

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. C. Härtel



Plastizität regulatorischer T-Zellen in Abhängigkeit des umgebenden Zytokinmilieus

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sara Aggar

aus Karlsruhe

Würzburg, Juli 2023



Referentin: Prof. Dr. med. Martina Prelog

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Friederike Berberich-Siebelt

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

19.02.2024

Die Promovendin ist Ärztin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation „Plastizität regulatorischer T-Zellen in Abhängigkeit des umgebenden Zytokinmilieus“ eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Karlsruhe, Juli 2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Rolle der T-Lymphozyten im Immunsystem	1
1.1.1	Das Immunsystem	1
1.1.2	T-Zell-Reifung im Thymus.....	2
1.1.3	T-Zell-Differenzierung	3
1.1.3.1	Naive T-Zellen	4
1.1.3.2	Effektorzellen.....	5
1.1.3.3	T-Gedächtniszellen.....	5
1.1.3.4	TEMRA-Zellen	6
1.1.4	T-Zell-Aktivierung	6
1.1.5	T-Helferzellen und ihre Effektorantworten.....	8
1.1.6	Immunologische Toleranzmechanismen durch regulatorische T-Zellen .	13
1.1.6.1	Zentrale T-Zell-Toleranz	13
1.1.6.2	Periphere T-Zell-Toleranz.....	13
1.1.6.3	Regulatorische T-Zellen und deren Phänotyp.....	13
1.1.6.4	Thymische Tregs (tTregs), periphere Tregs (pTregs) und in vitro induzierte Tregs (iTregs)	15
1.1.6.5	Treg-Funktion	17
1.1.7	T-Helferzell-Plastizität.....	19
1.1.8	CD8+ T-Zellen und ihre Effektorfunktionen	24
1.1.9	$\gamma\delta$ -T-Zellen	26
1.2	Rationale, Zielsetzung und Fragestellung	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Material.....	29
2.1.1	Geräte	29
2.1.2	Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial	30
2.1.3	Chemikalien, Puffer, Medien, Lösungen und Kits.....	32

2.1.4	Antikörper	35
2.1.5	Zytokine/ Stimuli	37
2.1.6	Software	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Ethische Voraussetzungen	38
2.2.2	Zeitlicher Ablauf der durchgeführten Versuche	38
2.2.3	Probanden, Ein- und Ausschlusskriterien	39
2.2.4	Gewinnung von PBMCs aus dem Blut gesunder Probanden	41
2.2.4.1	Blutentnahme und Weiterverarbeitung der Blutproben.....	41
2.2.4.2	Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation	41
2.2.4.3	Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer.....	43
2.2.4.4	Kryokonservierung.....	43
2.2.5	PBMC-Phänotypisierung	44
2.2.5.1	Durchflusszytometrie – Hintergrund.....	44
2.2.5.2	Auftauprozess.....	48
2.2.5.3	Stimulation der PBMCs mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, Ionomycin und Brefeldin A.....	48
2.2.5.4	Immunfluoreszenzfärbung – Übersicht	49
2.2.5.5	Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung und Vitalitätsfärbung.....	51
2.2.5.6	Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung	52
2.2.5.7	Durchflusszytometrische Messung des PBMC-Phänotyps.....	53
2.2.5.8	Auswertung mit FACS-Diva-Software	53
2.2.5.9	Statistik.....	56
2.2.6	Polarisierung und Funktionsuntersuchung regulatorischer T-Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen mittels Suppression-Assays	56
2.2.6.1	Zusammenfassung des Versuchsaufbaus	56
2.2.6.2	Auftauprozess.....	58
2.2.6.3	Isolierung von CD4+ T-Lymphozyten mittels magnetischer Zellseparation.....	59

