert und fließen in einem laminaren Strom durch die Messküvette. Der Laserstrahl trifft auf die Probe, sodass die optischen Streuphänomene Rückschlüsse auf Eigenschaften der Zelle erlauben. Abbildung modifiziert nach [146], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Der Experimentator: Immunologie. Durchflusszytometrie von Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper et al. © 2014.

Das monochromatische (also nur eine bestimmte Wellenlänge enthaltende) Licht, welches der Probenstrom durchfließt, wird durch Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) erzeugt. Das reflektierte und gestreute Licht wird durch Spiegel, Prismen, Linsen und Filter sortiert und zu Photodetektoren gelenkt (Abb. 2.3).

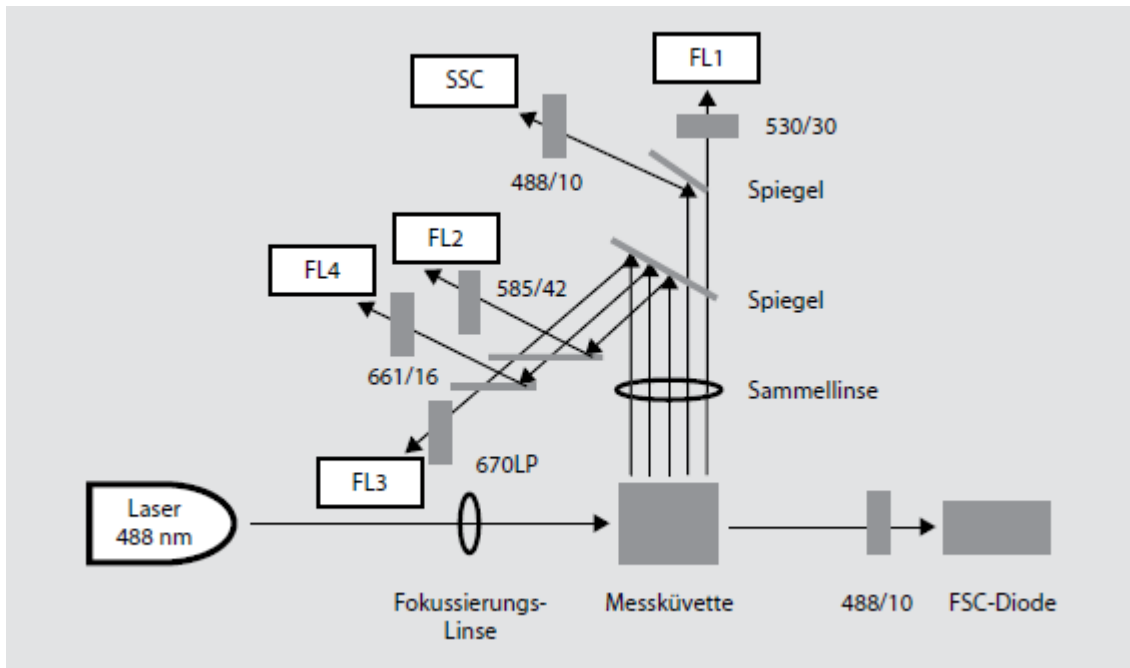


Abbildung 2.3: Beispiel eines optischen Systems mit vier Fluoreszenzkanälen. Das Streulicht eines monochromatischen Lasers wird durch Spiegel und Filter zu Photodetektoren gelenkt. Die FSC-Diode (*forward scatter*) registriert ein größenproportionales Signal in orthotoper Richtung hinter der Messküvette („Zellschatten“). Das Streulicht, welches den SSC-Detektor (*side scatter*) erreicht, liefert Informationen zur Granularität der Zelle. FL1-4 detektieren Licht spezifischer Wellenlängen, welches von Fluorochromen emittiert wird. 488/10, 530/30, 585/42, 661/16: Bandpassfilter; 670LP: Longpassfilter. Abbildung aus [146], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Der Experimentator: Immunologie. Durchflusszytometrie von Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper et al. © 2014.

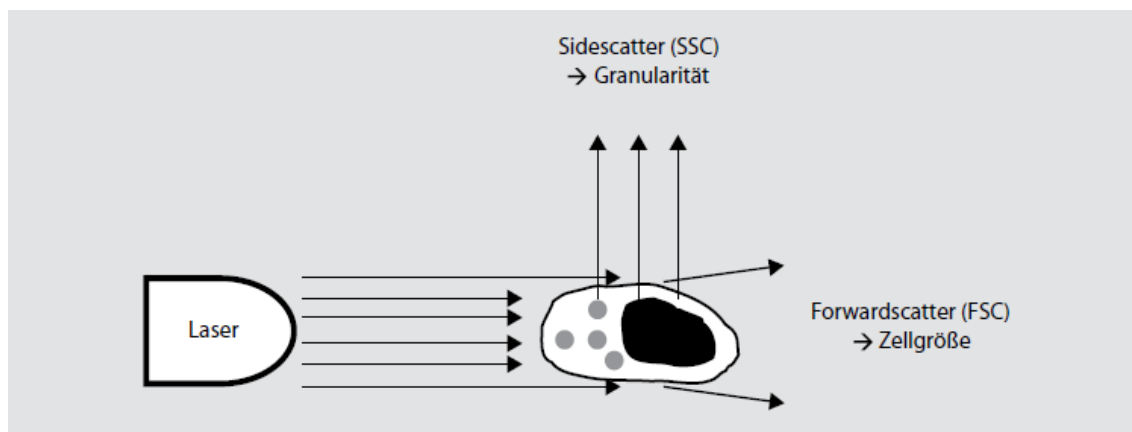
Je nach Gerät kommen verschiedene Lasertypen zum Einsatz, die auch miteinander kombiniert werden können. Das für die vorliegenden Experimente hauptsächlich verwendete Zytometer FACSCanto™ II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) verfügt über drei Laser, die in Tabelle 2.5 genauer charakterisiert sind.

Tabelle 2.5: Beschreibung der Laser des BD FACSCanto II. Aufgelistet sind die Bezeichnung des Herstellers, Wellenlänge des ausgestrahlten Lichts, sowie einige Fluorochrome, deren Exzitationsmaxima im entsprechenden Bereich liegen.

Laser	Wellenlänge (nm)	Fluorochrome
Coherent® Sapphire™ Solid State	488 (blau)	FITC, PE, PE-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5
JDS Uniphase™ 1144-P HeNe Air Cooled	633 (rot)	APC, APC-Cy7
Point Source™ iFLEX™ 2000- P-1-405-0.65-30-NP	405 (violett)	Pacific Blue™, AmCyan

Im Durchflusszytometer können bei bis zu  $10^4$  Zellen pro Sekunde mehrere Parameter gleichzeitig erfasst werden, die einen Rückschluss auf Art und Beschaffenheit der gemessenen Zelle erlauben.

Das Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches geradeaus hinter dem Probenstrom aufgefangen wird, also gewissermaßen der Schatten der gemessenen Zelle, ist proportional zu ihrer Größe. Das Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC) dient als Maß für die Granularität der Zelle, also ob sie eher homogen beschaffen ist oder nicht (Abb. 2.4). Je mehr unterschiedliche Strukturen der Zelle das Licht in verschiedene Richtungen brechen, desto höher ist das SSC-Signal. Allein mit diesen beiden Werten lassen sich die Leukozyten des menschlichen Blutes schon in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterscheiden (siehe Abb. 2.5).



**Abbildung 2.4: Forwardscatter und Sidescatter.** Das in Verlängerung des Laserstrahls gestreute Licht (*forward scatter*, FSC) entspricht der relativen Zellgröße. Seitlich abgelenktes Licht (*side scatter*, SSC) wird als Parameter für die Granularität der Zellen herangezogen. Abbildung aus [146], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Der Experimentator: Immunologie. Durchflusszytometrie von Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper et al. © 2014.

Die Möglichkeit, immer kleinere Zellgruppen voneinander abzugrenzen, wird durch die Markierung von Zellstrukturen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern erreicht. Zur Messung werden diese Antikörper mit fluoreszierenden Molekülen (Fluorochromen) gekoppelt (konjugiert). Es steht eine Vielzahl an Fluorochromen zur Verfügung, die sich durch ihre Struktur und Größe, vor allem aber durch ihre Absorptions- und Emissionsspektren unterscheiden. Die Absorptionswellenlänge bestimmt, durch welchen Laser ein Stoff angeregt werden kann. Zur Detektion des abgestrahlten Lichts müssen entsprechende optische Kanäle und Detektoren vorhanden sein. Jedes erdenkliche Molekül kann

so durch Färbung markiert und im Durchflusszytometer gemessen werden, insofern Laser, Farbstoff und Detektionskanal zusammenpassen.

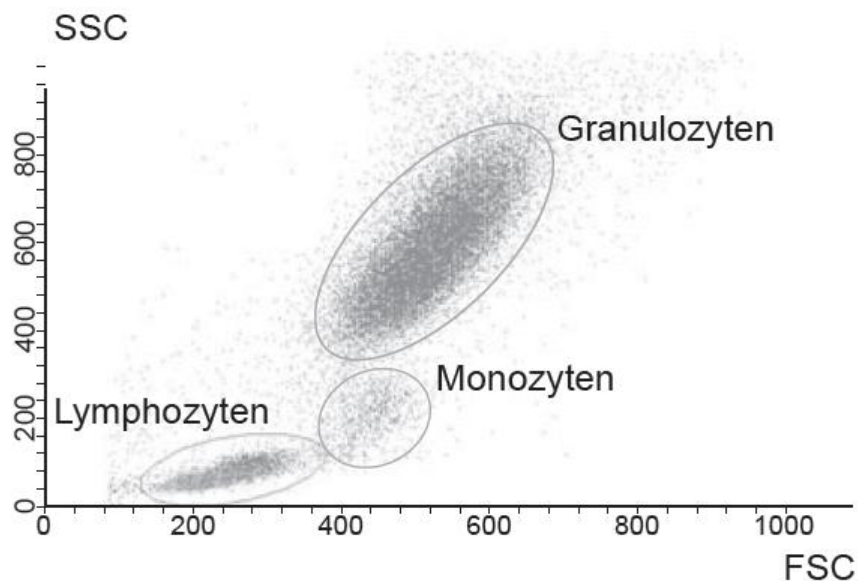


Abbildung 2.5: Durchflusszytometrische Differenzierung von Blutzellen anhand der Parameter *forward scatter* (FSC) und *side scatter* (SSC). Größere Zellen zeigen hierbei höhere FSC-Werte, SSC dient als Maß für die Granularität der untersuchten Zellen. Granulozyten mit vielfältig verformten Kernen und reichlich zytoplasmatischen Einschlüssen zeigen die höchsten SSC-Werte. Die kleineren, zytoplasmaarmen Lymphozyten sind gut als relativ homogene Gruppe abzugrenzen. Monozyten nehmen dazwischen eine Mittelstellung ein. Abbildung aus [230], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Grundwissen Immunologie von Christine Schütt, Barbara Bröker © 2011.

### 2.4.1 Multiparameteranalyse und Kompensation

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit war es notwendig, mehrere Zellparameter gleichzeitig zu erfassen, um so die Unterscheidung von spezifischen Subpopulationen zu erlauben, die nur einen sehr geringen Anteil der PBMC ausmachen. Dabei sind eine gründliche Vorbereitung und Planung notwendig. Die Markierung der Zellen muss so erfolgen, dass eine eindeutige Zuordnung zu den gewünschten Populationen möglich ist. Die Antigene müssen für die konjugierten Antikörper erreichbar sein und die verwendeten Fluorochrome auf die Voraussetzungen des verwendeten Zytometers, also dessen Laser und Detektoren, abgestimmt sein [146].

Bei der Verwendung mehrerer Fluorochrome in derselben Messung müssen verschiedene Aspekte beachtet werden. Die Absorptionsspektren müssen im Wellenlängenbereich des Lasers liegen und die Emissionsspektren von der Anordnung der Filter und Detektoren so erfasst werden, dass sie eindeutig und ohne Überlappung zugeordnet werden können. Das entsprechende Setup des verwendeten Zytometers (siehe Abb. 2.6) wurde im

Rahmen der vorliegenden Versuche so eingestellt, dass außer FSC und SSC acht Kanäle zur Messung unabhängiger Parameter verfügbar waren (siehe Tabelle 2.6).

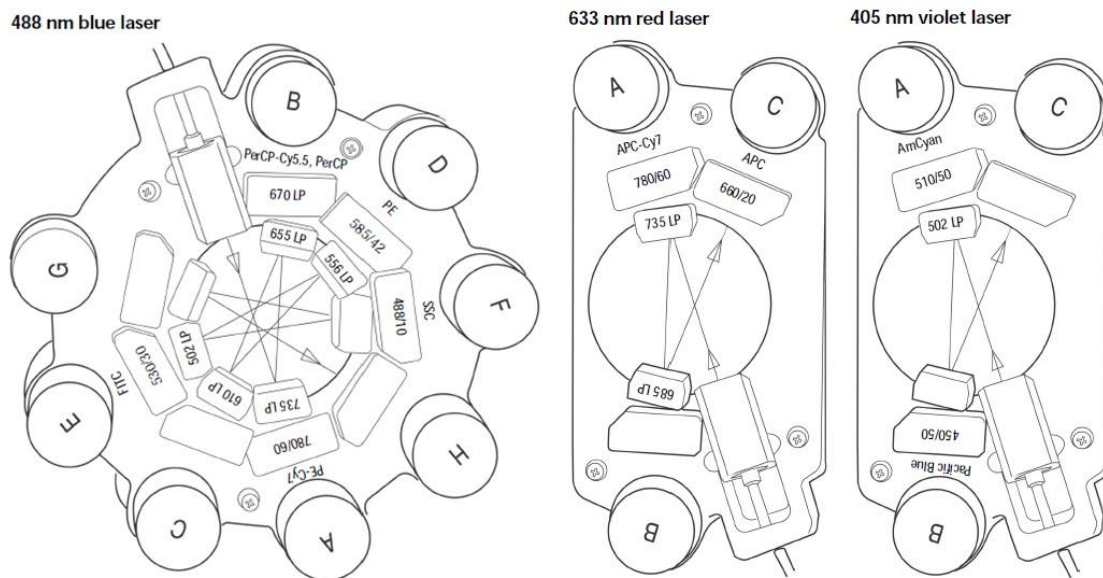


Abbildung 2.6: Optisches System des FACSCanto II. Das dargestellte Setup erlaubt die gleichzeitige Messung von FSC, SSC, sowie vier Fluorochrom-spezifischen Wellenlängenbereichen aus dem Licht des 488nm Lasers. Die Detektionskanäle für den 633nm und den 405nm Laser können je zwei Fluorochrome unterscheiden. Abbildung aus [21], mit freundlicher Genehmigung durch BD Biosciences: BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual. BD FACSCanto is a trademark of Becton, Dickinson and Company or its affiliates © 2021 BD. All rights reserved.

Tabelle 2.6: Absorptions- und Emissionsmaxima typischer Fluorochrome

Laser	488nm				633nm		405nm	
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	Pacific Blue	AmCyan
Absorptionsmaximum (nm)	495	480	482	480	650	650	410	467
Emissionsmaximum (nm)	519	578	695	785	660	785	455	510

Neben dieser physischen Einstellung der optischen Komponenten muss für jeden Versuchsaufbau auch eine Kalibrierung der rechnerischen Verarbeitung erfolgen. Diese Kompensation ist erforderlich, um Messartefakte zu vermeiden, welche durch Überlappungen der Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome entstehen. Je mehr Farben gleichzeitig zum Einsatz kommen, desto wichtiger ist die Kompensation. Nachdem jedes Fluorochrom einzeln gemessen wurde, wird dessen individuelles Spektrum dargestellt

und die ungewollte Überstrahlung in die nicht dafür vorgesehenen Kanäle bestimmt, um sie anschließend als unspezifisches Hintergrundsignal aus der Messung heraus zu rechnen.

Außer dieser optimalen Vorbereitung der Maschine ist eine strategische Auswahl der Antikörper-Fluorochrom-Konjugate aus weiteren Überlegungen heraus wichtig. Da sich die verfügbaren Fluorochrome nicht nur in ihren Absorptions- und Emissionsspektren, sondern auch in der Intensität des abgestrahlten Lichtes unterscheiden, sollten die signalstärksten Farben für jene Epitope verwendet werden, welche am schwächsten von den untersuchten Zellen exprimiert werden, während für zahlreich vorhandene Moleküle die Markierung mit Stoffen geringerer Lichtstärke genügt. So wird eine gute Messbarkeit auch bei Molekülen erreicht, die nur in geringer Anzahl oder auf einer sehr kleinen Zellpopulation vorhanden sind. Darüber hinaus gibt es für viele kommerziell angebotene fluoreszenzgekoppelte Antikörper unterschiedliche Klone, welche je nach Versuchsaufbau und Kombination Vor- und Nachteile haben können.

#### **2.4.2 Fluorescence activated cell sorting (FACS)**

Über die Multiparameteranalyse hinaus ermöglicht die durchflusszytometrische Technologie auch die Sortierung der gemessenen Zellen nach ihrer Fluoreszenz. So können beispielsweise eine CD4<sup>+</sup> und eine CD8<sup>+</sup> Population aus einer Probe aussortiert werden, um sie daraufhin in weiteren Experimenten getrennt zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

Hierfür wird der Probenstrom durch Vibration in einzelne Tröpfchen aufgebrochen, nachdem er die Messküvette durchflossen hat. Entspricht eine Zelle den vorher eingestellten Auswahlkriterien, wird der entsprechende Tropfen elektrisch geladen. Nun fließen die Tröpfchen durch ein elektrostatisches Feld, welches von Ablenkplatten aufgebaut wird. Abhängig von ihrer Ladung werden die Tröpfchen in eine Richtung abgelenkt und landen im entsprechenden Probenbehälter (Abb. 2.7).

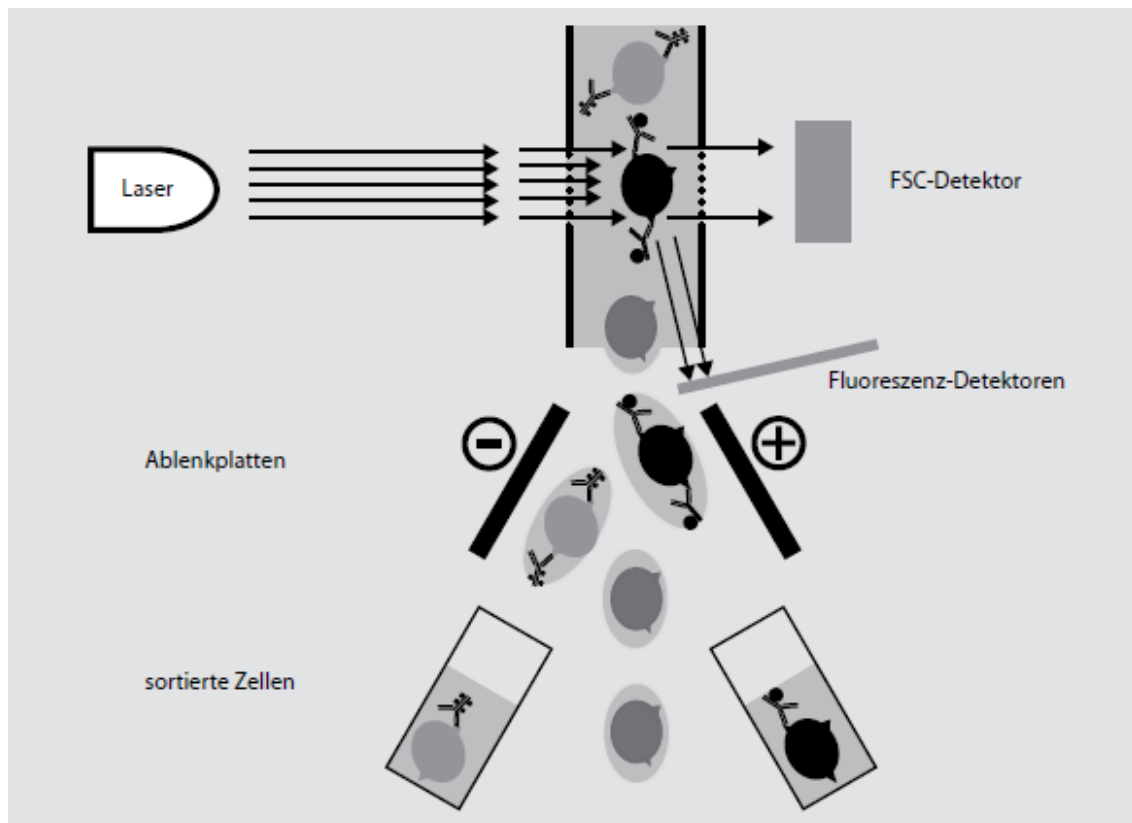


Abbildung 2.7: Fluorescence-activated cell sorting (FACS). Um Teile einer Probe zur Weiterverwendung sortieren zu können, wird der Probenstrom nach der Messküvette in einzelne Tropfen aufgebrochen. Je nach Eigenschaft der Zelle wird der entsprechende Tropfen elektrisch geladen und durch Ablenkplatten in getrennte Behälter geführt. Abbildung aus [146], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Der Experimentator: Immunologie. Durchflusszytometrie von Werner Luttmann, Kai Bratke, Michael Küpper et al. © 2014.

## 2.5 Färbung von Oberflächenmolekülen und Multiparameterscreening

Zellen wurden je nach Färbeschema und Verwendungszweck in Konzentrationen von  $1 \times 10^6/\text{ml}$  bis  $1 \times 10^8/\text{ml}$  in PBS + 1%FCS suspendiert. Zur Blockade der Fc-Rezeptoren wurden AB-Serum oder IgG (Gamunex, Talecris) verwendet. Nach Zugabe der Fluorochrom-konjugierten Antikörper und ihrer Isotyp-Kontrollen zur Oberflächenfärbung inkubierten die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen, um die lichtempfindlichen Farbstoffe nicht zu beeinflussen. Daraufhin wurde die Reaktion mit PBS im Überschuss abgestoppt. Eine Zentrifugation bei 400RCF für 5 Minuten wurde abgeschlossen, der Überstand verworfen und die Zellen entweder für weitere Experimente in entsprechenden Lösungen resuspendiert oder in  $100 \mu\text{l}$  PBS am FACSCanto II gemessen.

Für das systematische Screening humaner regulatorischer T-Lymphozyten wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem Antikörper-Panel zur Definition und Unterteilung von T<sub>reg</sub> und weiteren CD4<sup>+</sup>-T-Subpopulationen gefärbt (Tab. 2.7). CD3, CD4, CD25 und CD127 dienen zur Charakterisierung von T<sub>reg</sub> („T<sub>reg</sub>-Cocktail“), CD45RO und HLA-DR zur Einteilung in die T-Zell-Klassen „aktiviert“ (HLA-DR<sup>+</sup>) und „ruhend“ (HLA-DR<sup>-</sup>), sowie „memory“ (CD45RO<sup>+</sup>) und „naive“ (CD45RO<sup>-</sup>). Gescreent wurde mit spezifischen Antikörpern gegen 332 verschiedene Oberflächenmoleküle (LEGENDScreen® Human PE Kit, BioLegend, s. Anhang). Zur eindeutigen Abgrenzung positiver Fluoreszenzsignale wurden sowohl Isotyp- als auch FMO (*fluorescence minus one*) - Kontrollen mitgeführt. Es wurden vier unabhängige Screening-Durchläufe mit unterschiedlichen Spendern durchgeführt.

**Tabelle 2.7: Antikörper-Panel für das Oberflächenscreening**

	488 Laser				633 Laser		405 Laser	
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	Pe-Cy7	Alexa Fluor 647	APC-Cy7	Brilliant Violet 421	Brilliant Violet 510
Tubes 1-332	CD4	Legend Screen	HLA-DR	CD25		CD45RO	CD127	CD3
Tubes 333-342	CD4	IsoKtrl	HLA-DR	CD25		CD45RO	CD127	CD3
343	IsoKtrl	-	HLA-DR	CD25		CD45RO	CD127	CD3
344	CD4	-	IsoKtrl	CD25		CD45RO	CD127	CD3
345	CD4	-	HLA-DR	IsoKtrl		CD45RO	CD127	CD3
346	CD4	-	HLA-DR	CD25		IsoKtrl	CD127	CD3
347	CD4	-	HLA-DR	CD25		CD45RO	IsoKtrl	CD3
348	CD4	-	HLA-DR	CD25		CD45RO	CD127	FMO
349	FMO	-	HLA-DR	CD25		CD45RO	CD127	CD3
350	CD4	FMO	HLA-DR	CD25		CD45RO	CD127	CD3
351	CD4	-	FMO	CD25		CD45RO	CD127	CD3
352	CD4	-	HLA-DR	FMO		CD45RO	CD127	CD3
353	CD4	-	HLA-DR	CD25		FMO	CD127	CD3
354	CD4	-	HLA-DR	CD25		CD45RO	FMO	CD3
355	-	-	-	-		-	-	-

## 2.6 Intrazellulärfärbung

Um Strukturen färben zu können, die sich im Inneren der Zellen oder sogar im Zellkern befinden, müssen die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert, also für die Farbstoffe durchlässig gemacht werden. Da der Transkriptionsfaktor Forkhead Box Protein P3 (FoxP3) der bisher zuverlässigste Marker für humane T<sub>reg</sub> und naturgemäß intranukleär verortet ist, muss diese Methode zur Anwendung kommen, wenn man mit einer gewissen Sicherheit den Nachweis führen will, dass es sich tatsächlich um T<sub>reg</sub> handelt. Die Permeabilisation und Fixation verhindert allerdings weitere funktionelle Experimente nach der Intrazellulärfärbung.

Für die Intrazellulärfärbung wurde das True Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, San Diego, CA, USA) verwendet. Durch Verdünnung von einem Teil *4x Fix Concentrate* mit drei Teilen *Fix Diluent* wurde eine Fixierlösung hergestellt. Um einen Permeabilisationspuffer zu erhalten, wurde *10x Perm Buffer* 1:10 mit *Aqua destillata* verdünnt.