2.2.6.4	Durchflusszytometrische Isolierung der CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) und CD4+CD25-CD127- Zellen.....	61
2.2.6.5	Vorbereitungen für die Suppression-Assays	62
2.2.6.6	Prästimulations-Suppression-Assay	63
2.2.6.7	Stimulation.....	66
2.2.6.8	Poststimulations-Suppression-Assay.....	67
2.2.6.9	Auswertung mit der FACSDiva-Software	70
2.2.6.10	Ermittlung der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen	73
2.2.6.11	Statistik.....	74
3	Ergebnisse	75
3.1	PBMC-Phänotypisierung.....	75
3.1.1	Gating der Lymphozyten und Eliminierung der toten Zellen	75
3.1.2	Proportionale Zusammensetzung der Lymphozyten und Zytokinproduktion innerhalb der T-Lymphozyten-Populationen	76
3.1.2.1	Proportionale Zusammensetzung der Lymphozyten	76
3.1.2.2	Zytokinproduktion innerhalb der T-Lymphozyten-Subpopulationen ..	77
3.1.3	T-Zell-Differenzierung	80
3.1.4	Regulatorische T-Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen.....	85
3.1.4.1	Definition der Subpopulationen.....	85
3.1.4.2	Naive und Effektor- bzw. Gedächtnis- Tregs.....	87
3.1.4.3	FoxP3-Expression innerhalb der Treg-Subpopulationen.....	90
3.1.4.4	Zytokinproduktion innerhalb der Treg-Subpopulationen.....	95
3.1.5	Chemokinrezeptoren und CD161.....	100
3.2	Polarisierung und Funktionsuntersuchung regulatorischer T-Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen mittels Suppression-Assays	106
3.2.1	Zellzahlen nach den verschiedenen Isolationsprozessen	107
3.2.2	Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den unterschiedlichen Versuchsansätzen	108

3.2.2.1	Deskriptive Statistik der Prä- und Poststimulations-Suppression-Assays.....	108
3.2.2.2	Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Proliferation in den Kontrollansätzen	109
3.2.2.3	Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit unstimulierten oder stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen.....	113
3.2.2.4	Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Proliferation der CD4-Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25-CD127- Zellen	117
3.2.3	Vergleich der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen in den unterschiedlichen Versuchsansätzen.....	120
3.2.3.1	Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen.....	120
3.2.3.2	Vergleich der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen.....	124
3.2.3.3	Vergleich der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen.....	128
4	Diskussion.....	131
4.1	PBMC-Phänotypisierung.....	132
4.1.1	Proportionale Zusammensetzung der Lymphozyten	132
4.1.2	Zytokinproduktion innerhalb der T-Lymphozyten-Subpopulationen.....	132
4.1.3	T-Zell-Differenzierung	134
4.1.4	Regulatorische T-Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen.....	135
4.1.4.1	Definition des Phänotyps der regulatorischen T-Zellen	135
4.1.4.2	Anteil der Tregs an den CD4+ T-Lymphozyten.....	136
4.1.4.3	CD4+CD25-CD127- Zellen: Vorläuferzellen von iTregs?	137
4.1.4.4	CD45RA-Status innerhalb der Tregs	137

4.1.4.5	FoxP3-Expression innerhalb der Treg-Subpopulationen.....	138
4.1.4.6	Zytokinproduktion innerhalb der Treg-Subpopulationen.....	140
4.1.5	Chemokinrezeptoren und CD161.....	141
4.2	Polarisierung und Funktionsuntersuchung regulatorischer T-Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen mittels Suppression-Assays	142
4.2.1	Vergleich der Co-Kulturen von CD4- Effektorzellen mit CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Kontrollansätzen	142
4.2.1.1	Vergleich der Co-Kulturen von CD4- Effektorzellen mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Kontrollansätzen (Prästimulations-Suppression-Assays).....	143
4.2.1.2	Vergleich der Co-Kulturen von CD4- Effektorzellen mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Kontrollansätzen (Poststimulations-Suppression-Assays)	144
4.2.2	Vergleich der Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen.....	145
4.2.2.1	Vergleich der Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen.....	145
4.2.2.2	Vergleich der Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen	147
4.2.3	Vergleich der korrespondierenden Versuchsansätze von CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen	148
4.2.3.1	Vergleich der korrespondierenden Versuchsansätze von unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen (Prästimulations-Suppression-Assays).....	148
4.2.3.2	Vergleich der korrespondierenden Versuchsansätze von stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen (Poststimulations-Suppression-Assays)	149
4.3	Methoden-abhängige Faktoren und Limitationen	151
4.3.1	In vitro Verhältnisse	151

4.3.2	Kryokonservierung der Zellen	152
4.3.3	Mikrobielle Kontamination der Proben	153
4.3.4	Geringe Zellzahlen.....	154
4.3.4.1	Einfluss des Isolationsprozesses auf die Zellzahlen	154
4.3.4.2	Für und Wider einer Treg-Expansion	155
4.3.4.3	Einfluss des Treg zu Effektorzell-Verhältnisses in der Co-Kultur auf die benötigten Zellzahlen.....	156
4.3.5	Messung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in CFSE-basierten Proliferations-Assays und Beurteilung der Suppressionsfunktion der Tregs	157
4.3.6	Phänotyp der CD4+CD25+CD127low/- Zellen und der CD4+CD25-CD127- Zellen vor und nach der Zytokin-Stimulation	158
4.3.7	Vergleich der Ergebnisse der PBMC-Phänotypisierung mit den Ergebnissen des Zell-Sortings bezüglich des Anteils der Tregs an den CD4+ T-Lymphozyten.....	158
4.3.8	Einfluss der Stimulationsmethode auf die Zytokinproduktion von T-Lymphozyten.....	161
4.3.9	Definition der Effektorzellen	162
4.4	Bedeutung der Ergebnisse für die aktuelle Treg-Forschung und mögliche therapeutische Anwendungen.....	164
4.5	Ausblick	167
5	Zusammenfassung.....	169
6	Literaturverzeichnis	171

Appendix

- I. Abkürzungsverzeichnis
- II. Abbildungsverzeichnis
- III. Tabellenverzeichnis
- IV. Danksagung

1 Einleitung

1.1 Die Rolle der T-Lymphozyten im Immunsystem

1.1.1 Das Immunsystem

Der Begriff „Immunität“ kommt vom lateinischen Wort „immunitas“ und kann mit „Freisein von etwas“ übersetzt werden. Im medizinischen Sinne wurde Immunität historisch als „Freisein von Krankheit“ verstanden und speziell als Schutz vor Infektionskrankheiten [1].

Das Immunsystem ist eines unserer größten Organe und zeichnet sich sowohl durch seine Komplexität als auch durch seine hohe Dynamik aus [2]. Zu seinen Aufgaben gehören die Abwehr von Krankheitserregern und körperfremden Stoffen sowie die Beseitigung von körpereigenen toten Zellen und Tumorzellen [3]. Essenziell hierbei ist die immunologische Selbsttoleranz, die durch verschiedene Toleranzmechanismen aufrechterhalten wird und eine, gegen körpereigene Antigene gerichtete, selbstzerstörerische Autoimmunreaktion verhindert [4].

Man unterscheidet das angeborene Immunsystem vom erworbenen Immunsystem [1] [5]. Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist die schnelle, aber unspezifische Beseitigung von Krankheitserregern, Fremdstoffen oder verletzten Zellen [1]. Dies wird durch phagozytierenden Zellen wie Makrophagen und Granulozyten erreicht sowie durch humorale Mechanismen, zu denen auch das Komplementsystem gehört [2]. Die dendritischen Zellen (DCs), die ebenfalls zum angeborenen Immunsystem gehören, nehmen in der Peripherie Antigene auf, wandern in die sekundären lymphatischen Organe und präsentieren sie dort den Lymphozyten [6]. Sie bilden somit als Antigen-präsentierende Zellen (engl. (englisch) antigen-presenting cells = APCs) die Verbindung zum erworbenen Immunsystem, welches sich durch eine hohe Spezifität und ein immunologisches Gedächtnis auszeichnet [6]. Die Immunantwort des erworbenen Immunsystems kommt durch die antigenspezifischen Lymphozyten zustande [5] [7]. Man unterscheidet B-Lymphozyten von T-Lymphozyten [5]. B-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche CD19 (CD = engl. cluster of differentiation), welches an der Signalübertragung über den B-Zell-Rezeptor beteiligt ist [1] [8]. Sie stellen, durch ihre Differenzierung zu Plasmazellen mit der Fähigkeit der Bildung von löslichen Antikörpern, die humorale Komponente des erworbenen Immunsystems dar [9]. Die T-Lymphozyten sind für die zellvermittelte Immunabwehr verantwortlich [10].