Einer Suspension mit  $1 \times 10^6$  Zellen in 100µl PBS wurden 0,5ml Fixierlösung zugegeben, die durch Vortexen gleichmäßig verteilt wurde. Nach Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen wurde die Lösung zweimal mit 1ml Permeabilisationspuffer gewaschen, bei 400RCF für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit Alexa Fluor 647™-konjugierten FoxP3-Antikörpern und entsprechenden Isotyp-Kontrollen weitere 30 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut folgten zwei Waschschriffe mit 1ml Permeabilisationspuffer und 5 Minuten Zentrifugation bei 400RCF. Daraufhin konnten die Zellen in 100µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen werden.

## 2.7 Suppressionsassay

Eine wichtige Eigenschaft der T<sub>reg</sub> ist ihre Fähigkeit, die proliferative Antwort von proinflammatorischen Effektorzellen auf einen Stimulus zu unterdrücken. Diese kann im CFSE-Assay nachgewiesen und quantifiziert werden, indem man stimulierte Effektorzellen und T<sub>reg</sub> in verschiedenen Verhältnissen kokultiviert [262].

Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFDA-SE, kurz CFSE) ist ein Farbstoff, der die Zellmembran passieren kann. Intrazellulär werden die Acetylgruppen

enzymatisch abgespalten und es kommt zur kovalenten Bindung des Succinimidylrestes von CFSE an Aminogruppen zytoplasmatischer Strukturen (Abb. 2.8) [192].

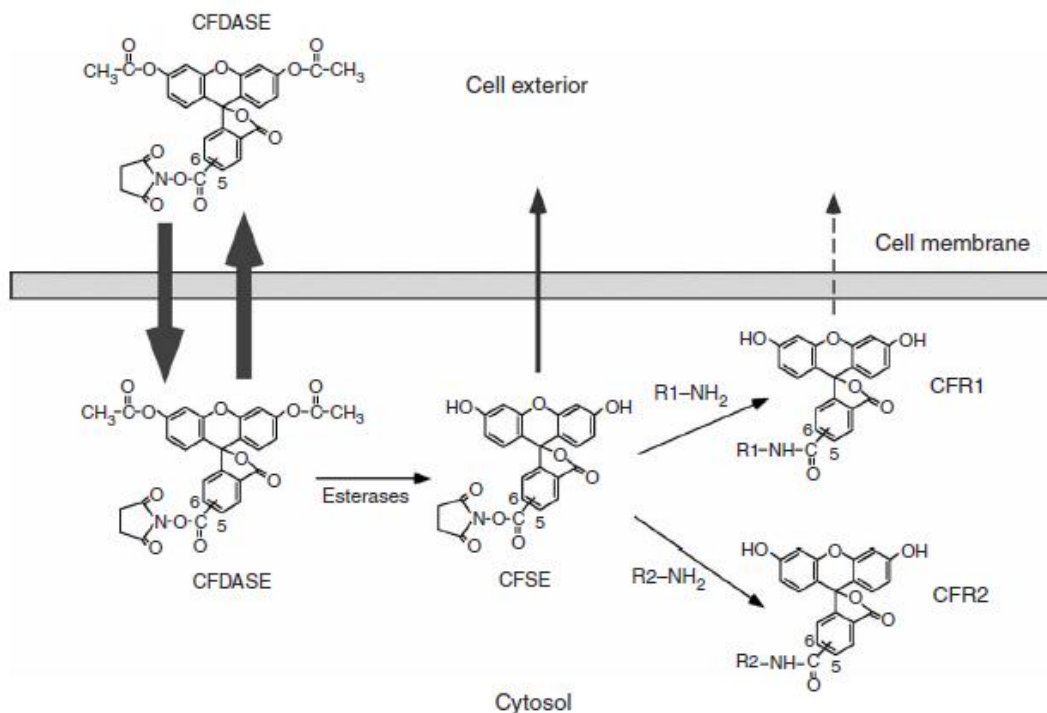


Abbildung 2.8: CFDASE passiert die Zellmembran und wird intrazellulär enzymatisch gespalten. CFSE bindet an verschiedene Reste, welche teilweise die Zelle wieder verlassen (CFR1) oder in der Zelle verbleiben (CFR2). Abbildung aus [192], mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature. Nature Protocols, Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Ben J C Quah et al. © 2007.

Bei der Zellteilung verbleibt je eine Hälfte der Carboxyfluoresceinkonjugate in einer Tochterzelle, sodass sich auch die Fluoreszenz halbiert. Auf diese Weise können mehrere Zellteilungen durchflusszytometrisch dargestellt werden (Abb. 2.9) [147].

In einem 15ml Röhrchen wurden  $1-5 \times 10^6$  Zellen in 1ml PBS aufgenommen. Nach Zugabe von  $10 \mu\text{l}$  CFSE einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  (Endkonzentration  $1 \mu\text{M}$ ) wurde die Suspension umgehend gründlich durchmischt und für 6min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5ml warmem X-Vivo<sup>TM</sup>15 Medium mit 10Vol% inaktiviertem AB-Serum und 1Vol% Penicillin/Streptomycin abgestoppt. Nach 5min Zentrifugation bei 400RCF wurde das Pellet in 5ml warmem Medium resuspendiert und für 15min bei  $37^\circ\text{C}$  ins Wasserbad gestellt. Ein weiterer Waschschrift bei 400RCF für 5min wurde angeschlossen und die Zellen für den Proliferationsassay in einer Konzentration von  $5 \times 10^5/\text{ml}$  in Medium aufgenommen.

Für die Stimulation im Proliferationsassay wurden Antikörper gegen CD3 und CD28 verwendet. Der Wachstumsreiz wird hierbei durch Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen hervorgerufen, welche eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst. Beide Antikörper wurden in einer Konzentration von jeweils 1 µg/ml den Zellkulturen hinzugefügt.

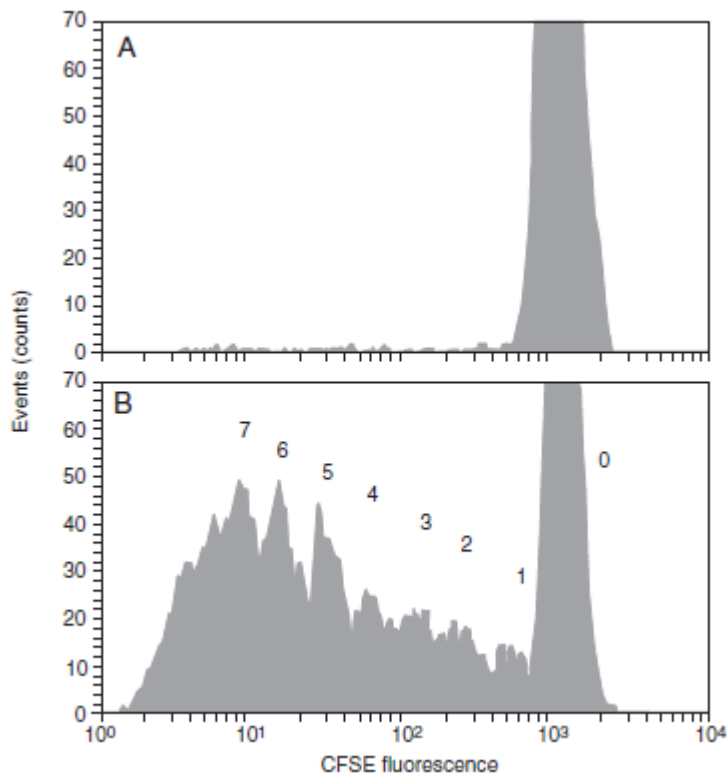


Abbildung 2.9: Darstellung der stimulierten Zellteilung mittels CFSE-Färbung. Unstimulierte (A) sowie stimulierte Lymphozyten (B) können anhand der CFSE-Fluoreszenz auf ihre Teilungsfrequenz hin untersucht werden. Pro Teilungszyklus (0-7) halbiert sich die Fluoreszenz. Abbildung aus [148], mit freundlicher Genehmigung durch Wiley: *Current Protocols in Cytometry* (2004), Unit 9.11, A. Bruce Lyons and Kathleen V. Doherty. Copyright © 2004 by John Wiley & Sons, Inc.

PBMC wurden wie oben beschrieben aus *Buffy Coats* gesunder Spender isoliert, die CD4<sup>+</sup> Fraktion angereichert und für den Sort angefärbt. Im FACS Aria® wurden zum Vergleich als „Standard-T<sub>reg</sub>“ eine CD25<sup>+</sup>, eine CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> und eine CD127<sup>-</sup> Population sowie CD25<sup>-</sup> „nonT<sub>reg</sub>“ sortiert. Drei neue Negativmarker wurden herangezogen, um jeweils eine Population ohne und mit CD25 - Expression auszuwählen. Dabei wurden jeweils die ca. 5% der Zellen mit niedrigster Fluoreszenz sortiert (Abb. 2.10).

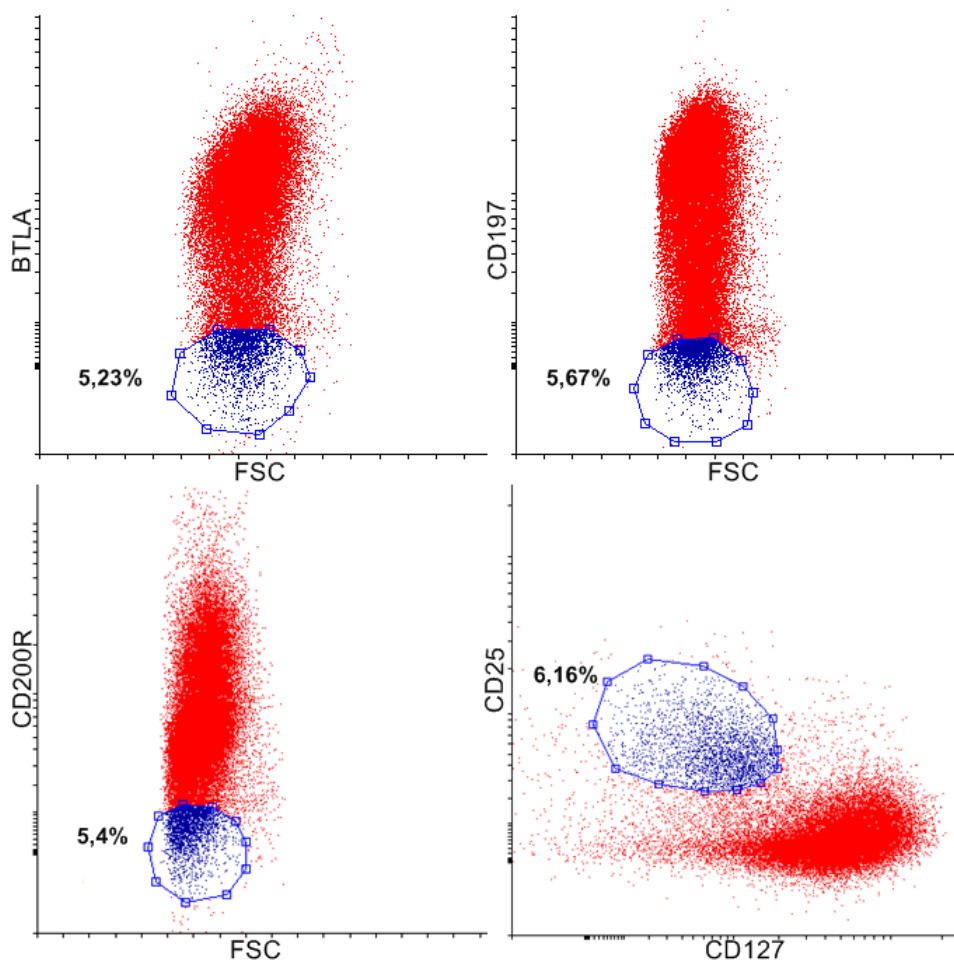


Abbildung 2.10: Exemplarische Darstellung der Sortgates zur Auswahl experimenteller und herkömmlicher  $T_{reg}$  - Populationen. CD4-angereicherte PBMC wurden aufgeteilt und mit Antikörpern gegen BTLA, CD197, CD200R oder CD25 und CD127 markiert und  $T_{reg}$  - Populationen ähnlicher Größenordnung für die Untersuchung in Suppressionsassays gesortet.

CFSE-markierte PBMC wurden als Responderzellen verwendet und mit gesorteten  $T_{reg}$ -Populationen in absteigenden Mengen kokultiviert wie in Tabelle 2.8 dargestellt, um eine dosisabhängige Suppression der Proliferation nachweisen zu können.

Tabelle 2.8: Versuchsanordnung für den  $T_{reg}$  Suppression Assay

Verhältnis Responder : $T_{reg}$	Responder-Zellen	$T_{reg}$
1:0	$5 \times 10^4$	
0:1		$5 \times 10^4$
1:1	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^4$
2:1	$5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
4:1	$5 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
1:0 Kontrolle	$5 \times 10^4$	
0:1 Kontrolle		$5 \times 10^4$

Um Bezugswerte für die Proliferation zu erhalten, wurden Responderzellen allein sowohl stimuliert als auch unstimuliert kultiviert. Stimulierte und unstimulierte CFSE-markierte Kontrollen wurden ebenfalls für die T<sub>reg</sub> mitgeführt, um deren Anergie darzustellen, also ihre fehlende Reaktion auf Wachstumsreize.

Die entsprechenden Antikörper- und Zellmengen wurden in jeweils 210µl Medium pro well in eine 96-well round bottom Kulturplatte gegeben und für 4 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (Tabellen 2.9 und 2.10).

**Tabelle 2.9: Pipettierschema für den Suppression Assay**

Verhältnis Responder : T <sub>reg</sub>	Responder (5×10 <sup>5</sup> /ml)	T <sub>reg</sub> (5×10 <sup>5</sup> /ml)	CD3- & CD28-Antikörper (20µg/ml)	Medium
1:1	100 µl	100 µl	10 µl	-
2:1	100 µl	50 µl	10 µl	50 µl
4:1	100 µl	25 µl	10 µl	75 µl

**Tabelle 2.10: Layout der Cokulturen des Suppressionsassays. In Spalte 1 wird das Titrationsverhältnis T<sub>reg</sub> zu Responderzelle genannt. In den Feldern B2 bis G11 sind die gesorteten Populationen beschrieben.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1:1	CD25+		CD25+ CD127-		BTLA-		CD197-		CD200R-		
C	2:1											
D	4:1											
E	1:1	CD25-		CD127-		CD25+ BTLA-		CD25+ CD197-		CD25+ CD200R-		
F	2:1											
G	4:1											
H												

Für die Messung am FACSCanto™ II wurden die Zellen im *well* mit APC-CD8 und APC-Cy7-CD4 gefärbt, zum Abstoppen in PBS im Überschuss in FACS-Röhrchen überführt und bei 400RCF 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100µl PBS resuspendiert. Unmittelbar vor der Messung wurde eine Nukleinsäurefärbung mit Sytox® Blue Dead Cell Stain (Invitrogen, Paisley, UK) vorgenommen, um Zellen mit verletzter Membranintegrität ausschließen zu können.

Dieser Suppressions-Assay wurde für verschieden definierte T<sub>reg</sub>-Populationen jeweils in Duplikaten durchgeführt und drei unabhängige Wiederholungen mit Proben verschiedener Individuen angefertigt.

## 2.8 Zytokinanalyse

Die Überstände aus den Ansätzen der Suppressionsversuche wurden durchflusszytometrisch auf die Konzentration verschiedener Zytokine hin untersucht, um darzustellen, welche humoralen Mikromilieus durch die verschiedenen Zellverhältnisse unter proinflammatorischer Stimulation entstanden. Zu diesem Zweck wurde das BioLegend® LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel verwendet. Das Prinzip dieses Testkits entspricht dem klassischer Sandwich-Immunoassays, indem antikörpergekoppelte *beads* (*Capture-Beads*) den Analyten binden und anschließend durch Markierung mit fluoreszenten Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Die Übertragung des Prinzips auf ein Durchflusszytometer erlaubt eine genauere und empfindlichere Messung mehrerer Parameter simultan durch den Einsatz von *Capture-Beads* unterschiedlicher Größe und Eigenfluoreszenz.

Entsprechend der Angaben im Herstellerprotokoll wurden 25µl des Überstandes der Zellkulturen aus den Suppressionsassays mit 25µl Assaypuffer, 25µl Titrationsstandard, 25µl Bead-Cocktail und 25µl biotinylierten Markierungs-Antikörpern vermischt und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einer Rüttelplatte inkubiert. Nach Zugabe des Farbstoffes SA-PE (Streptavidin-Phycoerythrin) und weiteren 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Proben 5 Minuten bei 1000RCF zentrifugiert und mit je 200µl Waschpuffer gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension wurden die Proben am FACSCanto™ II gemessen.

## 2.9 Statistik

Alle Ergebnisse aus Experimenten mit  $n \geq 3$  wurden mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Zur Erhebung der Signifikanz von Unterschieden wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt und  $p \leq 0,05$  als signifikant gewertet. Dabei ist die eingeschränkte Aussagekraft aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl zu beachten.

### 3 Ergebnisse

Als Leitfaden für die Darstellung der Ergebnisse dient das Ablaufschema der Fragestellungen und Vorgehensweisen:

1. Schritt: Etablierung einer Gatingstrategie zur Differenzierung von  $T_{reg}$   
Welche Oberflächenmarker korrelieren am stärksten mit FoxP3-Expression?  
⇒ Vergleich gegenwärtiger Gating-Strategien mit FoxP3-Intrazellulärfärbung
2. Schritt: Durchführung eines ergebnisoffenen systematischen Screenings  
Können neue  $T_{reg}$ -Marker oder -Subpopulationen identifiziert werden?  
Bestätigen sich bereits beschriebene Expressionsmuster?  
⇒ Multiparameter-Oberflächenfärbung mit 332 Antikörpern
3. Schritt: Validierung der Kandidaten  
Korreliert die Expression der gefundenen Oberflächenmarker mit FoxP3?  
⇒ Intrazellulärfärbung mit FoxP3
4. Schritt: Funktionelle Untersuchung der Suppressivität  
Eignen sich die neuen Marker zur CD25-unabhängigen Isolierung suppressiver T-Zellen?  
⇒ Zell-Sorting und CFSE-Suppressionsassay
5. Schritt: Hinweise auf sekretorische Aktivität  
Welche Zytokine könnten bei der suppressorischen Aktivität der neu definierten Populationen eine Rolle spielen?  
⇒ Zytokinanalyse der Überstände aus den Suppressionsversuchen

#### 3.1 Vergleich des Oberflächenphänotyps $CD4^+CD45RO^+CD25^+CD127^-$ mit Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3

Um regulatorische T-Lymphozyten ( $T_{reg}$ ) auf die Ausprägung von Oberflächenmolekülen hin untersuchen zu können, musste zunächst eine Gating-Strategie etabliert werden, welche mit größtmöglicher Sicherheit eine Zellpopulation mit hoher FoxP3-Expression definiert, ohne eine Intrazellulärfärbung durchzuführen.

Mit Rücksicht auf beschriebene Strategien zur Differenzierung der verschiedenen T-Zellsubpopulationen [32] wurde ein Panel aus sechs Markern erstellt, das die gleichzeitige

Intrazellulärfärbung mit Alexa Fluor 647-anti-FoxP3 erlaubte, sowie den PE-Kanal für die Screening-Antikörper des LegendScreen-Kits freihielt (vgl. Tab. 2.7). Die gebräuchliche  $T_{reg}$ -Definition  $CD4^+CD25^+CD127^-$  zeigte eine hohe Übereinstimmung mit FoxP3, die durch Hinzunahme des Reifemarkers CD45RO noch verbessert werden konnte (Abb. 3.1). Für die Auswertung des nachfolgenden Screenings wurden beide Strategien miteinander verglichen, da der Ausschluss der  $CD45RO^-$  Zellen zu einer geringeren Ausbeute an  $T_{reg}$  führte, andererseits jedoch den Anteil der Zellen mit niedriger FoxP3-Expression verminderte. Im Folgenden wird der Einfachheit halber für  $CD4^+CD25^+$  Zellen der Begriff  $T_{reg}$  verwendet, sowie gelegentlich  $CD4^+CD25^-$  Zellen als „non $T_{reg}$ “ bezeichnet.

### **3.2 Differentielle Expression von 10 Oberflächenmolekülen auf $T_{reg}$ im Vergleich zu $CD4^+CD25^-$**

Im systematischen Oberflächenscreening wurden  $CD4^+$  Zellen auf Expression 332 verschiedener Marker untersucht (vgl. Kap. 2.5). Ein großer Teil der Zielmoleküle konnte nicht bzw. in äußerst geringem Ausmaß auf den  $CD4^+$  Zellen nachgewiesen werden. Etliche weitere Antikörper konnten an nahezu alle untersuchten Zellen binden (Abb. 3.2).

Für 10 Epitope konnte eine differentielle Expression sowohl zwischen  $CD25^+CD127^- T_{reg}$  und  $CD25^-$  „non $T_{reg}$ “, als auch zwischen  $CD45RO^+CD25^+CD127^-$  „memory“- $T_{reg}$  und der entsprechenden  $CD45RO^+CD25^-$  „non $T_{reg}$ “-Population nachgewiesen werden (Abb. 3.3). Bedingt durch das Versuchsdesign stellte CD25 den stärksten positiven Diskriminator dar und CD127 den stärksten negativen. Die Zellen, die über PE-Cy7-konjugierte CD25-Antikörper aus dem  $T_{reg}$ -Cocktail als positiv gegatet wurden, wiesen also auch die höchsten Level des PE-Screening-Antikörpers gegen CD25 auf. Das Gleiche gilt umgekehrt für CD127.

Darüber hinaus wurden 3 Moleküle auf  $T_{reg}$  überexprimiert; CD39, CD71 und CD101 (Tab. 3.1). Die Ectonucleotidase CD39 fand sich auf der Oberfläche von 46,5% der  $T_{reg}$  und auf 1,75% der „non $T_{reg}$ “, bzw. auf 65,475% der  $CD45RO^+ T_{reg}$  und auf 4,575% der  $CD45RO^+$  „non $T_{reg}$ “. Damit stellte CD39 den Marker mit der stärksten Korrelation zum Phänotyp  $CD25^+CD127^-$  dar.

Auch CD101 konnte überwiegend auf  $T_{reg}$  gemessen werden (45,75%), während nur ein kleiner Teil der  $CD25^-$  „non $T_{reg}$ “ dafür positiv war (28,25%). Hier zeigten die  $CD45RO^+$  Subpopulationen diesen Unterschied ebenfalls noch deutlicher.

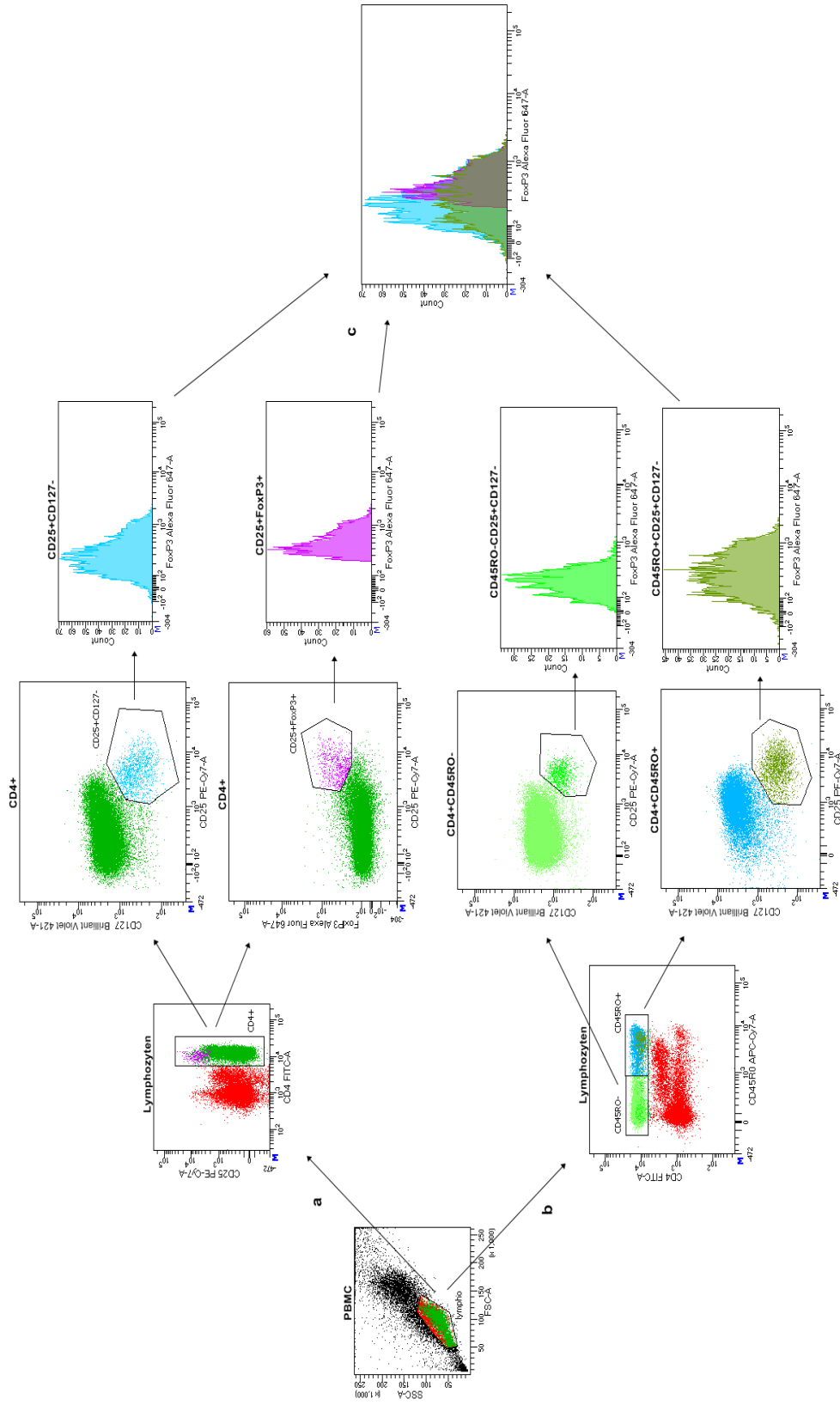


Abbildung 3.1: Gating-Strategie für das Screening nach Oberflächenmarkern. PBMC wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD4, CD25, CD127 und CD45RO gefärbt. Intrazellulärfärbung von FoxP3 wurde angeschlossen. Aus den CD4<sup>+</sup> Lymphozyten wurden die CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Population und die CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Population definiert und ihre FoxP3-Expression verglichen (a). CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T<sub>reg</sub> wurden weiter nach CD45RO-Expression unterteilt (b). Das überlagerte Histogramm zeigt die FoxP3-Expressionen (c).

Eine Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimierte CD71. Diese Zellen zeigten überwiegend einen T<sub>reg</sub> - Phänotyp: 17,75% der T<sub>reg</sub>, bzw. 25,525% der „memory“ - T<sub>reg</sub> wiesen diesen Marker auf, während er auf „nonT<sub>reg</sub>“ und „memory - nonT<sub>reg</sub>“ fast gar nicht nachzuweisen war.

Weitere differentiell exprimierte Oberflächenproteine zeigten eine umgekehrte Polarität, korrelierten also invers mit dem T<sub>reg</sub> - Phänotyp. So waren 76,5% der „nonT<sub>reg</sub>“ CD26<sup>+</sup>, im Gegensatz zu 33,25% der T<sub>reg</sub>. Ähnliche Unterschiede konnten auch beim Vergleich der CD45RO<sup>+</sup> „memory - T<sub>reg</sub>“ mit der entsprechenden „nonT<sub>reg</sub>“ - Population gemessen werden.

Auch CD49d konnte auf einer Minderheit der T<sub>reg</sub> (35,5%) gemessen werden, wohingegen ein Großteil der „nonT<sub>reg</sub>“ (65,5%) diesen Oberflächenmarker exprimierte. Dieser Unterschied stellte sich bei der Betrachtung der „memory“ - Subpopulationen noch etwas deutlicher dar: 32,35% auf CD45RO<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> vs. 77,775% auf CD45RO<sup>+</sup> „nonT<sub>reg</sub>“.

**Tabelle 3.1: Ausgewählte Ergebnisse des Screenings. Neben CD25 und CD127 wurden 8 Oberflächenmarker differentiell exprimiert. (SD: standard deviation, p: Signifikanzwert, n = 4)**

Antigen	Expression auf CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> T <sub>reg</sub> (% , SD)	Expression auf CD25 <sup>-</sup> „nonT <sub>reg</sub> “ (% , SD)	Anova: T <sub>reg</sub> vs. „non-T <sub>reg</sub> “ (p)	Expression auf CD45RO <sup>+</sup> T <sub>reg</sub> (% , SD)	Expression auf CD45RO <sup>+</sup> „non-T <sub>reg</sub> “ (% , SD)	Anova: CD45RO <sup>+</sup> T <sub>reg</sub> vs. CD45RO <sup>+</sup> „non-T <sub>reg</sub> “ (p)
CD25	85,25 (16,42)	2,25 (0,96)	<0,001	92,05 (7,99)	3,625 (1,87)	<0,001
CD26	33,25 (15,31)	76,5 (10,34)	0,003	20,375 (12,2)	70,275 (10,27)	0,001
CD39	46,5 (18,73)	1,75 (0,5)	0,003	65,475 (16,12)	4,575 (0,91)	<0,001
CD49d	35,5 (13,3)	65,5 (16,66)	0,031	32,35 (7,62)	77,775 (6,78)	<0,001
CD71	17,75 (11,03)	2 (2,16)	0,031	25,525 (17,08)	5,3 (7,82)	0,075
CD101	45,75 (15,33)	28,25 (17,33)	0,181	65,25 (9,45)	28,5 (12,99)	0,004
CD127	22,75 (21,64)	83,75 (11,32)	0,002	14,55 (13,78)	85,95 (7,46)	<0,001
CD148	24 (12,06)	8 (4,69)	0,048	35,75 (18)	13,3 (7,78)	0,062
CD197	35,75 (22,29)	73,25 (10,72)	0,023	18,2 (18,19)	39,25 (20,8)	0,178
CD200R	5,25 (2,5)	23,25 (7,46)	0,004	7,875 (2,88)	46,425 (10,89)	<0,001
BTLA	5 (10)	21,5 (41)	0,611	3,55 (6,9)	19,325 (35,92)	0,422

Der Lymphknoten - Homing - Rezeptor CCR7 (CD197) wurde auf 35,75% der T<sub>reg</sub> und auf 73,25% der „nonT<sub>reg</sub>“ gemessen. Seine Expression korrelierte stark invers mit dem Reifemarker CD45RO. Die „memory“ - Subpopulationen sowohl der T<sub>reg</sub> als auch der

nonT<sub>reg</sub> wiesen nur eine etwa halb so große CD197<sup>+</sup> Gruppe auf wie die ohne CD45RO definierten Zellen.

CD200R zeichnete eine kleine Untergruppe der T<sub>reg</sub> aus (5,25 %), bei den „nonT<sub>reg</sub>“ war dieser Teil mit 23,25% etwas größer. Betrachtet man die „memory“- Subpopulation, wird dieser Unterschied noch deutlicher: 7,875% der CD45RO<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> und 46,425% der „memory - nonT<sub>reg</sub>“ waren CD200R<sup>+</sup>.

Bei Messung der Expression des *B- and T-Lymphocyte Attenuator* BTLA (CD272) stellte sich ein Großteil der T<sub>reg</sub> negativ dar, während ein deutlich größerer Anteil der „nonT<sub>reg</sub>“ mit anti-BTLA markiert werden konnte, wobei hier erhebliche spenderabhängige Schwankungen auftraten.

### **3.3 Validierung der identifizierten Marker über Intrazellulärfärbung mit FoxP3**

Um nachzuweisen, dass die Ausprägung der identifizierten Oberflächenmarker T<sub>reg</sub> - spezifisch ist, wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, welche die Intrazellulärfärbung von FoxP3 einschlossen. Somit konnten die Expressionsmuster der jeweiligen Moleküle auf Zellen mit dem bisher zuverlässigsten T<sub>reg</sub>-Phänotyp CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> dargestellt werden (Abb. 3.4). Hierbei zeigten sich die differentiellen Expressionsmuster stabil. Einige Moleküle waren stärkeren interindividuellen Schwankungen unterworfen (Tab. 3.2).

Die Korrelation von CD39 zum T<sub>reg</sub> - Phänotyp ließ sich auch anhand der FoxP3 - Messung bestätigen. Während nonT<sub>reg</sub> kaum CD39 trugen, ließ sich das Ectoenzym auf etwa einem Drittel der FoxP3<sup>+</sup> Zellen messen, mit deutlichen Abweichungen zwischen den einzelnen Proben.

Ein ähnliches Muster zeigte sich auch bei CD71. Rund ein Drittel der FoxP3<sup>+</sup> Zellen trugen den Marker, wohingegen er auf nonT<sub>reg</sub> kaum messbar war.

Für CD101 ließ sich das Expressionsmuster des Screenings ebenfalls in der Validierung bestätigen. Es wird von einem Großteil FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert, aber nur von ca. einem Viertel der nonT<sub>reg</sub>.

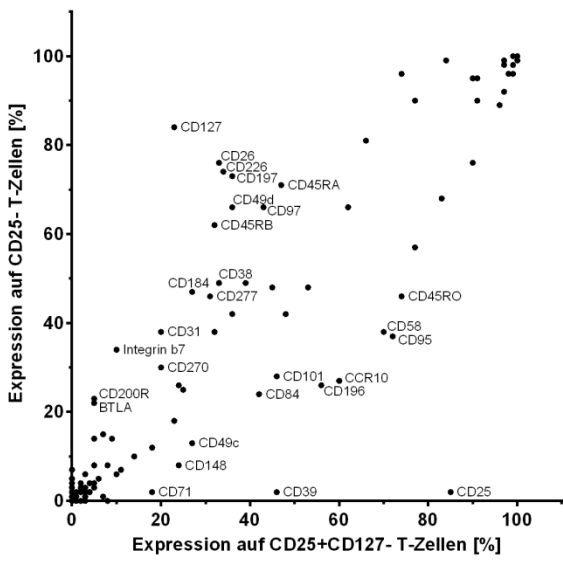
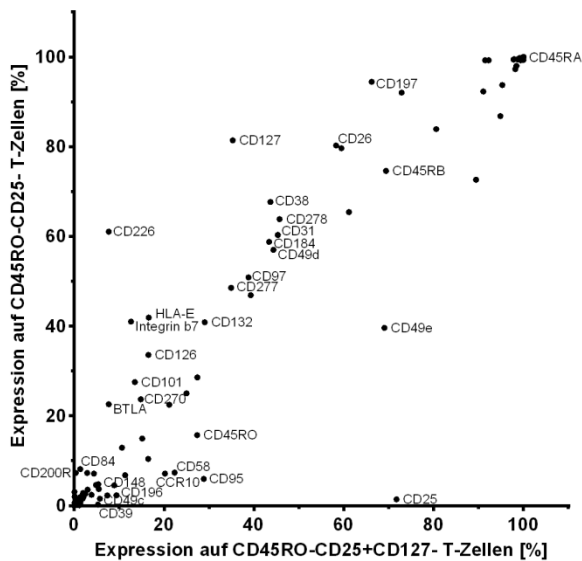
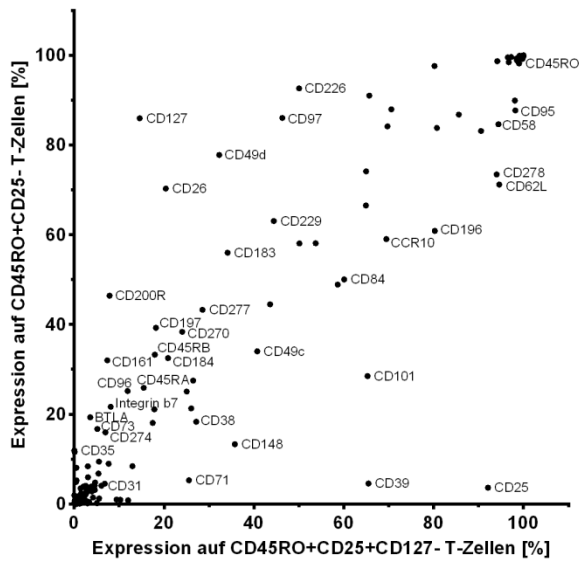


Abbildung 3.2: Ergebnis des Screenings (Punktwolken). Humane PBMC gesunder Spender wurden CD4-angereichert und mit T<sub>reg</sub>-Cocktail sowie 332 spezifischen Antikörpern sowie den entsprechenden Isotyp- und FMO-Kontrollen angefärbt. Die Expression auf CD25<sup>-</sup> wird der auf CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-Zellen gegenübergestellt (oberes Diagramm). Im mittleren und unteren Panel werden beide Populationen zusätzlich in CD45RO<sup>+</sup> und CD45RO<sup>-</sup> unterschieden. (n = 4)



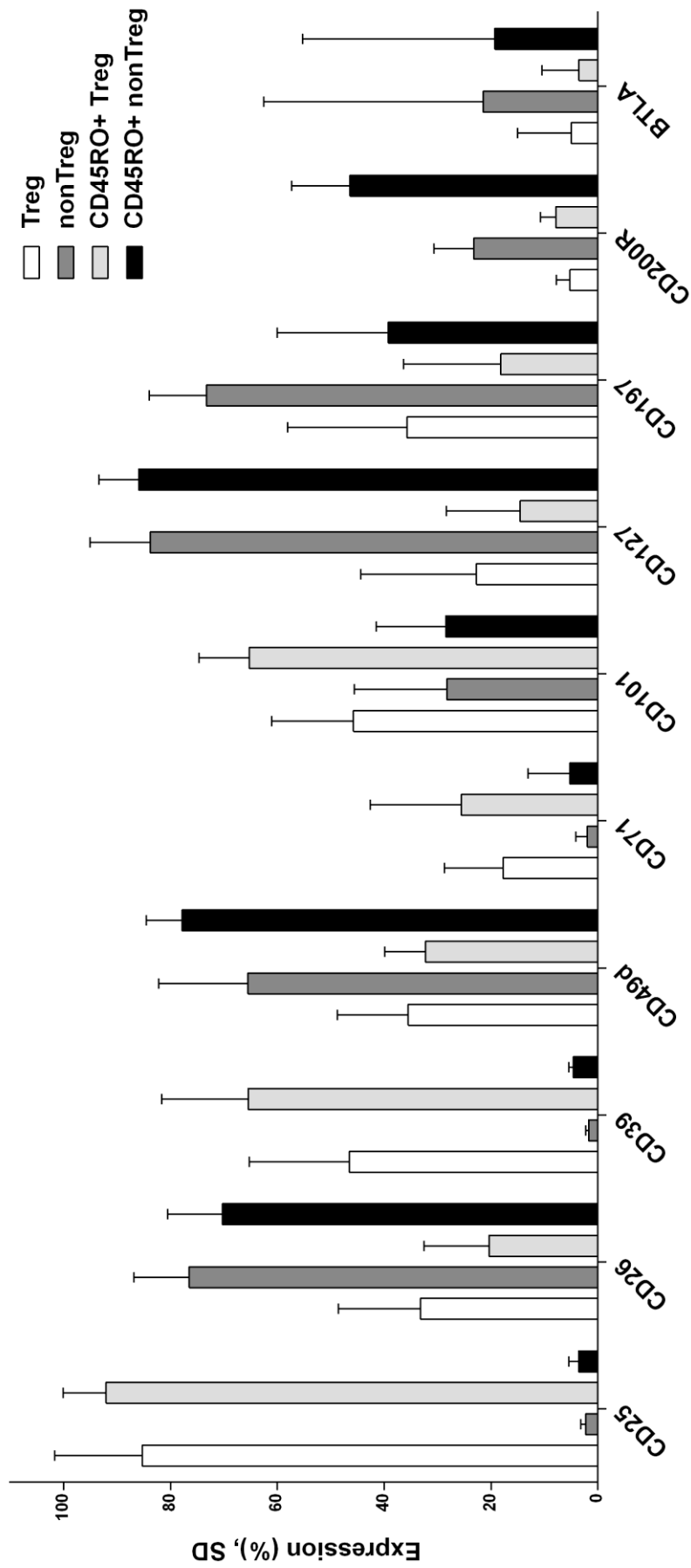


Abbildung 3.3: Ergebnisse des Screenings (Balkendiagramm). T<sub>reg</sub> wurden als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> definiert, „nonT<sub>reg</sub>“ als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Diese Gatingstrategie wurde mit den jeweils CD45RO<sup>+</sup> Subpopulationen verglichen. Es wurden vier unabhängige Durchläufe mit Zellen unterschiedlicher Spender durchgeführt.

Auch die Negativmarker zeigten sich in der Validierung stabil. CD26 konnte auf 19,6% der auf FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> gemessen werden, während es von 71,87% der nonT<sub>reg</sub> exprimiert wurde. Somit stellt CD26 einen stabilen Diskriminator dar, welcher auf „nonT<sub>reg</sub>“ häufiger vorkommt als auf T<sub>reg</sub>. Einschränkend muss festgehalten werden, dass auch ein nicht unerheblicher Anteil der T<sub>reg</sub> diesen Marker exprimiert.

CD49d wurde auf etwa einem Drittel der FoxP3<sup>+</sup> Zellen und auf ca. drei Viertel der nonT<sub>reg</sub> gemessen. Damit bestätigte sich auch hier die inverse Korrelation mit der Einschränkung einer substanziellen CD49d<sup>+</sup> Subpopulation der FoxP3<sup>+</sup> Zellen.

CD197 zeigte in der Validierung eine ähnliche Verteilung wie auf der CD45RO<sup>+</sup> „memory“ - Subpopulation der T-Zellen im Oberflächenscreening. Weniger als 10% der FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> trugen den Chemokinrezeptor, gegenüber etwa einem Drittel der nonT<sub>reg</sub>.

Der Marker CD200R hatte im Screening besonders innerhalb der CD45RO<sup>+</sup> Untergruppe eine deutliche negative Korrelation zu T<sub>regs</sub>. Anhand der FoxP3 - Färbung wurde dieser Unterschied noch etwas klarer. Über die Hälfte der nonT<sub>reg</sub> konnten mit anti-CD200R markiert werden, während dieser Anteil bei den T<sub>reg</sub> ca. 10-20% ausmachte.

Das Expressionsmuster von BTLA war im Screening stark spenderabhängig gewesen, hatte gemittelt aber eine differentielle negative Aussagekraft für den T<sub>reg</sub> - Phänotyp. In der Validierung konnte diese unterschiedliche Ausprägung noch deutlicher dargestellt werden. Weniger als 10% der T<sub>reg</sub> wiesen BTLA auf ihrer Oberfläche auf, bei nonT<sub>reg</sub> waren es etwa zwei Drittel.

**Tabelle 3.2: Ergebnisse der Validierung durch Intrazellulärfärbung mit FoxP3. (SD: standard deviation, p: Signifikanzwert, n = 3, \*n = 4)**

<b>Antigen</b>	<b>Expression auf FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> (% , SD)</b>	<b>Expression auf „nonT<sub>reg</sub>“ (% , SD)</b>	<b>Anova: FoxP3<sup>+</sup> Treg vs. „nonT<sub>reg</sub>“ (p)</b>
CD26	19,6 (2,91)	71,87 (9,89)	0,001
CD39	35,7 (31,51)	1,17 (1,22)	0,131
CD49d	29,6 (3,25)	74,73 (14,84)	0,007
CD71	30,9 (7,05)	1,5 (0,72)	0,002
CD101	57,83 (40,16)	26,5 (23,23)	0,307
CD197	3,7 (3,49)	35,3 (21,75)	0,068
CD200R*	14,25 (5,14)	51,85 (8,42)	<0,001
BTLA (CD272)	6 (2,34)	66,53 (6,15)	<0,001

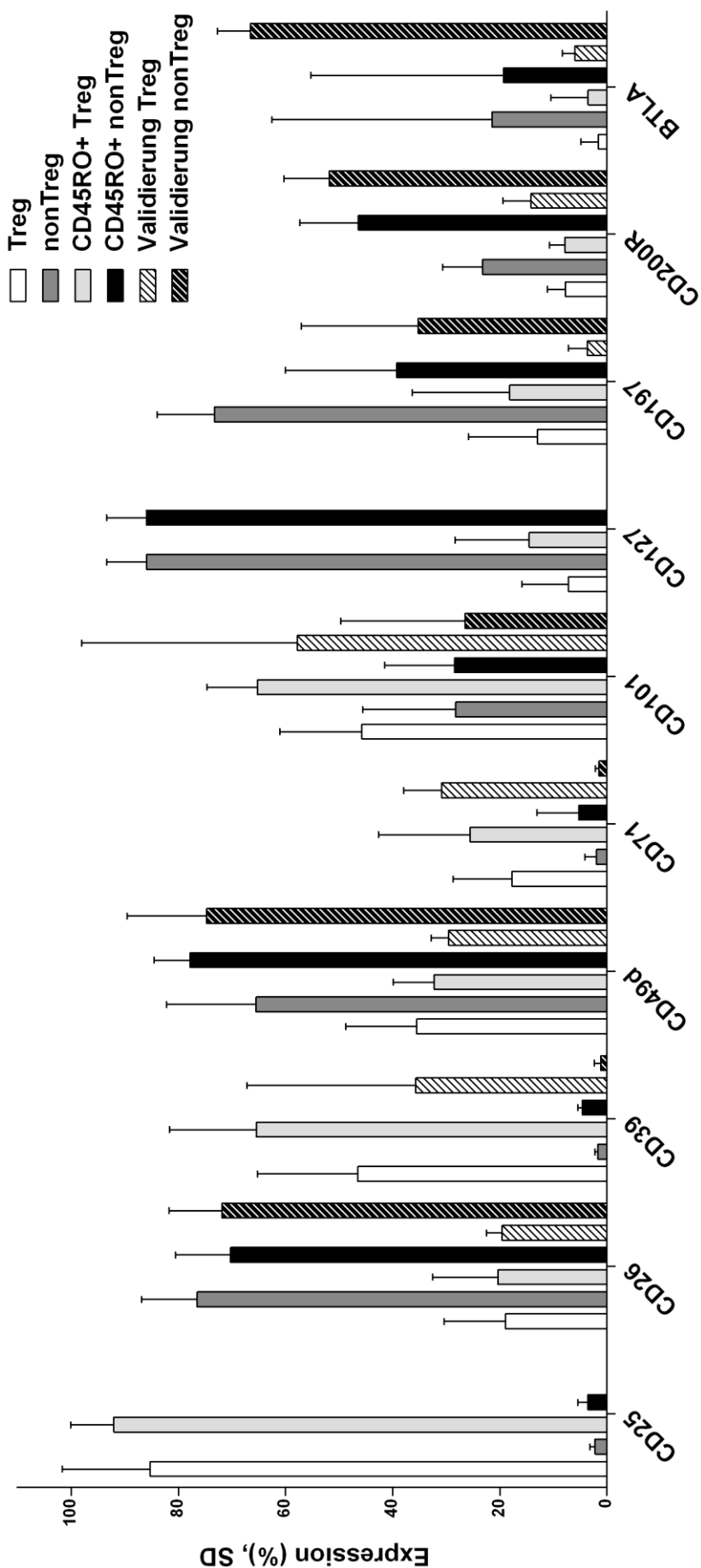


Abbildung 3.4: Validierung der differentiell exprimierten Antigene durch Vergleich mit FoxP3-Intrazellulärfärbung. Zum direkten Vergleich sind die Ergebnisse des Screenings mit der T<sub>reg</sub>-Definition CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> sowie der CD45RO<sup>+</sup> Subpopulation erneut dargestellt. Die jeweils zwei rechten Balken repräsentieren die Expression auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> bzw. auf CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>,nonT<sub>reg</sub>. Alle Balken repräsentieren mindestens drei unabhängige Durchläufe. SD: *standard deviation*

### 3.4 Neu definierte T<sub>reg</sub> - Populationen supprimieren die Expansion von PBMC im CFSE-basierten in vitro Proliferationsassay

Zur funktionellen Untersuchung postulierter neuer T<sub>reg</sub> - Populationen wurde ihre Suppressivität im Proliferationsassay dargestellt. Die titrierten Cokulturen aus den verschiedenen gesorteten Populationen mit CFSE-markierten homologen PBMC als Responderzellen wurden stimuliert und nach vier Tagen gemessen, wie in Kapitel 2.7 beschrieben.

Wie beispielhaft in Abb. 3.5 zu sehen ist, konnte die beschriebene Suppressivität der herkömmlichen CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T<sub>reg</sub> reproduziert werden. Analog dazu gelang es auch, für die neu definierten T<sub>reg</sub>-Populationen eine dosisabhängige Hemmung der Responderproliferation darzustellen.

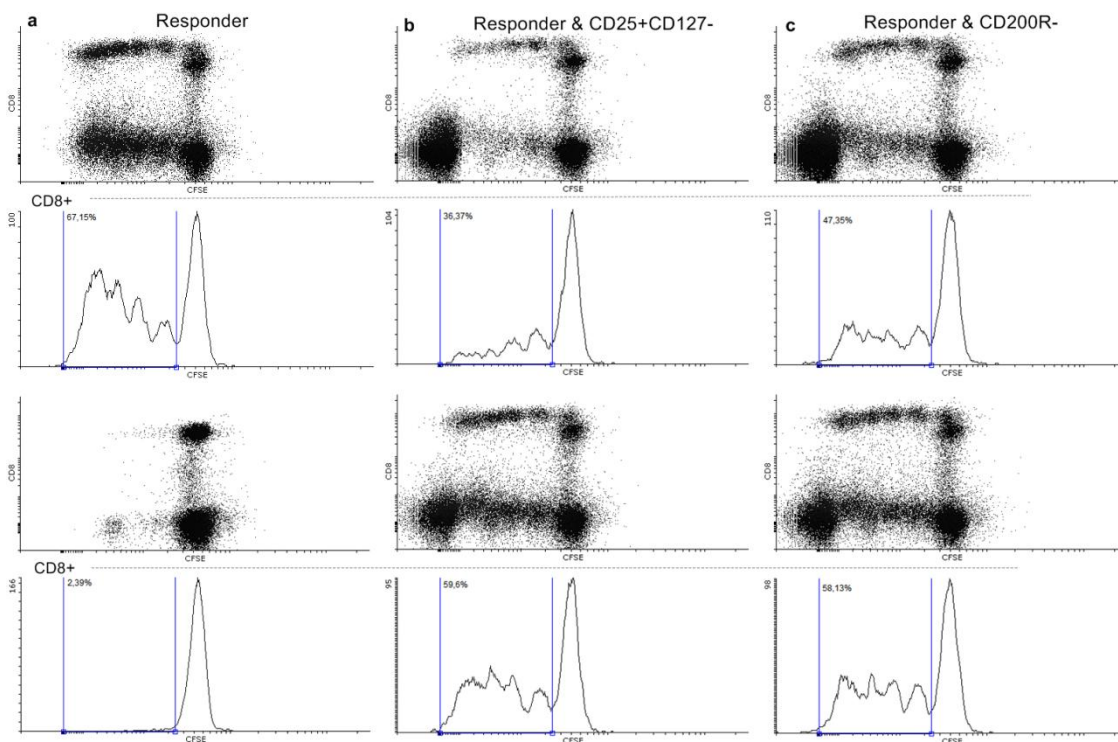


Abbildung 3.5: Suppression im CFSE-Assay. CFSE-markierte PBMC wurden als Responderzellen verwendet. Nach Stimulation mit CD3- und CD28-Antikörpern stellen sich deutlich 4 Tochtergenerationen durch Halbierung der Fluoreszenz dar (a, oben). Im Gegensatz dazu ist nach 4-tägiger Kultur ohne Stimulation praktisch keine Proliferation erkennbar (a, unten). b und c zeigen die gehemmte Proliferation bei Cokultur mit CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> „Standard-T<sub>reg</sub>“ bzw. CD200R<sup>-</sup> T-Zellen, jeweils oben im Verhältnis 5×10<sup>4</sup> Responderzellen zu 5×10<sup>4</sup> T<sub>reg</sub> (1:1), unten 5×10<sup>4</sup> Responderzellen zu 1,25×10<sup>4</sup> T<sub>reg</sub> (4:1). Die Darstellung ist repräsentativ für 3 unabhängige Wiederholungen.