Sie tragen das Antigen CD3 auf ihrer Oberfläche, welches mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) assoziiert ist [11].

T-Zellen lassen sich weiter in CD4-positive und CD8-positive T-Lymphozyten unterteilen (positiv(e) = +) [10]. CD4+ T-Helferzellen (Th) optimieren als Effektorzellen die Immunantwort gegen körperfremde Pathogene und sind außerdem als regulatorische T-Zellen (Tregs) für die Kontrolle von Immunantworten verantwortlich [12]. CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) sind darauf spezialisiert, infizierte Zellen zu töten [13].

Da diese Arbeit die Polarisierbarkeit von T-Helferzellen behandelt, wird im Folgenden auf die Entstehung, Differenzierung, Aktivierung, Funktion und Plastizität der T-Helferzellen eingegangen und hierbei ein besonderes Augenmerk auf die regulatorischen T-Zellen gelegt.

1.1.2 T-Zell-Reifung im Thymus

Die T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus einer pluripotenten Stammzelle und machen im Thymus einen komplexen Reifungsprozess durch [14] [15]. Hier entstehen Milliarden von Antigenespezifitäten, indem die Gene für den TCR rekombiniert und exprimiert werden [5] [16]. Im Folgenden werden die $\alpha\beta$ -T-Zellen beschrieben, die ca. 95 % der T-Lymphozyten ausmachen und deren TCR aus α - und β -Ketten besteht und [1] [9]. Zu Beginn des Differenzierungsprozesses im Thymus trennen sie sich von der Zelllinie der $\gamma\delta$ -T-Zellen [17], auf die in Kapitel 1.1.9 eingegangen wird.

Im Thymus werden den unreifen T-Zellen (Thymozyten) körpereigene Antigene auf MHC-Molekülen (MHC = engl. major histocompatibility complex) der APCs dargeboten [17]. Es kommt zu einem positiven Selektionsprozess, der dafür sorgt, dass nur Thymozyten überleben, die eine Affinität zu den Komplexen aus MHC-Molekülen mit körpereigenen Antigenen aufweisen [18] [19].

Danach folgt ein negativer Selektionsprozess, bei dem diejenigen Thymozyten, die eine sehr hohe Affinität zu den körpereigenen Antigenen auf MHC-Molekülen aufweisen, eliminiert werden [17] [5]. So werden autoreaktive T-Zellen, die eine Immunantwort gegen körpereigene Zellen auslösen würden, beseitigt [18] [20].

Einige Thymozyten mit intermediärer Affinität zu MHC-Molekülen werden nicht durch den negativen Selektionsprozess eliminiert, sondern differenzieren sich zu thymischen regulatorischen T-Zellen (tTregs) [6] [20] [21] [22]. Über unterschiedliche Mechanismen

supprimieren sie Immunantworten und sind damit essenziell für die immunologische Selbsttoleranz und Immunhomöostase [23] [24] [25].

Die T-Zellen mit geringer Affinität zu den, auf den MHC-Molekülen dargebotenen, Antigenen werden zu konventionellen T-Zellen, welche Immunantworten gegen unterschiedliche Antigene vermitteln [26].

In Abbildung 1 ist der Differenzierungsweg der CD4+ Thymozyten in Abhängigkeit von der Affinität der T-Zell-Rezeptoren zu den MHC-Molekülen vereinfacht dargestellt.

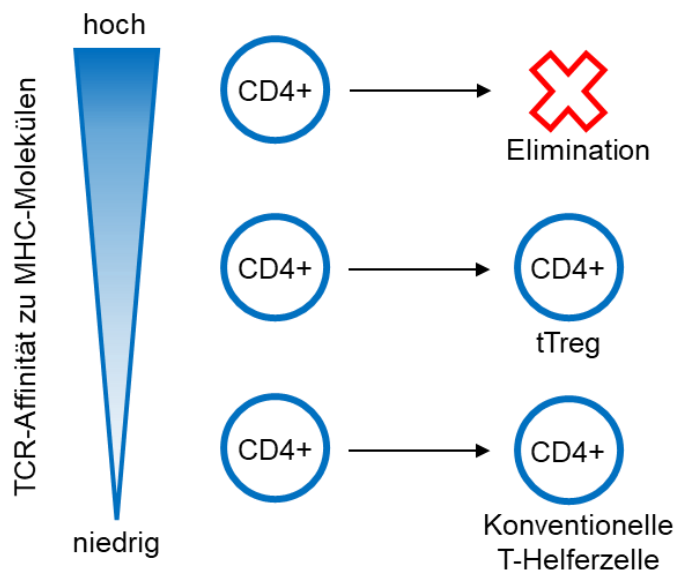


Abbildung 1: Differenzierungsweg der CD4+ Thymozyten (modifiziert nach [20]).

CD4+ Thymozyten differenzieren sich in Abhängigkeit von der Affinität ihrer TCR zu den MHC-Molekülen auf APCs, auf denen ihnen körpereigene Antigene dargeboten werden. Die Thymozyten mit hoher TCR-Affinität zu den MHC-Molekülen werden im negativen Selektionsprozess eliminiert. Thymozyten, deren T-Zell-Rezeptoren eine intermediäre Affinität zu den MHC-Molekülen aufweisen, differenzieren sich zu tTregs. Thymozyten mit geringer TCR-Affinität zu den MHC-Molekülen differenzieren sich zu konventionellen T-Helferzellen. *Abkürzungen: Antigen-präsentierende Zellen (engl. antigen-presenting cells, APCs), engl. cluster of differentiation (CD), engl. major histocompatibility complex (MHC), positiv (+), T-Zell-Rezeptor (TCR), thymische regulatorische T-Zellen (tTregs).*

1.1.3 T-Zell-Differenzierung

Die reifen naiven T-Lymphozyten, die den Thymus verlassen, sind, aufgrund des dort stattgefundenen Differenzierungsprozesses, entweder CD4+ oder CD8+ [17]. Sie zirkulieren zwischen dem peripheren Blut und den sekundären lymphatischen Organen, wo sie von Antigenen zur Proliferation aktiviert werden können und sich nachfolgend zu Effektor- und Gedächtniszellen differenzieren [1] [27]. Die Oberflächenmoleküle, die

am häufigsten genutzt werden, um diese T-Zell-Subpopulationen zu unterscheiden, sind CD45RA, CD27, CD28 und CCR7 (CCR = CC-Chemokinrezeptor) [28].

In dieser Arbeit wurde die Einteilung der T-Zellen in die fünf Subpopulationen naive Zellen (N), zentrale Gedächtniszellen (CM = engl. central memory cells), Effektor-Gedächtniszellen (EM = engl. effector memory cells), Effektorzellen (Eff) und TEMRA-Zellen (TEMRA = engl. terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA) anhand der Oberflächenmoleküle CCR7, CD45RA und CD27 vorgenommen. Die Einteilung in diese Subpopulationen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Phänotyp-definierende Marker der T-Zell-Subpopulationen (modifiziert nach [1]).

	N	CM	EM	Eff	TEMRA
CCR7	+	+	-	-	-
CD45RA	+	-	-	-	+
CD27	+	+	+	-	-

Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), Effektor-Gedächtniszellen (EM = engl. effector memory cells), Effektorzellen (Eff), naive Zellen (N), negativ (-), positiv (+), terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA (TEMRA), Zentrale Gedächtniszellen (CM = engl. central memory cells).