Aus den CFSE-Messungen wurde der prozentuale Anteil der Responderzellen bestimmt, welche in der 4-tägigen Kulturzeit mindestens eine Teilung durchlaufen hatte. Die Suppression wurde berechnet aus:

$$100 - (\text{Proliferation ohne Treg} : \text{Proliferation mit Treg}) \times 100$$

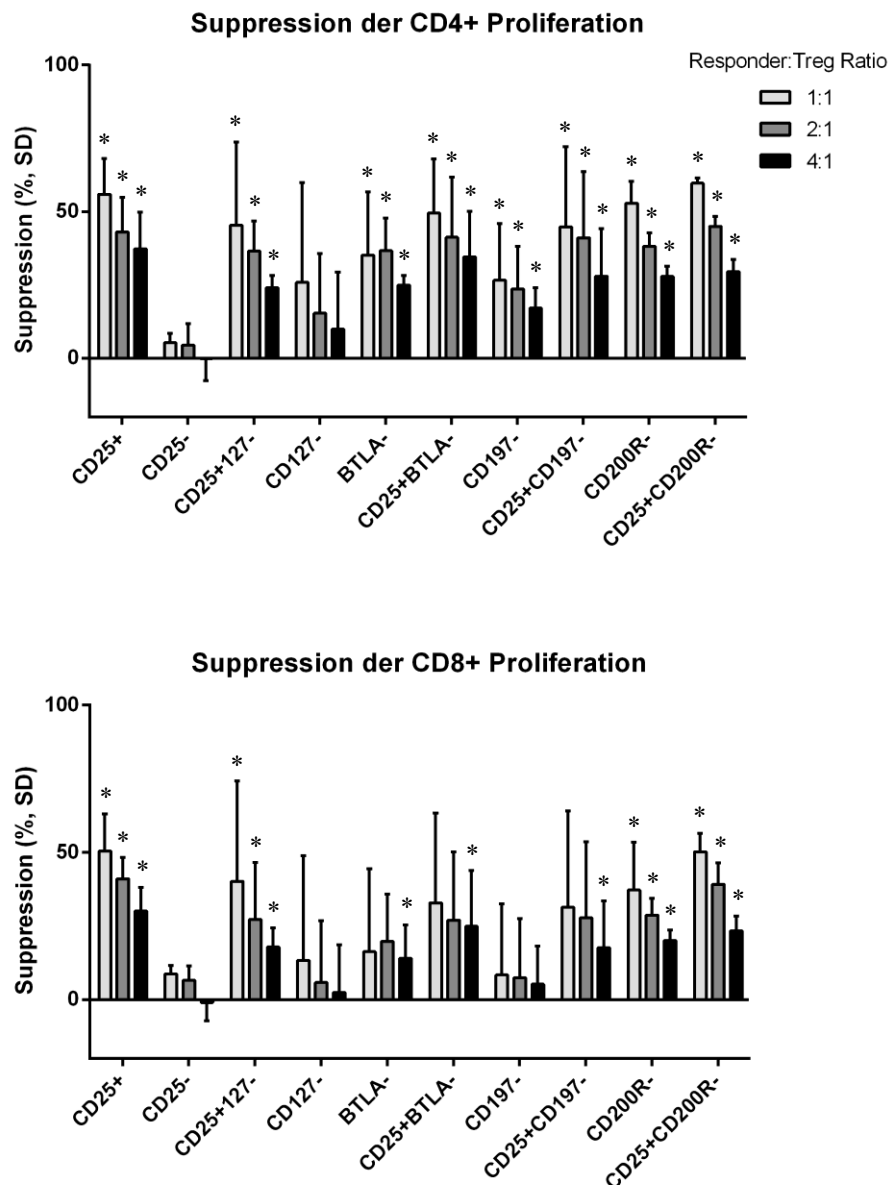


Abbildung 3.6: Quantifizierung der suppressiven Aktivität unterschiedlicher T<sub>reg</sub> - Populationen im CFSE-basierten Proliferations-Assay. 9 verschiedene T<sub>reg</sub> - Gruppen (3 etablierte Definitionen und 6 neue) sowie eine nonT<sub>reg</sub> - Kontrolle (CD25-) wurden gesortet und mit homologen PBMC unter Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 kokultiviert. Das Konzentrationsverhältnis wurde titriert; 1:1 = 5x10<sup>4</sup> Responder (PBMC) zu 5x10<sup>4</sup> T<sub>reg</sub>. Suppression wurde berechnet aus: 100 - (Proliferation ohne T<sub>reg</sub> : Proliferation mit T<sub>reg</sub>) × 100.

Drei unabhängige Wiederholungen mit Zellen verschiedener Spender wurden jeweils in Dubletten durchgeführt. SD: *standard deviation*, \*: Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu CD25-.

Für alle neu postulierten T<sub>reg</sub>-Populationen konnte eine dosisabhängige Suppression der Proliferation sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Responderzellen dargestellt werden (Abb. 3.6).

### 3.5 Zytokinanalyse der Überstände aus Suppressionsassays

Aus den Überständen der Suppressionsversuche wurden die Konzentrationen typischer T-Zell-Zytokine bestimmt, um über die Hemmung der Proliferation hinaus weitere Anhaltspunkte auf funktionelle Aktivität der Kokulturen zu erhalten. Die neu postulierten T<sub>reg</sub>-Populationen verhielten sich hierbei ähnlich wie die „Standard - T<sub>reg</sub>“; in den Überständen konnten erhöhte Mengen IL-10 gemessen werden, während die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  vermindert war. Eine Ausnahme stellten hierbei die Populationen dar, die über niedrige Expression von CD197 definiert waren. In den entsprechenden Kulturüberständen waren neben hohen IL-10-Konzentrationen auch vermehrt IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  messbar (s. Abb. 3.7 und 3.8).

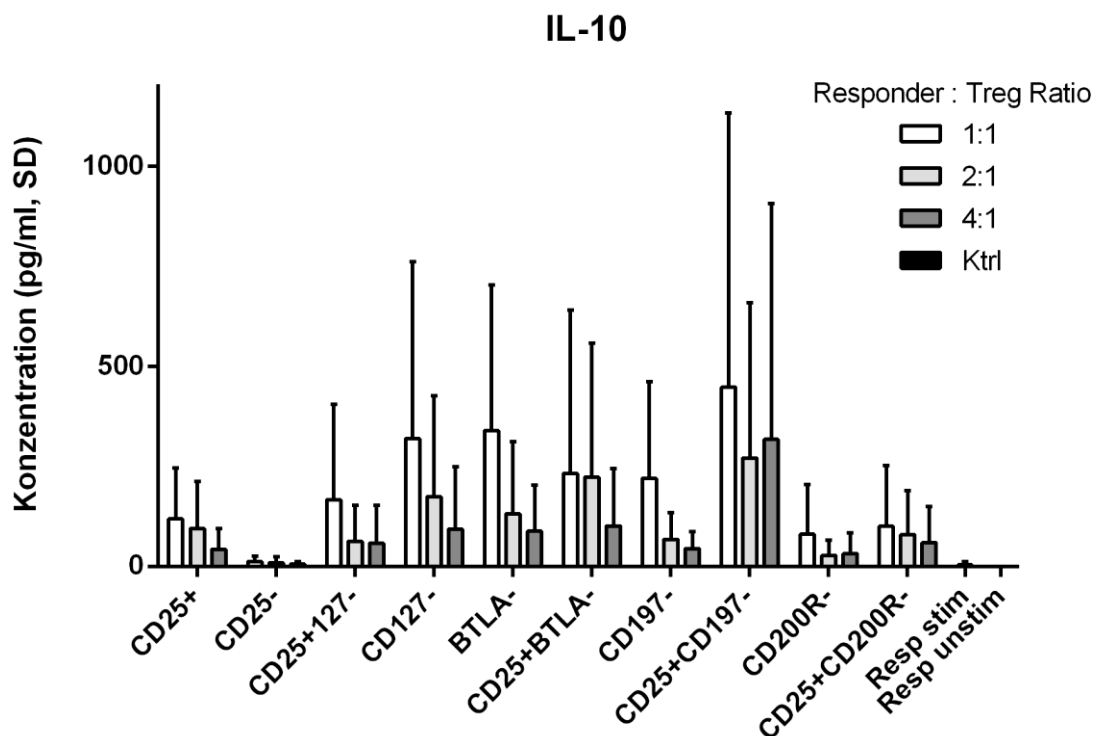


Abbildung 3.7: IL-10-Konzentrationen in den Überständen der Suppressionsassays. Überstände aus 4-tägiger Kokultur gesorteter Zellen („T<sub>reg</sub>“) mit PBMC wurden gemessen. Resp: Responderzellen (homologe PBMC), stim: stimuliert, unstim: unstimuliert, SD: *standard deviation* (n = 3). Statistische Signifikanz wurde nicht erreicht.

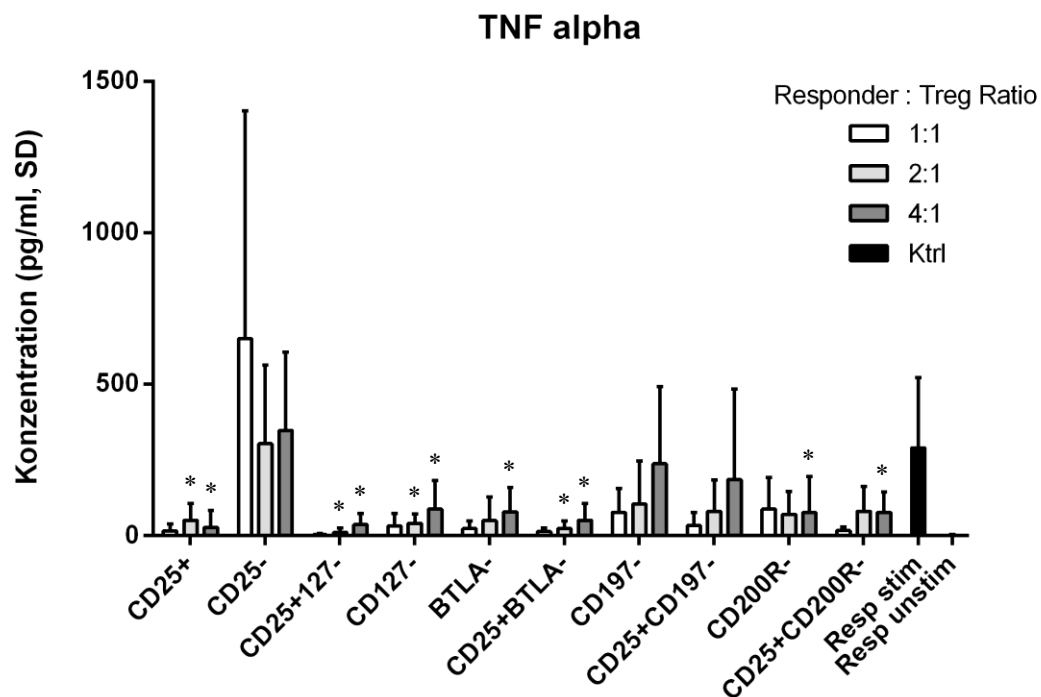
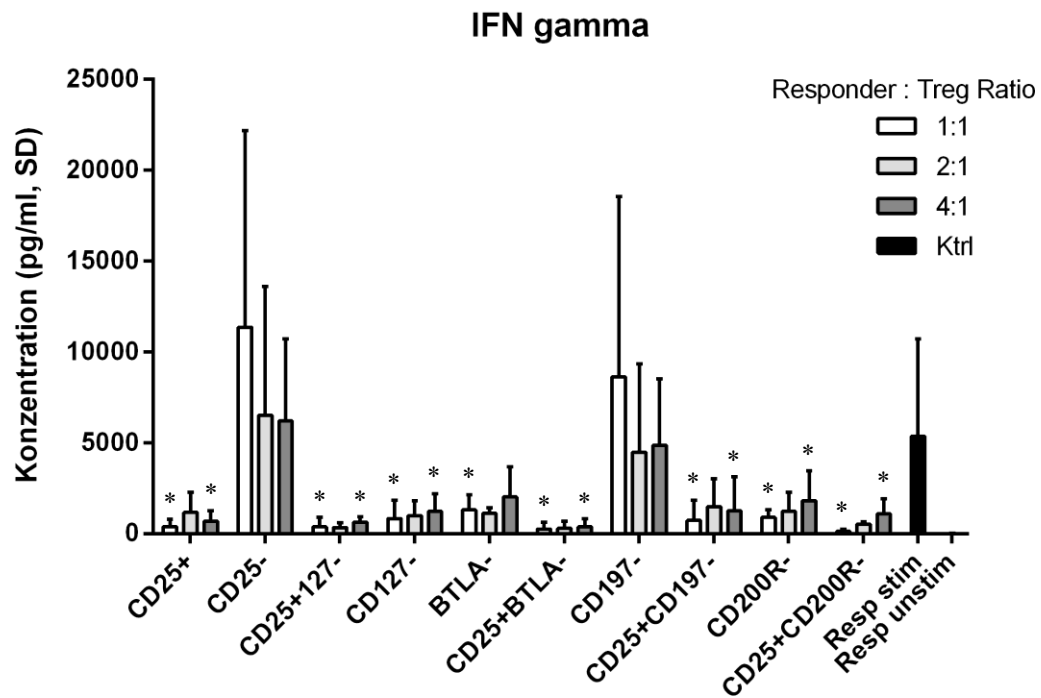


Abbildung 3.8: Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in den Überständen der Suppressionsassays. Überstände aus 4-tägiger Kokultur gesorteter Zellen („T<sub>reg</sub>“) mit PBMC wurden gemessen. Resp: Responderzellen (homologe PBMC), stim: stimuliert, unstim: unstimuliert, SD: *standard deviation* (n = 3), \*: Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$  im Vergleich zu CD 25<sup>+</sup>.

## 4 Diskussion

Nachdem Durchführung und Ergebnisse der 5 Schritte des Versuchsablaufes dargestellt wurden, sollen die Methoden und Resultate nun im Einzelnen diskutiert werden.

1. Schritt: Etablierung einer Gatingstrategie zur Differenzierung von  $T_{reg}$   
Welche Oberflächenmarker korrelieren am stärksten mit FoxP3-Expression?  
⇒ Vergleich gegenwärtiger Gating-Strategien mit FoxP3-Intrazellulärfärbung
2. Schritt: Durchführung eines ergebnisoffenen systematischen Screenings  
Können neue  $T_{reg}$ -Marker oder -Subpopulationen identifiziert werden?  
Bestätigen sich bereits beschriebene Expressionsmuster?  
⇒ Multiparameter-Oberflächenfärbung mit 332 Antikörpern
3. Schritt: Validierung der Kandidaten  
Korreliert die Expression der gefundenen Oberflächenmarker mit FoxP3?  
⇒ Intrazellulärfärbung mit FoxP3
4. Schritt: Funktionelle Untersuchung der Suppressivität  
Eignen sich die neuen Marker zur CD25-unabhängigen Isolierung suppressiver T-Zellen?  
⇒ Zell-Sorting und CFSE-Suppressionsassay
5. Schritt: Hinweise auf sekretorische Aktivität  
Welche Zytokine könnten bei der suppressorischen Aktivität der neu definierten Populationen eine Rolle spielen?  
⇒ Zytokinanalyse der Überstände aus den Suppressionsversuchen

### 4.1 Methodendiskussion

Jede wissenschaftliche Methode geht einher mit Beschränkungen und Unsicherheiten. Hierbei stellt auch die Durchflusszytometrie keine Ausnahme dar. Beschränkungen der Aussagekraft beinhalten die Fokussierung auf Strukturen, welche über Antikörper markierbar sind. Bei der Untersuchung intakter Zellen ist somit lediglich die äußere Membranoberfläche zugänglich. Zur Färbung intrazellulärer Strukturen muss, wie bereits dargestellt, die Membranintegrität verletzt werden, sodass daraufhin keine aussagekräftigen Untersuchungen dieser Zellen mehr möglich sind. Die Färbung von Oberflächenmerkmalen ist zunächst rein deskriptiv und erlaubt Schlussfolgerungen auf funktionelle

Zusammenhänge lediglich auf Grundlage der Anwesenheit oder Abwesenheit von Molekülen, die für bestimmte Funktionen notwendig sind. Der CFSE-basierte *in vitro*-Suppressionsassay stellt hierbei eine Ausnahme dar, indem die besonderen Eigenschaften des Farbstoffes herangezogen werden, um tiefer gehende Aussagen zu treffen – in diesem Fall die Proliferation der untersuchten Zellen.

Das Probenmaterial bestimmt in erheblichem Maß die Aussagekraft eines Versuches. Im vorliegenden Fall wurde bewusst auf Blutproben gesunder junger erwachsener Spender zurückgegriffen, um eine gute Vergleichbarkeit zu erzielen. Daraus ergeben sich unweigerlich Einschränkungen der möglichen Befunde, da gerade bei Immunzellen im peripheren Blut bestimmte Charakteristika vorherrschen. So finden sich etliche für  $T_{reg}$  beschriebene Oberflächenmarker überhaupt nur oder in entscheidend höherer Frequenz auf Zellen, die aus Lymphknoten oder Mucosa-assoziierten lymphatischen Geweben (MALT) gewonnen werden [202]. Des Weiteren folgt aus der Spenderauswahl die Beschränkung auf Zellen in ruhendem Zustand ohne die Möglichkeit einer Betrachtung *in vivo* aktiver  $T_{reg}$ , was auf der anderen Seite bekannte Schwierigkeiten der Identifikation suppressiver Regulatorzellen unter inflammatorischen Bedingungen durch Veränderungen des Rezeptorrepertoires vermeidet (vgl. etwa [3]).

Durch das ergebnisoffene Multiparameterscreening lassen sich Unterschiede der Oberflächenstrukturen verschiedener Zellen hervorragend unvoreingenommen quantifizieren. Limitationen sind allein durch das Versuchsdesign gegeben; in diesem Fall die Gating-Strategie, welche lediglich die Identifizierung von Markern erlaubt, die abhängig der angewandten  $T_{reg}$ -Definition nachweisbar sind.

## 4.2 Ergebnisdiskussion

Im dargestellten ersten Schritt wurden verschiedene  $T_{reg}$ -Definitionen miteinander verglichen und insbesondere auf ihre Korrelation mit der FoxP3-Expression hin untersucht, um den optimalen Versuchsaufbau für das Oberflächenmarkerscreening zu erarbeiten. Hierbei zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der  $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$  T-Zellen mit der FoxP3<sup>+</sup> Population, die durch Hinzunahme des Reifemarkers CD45RO noch verstärkt wurde. Eine völlige Kongruenz war nicht zu erreichen. Diese Ergebnisse reproduzieren vielfach beschriebene und diskutierte Messungen, wobei die Schwierigkeit einer fehlenden Standardisierung für ein  $T_{reg}$ -Gating ebenso in Erscheinung trat wie die daraus

resultierende Unsicherheit, über welche Zellen man genau spricht, wenn der Begriff  $T_{reg}$  verwendet wird (vgl. Abb. 3.1 sowie [223]).

Die vorgestellte Versuchsanordnung des Oberflächenscreenings erlaubte die Identifikation einiger Oberflächenmoleküle, welche auf  $T_{reg}$  über- oder unterexprimiert sind im Vergleich zu  $CD25^-$  T-Helferzellen. Etliche dieser Marker wurden bereits beschrieben und dienen als Richtmaß für die externe Validität der gemessenen Daten.

Die Überexpression des Ectoenzym CD39 auf humanen  $T_{reg}$  wurde von mehreren Autoren berichtet (vgl. Kap. 1.4.2) und gibt Anlass zu Überlegungen bezüglich einer funktionellen Relevanz im Sinne einer Veränderung des extrazellulären Milieus mit hemmender Wirkung auf Stimulation und Costimulation proinflammatorischer Effektorzellen durch Erniedrigung der extrazellulären ATP-Konzentration [33, 69]. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen beschriebene Unterschiede in der CD39-Expression zwischen  $T_{reg}$  und  $nonT_{reg}$  sowohl qualitativ als auch quantitativ.

Als zusätzlicher Negativmarker, der ähnlich wie CD127 invers mit der FoxP3-Expression humaner  $T_{reg}$  korreliert, wurde CD49d beschrieben [132]. Sowohl im Screening über Oberflächenmarker als auch in der Kontrolle mit intrazellulärer FoxP3-Färbung konnten die Ergebnisse mit ähnlichen Größenverhältnissen der  $CD49d^+$  bzw.  $CD49d^-$   $T_{reg}$ -Populationen reproduziert werden.

Einige Moleküle, die im Zusammenhang mit  $T_{reg}$ -Subpopulationen oder -Funktionen beschrieben wurden, konnten in diesen Versuchen nicht oder nur unwesentlich auf  $T_{reg}$  nachgewiesen werden. Im Falle von CTLA-4 erklärt sich dieser Umstand (s. Anhang 11.2) durch die im Ruhezustand vorwiegend intrazelluläre Expression dieses Markers, der erst nach Stimulation vermehrt an der Oberfläche regulatorischer T-Zellen erscheint (vgl. etwa [122]). Im Falle von CD103, OX40 (CD134), PD-1 (CD279), Neuropilin-1 (CD304), GITR (CD357) und GARP wurden niedrige bis sehr niedrige Frequenzen gemessen (s. Anhang 11.2), was mit Berichten übereinstimmt, die in  $T_{reg}$  aus peripherem menschlichen Blut eine weitaus niedrigere Expression zeigen als in  $T_{reg}$  aus MALT bzw. aus murinen Geweben [202].

Für CD62L, CD73, HLA-DR, CCR6 (CD196) und ICOS (CD278) konnte die beschriebene Expression auf entsprechenden  $T_{reg}$ -Subsets reproduziert werden (vgl. Tab. 1.1, Anhang 11.2).

Aus der Versuchsanordnung ergibt sich die Annahme, dass Beobachtungen, die an über Oberflächenmarker definierten  $T_{reg}$  gemacht werden, auch auf  $FoxP3^+$   $T_{reg}$  übertragbar sind. Die Marker mit der stärksten differentiellen Expression wurden zur Überprüfung im dritten Schritt auf ihre direkte Korrelation mit FoxP3 hin überprüft, wobei sich in der Tat einige Beobachtungen mit noch verstärktem Effekt bestätigten (vgl. Abb. 3.4), während andere relativiert wurden.

In den funktionellen Versuchen mit stimulierten Cokulturen bereits etablierter und experimentell definierter  $T_{reg}$ -Populationen mit autologen PBMC als Responderzellen zur Bestimmung der Proliferation bzw. Suppression und Messung sekretorischer Aktivität zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit veröffentlichter Ergebnisse anhand standardisierter Protokolle.

### 4.3 Neue Negativmarker

In Oberflächenscreening und Validierung mit Intrazellulärfärbung wiesen drei Moleküle ein differentielles Expressionsmuster auf, welches invers mit dem  $T_{reg}$ -Phänotyp korrelierte und die in diesem Zusammenhang in vorliegenden Berichten mit humanen Blutproben nicht näher untersucht wurden.  $CD197^-$ ,  $CD200R^-$  und  $BTLA^-$  T-Helferzellen zeigten darüber hinaus überzeugende suppressorische Aktivität in stimulierten Zellkulturen, weshalb diese Marker im Einzelnen genauer betrachtet werden sollen.

#### 4.3.1 CD197

Bei CCR7 bzw. CD197 handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor für die C-C-Motiv-Chemokine CCL19 und CCL21 [26, 277]. Funktionell handelt es sich um einen Homing-Rezeptor, welcher eine „zentrale“ Migrationsroute naiver T-Zellen ermöglicht; aus dem Blut in sekundäre Lymphorgane (Lymphknoten-Homing-Rezeptor) und über das Lymphgefäßsystem ins Blut zurück [172]. CCL21 wird von Lymphknoten-Stromazellen sezerniert und auf Endothelzellen der *High Endothelial Venules* (HEV) präsentiert, wodurch  $CD197^+$  naive T-Lymphozyten zur Extravasation befähigt werden [44]. Dieser Prozess benötigt darüber hinaus noch weitere Zelladhäsionsmoleküle und Integrine. Dendritische Zellen, welche in den parakortikalen T-Zell-Zonen der Lymphknoten residieren, produzieren CCL19 und CCL21, welche über die Bindung an CD197 die Lokalisierung der naiven T-Zellen in der T-Zell-Zone vermitteln, wo sie von APC

Antigene präsentiert bekommen [172]. Ein ähnlicher Mechanismus lenkt mithilfe weiterer Chemokin-Rezeptor-Interaktionen die Migration naiver T-Zellen in Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT). Fehlende CCR7-Expression impliziert die Unfähigkeit der Migration in lymphatische Organe, während dort aktivierte T-Lymphozyten zum Teil den Rezeptor wieder herunter regulieren, möglicherweise als Voraussetzung, das Gewebe verlassen zu können [44, 172].

CD197 wird ebenso auf aktivierten Dendritischen Zellen hochreguliert, was sie zur Migration in Lymphknoten befähigt, wo sie das aktivierende Antigen präsentieren. B-Zellen, die im Lymphfollikel (B-Zell-Zone) aktiviert wurden, exprimieren gleichfalls vorübergehend CD197, wodurch sie zur Grenze der T-Zell-Zone gelangen, um mit T-Zellen interagieren und weitere costimulatorische Signale erhalten zu können [172].

CD197 findet sich auf aktivierten B- und T-Lymphozyten, insbesondere bei solchen, die mit Herpesviren infiziert sind [172]. Das Gen wurde identifiziert, da es nach Infektion mit Epstein-Barr-Virus vermehrt transkribiert wird (*Epstein-Barr virus induced gene 1*; EB1) [26].

Der Chemokinrezeptor wird unter anderem dazu herangezogen, *memory*-T-Zellen zu unterscheiden, da „zentrale“ T-Gedächtniszellen (*central memory T cells*,  $T_{CM}$ )  $CD197^+$  sind, „Effektor“- (*effector memory T cells*,  $T_{EM}$ ) und „gewebeständige“ T-Gedächtniszellen (*tissue-resident memory T cells*,  $T_{RM}$ ) dieses Molekül jedoch nicht exprimieren [172, 220].