1.1.3.1 Naive T-Zellen

Naive T-Zellen sind ruhende Lymphozyten, die sich weder teilen noch Effektor-Funktionen wahrnehmen und zwischen den sekundären lymphatischen Organen zirkulieren [1]. Durch die schwache Erkennung von Komplexen aus körpereigenen Antigenen mit MHC-Molekülen erhalten sie Überlebenssignale [29] [30] [31]. Zusätzlich wirkt das Zytokin Interleukin-7 (IL = Interleukin) über die Bindung an seinen Rezeptor CD127 (IL-7R α) auf naiven T-Zellen als Überlebensfaktor [29] [31] [32]. Um die Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen auszulösen, werden weitere, durch APCs vermittelte, Signale benötigt [31]. Naive T-Lymphozyten sind durch die Expression der Oberflächenmoleküle CCR7, CD45RA, CD27, CD28, CD127 und CD62L (L-Selektin) gekennzeichnet [31]. Die Differenzierung der naiven T-Zellen durch steigende Antigenerfahrung geht mit dem Verlust und der Zurückgewinnung der Expression einzelner Oberflächenmoleküle einher [28].

An der Migration der naiven T-Zellen aus dem Blut über die hochendothelialen Venolen in die sekundären lymphatischen Organe sind die lymphozytären Oberflächenmoleküle CCR7 und CD62L beteiligt [33] [31]. CCR7 ist ein Chemokinrezeptor, an den die

Liganden CCL19 und CCL21 (CCL = CC-Chemokinligand) binden, welche in den T-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Organe von DCs und Endothelzellen dargeboten werden [13] [34]. Zudem ist die Interaktion von CD62L auf naiven Lymphozyten mit seinen Liganden auf den Endothelzellen der hochendothelialen Venolen von Bedeutung [35] [29] [36].

1.1.3.2 Effektorzellen

Trifft eine naive T-Zelle in der T-Zell-Zone eines Lymphgewebes auf ihr spezifisches Antigen, proliferiert sie und durchläuft eine klonale Expansion und Differenzierung [1] [27]. So entstehen aus naiven CD4+ T-Zellen T-Helferzellen und aus naiven CD8+ T-Zellen die CTLs [1] [27]. Hierbei verändert sich die Expression von spezifischen Oberflächenmolekülen und Chemokinrezeptoren [27]. Bei der Differenzierung naiver T-Zellen zur Effektorzellen wird die Expression von CCR7 und CD62L abgeschaltet, damit die Effektorzellen die lymphatischen Gewebe verlassen und in Richtung des Infektionsherdes auswandern können [13] [37] [38]. Außerdem wird die Expression des Oberflächenmoleküls CD45 verändert [27]. CD45 ist eine membranständige Tyrosin-Phosphatase, die an der Zellaktivierung von T-Zellen beteiligt ist [1]. Naive T-Zellen exprimieren die Isoform CD45RA, Effektorzellen und Gedächtniszellen die kleinere Splicing-Variante CD45RO, die eine schnellere Stimulierung der Zellen durch ein spezifisches Antigen ermöglicht [13]. CD27 kann, ähnlich wie CD28, als Co-stimulatorisches Molekül bei der T-Zell-Aktivierung wirken und wird bei Effektorzellen – im Gegensatz zu naiven T-Zellen – nicht mehr exprimiert [27] [31]. Effektorzellen produzieren direkt nach ihrer Aktivierung IL-2 und exprimieren das Oberflächenmolekül CD25, die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors, wodurch sie ihre Antwort selbst verstärken [1] [38]. Dafür wird der Expression von CD127 (IL-7R α) nach der Aktivierung beendet, sodass die Effektorzellen keine Überlebenssignale mehr durch IL-7 empfangen und schließlich durch Apoptose zugrunde gehen [13] [32]. Dies ist wichtig, da die T-Zell-Effektorantwort dadurch, nach Eliminierung des Antigens, beendet wird und im Immunsystem wieder ein Gleichgewicht eintritt [1]. Eine Ausnahme stellt eine kleine Population von Effektorzellen dar, die CD127 heraufregulieren und im Folgenden zu Gedächtniszellen werden [32].