Im vorliegenden Versuch konnte dargestellt werden, dass  $T_{reg}$  sich durch eine niedrige CD197-Expression auszeichnen, wenn sie mit  $CD25^-$  „non- $T_{reg}$ “ verglichen werden, bzw. dass in der CD197-negativen T-Zell-Fraktion  $FoxP3^+CD25^+$  Zellen angereichert sind. Die funktionelle Untersuchung im Suppressionsassay konnte eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation stimulierter Responderzellen durch gesortete  $CD197^- CD4^+$ -T-Zellen nachweisen. Die Analyse der Zytokinüberstände aus diesen Versuchen zeigte für die  $CD197^-$  Population eine ambivalente Produktion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine, was darauf zurückgeführt werden könnte, dass diese Sort-Strategie unweigerlich auch einen Anteil an Effektor-T-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ ) beinhaltet, die nach Stimulation ihr proinflammatorisches Programm aktivieren. Konzeptionell schließt die Selektion  $CD197^-$  Lymphozyten naive T-Zellen auf dem Weg in sekundäre lymphatische

Organe und  $T_{CM}$  aus und beinhaltet neben  $T_{EM}$  auch  $T_{RM}$ , die im peripheren Blut jedoch kaum zu finden sind.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass  $CD197^- T_{reg}$  in nichtlymphatischen Organen angereichert sind und sich von  $CD197^+ T_{reg}$  durch ihre IL-2-Sensitivität unterscheiden [240].

Die weiterführende Frage ist, ob die dargestellten Ergebnisse schlicht dadurch zustande kommen, dass  $T_{reg}$  im peripheren menschlichen Blut mehrheitlich  $CD197^-$  sind und damit *effector memory*-Charakteristika aufweisen oder ob es sich bei den lediglich nach  $CD197^-$  Expression selektierten T-Helferzellen um eine  $T_{reg}$ -Subpopulation handelt, welche spezialisierte Funktionen wahrnehmen kann.

### 4.3.2 CD200R

Der CD200-Rezeptor ist wie sein Bindungspartner ein Typ1-Transmembrandomänen-Glykoprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie und wurde 2000 zuerst beschrieben [274]. Der extrazelluläre Rest beider Moleküle enthält sowohl eine V-Typ- als auch eine C-Typ-Domäne. Ein wesentlicher Unterschied betrifft den zytoplasmatischen Anteil. Hier trägt CD200 nur wenige Aminosäuren, die nach bisheriger Kenntnis keine funktionalen Aufgaben erfüllen, wohingegen CD200R zwei Tyrosinreste aufweist, welche im phosphorylierten Zustand in der Lage sind, Signaltransduktionswege in Gang zu setzen [273, 162]. Der distale Tyrosinrest ist Teil eines Phosphotyrosinbindenden (PTB) NPxY-Motivs, welches über das Adaptermolekül Dok2 (*downstream of tyrosin kinase / docking protein*) den Ras-p21-Proteinaktivator-1 (*RasGAP GTPase-activating protein*)-Weg aktiviert. Dies führt zur Hemmung des Ras-ERK- und des PI3K-abhängigen Aktivierungssignals [160].

Daraus ergibt sich funktionell die Rolle eines coinhibitorischen Rezeptors, obwohl CD200R nicht über ein ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) verfügt [162, 136]. So führt die Interaktion von CD200 verschiedener Zellen mit seinem Rezeptor auf Makrophagen und Dendritischen Zellen zur Hemmung deren inflammatorischer Antwort. Hierbei spielt eine Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  sowie die Induktion von IL10 und  $TGF\beta$  eine Rolle [136]. Das Ausbleiben des CD200:CD200R-abhängigen Signals führt in experimentellen Modellen autoimmuner Krankheiten zu einem rascheren Fortschreiten [108].

Die Expressionsmuster beider Moleküle unterscheiden sich wesentlich; während CD200 auf einer breiten Vielzahl sowohl hämatopoetischer als auch nicht-hämatopoetischer Zellen exprimiert wird, ist die Darstellung von CD200R deutlich begrenzter auf Zellen der myeloiden Reihe (Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Mastzellen) und einige lymphoide Zellen [273]. Die CD200R-Expression auf T-Helferzellen ist bei pädiatrischen Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung erniedrigt, während die CD200<sup>+</sup>-Frequenz erhöht ist [75]. Im TME (*tumor microenvironment*) spielt die CD200:CD200R-Interaktion Untersuchungen zufolge eine Rolle durch Promotion der Tumorpheriferation, sodass die Blockade dieses Signals als Immuncheckpoint in der Tumorthherapie untersucht wird [120].

Im hier durchgeführten Oberflächenscreening ist CD200R auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> unterexprimiert im Vergleich zu „non-T<sub>reg</sub>“. Diese Beobachtung ließ sich durch Intrazellulärfärbung mit FoxP3 auch auf diese T<sub>reg</sub>-Definition übertragen. Im Suppressionsassay konnte eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation stimulierter Responderzellen durch gesortete CD200R<sup>-</sup> T-Helferzellen dargestellt werden. In den Überständen wurde eine gegenüber der nicht gehemmten Kontrolle verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , sowie eine moderate IL-10-Produktion gemessen.

Angesichts des restriktiven Expressionsmusters des CD200-Rezeptors insbesondere auf lymphoiden Zellen sind diese Ergebnisse nicht ohne Weiteres selbstverständlich. Nur etwa die Hälfte der nonT<sub>reg</sub>-Zellen waren im Screening CD200R<sup>+</sup>. Möglicherweise existiert ein Gradient, an dessen unterem Ende T<sub>reg</sub> angereichert sind.

Ein Fehlen von CD200R bei gleichzeitiger Expression des Agonisten CD200 ist gut vereinbar mit einer regulatorisch aktiven Zelle, die insbesondere hemmend auf myeloide Abwehrzellen wirkt. Allerdings zeigte im Screening nur eine kleine Subpopulation der CD4<sup>+</sup> Zellen eine CD200-Expression, ohne signifikante Unterschiede zwischen T<sub>reg</sub> und nonT<sub>reg</sub> (s. Anhang 11.2).

### 4.3.3 BTLA (CD272)

Der *B- and T-Lymphocyte Attenuator/Associated* wurde erstmals 2003 beschrieben [269]. Es handelt sich um ein Transmembrandomänen-Rezeptorprotein aus der CD28-Immunglobulin-Superfamilie [163]. BTLA enthält in seiner zytoplasmatischen Domäne ein ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) und ein ITSM (*immunoreceptor*

*tyrosine-based switch motif*), welche im (Tyrosin-) phosphorylierten Zustand inhibitorische Phosphatasen rekrutieren können. Diese sind in der Lage, verschiedene Phosphatreste von Proteinen zu entfernen, welche von Tyrosinkinasen angefügt wurden, wodurch die Aktivierung dieser Proteine rückgängig gemacht und ihr Signalweg gehemmt wird [172]. Es wird auf aktivierten T- und B-Zellen, sowie einigen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert [172].

BTLA bindet im Gegensatz zu anderen Molekülen der CD28-Superfamilie keine B7-Moleküle, sondern den *Herpes Virus Entry Mediator* HVEM (CD270), welcher zur TNFRSF zählt und auf ruhenden T-Zellen sowie unreifen Dendritischen Zellen hoch exprimiert wird [232]. Verfügt die Zielzelle nur über HVEM, löst die Bindung von BTLA die Aktivierung eines NFκB-abhängigen Überlebenssignals aus. Bei Coexpression beider Moleküle verhindert BTLA diesen HVEM-vermittelten Signalweg [172].

HVEM bindet seinerseits noch weitere Liganden. Ein costimulatorisches Signal wird durch Interaktion mit dem LIGHT-Molekül (CD258) empfangen. Als coinhibitorischer Rezeptor für HVEM fungiert analog zu BTLA auch CD160 [70].

Die Rolle von BTLA als coinhibitorischer Rezeptor wird durch Beobachtungen aus experimentellen Studien gestützt, die durch BTLA-Knockout das Auftreten verschiedener autoimmunologischer Phänomene herbeiführten [185]. Ein Suppressionsmechanismus durch Bindung von auf  $T_{reg}$  exprimiertem HVEM mit BTLA auf  $T_{eff}$  wird diskutiert [163].

Abweichend hiervon konnten sowohl für BTLA als auch für CD160 bei Bindung an HVEM eine Aktivierung NFκB-abhängiger Überlebenssignale beschrieben werden, welche eine situationsabhängige stimulatorische Funktion implizieren [254].

Interessanterweise zeigte sich BTLA auf  $CD25^+ T_{reg}$  ebenso wie auf  $FoxP3^+ T_{reg}$  erniedrigt gegenüber der  $CD25^-$  „non $T_{reg}$ “-Population. Diese Beobachtung wurde bereits auf murinen Zellen beschrieben, wobei zusätzlich gezeigt wurde, dass  $T_{reg}$  auf Stimulation hin einen deutlich schwächeren Anstieg der BTLA-Expression aufweisen als  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen [115, 251].

Die gesortete BTLA $^-$  Population supprimierte die Proliferation stimulierter Responderzellen dosisabhängig und in vergleichbarem Ausmaß wie konventionell gesortete  $CD25^+CD127^- T_{reg}$ . Die Zytokinanalyse der Überstände zeigte eine verminderte Konzentration proinflammatorischer Zytokine sowie eine starke IL-10-Produktion. Als

Konsequenz dieser Beobachtungen vor dem Hintergrund der beschriebenen Erkenntnisse zur Funktion von BTLA lässt sich diskutieren, ob die Abwesenheit des Rezeptors auf der dargestellten, suppressorisch aktiven Population einen Surrogatmarker darstellt, welcher mit anderen, funktionell bedeutsameren Charakteristika lediglich koinzidiert, oder ob sich ein eigener, von BTLA oder dessen Abwesenheit getragener Mechanismus abgrenzen lässt. Eine Möglichkeit ist das Fehlen des Überlebenssignals, welches BTLA bei der Bindung an HVEM auslöst, bei der Interaktion zwischen  $T_{reg}$  und  $T_{eff}$ . Des Weiteren könnte das Fehlen von BTLA bei gleichzeitiger Expression von HVEM durch  $T_{reg}$  zu einer größeren Überlebenswahrscheinlichkeit führen - ein möglicher Synergismus zur privilegierten IL-2-Sensitivität der  $T_{reg}$  auf Basis des hochaffinen IL-2-Rezeptors. Im vorliegenden Screening zeigten ca. 25% der  $T_{reg}$  eine Expression von HVEM, welche allerdings deutlich niedriger war als auf non- $T_{reg}$  (s. Anhang 11.2).

#### **4.4 Ausblick, weiterer Forschungsbedarf**

Aus dem durchgeführten Oberflächenscreening ergibt sich ein breites Bild als Markerprofil der  $CD4^+$  T-Zellen (s. Anhang 11.2), welches als Anhalts- und Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen dienen kann. So können etwa Studien an Zellen anderer Gewebe oder unter immunaktiven Bedingungen mit diesem Bild im *steady state* verglichen werden.

Weitere Untersuchungen auf dieser Grundlage könnten tiefergehende funktionelle Aussagen erlauben, indem etwa die Verteilung bestimmter Marker bei Patienten mit autoimmunem, inflammatorischen oder Krebskrankheiten untersucht und mit der gesunder Spender verglichen würde. Ebenso spannend ist ein Vergleich des dargestellten Markerprofils mit dem gewebebeständiger  $T_{reg}$  aus Lymphknoten oder Schleimhautproben.

Die dargestellten Ergebnisse liefern Anhaltspunkte für bisher nicht untersuchte  $T_{reg}$ -Definitionen bzw. -Subpopulationen. Weitere Untersuchungen könnten die Darstellung molekularbiologischer Hintergründe der neu postulierten Marker im Rahmen der etablierten genetischen und epigenetischen Konzepte des derzeitigen  $T_{reg}$ -Modells beinhalten.

Die Natur der untersuchten Negativmarker ermöglicht einen unkomplizierten Zugang zu suppressorisch aktiven Populationen, die über Färbung eines einzelnen Markers aus der  $CD4^+$  Fraktion von PBMC identifizierbar sind, ohne daraufhin von einem Fluorochrom-

konjugierten Antikörper gebunden zu sein („*untouched*“). Somit könnten sie nach weiteren Untersuchungen und unabhängiger Bestätigung eine attraktive Alternative zu derzeitigen Vorgehensweisen darstellen, T<sub>reg</sub> für Forschung oder klinische Anwendungen zu isolieren.

## 5 Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) machen einen geringen Prozentsatz  $CD4^+$  T-Zellen aus, spielen jedoch eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase. Sie tragen einen zellulären Mechanismus dominanter peripherer Toleranz, indem sie proinflammatorische Zellen aktiv mittels eines eigenen Repertoires an Zelloberflächenmolekülen und löslichen Faktoren hemmen. Die Biologie der  $T_{reg}$  ermöglicht ein besseres Verständnis des Immunsystems und die Nutzbarmachung ihrer Eigenschaften stellt die Entwicklung neuer Behandlungsansätze sowohl für Autoimmun- als auch für Krebserkrankungen in Aussicht.

Die stabilste und entscheidendste Eigenschaft der heterogenen Zellfamilie ist eine epigenetische Landschaft mit  $T_{reg}$ -spezifischen demethylierten DNS-Regionen und einer starken Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, insbesondere FoxP3. Die Expression von Zelloberflächenmolekülen, vornehmlich CD25 kann herangezogen werden, um funktionell suppressive  $T_{reg}$  für experimentelle und klinische Anwendungen zu beschreiben und zu isolieren. Es bestehen jedoch weiterhin Herausforderungen für Fortschritte in Verständnis und Anwendung, da keine dieser Marker ausschließlich bei  $T_{reg}$  zu finden sind.

Um den  $T_{reg}$ -Phänotyp weiter zu untersuchen, wurde ein durchflusszytometrisches Screening mit mehreren hundert Oberflächenepitopen an  $CD4^+$  Zellen aus peripherem Blut erwachsener humaner Spender durchgeführt, nachdem eine Gating-Strategie zur optimalen Korrespondenz mit nukleärer FoxP3-Expression feinjustiert worden war. Daraus ergab sich ein umfangreiches Oberflächenprofil  $CD4^+$  T-Zellen mit der Möglichkeit, verschiedene Subpopulationen zu untersuchen. Vielversprechende Kandidatenmoleküle wurden mittels Intrazellulärfärbung direkt mit der Expression von FoxP3 verglichen. Drei Moleküle zeigten eine niedrige Expression auf  $T_{reg}$  im Vergleich zu  $CD4^+CD25^-$  oder FoxP3 $^-$  Zellen, die vorher nicht im Zusammenhang mit  $T_{reg}$  beschrieben wurden: CD197, CD200R und BTLA. Es folgten Experimente mit Cokulturen gesorteter Zellpopulationen anhand dieser Negativmarker. Die neu definierten Zellen zeigten ähnliche suppressive Kapazität und Zytokinsekretionsmuster wie herkömmliche  $T_{reg}$ -Populationen. Diese Ergebnisse eröffnen neue Perspektiven auf Identität, Entwicklung und Verhalten von  $T_{reg}$  und ermöglichen deren unmarkierte Isolierung.

## 6 Abstract

Regulatory T cells ( $T_{reg}$ ) represent a small percentage of  $CD4^+$  T cells while playing a crucial role in the maintenance of immune homeostasis. They carry a cellular mechanism of dominant peripheral tolerance by actively suppressing proinflammatory cells using a distinct repertoire of cell surface molecules and soluble factors.  $T_{reg}$  biology promises a better understanding of the immune system and the exploitation of its features can open new paths of treatment in both autoimmune disorders and cancer.

The most stable and decisive characteristic of the heterogeneous cell family is an epigenetic landscape with  $T_{reg}$ -specific demethylated DNA regions and strong activation of certain transcription factors, most importantly FoxP3. Expression of cell surface markers, particularly CD25 can be used to describe and isolate functionally suppressive  $T_{reg}$  in experimental and clinical applications. There remain challenges to the advancing understanding and implementation, however, since none of these markers are exclusive to  $T_{reg}$ .

In order to further elucidate the  $T_{reg}$  surface phenotype, a flowcytometric screening for several hundred surface epitopes was carried out on  $CD4^+$  peripheral blood cells of adult human donors after fine-tuning a gating strategy which corresponds best with the nuclear expression of FoxP3. This yielded an extensive surface molecule profile of  $CD4^+$  T cells with the possibility to analyze various subpopulations. Promising candidate molecules were directly compared with FoxP3 expression using intracellular staining. Three molecules showed low expression on  $T_{reg}$  compared to  $CD4^+CD25^-$  or  $FoxP3^-$  cells, that were not previously described in connection with  $T_{reg}$  biology: CD197, CD200R and BTLA. Cell sorting and co-culture experiments followed to study these three negative markers. The newly defined cells showed similar suppressive capacity and cytokine secretion patterns compared to conventional  $T_{reg}$  populations. These results allow new perspectives on  $T_{reg}$  identity, development and behavior as well as untouched access for isolation.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ACT	<i>Adoptive cell therapy</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AmCyan	<i>Anemonia majano</i> Cyan
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> ; Antigenpräsentierende Zelle
APC (Fluorochrom)	Allophycocyanin
ATF1	<i>Activating transcription factor 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
at-RA	<i>all-trans retinoic acid</i> , Tretinoin
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma protein 6</i>
BTLA	<i>B- and T-Lymphocyte Attenuator (CD272)</i>
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CAR-T	<i>Chimeric antigen receptor T cell</i>
CBF $\beta$	<i>Core-binding factor subunit <math>\beta</math></i>
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFDA-SE / CFSE	Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester
cMyc	<i>cellular Myelocytomatosis</i>
CNS	<i>Conserved non-coding sequence</i>

COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CREB	<i>cAMP-responsive element-binding protein</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CD152)</i>
CXCR	<i>CXC-Motiv-Chemokinrezeptor</i>
Cy	<i>Cyanin</i>
DC	<i>Dendritic cell; Dendritische Zelle</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure</i>
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i>
DNS	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
Dok	<i>Downstream of tyrosin kinase / docking protein</i>
DR3	<i>Death receptor 3</i>
EAAI	<i>Experimental allergic airway inflammation</i>
EAE	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EBI1	<i>Epstein-Barr virus induced gene 1</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
ENTPD1	<i>Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase-1 (CD39)</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
ETS	<i>E26 transformation-specific</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAO	<i>Fatty acid oxidation</i>
Fc	<i>Fraction crystallizable</i>
FCS	<i>Fetal calve serum</i>

FDA	<i>Food and drug administration</i> der USA
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
FoxO	<i>Forkhead box protein</i> Gruppe O
FoxP	<i>Forkhead box protein</i> Gruppe P
FSC	<i>Forward scatter</i>
GAL	Galectin
GARP	<i>Glycoprotein A Reiterations Predominant</i>
GATA-3	GATA-bindender Transkriptionsfaktor 3
GITR	Glukokortikoid-induzierbarer TNF-Rezeptor (CD357, TNFRSF18)
Glut1	Glukosetransporter 1
GvHD	<i>Graft-versus-Host disease</i>
HA	<i>Hyaluronic acid</i> ; Hyaluronsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HEV	<i>High Endothelial Venules</i>
HIF1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HVEM	<i>Herpes Virus Entry Mediator</i>
ICI	Immun-Checkpoint-Inhibitoren
ICOS	<i>Inducible T-Cell costimulator</i> (CD278)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin

IKZF	<i>Ikaros family zinc finger protein</i>
IL	Interleukin
IPEX	<i>Immundysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
iT <sub>reg</sub>	<i>(in vitro)</i> induzierte T <sub>reg</sub>
ITSM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
KAT5	Histon-Acetyltransferase KAT5
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
LAG-3	<i>Lymphocyte activating gene 3</i>
LAP	<i>Latency associated peptide</i>
LIGHT	<i>homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes (TNFSF14, CD258)</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	<i>Membrane attack complex</i>
MAdCAM-1	<i>Mucosal vascular adressin cell adhesion molecule 1</i>
MALT	<i>Mucosa-associated lymphatic tissue; Mucosa-assozierte lymphatische Gewebe</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex</i>
MS	Multiple Sklerose
mTOR	<i>mammalian/mechanisitic Target of Rapamycin</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>

NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Natürliche Killerzelle
NOD	<i>Nonobese diabetic mouse</i>
Nrp-1	Neuropilin 1
NT5E	Ecto-5'-Nucleotidase (5'-NT/CD73)
nT <sub>reg</sub>	natürliche T <sub>reg</sub>
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> ; Pathogenassoziiertes molekulares Muster
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1 (CD 279)</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PP1	Proteinphosphatase 1
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome-proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>
PTB	Phosphotyrosinbindende Domäne
pT <sub>reg</sub>	Peripherie-derivierte T <sub>reg</sub>
RA	Rheumatoide Arthritis
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i> (GTP-bindendes Protein)
RCF	<i>Relative centrifugal force</i>

REL	Teil der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>
ROR $\gamma$ t	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i> , thymusspezifische Isoform
rrMS	<i>relapsing-remitting</i> (schubförmig remittierende) Multiple Sklerose
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome corona virus 2</i>
SCFA	<i>Short chain fatty acid</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SFB	<i>Segmented filamentous bacteria</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SMAD	Transkriptionsfaktorenfamilie mit genetischen Homologien zu SMA- ( <i>small worm phenotype</i> ) bei <i>Caenorhabditis elegans</i> und MAD- ( <i>mothers against decapentaplegic</i> ) bei <i>Drosophila</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
T <sub>C</sub>	Cytotoxische T-Zellen
T <sub>CM</sub>	<i>Central memory</i> T-Zellen
TCA cycle	<i>Tricarboxylic acid cycle</i> ; Citratzyklus
TCR	<i>T cell receptor</i>
T <sub>eff</sub>	T-Effektorzellen
T <sub>EM</sub>	<i>Effector memory</i> T-Zellen

TET	<i>Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TME	<i>Tumor Microenvironment</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF	TNF-Rezeptor-Superfamilie
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Lymphozyten
T <sub>RM</sub>	<i>Tissue-resident memory T-Zellen</i>
TSDR	T <sub>reg</sub> -spezifische demethylierte Regionen
tT <sub>reg</sub>	Thymus-derivierte T <sub>reg</sub>
USP7	<i>Ubiquitin-specific peptidase 7</i>
VDRE	<i>Vitamin D Response Element</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Lymphopoese ist ein Teil der Blutbildung und bringt neben B- und NK-Zellen alle T-Zellen hervor.....	6
Abbildung 1.2: Aviditätstheorie der TCR-Diversität.....	12
Abbildung 1.3: T <sub>reg</sub> -Phänotyp.....	17
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen von FoxP3 und ihren Interaktionspartnern.....	18
Abbildung 1.5: Epigenetische Kontrolle über die FoxP3-Expression wird durch Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an Promoter sowie CNS 1-3 ausgeübt.....	20
Abbildung 1.6: Mechanismen T <sub>reg</sub> -vermittelter Suppression.....	24
Abbildung 1.7: Metabolische Faktoren beeinflussen die Immunhomöostase.....	25
Abbildung 1.8: Das lokale Mikromilieu beeinflusst Stabilität und Funktion der regulatorischen T-Zellen.....	27
Abbildung 1.9: Therapeutische Ansätze der T <sub>reg</sub> -Biologie.....	32
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Dichtegradienten-Zentrifugation.....	41
Abbildung 2.2: Grundprinzip der Durchflusszytometrie.....	43
Abbildung 2.3: Beispiel eines optischen Systems mit vier Fluoreszenzkanälen.....	44
Abbildung 2.4: <i>Forwardscatter</i> und <i>Sidescatter</i> .....	45
Abbildung 2.5: Durchflusszytometrische Differenzierung von Blutzellen anhand der Parameter <i>forward scatter</i> (FSC) und <i>side scatter</i> (SSC).....	46
Abbildung 2.6: Optisches System des FACSCantoII.....	47
Abbildung 2.7: Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....	49
Abbildung 2.8: CFDASE passiert die Zellmembran und wird intrazellulär enzymatisch gespalten.....	52
Abbildung 2.9: Darstellung der stimulierten Zellteilung mittels CFSE-Färbung.....	53
Abbildung 2.10: Exemplarische Darstellung der Sortgates zur Auswahl experimenteller und herkömmlicher T <sub>reg</sub> - Populationen.....	54
Abbildung 3.1: Gating-Strategie für das Screening nach Oberflächenmarkern.....	60
Abbildung 3.2: Ergebnis des Screenings (Punktwolken).....	63
Abbildung 3.3: Ergebnisse des Screenings (Balkendiagramm).....	64
Abbildung 3.4: Validierung der differentiell exprimierten Antigene durch Vergleich mit FoxP3-Intrazellulärfärbung.....	66

Abbildung 3.5: Suppression im CFSE-Assay. ....	67
Abbildung 3.6: Quantifizierung der suppressiven Aktivität unterschiedlicher T <sub>reg</sub> - Populationen im CFSE-basierten Proliferations-Assay.....	68
Abbildung 3.7: IL-10-Konzentrationen in den Überständen der Suppressionsassays. ....	69
Abbildung 3.8: Konzentrationen von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ in den Überständen der Suppressionsassays.....	70

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Weitere T <sub>reg</sub> -Marker. ....	15
Tabelle 2.1: Reagenzien, Pufferlösungen und Medien .....	37
Tabelle 2.2: Fluorochrom-konjugierte Antikörper .....	38
Tabelle 2.3: Laborzubehör .....	39
Tabelle 2.4: Geräte, Software.....	40
Tabelle 2.5: Beschreibung der Laser des BD FACSCanto II.....	44
Tabelle 2.6: Absorptions- und Emissionsmaxima typischer Fluorochrome .....	47
Tabelle 2.7: Antikörper-Panel für das Oberflächenscreening.....	50
Tabelle 2.8: Versuchsanordnung für den T <sub>reg</sub> Suppression Assay .....	54
Tabelle 2.9: Pipettierschema für den Suppression Assay .....	55
Tabelle 2.10: Layout der Cokulturen des Suppressionsassays.....	55
Tabelle 3.1: Ausgewählte Ergebnisse des Screenings. ....	61
Tabelle 3.2: Ergebnisse der Validierung durch Intrazellulärfärbung mit FoxP3. ....	65

## 10 Literatur

1. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA et al. (2013) Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nature immunology* 14(4):307–308
2. Abbasi J (2020) Regulatory T Cells Tested in Patients With COVID-19 ARDS. *JAMA* 324(6):539
3. Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG et al. (2008) Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cellular immunology* 251(2):109–115
4. Akkaya B, Oya Y, Akkaya M et al. (2019) Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nature immunology* 20(2):218–231
5. Alam MS, Kurtz CC, Rowlett RM et al. (2009) CD73 is expressed by human regulatory T helper cells and suppresses proinflammatory cytokine production and *Helicobacter felis*-induced gastritis in mice. *The Journal of infectious diseases* 199(4):494–504
6. Allakhverdi Z, Fitzpatrick D, Boisvert A et al. (2006) Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets. *The Journal of allergy and clinical immunology* 118(6):1342–1349
7. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK et al. (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International immunology* 19(4):345–354
8. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F et al. (2002) Phenotype, Localization, and Mechanism of Suppression of CD4 + CD25 + Human Thymocytes. *J Exp Med* 196(3):379–387
9. Arpaia N, Campbell C, Fan X et al. (2013) Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504(7480):451–455
10. Arpaia N, Green JA, Moltedo B et al. (2015) A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* 162(5):1078–1089
11. Arpaia N, Rudensky AY (2014) Microbial metabolites control gut inflammatory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(6):2058–2059

12. Asano M, Toda M, Sakaguchi N et al. (1996) Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *The Journal of experimental medicine* 184(2):387–396
13. Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR et al. (1994) Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 76(4):651–663
14. Ayyoub M, Deknuydta F, Raimbauda I et al. (2009) Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(21):8635–8640
15. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E et al. (2006) Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *The Journal of clinical investigation* 116(6):1713–1722
16. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ et al. (2001) CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *The Journal of Immunology* 167(3):1245–1253
17. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA (2002) Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169(11):6210–6217
18. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA (2006) MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 176(8):4622–4631
19. Bailey-Bucktrout SL, Bluestone JA (2011) Regulatory T cells: stability revisited. *Trends in immunology* 32(7):301–306
20. Barbi J, Pardoll D, Pan F (2013) Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunological Reviews* 252(1):52–77
21. BD Biosciences (2006) BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual
22. Belkaid Y (2007) Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature reviews. Immunology* 7(11):875–888
23. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *nature genetics* 27(1):20–21
24. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW et al. (2009) IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 113(18):4240–4249

25. Bianchini R, Bistoni O, Alunno A et al. (2011) CD4(+) CD25(low) GITR(+) cells: a novel human CD4(+) T-cell population with regulatory activity. *European journal of immunology* 41(8):2269–2278
26. Birkenbach M, Josefsen K, Yalamanchili R et al. (1993) Epstein-Barr virus-induced genes: first lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *Journal of virology* 67(4):2209–2220
27. Bittner S, Knoll G, Ehrenschwender M (2017) Death receptor 3 signaling enhances proliferation of human regulatory T cells. *FEBS letters* 591(8):1187–1195
28. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M et al. (2015) Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science translational medicine* 7(315):315
29. Bluestone JA, Tang Q (2018) Treg cells-the next frontier of cell therapy. *Science (New York, N.Y.)* 362(6411):154–155
30. Boehmer H von, Daniel C (2013) Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 12(1):51–63
31. Boitard C, Yasunami R, Dardenne M et al. (1989) T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *The Journal of experimental medicine* 169(5):1669–1680
32. Boldt A, Borte S, Fricke S et al. (2014) Eight-color immunophenotyping of T-, B-, and NK-cell subpopulations for characterization of chronic immunodeficiencies. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 86(3):191–206
33. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D et al. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110(4):1225–1232
34. Bouvier M, Hacker M, lefevre Sb (2020) Efficacy of Oral Tolerance Induction to raw apple using an Ultra Rush protocol in 28 patients allergic to rosaceae fruits: RAAP Study
35. Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 97:77–89
36. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM et al. (2004) Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *European journal of immunology* 34(3):623–630

37. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. (2001) Disruption of a new fork-head/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *nature genetics* 27(1):68–73
38. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q 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):1061–1070
39. Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH et al. (2016) Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood* 127(8):1044–1051
40. Buckner JH (2010) Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature reviews. Immunology* 10(12):849–859
41. Buerth C, Mausberg AK, Heininger MK et al. (2016) Oral Tolerance Induction in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Candida utilis Expressing the Immunogenic MOG35-55 Peptide. *PLoS ONE* 11(5):e0155082
42. Calzada D, Baos S, Cremades-Jimeno L et al. (2018) Immunological Mechanisms in Allergic Diseases and Allergen Tolerance: The Role of Treg Cells. *Journal of immunology research* 2018:6012053
43. Camisaschi C, Casati C, Rini F et al. (2010) LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184(11):6545–6551
44. Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ et al. (2001) CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166(2):877–884
45. Cao D, Malmström V, Baecher-Allan C et al. (2003) Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *European journal of immunology*(33):215–223
46. Caridade M, Graca L, Ribeiro RM (2013) Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models. *Frontiers in immunology* 4:378
47. Cepika A-M, Sato Y, Liu JM-H et al. (2018) Tregopathies: Monogenic diseases resulting in regulatory T-cell deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* 142(6):1679–1695

48. Charych DH, Hoch U, Langowski JL et al. (2016) NKTR-214, an Engineered Cytokine with Biased IL2 Receptor Binding, Increased Tumor Exposure, and Marked Efficacy in Mouse Tumor Models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22(3):680–690
49. Chatila TA, Blaeser F, Ho N et al. (2000) JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *The Journal of clinical investigation* 106(12):81
50. Chen C, Rowell EA, Thomas RM et al. (2006) Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *The Journal of biological chemistry* 281(48):36828–36834
51. Chen M-L, Yan B-S, Bando Y et al. (2008) Latency-Associated Peptide Identifies a Novel CD4+CD25+ Regulatory T Cell Subset with TGF- $\beta$ -Mediated Function and Enhanced Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 180(11):7327–7337
52. Chen W, Jin W, Hardegen N et al. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25-naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198(12):1875–1886
53. Chen X, Oppenheim JJ (2011) Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *International immunopharmacology* 11(10):1489–1496
54. Chen X, Subleski JJ, Hamano R et al. (2010) Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *European journal of immunology* 40(4):1099–1106
55. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J et al. (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265(5176):1237–1240
56. Chen Y, Sun J, Liu H et al. (2019) Immunotherapy Deriving from CAR-T Cell Treatment in Autoimmune Diseases. *Journal of immunology research* 2019:5727516
57. Chetty R, Gatter K (1994) CD3: Structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *The Journal of Pathology* 173(4):303–307
58. Cipolla EM, Alcorn JF (2020) Repair of the Lung by Regulatory T Cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 63(4):405–407

59. Cipolletta D, Feuerer M, Li A et al. (2012) PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486(7404):549–553
60. Clough JN, Omer OS, Tasker S et al. (2020) Regulatory T-cell therapy in Crohn's disease: challenges and advances. *Gut* 69(5):942–952
61. Coe DJ, Kishore M, Marelli-Berg F (2014) Metabolic regulation of regulatory T cell development and function. *Frontiers in immunology* 5:590
62. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL et al. (2010) IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature immunology* 11(12):1093–1101
63. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT et al. (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450(7169):566–569
64. Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo CV et al. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF- $\beta$  and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 204(8):1757–1764
65. Costantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA (2008) Multiple sclerosis and regulatory T cells. *Journal of clinical immunology* 28(6):697–706
66. Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* 10(9):942–949
67. D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR et al. (2009) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *The Journal of clinical investigation* 119(10):2898–2913
68. Daniel C, Weigmann B, Bronson R et al. (2011) Prevention of type 1 diabetes in mice by tolerogenic vaccination with a strong agonist insulin mimotope. *The Journal of experimental medicine* 208(7):1501–1510
69. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W et al. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* 204(6):1257–1265
70. del Rio ML, Lucas CL, Buhler L et al. (2010) HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. *Journal of leukocyte biology* 87(2):223–235
71. Desreumaux P, Foussat A, Allez M et al. (2012) Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 143(5):1207

72. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A et al. (2011) Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 117(14):3921–3928
73. Dietze KK, Zelinskyy G, Liu J et al. (2013) Combining Regulatory T Cell Depletion and Inhibitory Receptor Blockade Improves Reactivation of Exhausted Virus-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells and Efficiently Reduces Chronic Retroviral Loads. *PLOS Pathogens* 9(12):1–7
74. Dyck L, Mills KHG (2017) Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *European journal of immunology* 47(5):765–779
75. Elshal MF, Aldahlawi AM, Saadah OI et al. (2016) Expression of CD200R1 and its Ligand CD200 on T-helper Lymphocytes of Pediatric Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Clinical laboratory* 62(8):1521–1529
76. Ermann J (2005) Only the CD62L<sup>+</sup> subpopulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 105(5):2220–2226
77. Esmaeilzadeh A, Tahmasebi S, Athari SS (2020) Chimeric antigen receptor -T cell therapy: Applications and challenges in treatment of allergy and asthma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 123:109685
78. Faria AMC, Weiner HL (2006) Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & developmental immunology* 13(2-4):143–157
79. Ferreira LMR, Muller YD, Bluestone JA et al. (2019) Next-generation regulatory T cell therapy. *Nature reviews. Drug discovery* 18(10):749–769
80. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D et al. (2009) Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature medicine* 15(8):930–939
81. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH (2010) The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews* 236:219–242
82. Fu S, Yopp AC, Mao X et al. (2004) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD62<sup>+</sup> T-Regulatory Cell Subset Has Optimal Suppressive and Proliferative Potential. *Am J Transplant* 4(1):65–78
83. Fu W, Ergun A, Lu T et al. (2012) A multiply redundant genetic switch 'locks in' the transcriptional signature of regulatory T cells. *Nature immunology* 13(10):972–980
84. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S et al. (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504(7480):446–450

85. Gagliani N, Magnani CF, Huber S et al. (2013) Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature medicine* 19(6):739–746
86. Garín MI, Chu C-C, Golshayan D et al. (2007) Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109(5):2058–2065
87. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD et al. (2007) Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445(7129):771–775
88. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E et al. (2005) Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(17):6659–6664
89. GE Healthcare (2014) Isolation of mononuclear cells. Methodology and applications
90. Georgiev P, Charbonnier L-M, Chatila TA (2019) Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *Journal of clinical immunology* 39(7):623–640
91. Gershon RK, Cohen P, Hencin R et al. (1972) Suppressor T cells. *The Journal of Immunology*(108):586–590
92. Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV et al. (2010) A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Molecular immunology* 47(7-8):1595–1600
93. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MAE et al. (2011) Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* 34(5):794–806
94. Gladstone DE, Kim BS, Mooney K et al. (2020) Regulatory T Cells for Treating Patients With COVID-19 and Acute Respiratory Distress Syndrome: Two Case Reports. *Annals of internal medicine*
95. Gondek DC, Lu L-F, Quezada SA et al. (2005) Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174(4):1783–1786
96. Green DR, Webb DR (1993) Saying the ‘S’ word in public. *Immunology Today* 14(11):523–525
97. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F et al. (2002) CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature immunology* 3(11):1097–1101

98. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W et al. (2004) Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21(4):589–601
99. Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. (1997) A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652):737–742
100. Gu P, Gao JF, D'Souza CA et al. (2012) Trogocytosis of CD80 and CD86 by induced regulatory T cells. *Cellular & molecular immunology* 9(2):136–146
101. Han S, Toker A, Liu ZQ et al. (2019) Turning the Tide Against Regulatory T Cells. *Frontiers in oncology* 9:279
102. Hasenkrug KJ, Chougnet CA, Dittmer U (2018) Regulatory T cells in retroviral infections. *PLOS Pathogens* 14(2):e1006776
103. He J, Zhang X, Wei Y et al. (2016) Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4<sup>(+)</sup> T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nature medicine* 22(9):991–993
104. Heinrichs J, Bastian D, Veerapathran A et al. (2016) Regulatory T-Cell Therapy for Graft-versus-host Disease. *Journal of immunology research and therapy* 1(1):1–14
105. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B et al. (2002) The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clinical Chemistry* 48(10):1819–1827
106. Hill JA, Feuerer M, Tash K et al. (2007) Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27(5):786–800
107. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T et al. (2006) Prevalence of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12(18):5423–5434
108. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA et al. (2000) Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science (New York, N.Y.)* 290(5497):1768–1771
109. Hoerning A, Koss K, Datta D et al. (2011) Subsets of human CD4<sup>(+)</sup> regulatory T cells express the peripheral homing receptor CXCR3. *European journal of immunology* 41(8):2291–2302

110. Hori S (2012) The Foxp3 interactome: a network perspective of T(reg) cells. *Nature immunology* 13(10):943–945
111. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)* 299(5609):1057–1061
112. Hou TZ, Qureshi OS, Wang CJ et al. (2015) A transendocytosis model of CTLA-4 function predicts its suppressive behavior on regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194(5):2148–2159
113. Howie D, Waldmann H, Cobbold S (2014) Nutrient Sensing via mTOR in T Cells Maintains a Tolerogenic Microenvironment. *Frontiers in immunology* 5:409
114. Huang C-T, Workman CJ, Flies D et al. (2004) Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21(4):503–513
115. Hurchla MA, Sedy JR, Gavrielli M et al. (2005) B and T Lymphocyte Attenuator Exhibits Structural and Expression Polymorphisms and Is Highly Induced in Anergic CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology* 174(6):3377–3385
116. Ichihara F, Kono K, Takahashi A et al. (2003) Increased Populations of Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients with Gastric and Esophageal Cancers. *Clinical Cancer Research* 9(12):4404–4408
117. Ito T, Hanabuchi S, Wang Y-H et al. (2008) Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28(6):870–880
118. Iwashiro M, Messer RJ, Peterson KE et al. (2001) Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16):9226–9230
119. Jeffery LE, Burke F, Mura M et al. (2009) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183(9):5458–5467
120. Jin-Qing Liu, Aiyan Hu, Jianmin Zhu et al. CD200-CD200R pathway in the regulation of tumor immune microenvironment and immunotherapy
121. Joly E, Hudrisier D (2003) What is trogocytosis and what is its purpose? *Nature immunology* 4(9):815
122. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M et al. (2001) Identification and Functional Characterization of Human Cd4 + Cd25 + T Cells with Regulatory Properties Isolated from Peripheral Blood. *J Exp Med* 193(11):1285–1294

123. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY (2012) Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology* 30:531–564
124. Kang SW, Kim SH, Lee N et al. (2012) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> promotes FOXP3 expression via binding to vitamin D response elements in its conserved noncoding sequence region. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 188(11):5276–5282
125. Kapp JA (2008) Special regulatory T-cell review: Suppressors regulated but un-suppressed. *Immunology* 123(1):28–32
126. Kaufmann SH (2014) *Basiswissen Immunologie*, 1. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
127. Kim J-H, Kim BS, Lee S-K (2020) Regulatory T Cells in Tumor Microenvironment and Approach for Anticancer Immunotherapy. *Immune network* 20(1):e4
128. Kisielow P, Teh HS, Blüthmann H et al. (1988) Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335(6192):730–733
129. Kitazawa Y, Fujino M, Wang Q et al. (2007) Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation* 83(6):774–782
130. Kleijwegt FS, Laban S, Duinkerken G et al. (2010) Critical role for TNF in the induction of human antigen-specific regulatory T cells by tolerogenic dendritic cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 185(3):1412–1418
131. Kleinewietfeld M, Puentes F, Borsellino G et al. (2005) CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4<sup>+</sup> T-cell subset. *Blood* 105(7):2877–2886
132. Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D et al. (2009) CD49d provides access to "untouched" human Foxp3<sup>+</sup> Treg free of contaminating effector cells. *Blood* 113(4):827–836
133. Kobie JJ, Shah PR, Yang L et al. (2006) T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 177(10):6780–6786
134. Koch MA, Thomas KR, Perdue NR et al. (2012) T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor  $\beta$ 2. *Immunity* 37(3):501–510

135. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S et al. (2014) Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nature medicine* 20(1):62–68
136. Kotwica-Mojzych K, Jodłowska-Jędrych B, Mojzych M (2021) CD200:CD200R Interactions and Their Importance in Immunoregulation. *International journal of molecular sciences* 22(4)
137. Kubach J, Lutter P, Bopp T et al. (2007) Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 110(5):1550–1558
138. Li MO, Wan YY, Sanjabi S et al. (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology* 24:99–146
139. Liang B, Workman C, Lee J et al. (2008) Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180(9):5916–5926
140. Lindley S, Dayan CM, Bishop A et al. (2005) Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54(1):92–99
141. Liu T, Soong L, Liu G et al. (2009) CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. *Biology direct* 4:40
142. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z et al. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 203(7):1701–1711
143. Liyanage UK, Moore TT, Joo H-G et al. (2002) Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169(5):2756–2761
144. Loblay RH, Pritchard-Briscoe H, Basten A (1978) Suppressor T-cell memory. *Nature* 272(5654):620–622
145. Lu L, Barbi J, Pan F (2017) The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nature reviews. Immunology* 17(11):703–717
146. Luttmann W (2009) *Der Experimentator: Immunologie*, 3. Aufl. Der Experimentator. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg
147. Lyons A, Parish CR (1994) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 171(1):131–137

148. Lyons AB, Doherty KV (2004) Flow cytometric analysis of cell division by dye dilution. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.] Chapter 9:Unit 9.11*
149. Maizels RM, Smith KA (2011) Regulatory T cells in infection. *Advances in immunology* 112:73–136
150. Mao R-F, Chen Y-Y, Zhang J et al. (2020) Type 1 diabetes mellitus and its oral tolerance therapy. *World journal of diabetes* 11(10):400–415
151. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM et al. (2007) Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445(7130):931–935
152. Martin MU, Resch K (2009) *Immunologie. Mit 26 Tabellen.* utb.de Bachelor-Bibliothek, Stuttgart
153. Martín-Orozco E, Norte-Muñoz M, Martínez-García J (2017) Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. *Frontiers in pediatrics* 5:117
154. Mathew JM, H-Voss J, LeFever A et al. (2018) A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants. *Scientific reports* 8(1):7428
155. Mazzucchelli R, Durum SK (2007) Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature reviews. Immunology* 7(2):144–154
156. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM (2005) Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells within the central nervous system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175(5):3025–3032
157. McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., and Byrne, M. C. (2002) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Immunoregulatory T Cells: Gene Expression Analysis Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-induced TNF Receptor. *Immunity*(16):311–323
158. Merkenschlager M, Graf D, Lovatt M et al. (1997) How many thymocytes audition for selection? *The Journal of experimental medicine* 186(7):1149–1158
159. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR et al. (2011) Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cell subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186(6):3299–3303

160. Mahrshahi R, Barclay AN, Brown MH (2009) Essential roles for Dok2 and RasGAP in CD200 receptor-mediated regulation of human myeloid cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183(8):4879–4886
161. Milpied P, Renand A, Bruneau J et al. (2009) Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3<sup>+</sup> Treg. *European journal of immunology* 39(6):1466–1471
162. Minas K, Liversidge J (2006) Is the CD200/CD200 receptor interaction more than just a myeloid cell inhibitory signal? *Critical reviews in immunology* 26(3):213–230
163. Mir MA (2015) Costimulation in Lymphomas and Cancers. In: Mir MA (Hrsg) *Developing costimulatory molecules for immunotherapy of diseases*. Academic Press, Amsterdam [Netherlands], S 185–254
164. Miri SM, Tafsiri E, Cho WCS et al. (2020) CRISPR-Cas, a robust gene-editing technology in the era of modern cancer immunotherapy. *Cancer cell international* 20:456
165. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S et al. (2004) Cutting edge: human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172(8):4676–4680
166. Miyao T, Floess S, Setoguchi R et al. (2012) Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* 36(2):262–275
167. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A et al. (2009) Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30(6):899–911
168. Moore AC, Gallimore A, Draper SJ et al. (2005) Anti-CD25 antibody enhancement of vaccine-induced immunogenicity: increased durable cellular immunity with reduced immunodominance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175(11):7264–7273
169. Morikawa H, Ohkura N, Vandenberg A et al. (2014) Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(14):5289–5294
170. Morikawa H, Sakaguchi S (2014) Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunological Reviews*(Vol. 259):192–205

171. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F (2003) Cutting edge: cure of colitis by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 170(8):3939–3943
172. Murphy KM, Weaver C, Mowat A et al. (2017) *Janeway's immunobiology*, 9th edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York
173. Nagar M, Jacob-Hirsch J, Vernitsky H et al. (2010) TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA<sup>+</sup> regulatory T cells that modulates their suppressive function. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 184(7):3570–3581
174. Ndure J, Flanagan KL (2014) Targeting regulatory T cells to improve vaccine immunogenicity in early life. *Frontiers in microbiology* 5:477
175. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL et al. (2017) Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *The New England journal of medicine* 377(26):2531–2544
176. Nishikawa H, Sakaguchi S (2010) Regulatory T cells in tumor immunity. *International journal of cancer* 127(4):759–767
177. Noval Rivas M, Chatila TA (2016) Regulatory T cells in allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* 138(3):639–652
178. Ogino H, Nakamura K, Iwasa T et al. (2012) Regulatory T cells expanded by rapamycin in vitro suppress colitis in an experimental mouse model. *Journal of gastroenterology* 47(4):366–376
179. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H et al. (2012) T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 37(5):785–799
180. Ohue Y, Nishikawa H (2019) Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer science* 110(7):2080–2089
181. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T et al. (2008) Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(29):10113–10118
182. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H et al. (2005) Increased Populations of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 65(6):2457–2464

183. Overacre-Delgoffe AE, Chikina M, Dadey RE et al. (2017) Interferon- $\gamma$  Drives Treg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell* 169(6):1130
184. Owczarczyk-Saczonek A, Czerwińska J, Placek W (2018) The role of regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in psoriasis. *Acta Dermatovenerologica Alpina Pannonica et Adriatica* 27(1)
185. Oya Y, Watanabe N, Owada T et al. (2008) Development of autoimmune hepatitis-like disease and production of autoantibodies to nuclear antigens in mice lacking B and T lymphocyte attenuator. *Arthritis and rheumatism* 58(8):2498–2510
186. Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kraj P et al. (2006) Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 25(2):249–259
187. Pan F, Yu H, Dang EV et al. (2009) Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science (New York, N.Y.)* 325(5944):1142–1146
188. Pandiyan P, Bhaskaran N, Zou M et al. (2019) Microbiome Dependent Regulation of Tregs and Th17 Cells in Mucosa. *Frontiers in immunology* 10:426
189. Pillai V, Ortega SB, Wang CK et al. (2007) Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 123(1):18–29
190. Probst-Kepper M, Geffers R, Kröger A et al. (2009) GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 13(9B):3343–3357
191. Procaccini C, Rosa V de, Galgani M et al. (2010) An oscillatory switch in mTOR kinase activity sets regulatory T cell responsiveness. *Immunity* 33(6):929–941
192. Quah BJC, Warren HS, Parish CR (2007) Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature protocols* 2(9):2049–2056
193. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K et al. (2011) Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)* 332(6029):600–603
194. Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D et al. (2006) Regulated Compartmentalization of Programmed Cell Death-1 Discriminates CD4+CD25+ Resting Regulatory T Cells from Activated T Cells. *The Journal of Immunology* 176(5):2808–2816
195. Ramlal R, Hildebrandt GC (2017) Advances in the Use of Regulatory T-Cells for the Prevention and Therapy of Graft-vs.-Host Disease. *Biomedicines* 5(2)

196. Ramsdell F, Ziegler SF (2014) FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nature reviews. Immunology* 14(5):343–349
197. Rao PE, Petrone AL, Ponath PD (2005) Differentiation and Expansion of T Cells with Regulatory Function from Human Peripheral Lymphocytes by Stimulation in the Presence of TGF-. *The Journal of Immunology* 174(3):1446–1455
198. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN et al. (2015) T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74(1):5–17
199. Resta R, Yamashita Y, Thompson LF (1998) Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunological Reviews* 161:95–109
200. Rezende RM, Weiner HL (2017) History and mechanisms of oral tolerance. *Seminars in immunology* 30:3–11
201. Riegel C, Boeld TJ, Doser K et al. (2020) Efficient treatment of murine acute GvHD by in vitro expanded donor regulatory T cells. *Leukemia* 34(3):895–908
202. Rodríguez-Perea AL, Arcia ED, Rueda CM et al. (2016) Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clinical and experimental immunology* 185(3):281–291
203. Roemhild A, Otto NM, Moll G et al. (2020) Regulatory T cells for minimising immune suppression in kidney transplantation: phase I/IIa clinical trial. *BMJ (Clinical research ed.)* 371:m3734
204. Rosa V de, Procaccini C, Cali G et al. (2007) A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity* 26(2):241–255
205. Rosenblum MD, Gratz IK, Paw JS et al. (2011) Response to self antigen imprints regulatory memory in tissues. *Nature* 480(7378):538–542
206. Rosenblum MD, Way SS, Abbas AK (2016) Regulatory T cell memory. *Nature reviews. Immunology* 16(2):90–101
207. Röttschke O, Borsellino G, Battistini L et al. (2009) In vivo-activated CD103+ Foxp3+ Tregs: of men and mice. *Blood* 113(9):2119-20; author reply 2120
208. Rowe JH, Ertelt JM, Xin L et al. (2012) Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature* 490(7418):102–106
209. Rubtsov YP, Niec RE, Josefowicz S et al. (2010) Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science (New York, N.Y.)* 329(5999):1667–1671
210. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY et al. (2008) Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28(4):546–558

211. Rudra D, deRoos P, Chaudhry A et al. (2012) Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nature immunology* 13(10):1010–1019
212. Rudra D, Egawa T, Chong MMW et al. (2009) Runx-CBFbeta complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nature immunology* 10(11):1170–1177
213. Sadlon TJ, Wilkinson BG, Pederson S et al. (2010) Genome-wide identification of human FOXP3 target genes in natural regulatory T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 185(2):1071–1081
214. Sakaguchi S (2000) Regulatory T Cells. *Cell* 101(5):455–458
215. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM et al. (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology* 10(7):490–500
216. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y (1982) Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *The Journal of experimental medicine* 156(6):1577–1586
217. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M (2007) Regulatory T cells - a brief history and perspective. *European journal of immunology* 37 Suppl 1:23
218. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T et al. (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133(5):775–787
219. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of selftolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151–1164 (1995).
220. Sallusto F, Lenig D, Förster R et al. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401(6754):708–712
221. Samstein RM, Arvey A, Josefowicz SZ et al. (2012) Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell* 151(1):153–166
222. Sanchez AM, Zhu J, Huang X et al. (2012) The development and function of memory regulatory T cells after acute viral infections. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 189(6):2805–2814

223. Santegoets SJ, Dijkgraaf EM, Battaglia A et al. (2015) Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 64(10):1271–1286
224. Saoudi A, Seddon B, Fowell D et al. (1996) The thymus contains a high frequency of cells that prevent autoimmune diabetes on transfer into prediabetic recipients. *The Journal of experimental medicine* 184(6):2393–2398
225. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y et al. (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98(5):1089–1099
226. Sato E, Olson SH, Ahn J et al. (2005) Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(51):18538–18543
227. Schaefer C, Kim GG, Albers A et al. (2005) Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *British journal of cancer* 92(5):913–920
228. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF (2012) Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 26(6):2253–2276
229. Schreiber TH, Wolf D, Tsai MS et al. (2010) Therapeutic Treg expansion in mice by TNFRSF25 prevents allergic lung inflammation. *The Journal of clinical investigation* 120(10):3629–3640
230. Schütt C, Bröker B (2011) *Grundwissen Immunologie*, 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
231. Sebe A, Anliker B, Rau J et al. (2020) Genetisch modifizierte regulatorische T-Zellen: Therapiekonzepte und ihr regulatorischer Rahmen (Genetically modified regulatory T cells: therapeutic concepts and regulatory aspects). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 63(11):1403–1411
232. Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG et al. (2005) B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nature immunology* 6(1):90–98

233. Sehrawat S, Rouse BT (2011) Tregs and infections: on the potential value of modifying their function. *Journal of leukocyte biology* 90(6):1079–1087
234. Shang B, Liu Y, Jiang S et al. (2015) Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports* 5:15179
235. Shevach EM (2000) Regulatory T Cells in Autoimmunity(18):423–449
236. Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30(5):636–645
237. Shevach EM (2018) Foxp3+ T Regulatory Cells: Still Many Unanswered Questions-A Perspective After 20 Years of Study. *Frontiers in immunology* 9:1048
238. Shevach EM, Thornton AM (2014) tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological Reviews* 259(1):88–102
239. Skuljec J, Chmielewski M, Happel C et al. (2017) Chimeric Antigen Receptor-Redirected Regulatory T Cells Suppress Experimental Allergic Airway Inflammation, a Model of Asthma. *Frontiers in immunology* 8:1125
240. Smigielski KS, Richards E, Srivastava S et al. (2014) CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *The Journal of experimental medicine* 211(1):121–136
241. Smith PM, Howitt MR, Panikov N et al. (2013) The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science (New York, N.Y.)* 341(6145):569–573
242. Stephen-Victor E, Das M, Karnam A et al. (2020) Potential of regulatory T-cell-based therapies in the management of severe COVID-19. *The European respiratory journal* 56(3)
243. Stockis J, Colau D, Coulie PG et al. (2009) Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *European journal of immunology* 39(12):3315–3322
244. Sugimoto N, Oida T, Hirota K et al. (2006) Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *International immunology* 18(8):1197–1209
245. Szanya V, Ermann J, Taylor C et al. (2002) The Subpopulation of CD4+CD25+ Splenocytes That Delays Adoptive Transfer of Diabetes Expresses L-Selectin and High Levels of CCR7. *The Journal of Immunology* 169(5):2461–2465

246. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M et al. (1998) Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International immunology* 10(12):1969–1980
247. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S 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):303–310
248. Tanaka A, Sakaguchi S (2017) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell research* 27(1):109–118
249. Tanaka A, Sakaguchi S (2019) Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. *European journal of immunology* 49(8):1140–1146
250. Tang Q, Vincenti F (2017) Transplant trials with Tregs: perils and promises. *The Journal of clinical investigation* 127(7):2505–2512
251. Tao R, Wang L, Murphy KM et al. (2008) Regulatory T cell expression of herpesvirus entry mediator suppresses the function of B and T lymphocyte attenuator-positive effector T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180(10):6649–6655
252. Thonhoff JR, Beers DR, Zhao W et al. (2018) Expanded autologous regulatory T-lymphocyte infusions in ALS: A phase I, first-in-human study. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation* 5(4):e465
253. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ et al. (2010) Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184(7):3433–3441
254. Timothy C. Cheung, Marcos W. Steinberg, Lisa M. Osborne, Matthew G. Macculey, Satoshi Fukuyama, Hideki Sanjo, Claire D’Souza, Paula S. Norris, Klaus Pfeffer, Kenneth M. Murphy, Mitchell Kronenberg, Patricia G. Spear, and Carl F. Ware (2009) Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(38):16535–16536
255. Todo S, Yamashita K, Goto R et al. (2016) A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64(2):632–643

256. Tran DQ, Andersson J, Hardwick D et al. (2009) Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 113(21):5125–5133
257. Tran DQ, Andersson J, Wang R et al. (2009) GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(32):13445–13450
258. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM (2007) Induction of FOXP3 expression in naive human CD4<sup>+</sup>FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 110(8):2983–2990
259. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J et al. (2009) First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T regulatory cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 133(1):22–26
260. van Mierlo, G. J. D., Scherer HU, Hameetman M et al. (2008) Cutting Edge. TNFR-Shedding by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Inhibits the Induction of Inflammatory Mediators. *The Journal of Immunology* 180(5):2747–2751
261. Venken K, Hellings N, Liblau R et al. (2010) Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends in molecular medicine* 16(2):58–68
262. Venken K, Thewissen M, Hellings N et al. (2007) A CFSE based assay for measuring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell mediated suppression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses. *Journal of immunological methods* 322(1-2):1–11
263. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL et al. (2004) Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 199(7):971–979
264. Voo KS, Wang Y-H, Santori FR et al. (2009) Identification of IL-17-producing FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(12):4793–4798
265. Wallace KL, Zheng L-B, Kanazawa Y et al. (2014) Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* 20(1):6–21

266. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort, Ellen I H et al. (2007) Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *European journal of immunology* 37(1):129–138
267. Wang R, Kozhaya L, Mercer F et al. (2009) Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(32):13439–13444
268. Wang R, Wan Q, Kozhaya L et al. (2008) Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS ONE* 3(7):e2705
269. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR et al. (2003) BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nature immunology* 4(7):670–679
270. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F et al. (2011) Oral tolerance. *Immunological Reviews* 241(1):241–259
271. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P et al. (2008) CTLA-4 control over Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science (New York, N.Y.)* 322(5899):271–275
272. Wolf AM, Wolf D, Steurer M et al. (2003) Increase of Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 9(2):606–612
273. Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M et al. (2003) Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171(6):3034–3046
274. Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC et al. (2000) Lymphoid/Neuronal Cell Surface OX2 Glycoprotein Recognizes a Novel Receptor on Macrophages Implicated in the Control of Their Function. *Immunity* 13(8):233–242
275. Yadav M, Louvet C, Davini D et al. (2012) Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *The Journal of experimental medicine* 209(10):1713–22, S1–19
276. Yamazaki T, Yang XO, Chung Y et al. (2008) CCR6 Regulates the Migration of Inflammatory and Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 181(12):8391–8401
277. Yoshida R, Nagira M, Kitaura M et al. (1998) Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *The Journal of biological chemistry* 273(12):7118–7122
278. You S, Leforban B, Garcia C et al. (2007) Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3

- antibody treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(15):6335–6340
279. Zeng H, Chi H (2013) mTOR and lymphocyte metabolism. *Current opinion in immunology* 25(3):347–355
280. Zeng H, Chi H (2015) Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends in immunology* 36(1):3–12
281. Zeng H, Yang K, Cloer C et al. (2013) mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature* 499(7459):485–490
282. Zhang J, Zhang Y, Wang Q et al. (2019) Interleukin-35 in immune-related diseases: protection or destruction. *Immunology* 157(1):13–20
283. Zhang S-X, Ma X-W, Li Y-F et al. (2018) The Proportion of Regulatory T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. *Journal of immunology research* 2018:7103219
284. Zhao D, Zhang C, Yi T et al. (2008) In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood* 112(5):2129–2138
285. Zhao D-M, Thornton AM, DiPaolo RJ et al. (2006) Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107(10):3925–3932
286. Zhao S-T, Wang C-Z (2018) Regulatory T cells and asthma. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 19(9):663–673
287. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A et al. (2010) Role of conserved non-coding DNA elements in the *Foxp3* gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463(7282):808–812
288. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A et al. (2007) Genome-wide analysis of *Foxp3* target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445(7130):936–940

## 11 Anhang

### 11.1 Übersicht über Inhalt und Anordnung des Biolegend LegendSCREEN

<http://www.biolegend.com/legendscreen>

Plate 1

Location		Clone	Isotype
A1	Blank		
A2	CD1a	HI149	Mouse IgG1, κ
A3	CD1b	SN13 (K5-1B8)	Mouse IgG1, κ
A4	CD1c	L161	Mouse IgG1, κ
A5	CD1d	51,1	Mouse IgG2b, κ
A6	CD2	RPA-2.10	Mouse IgG1, κ
A7	CD3	HIT3a	Mouse IgG2a, κ
A8	CD4	RPA-T4	Mouse IgG1, κ
A9	CD5	UCHT2	Mouse IgG1, κ
A10	CD6	BL-CD6	Mouse IgG1, κ
A11	CD7	CD7-6B7	Mouse IgG2a, κ
A12	CD8a	HIT8a	Mouse IgG1, κ
B1	CD9	HI9a	Mouse IgG1, κ
B2	CD10	HI10a	Mouse IgG1, κ
B3	CD11a	HI111	Mouse IgG1, κ
B4	CD11b	ICRF44	Mouse IgG1, κ
B5	CD11b	CBRM1/5	Mouse IgG1, κ
B6	CD11c	3,9	Mouse IgG1, κ
B7	CD13	WM15	Mouse IgG1, κ
B8	CD14	M5E2	Mouse IgG2a, κ
B9	CD15	W6D3	Mouse IgG1, κ
B10	CD16	3G8	Mouse IgG1, κ
B11	CD18	TS1/18	Mouse IgG1, κ
B12	CD19	HIB19	Mouse IgG1, κ
C1	CD20	2H7	Mouse IgG2b, κ
C2	CD21	Bu32	Mouse IgG1, κ
C3	CD22	HIB22	Mouse IgG1, κ
C4	CD23	EBVCS-5	Mouse IgG1, κ
C5	CD24	ML5	Mouse IgG2a, κ
C6	CD25	BC96	Mouse IgG1, κ
C7	CD26	BA5b	Mouse IgG2a, κ
C8	CD27	O323	Mouse IgG1, κ
C9	CD28	CD28.2	Mouse IgG1, κ
C10	CD29	TS2/16	Mouse IgG1, κ

C11	CD30	BY88	Mouse IgG1, κ
C12	CD31	WM59	Mouse IgG1, κ
D1	CD32	FUN-2	Mouse IgG2b, κ
D2	CD33	WM53	Mouse IgG1, κ
D3	CD34	581	Mouse IgG1, κ
D4	CD35	E11	Mouse IgG1, κ
D5	CD36	5-271	Mouse IgG2a, κ
D6	CD38	HIT2	Mouse IgG1, κ
D7	CD39	A1	Mouse IgG1, κ
D8	CD40	HB14	Mouse IgG1, κ
D9	CD41	HIP8	Mouse IgG1, κ
D10	CD42b	HIP1	Mouse IgG1, κ
D11	CD43	CD43-10G7	Mouse IgG1, κ
D12	CD44	BJ18	Mouse IgG1, κ
E1	CD45	HI30	Mouse IgG1, κ
E2	CD45RA	HI100	Mouse IgG2b, κ
E3	CD45RB	MEM-55	Mouse IgG2b, κ
E4	CD45RO	UCHL1	Mouse IgG2a, κ
E5	CD46	TRA-2-10	Mouse IgG1
E6	CD47	CC2C6	Mouse IgG1, κ
E7	CD48	BJ40	Mouse IgG1, κ
E8	CD49a	TS2/7	Mouse IgG1, κ
E9	CD49c	ASC-1	Mouse IgG1, κ
E10	CD49d	9F10	Mouse IgG1, κ
E11	CD49e	NKI-SAM-1	Mouse IgG2b, κ
E12	CD49f	GoH3	Rat IgG2a, κ
F1	CD50	CBR-IC3/1	Mouse IgG1, κ
F2	CD51	NKI-M9	Mouse IgG2a, κ
F3	CD51,CD61	23C6	Mouse IgG1, κ
F4	CD52	HI186	Mouse IgG2b, κ
F5	CD53	HI29	Mouse IgG1, κ
F6	CD54	HA58	Mouse IgG1, κ
F7	CD55	JS11	Mouse IgG1, κ
F8	CD56	HCD56	Mouse IgG1, κ
F9	CD57	HCD57	Mouse IgM, κ
F10	CD58	TS2/9	Mouse IgG1, κ
F11	CD59	p282 (H19)	Mouse IgG2a, κ
F12	CD61	VI-PL2	Mouse IgG1, κ
G1	CD62E	HAE-1f	Mouse IgG1, κ
G2	CD62L	DREG-56	Mouse IgG1, κ
G3	CD62P	AK4	Mouse IgG1, κ
G4	CD63	H5C6	Mouse IgG1, κ
G5	CD64	10,1	Mouse IgG1, κ
G6	CD66a/c/e	ASL-32	Mouse IgG2b, κ
G7	CD66b	G10F5	Mouse IgM, κ

G8	CD69	FN50	Mouse IgG1, κ
G9	CD70	113-16	Mouse IgG1, κ
G10	CD71	CY1G4	Mouse IgG2a, κ
G11	CD73	AD2	Mouse IgG1, κ
G12	CD74	LN2	Mouse IgG1, κ
H1	CD79b	CB3-1	Mouse IgG1, κ
H2	CD80	2D10	Mouse IgG1, κ
H3	CD81	5A6	Mouse IgG1, κ
H4	CD82	ASL-24	Mouse IgG1, κ
H5	CD83	HB15e	Mouse IgG1, κ
H6	CD84	CD84.1.21	Mouse IgG2a, κ
H7	CD85	MKT5.1	Rat IgG2a, κ
H8	CD85d	42D1	Rat IgG2a, κ
H9	CD85	17G10.2	Mouse IgG1, κ
H10	CD85h	24	Mouse IgG2b, κ
H11	CD85	GHI/75	Mouse IgG2b, κ
H12	CD85k	ZM4.1	Mouse IgG1, κ

Plate 2

Location		Clone	Isotype
A1	Blank		
A2	CD86	IT2.2	Mouse IgG2b, κ
A3	CD87	VIM5	Mouse IgG1, κ
A4	CD88	S5/1	Mouse IgG2a, κ
A5	CD89	A59	Mouse IgG1, κ
A6	CD90	5E10	Mouse IgG1, κ
A7	CD93	VIMD2	Mouse IgG1, κ
A8	CD94	DX22	Mouse IgG1, κ
A9	CD95	DX2	Mouse IgG1, κ
A10	CD96	NK92.39	Mouse IgG1, κ
A11	CD97	VIM3b	Mouse IgG1, κ
A12	CD99	HCD99	Mouse IgG2a, κ
B1	CD100	A8	Mouse IgG1, κ
B2	Please Inquire	BB27	Mouse IgG1, κ
B3	CD102	CBR-IC2/2	Mouse IgG2a, κ
B4	CD103	Ber-ACT8	Mouse IgG1, κ
B5	CD104	58XB4	Mouse IgG2a, κ
B6	CD105	43A3	Mouse IgG1, κ
B7	CD106	STA	Mouse IgG1, κ
B8	CD107a	H4A3	Mouse IgG1, κ
B9	CD108	MEM-150	Mouse IgM, κ
B10	CD109	W7C5	Mouse IgG1, κ

B11	CD111	R1.302	Mouse IgG1, κ
B12	CD112	TX31	Mouse IgG1, κ
C1	CD114	LMM741	Mouse IgG1, κ
C2	CD115	9-4D2-1E4	Rat IgG1, κ
C3	CD116	4H1	Mouse IgG1, κ
C4	CD117	104D2	Mouse IgG1, κ
C5	CD119	GIR-208	Mouse IgG1, κ
C6	CD122	TU27	Mouse IgG1, κ
C7	CD123	6H6	Mouse IgG1, κ
C8	CD124	G077F6	Mouse IgG2a, κ
C9	CD126	UV4	Mouse IgG1, κ
C10	CD127	A019D5	Mouse IgG1, κ
C11	CD129	AH9R7	Mouse IgG2b, κ
C12	CD131	1C1	Mouse IgG1, κ
D1	CD132	TUGh4	Rat IgG2b, κ
D2	CD134	Ber-ACT35 (ACT35)	Mouse IgG1, κ
D3	CD135	BV10A4H2	Mouse IgG1, κ
D4	CD137	4B4-1	Mouse IgG1, κ
D5	4-1BB Ligand	5F4	Mouse IgG1, κ
D6	CD138	DL-101	Mouse IgG1, κ
D7	CD140a	16A1	Mouse IgG1, κ
D8	CD140b	18A2	Mouse IgG1, κ
D9	CD141	M80	Mouse IgG1, κ
D10	CD143	5-369	Mouse IgG1, κ
D11	CD144	BV9	Mouse IgG2a, κ
D12	CD146	SHM-57	Mouse IgG2a, κ
E1	CD148	A3	Mouse IgG1, κ
E2	CD150	A12 (7D4)	Mouse IgG1, κ
E3	CD152	L3D10	Mouse IgG1, κ
E4	CD154	24-31	Mouse IgG1, κ
E5	CD155	SKII.4	Mouse IgG1, κ
E6	CD156c	SHM14	Mouse IgG1, κ
E7	CD158a/h	HP-MA4	Mouse IgG2b, κ
E8	CD158b	DX27	Mouse IgG2a, κ
E9	CD158d	mAB 33 (33)	Mouse IgG1, κ
E10	CD158e1	DX9	Mouse IgG1, κ
E11	CD158f	UP-R1	Mouse IgG1, κ
E12	CD161	HP-3G10	Mouse IgG1, κ
F1	CD162	KPL-1	Mouse IgG1, κ
F2	CD163	GHI/61	Mouse IgG1, κ
F3	CD164	67D2	Mouse IgG1, κ
F4	CD165	SN2 (N6-D11)	Mouse IgG1, κ
F5	CD166	3A6	Mouse IgG1, κ
F6	CD167a	51D6	Mouse IgG3, κ
F7	CD169	7-239	Mouse IgG1, κ

F8	CD170	1A5	Mouse IgG1, κ
F9	CD172a	SE5A5	Mouse IgG1, κ
F10	CD172b	B4B6	Mouse IgG1, κ
F11	CD172g	LSB2.20	Mouse IgG1, κ
F12	CD178	NOK-1	Mouse IgG1, κ
G1	CD179a	HSL96	Mouse IgG1, κ
G2	CD179b	HSL11	Mouse IgG1, κ
G3	CD180	MHR73-11	Mouse IgG1, κ
G4	CD181	8F1/CXCR1	Mouse IgG2b, κ
G5	CD182	5E8/CXCR2	Mouse IgG1, κ
G6	CD183	G025H7	Mouse IgG1, κ
G7	CD184	12G5	Mouse IgG2a, κ
G8	CD193	5E8	Mouse IgG2b, κ
G9	CD195	T21/8	Mouse IgG1, κ
G10	CD196	G034E3	Mouse IgG2b, κ
G11	CD197	G043H7	Mouse IgG2a, κ
G12	CD200	OX-104	Mouse IgG1, κ
H1	CD200R	OX-108	Mouse IgG1, κ
H2	CD201	RCR-401	Rat IgG1, κ
H3	CD202b	33.1 (Ab33)	Mouse IgG1, κ
H4	CD203c	NP4D6	Mouse IgG1, κ
H5	CD205	HD30	Mouse IgG1, κ
H6	CD206	15-2	Mouse IgG1, κ
H7	CD207	10E2	Mouse IgG1, κ
H8	CD209	9E9A8	Mouse IgG2a, κ
H9	CD210	3F9	Rat IgG2a, κ
H10	CD213a2	SHM38	Mouse IgG1, κ
H11	CD215	JM7A4	Mouse IgG2b, κ
H12	CD218a	H44	Mouse IgG1, κ

Plate 3

Location		Clone	Isotype
A1	Blank		
A2	CD220	B6.220	Mouse IgG2b, κ
A3	CD221	1H7/CD221	Mouse IgG1, κ
A4	CD226	11A8	Mouse IgG1, κ
A5	CD229	Hly-9.1.25	Mouse IgG1, κ
A6	CD231	SN1a (M3-3D9)	Mouse IgG1, κ
A7	CD235ab	HIR2	Mouse IgG2b, κ
A8	CD243	UIC2	Mouse IgG2a, κ
A9	CD244	C1.7	Mouse IgG1, κ
A10	Please Inquire	DY12	Mouse IgG1, κ

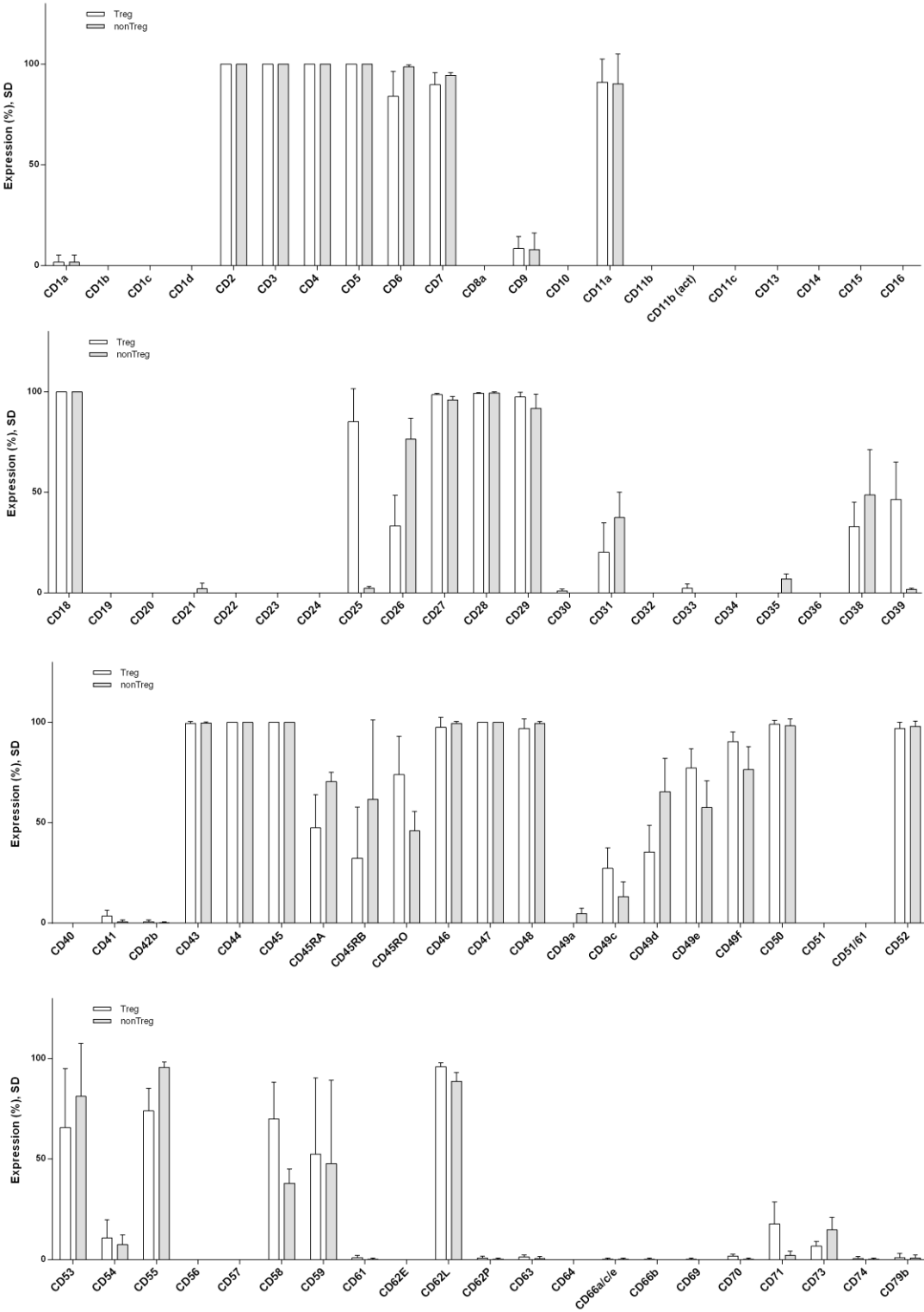
A11	CD252	11C3.1	Mouse IgG1, κ
A12	CD253	RIK-2	Mouse IgG1, κ
B1	CD254	MIH24	Mouse IgG1, κ
B2	CD255	CARL-1	Mouse IgG3, κ
B3	CD257	T7-241	Mouse IgG1, κ
B4	CD258	T5-39	Mouse IgG2a, κ
B5	CD261	DJR1	Mouse IgG1, κ
B6	CD262	DJR2-4 (7-8)	Mouse IgG1, κ
B7	CD263	DJR3	Mouse IgG1, κ
B8	CD266	ITEM-1	Mouse IgG1, κ
B9	CD267	1A1	Rat IgG2a, κ
B10	CD268	11C1	Mouse IgG1, κ
B11	HVEM	122	Mouse IgG1, κ
B12	CD271	ME20.4	Mouse IgG1, κ
C1	CD273	24F.10C12	Mouse IgG2a, κ
C2	CD274	29E.2A3	Mouse IgG2b, κ
C3	CD275	9F.8A4	Mouse IgG1, κ
C4	CD276	MIH42	Mouse IgG1, κ
C5	CD277	BT3.1	Mouse IgG1, κ
C6	CD278	C398.4A	Arm. Hamster IgG
C7	CD279	EH12.2H7	Mouse IgG1, κ
C8	CD282	TL2.1	Mouse IgG2a, κ
C9	CD284	HTA125	Mouse IgG2a, κ
C10	CD286	TLR6.127	Mouse IgG1, κ
C11	CD290	3C10C5	Mouse IgG1, κ
C12	CD294	BM16	Rat IgG2a, κ
D1	CD298	LNH-94	Mouse IgG1, κ
D2	CD300e	UP-H2	Mouse IgG1, κ
D3	CD300F	UP-D2	Mouse IgG1, κ
D4	CD301	H037G3	Mouse IgG2a, κ
D5	CD303	201A	Mouse IgG2a, κ
D6	CD304	12C2	Mouse IgG2a, κ
D7	CD307e	509f6	Mouse IgG2a, κ
D8	FcRL4	413D12	Mouse IgG2b, κ
D9	CD314	1D11	Mouse IgG1, κ
D10	CD317	RS38E	Mouse IgG1, κ
D11	CD318	CUB1	Mouse IgG2b, κ
D12	CD319	162,1	Mouse IgG2b, κ
E1	CD324	67A4	Mouse IgG1, κ
E2	CD325	8C11	Mouse IgG1, κ
E3	CD326	9C4	Mouse IgG2b, κ
E4	CD328	6-434	Mouse IgG1, κ
E5	CD334	4FR6D3	Mouse IgG1, κ
E6	CD335	9E2	Mouse IgG1, κ
E7	CD336	P44-8	Mouse IgG1, κ

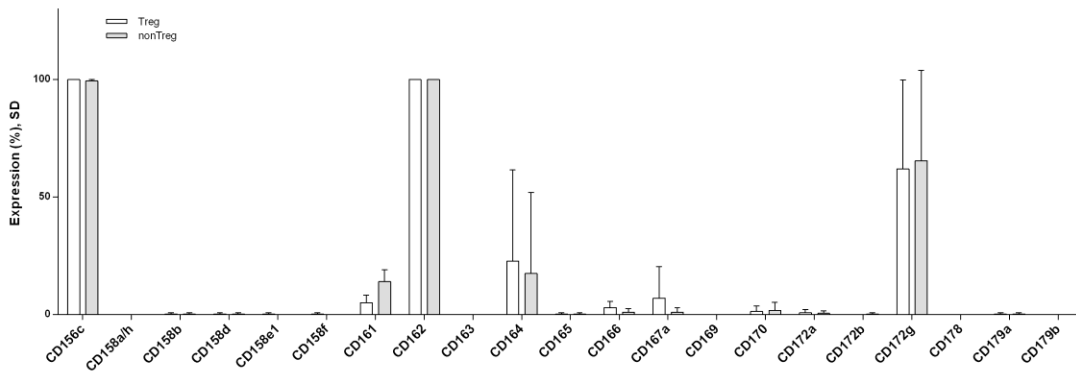
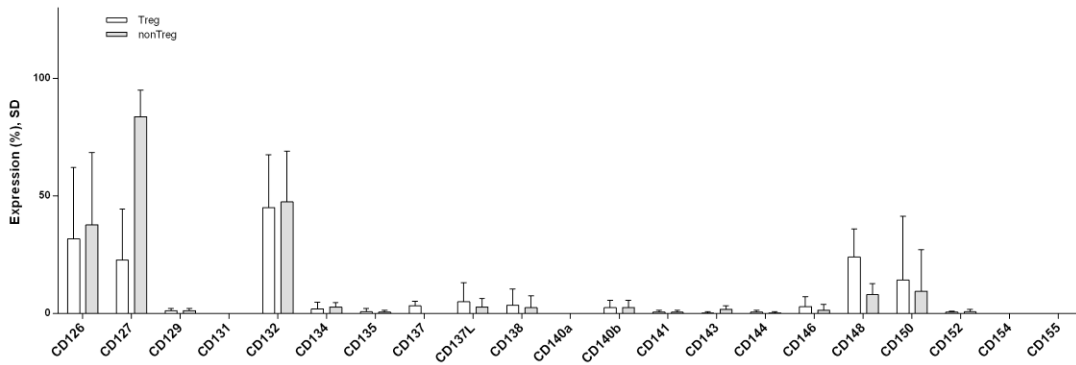
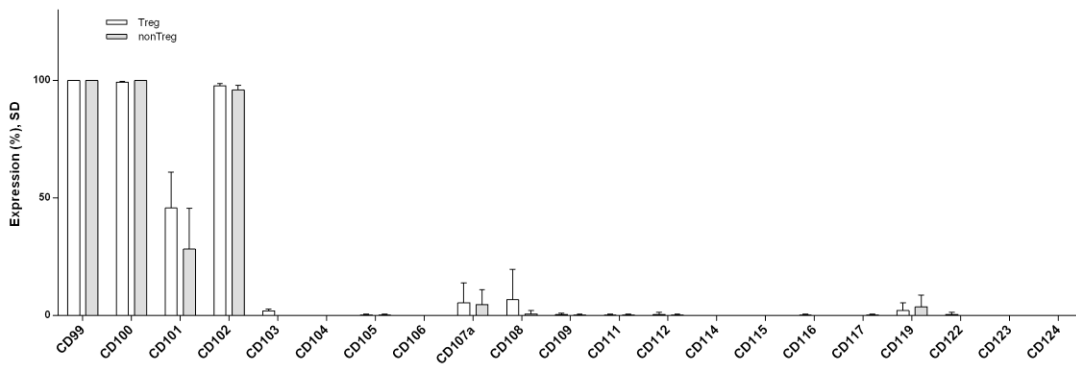
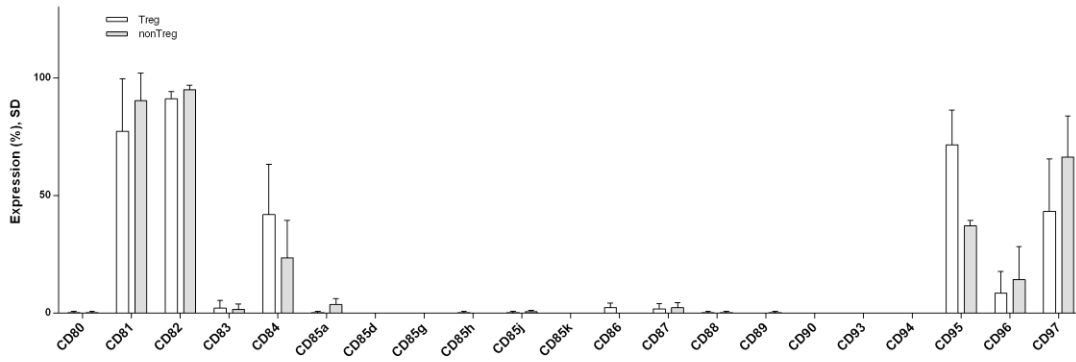
E8	CD337	P30-15	Mouse IgG1, κ
E9	CD338	5D3	Mouse IgG2b, κ
E10	CD340	24D2	Mouse IgG1, κ
E11	CD344	CH3A4A7	Mouse IgG1, κ
E12	CD351	TXD1	Mouse IgG1, κ
F1	CD352	NT-7	Mouse IgG1, κ
F2	CD354	TREM-26	Mouse IgG1, κ
F3	CD355	Cr24.1	Mouse IgG2a, κ
F4	CD357	621	Mouse IgG1, κ
F5	CD360	2G1-K12	Mouse IgG1, κ
F6	β2-microglobulin	2M2	Mouse IgG1, κ
F7	CD272	MIH26	Mouse IgG2a, κ
F8	C3aR	hC3aRZ8	Mouse IgG2b
F9	C5L2	1D9-M12	Mouse IgG2a, κ
F10	CCR10	6588-5	Arm. Hamster IgG
F11	CLEC12A	50C1	Mouse IgG2a, κ
F12	CLEC9A	8F9	Mouse IgG2a, κ
G1	CX3CR1	2A9-1	Rat IgG2b, κ
G2	CXCR7	8F11-M16	Mouse IgG2b, κ
G3	Delta Opioid Receptor	DOR7D2A4	Mouse IgG2b, κ
G4	DLL1	MHD1-314	Mouse IgG1, κ
G5	DLL4	MHD4-46	Mouse IgG1, κ
G6	DR3	JD3	Mouse IgG1, κ
G7	EGFR	AY13	Mouse IgG1, κ
G8	erbB3	1B4C3	Mouse IgG2a, κ
G9	FcεRIα	AER-37 (CRA-1)	Mouse IgG2b, κ
G10	Please Inquire	2H3	Mouse IgG2b, κ
G11	Galectin-9	9M1-3	Mouse IgG1, κ
G12	GARP	7B11	Mouse IgG2b, κ
H1	HLA-A,B,C	W6/32	Mouse IgG2a, κ
H2	HLA-A2	BB7.2	Mouse IgG2b, κ
H3	HLA-DQ	HLADQ1	Mouse IgG1, κ
H4	HLA-DR	L243	Mouse IgG2a, κ
H5	HLA-E	3D12	Mouse IgG1, κ
H6	HLA-G	87G	Mouse IgG2a, κ
H7	IFN-γ R b chain	2HUB-159	Hamster IgG
H8	Ig light chain κ	MHK-49	Mouse IgG1, κ
H9	Ig light chain λ	MHL-38	Mouse IgG2a, κ
H10	IgD	IA6-2	Mouse IgG2a, κ
H11	IgM	MHM-88	Mouse IgG1, κ
H12	IL-28RA	MHLICR2a	Mouse IgG2a, κ

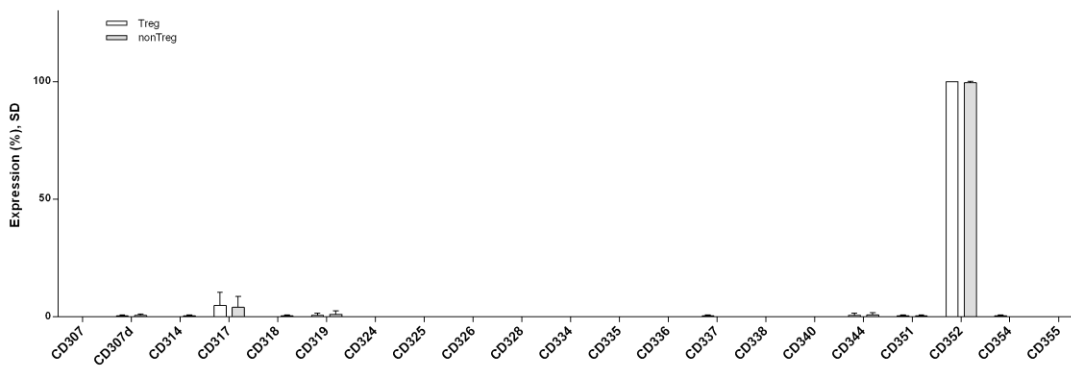
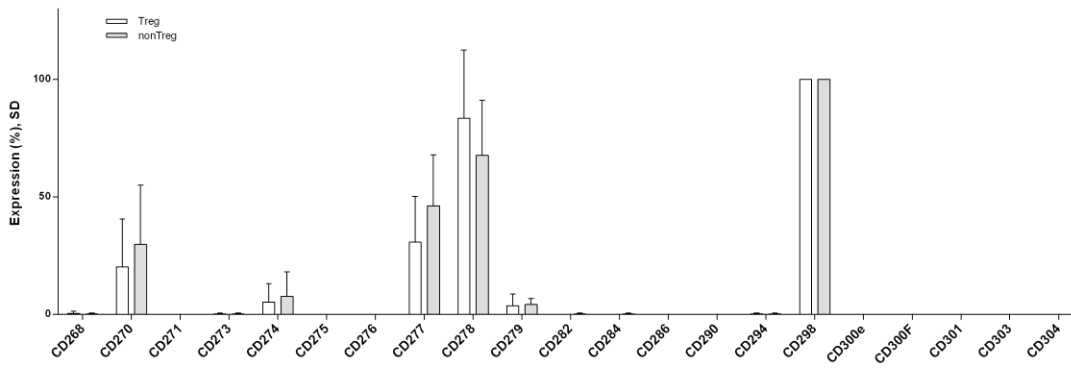
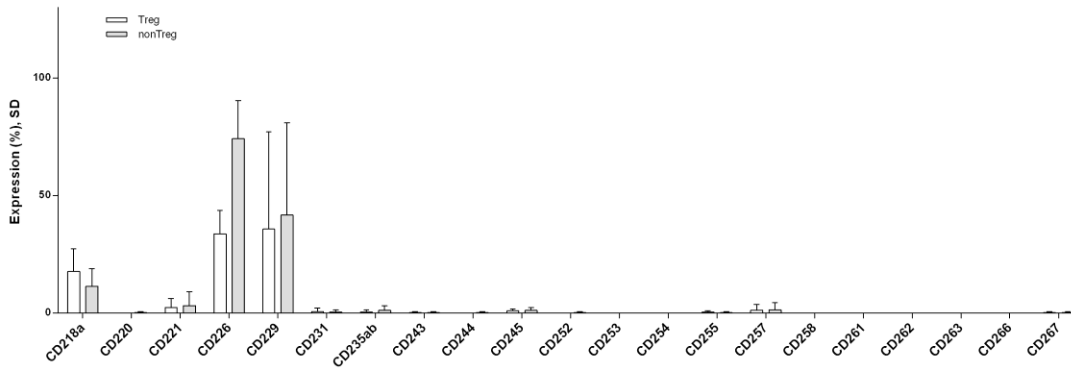
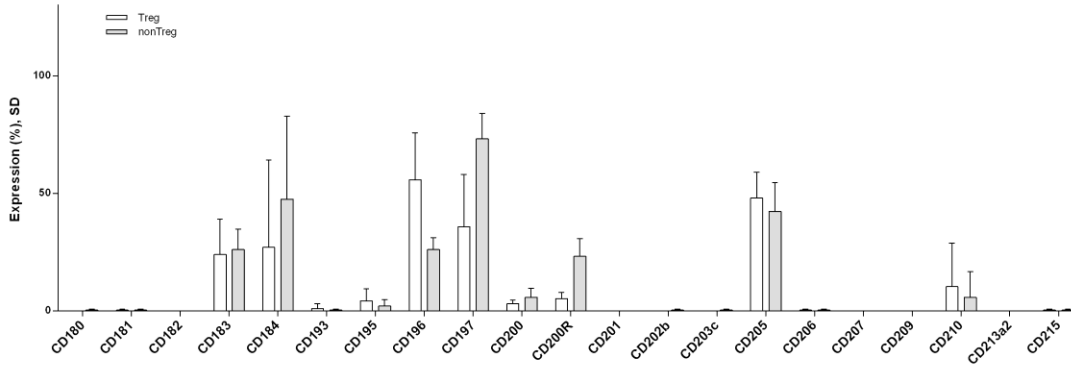
Location		Clone	Isotype
A1	Blank		
A2	Integrin $\alpha 9\beta 1$	Y9A2	Mouse IgG1, $\kappa$
A3	integrin $\beta 5$	AST-3T	Mouse IgG2a, $\kappa$
A4	Integrin $\beta 7$	FIB504	Rat IgG2a, $\kappa$
A5	Jagged 2	MHJ2-523	Mouse IgG1, $\kappa$
A6	LAP	TW4-6H10	Mouse IgG1, $\kappa$
A7	Lymphotoxin $\beta$ Receptor	31G4D8	Mouse IgG2b, $\kappa$
A8	Mac-2	Gal397	Mouse IgG1, $\kappa$
A9	MAIR-II	TX45	Mouse IgG1, $\kappa$
A10	MICA/MICB	6D4	Mouse IgG2a, $\kappa$
A11	SUSD2	W3D5	Mouse IgG2a, $\kappa$
A12	SUSD2	W5C5	Mouse IgG1, $\kappa$
B1	MSC	W7C6	Mouse IgG1, $\kappa$
B2	MSC,NPC	W4A5	Mouse IgG1, $\kappa$
B3	TNAP	W8B2	Mouse IgG1, $\kappa$
B4	NKp80	5D12	Mouse IgG1, $\kappa$
B5	Notch 1	MHN1-519	Mouse IgG1, $\kappa$
B6	Notch 2	MHN2-25	Mouse IgG2a, $\kappa$
B7	Notch3	MHN3-21	Mouse IgG1, $\kappa$
B8	Notch 4	MHN4-2	Mouse IgG1, $\kappa$
B9	NPC	57D2	Mouse IgG1, $\kappa$
B10	Podoplanin	NC-08	Rat IgG2a, $\lambda$
B11	Pre-BCR	HSL2	Mouse IgG1, $\kappa$
B12	PSMA	LNI-17	Mouse IgG1, $\kappa$
C1	Siglec-10	5G6	Mouse IgG1, $\kappa$
C2	Siglec-8	7C9	Mouse IgG1, $\kappa$
C3	Siglec-9	K8	Mouse IgG1, $\kappa$
C4	SSEA-1	MC-480	Mouse IgM, $\kappa$
C5	SSEA-3	MC-631	Rat IgM, $\kappa$
C6	SSEA-4	MC-813-70	Mouse IgG3, $\kappa$
C7	SSEA-5	8E11	Mouse IgG1, $\kappa$
C8	TCR gamma/delta	B1	Mouse IgG1, $\kappa$
C9	TCR V $\beta$ 13.2	H132	Mouse IgG1, $\kappa$
C10	TCR V $\beta$ 23	$\alpha$ HUT7	Mouse IgG1, $\kappa$
C11	TCR V $\beta$ 8	JR2 (JR.2)	Mouse IgG2b, $\kappa$
C12	TCR V $\beta$ 9	MKB1	Mouse IgG2b, $\kappa$
D1	TCR V $\delta$ 2	B6	Mouse IgG1, $\kappa$
D2	V $\gamma$ 9	B3	Mouse IgG1, $\kappa$
D3	TCR V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18	6B11	Mouse IgG1, $\kappa$
D4	TCR V $\alpha$ 7.2	3C10	Mouse IgG1, $\kappa$
D5	TCR $\alpha/\beta$	IP26	Mouse IgG1, $\kappa$
D6	Tim-1	1D12	Mouse IgG1, $\kappa$
D7	Tim-3	F38-2E2	Mouse IgG1, $\kappa$

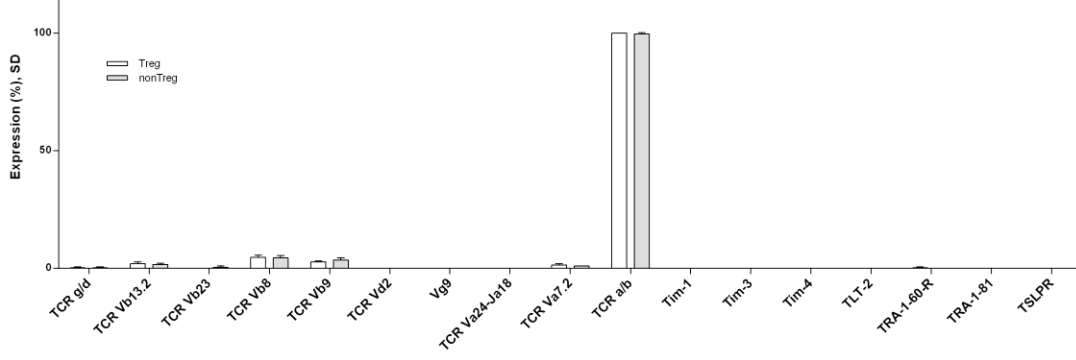
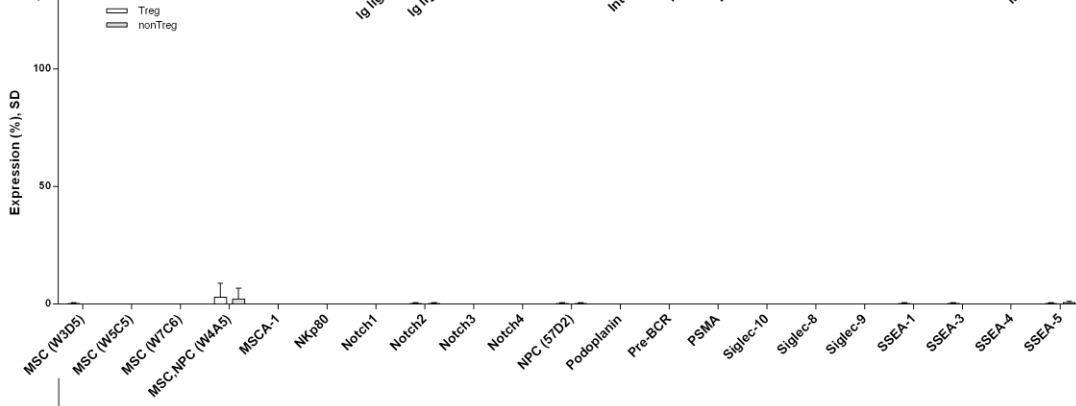
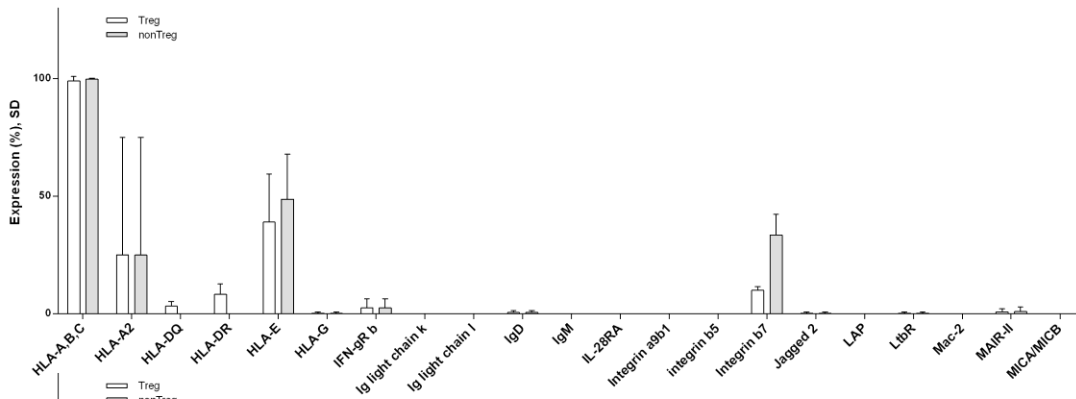
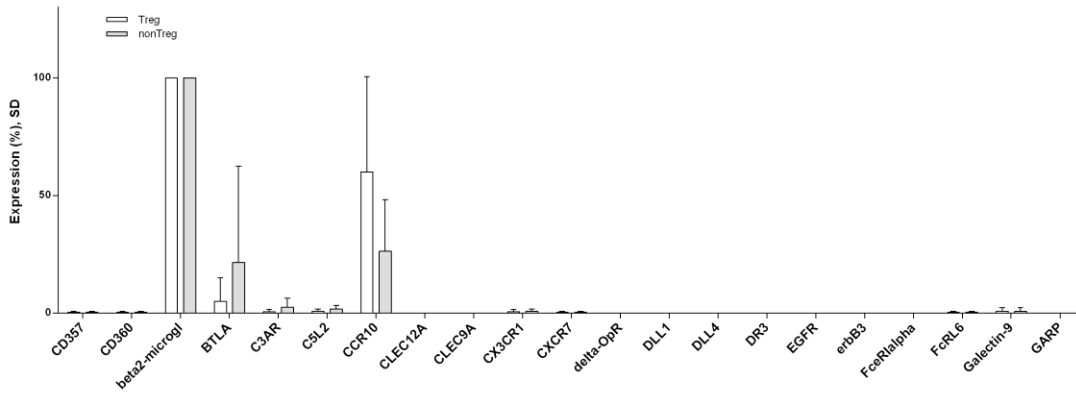
D8	Tim-4	9F4	Mouse IgG1, κ
D9	TLT-2	MIH61	Mouse IgG1, κ
D10	TRA-1-60-R	TRA-1-60-R	Mouse IgM, κ
D11	TRA-1-81	TRA-1-81	Mouse IgM, κ
D12	TSLPR	1B4	Mouse IgG1, κ
E1	IgG1, κ Isotype Ctrl	MOPC-21	Mouse IgG1, κ
E2	IgG2a, κ Isotype Ctrl	MOPC-173	Mouse IgG2a, κ
E3	IgG2b, κ Isotype Ctrl	MPC-11	Mouse IgG2b, κ
E4	IgG3,k Isotype Ctrl	MG3-35	Mouse IgG3, κ
E5	IgM, κ Isotype Ctrl	MM-30	Mouse IgM, κ
E6	IgG1, κ Isotype Ctrl	RTK2071	Rat IgG1, κ
E7	IgG2a, κ Isotype Ctrl	RTK2758	Rat IgG2a, κ
E8	IgG2b, κ Isotype Ctrl	RTK4530	Rat IgG2b, κ
E9	IgM, κ Isotype Ctrl	RTK2118	Rat IgM, κ
E10	IgG Isotype Ctrl	HTK888	Arm. Hamster IgG
E11-H12	Blank		

# 11.2 Vollständige Ergebnisse des Oberflächenscreenings









## 12 Publikationsverzeichnis

Posterpräsentation auf dem Joint Congress DGTI & DGI mit 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) und 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik e. V. (DGI), 7.–10. September 2016, Nürnberg:

Steinhauser J., Baal N., Michel G., Bein G., Hackstein H. Dissection of human regulatory T cells by flow cytometry reveals novel surface markers.

Abstract publiziert in: *Transfus Med Hemother* 2016;43(suppl 1):1–88

### 13 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

Unterschrift

## 14 Danksagung

Ohne die Unterstützung von KollegInnen, Familie und Freunden wäre mir die Fertigstellung dieser Arbeit unmöglich gewesen.

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Hackstein für die Erarbeitung des Themas, die Anleitung in der Entwicklung der experimentellen Herangehensweise und die Betreuung der Umsetzung und Ausarbeitung sowie den kooperativen Austausch, welcher die gesamte Zeit über die Arbeit begleitete.

Das Team im FACS-Labor der experimentellen Immunologie hat mich sehr freundlich aufgenommen und angeleitet, für die tatkräftige und beratende Hilfe wie auch für die emotionale Unterstützung bin ich unendlich dankbar. Besonders Gaby Michel hat mich in die Methoden und die Bedienung der Geräte geduldig eingearbeitet und war immer für hilfreiche Tipps bei der Entwicklung der Protokolle verfügbar. Mit der Messung der Zytokinüberstände aus den Suppressionsversuchen hat sie mir außerdem enorm geholfen. Tausend Dank auch an Dr. Nelli Baal für die vielen Stunden am Sorter. Für die vielen Routinearbeiten, Profitipps und stetige Anteilnahme im täglichen Miteinander lieben Dank an Anne, Juri und Sarah.

Meiner Familie danke ich für die stetige Bestärkung und die von Zeit zu Zeit beharrlichen Fragen in der langwierigen Phase der schriftlichen Ausarbeitung, für die wertvollen Anregungen beim Durchlesen und meinen Eltern ohnehin für die liebevolle Aufopferung, die meinen Werdegang zum und durch das Studium mitsamt der Promotion erst ermöglichte. Abschließend herzlichen Dank an meine geliebte Frau für ihren Beistand in allen Phasen der Arbeit, für die Unterstützung in der Bewältigung der zeitlichen, mentalen und emotionalen Herausforderungen.