1.1.3.3 T-Gedächtniszellen

T-Gedächtniszellen entstehen beim Kontakt mit Infektionserregern und persistieren nach der Infektion für Jahre, evtl. sogar lebenslang [1] [38]. Ihre Anzahl steigt, durch die ständige Exposition gegenüber Pathogenen, im Laufe des Lebens an, wohingegen

die Anzahl der naiven Lymphozyten aufgrund der Thymusinvolution abnimmt [33] [39] [40] [41]. T-Gedächtniszellen sorgen bei erneuter Infektion mit demselben Krankheitserreger für eine schnellere und effizientere sekundäre Immunantwort [38]. Wie die naiven T-Zellen gehören sie zu den ruhenden Lymphozyten, tragen CD127 auf ihrer Oberfläche und können dadurch Überlebenssignale durch IL-7 empfangen [29] [38] [40]. Wie Effektorzellen tragen auch Gedächtniszellen die kürzere Spleißvariante von CD45, das CD45RO, auf ihrer Oberfläche [27] [36]. Die Co-stimulatorischen Moleküle CD27 und CD28 werden von den Gedächtniszellen weiterhin exprimiert, da sie für deren Aktivierung benötigt werden [27] [38] [40].

Man unterscheidet zwei Subpopulationen von T-Gedächtniszellen [42] [43]. Zentrale T-Gedächtniszellen (CM = engl. central memory cells) exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7 und das L-Selektin und zirkulieren zwischen den peripheren lymphatischen Organen [31] [33] [40] [42] [44]. Bei Aktivierung durch ihr spezifisches Antigen sezernieren sie hauptsächlich IL-2 und proliferieren sehr stark [31] [44] [45] [46]. Nachfolgend differenzieren sie sich zu Effektorzellen, die Effektorzytokine produzieren [31]. Die Effektor-Gedächtniszellen (EM) exprimieren kein CCR7 und migrieren daher in die entzündeten peripheren Gewebe, wie zum Beispiel (z.B.) die Schleimhäute [33] [44]. Bei Stimulation differenzieren sie sich – verglichen mit zentralen Gedächtniszellen – schnell zu Effektorzellen, welche innerhalb kürzester Zeit Effektorzytokine produzieren [31] [42] [46].

1.1.3.4 TEMRA-Zellen

TEMRA steht für engl. “terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA” [27] [46]. Diese Zellen sind, wie die Effektorzellen, CCR7-, CD27- und CD28-negativ (negativ = -), re-exprimieren jedoch CD45RA [27] [33]. TEMRA-Zellen existieren innerhalb der CD8+ T-Zellen und exprimieren Gene, die für Effektorfunktionen, wie z.B. die Granzym- und Perforin-vermittelte Zytotoxizität, kodieren [44]. Innerhalb der CD4+ T-Zellen gesunder Erwachsener wurden sie noch nicht sicher identifiziert [27].

1.1.4 T-Zell-Aktivierung

In den sekundären lymphatischen Organen werden naive T-Lymphozyten aktiviert, proliferieren und differenzieren sich daraufhin zu Effektor- und Gedächtniszellen [13] [31]. Für die Aktivierung der T-Zellen werden mindestens zwei Signale benötigt [47].

Die hochspezifische Bindung des MHC/Peptid-Komplexes der Antigen-präsentierenden Zelle an den TCR der T-Zelle stellt das erste Signal dar, welches jedoch allein noch

nicht zur Aktivierung der T-Zelle führt [5] [31] [48]. Dieses erste Aktivierungssignal durch ein Antigen kann in vitro durch Anti-CD3-Antikörper imitiert werden [1] [48]. CD4⁺ T-Lymphozyten interagieren mit MHCII-Molekülen, die sich nur auf der Oberfläche von professionellen APCs befinden [5] [47] [49] [50]. CD8⁺ T-Lymphozyten erkennen MHCI-Moleküle, die auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden [5] [50] [51] [52].

Erst durch ein zweites co-stimulatorisches Signal der APCs werden bei den naiven T-Lymphozyten die Proliferation, die Differenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen und die Zytokinsekretion eingeleitet [47]. Der am besten untersuchte co-stimulatorische Signalweg läuft über die Interaktion der co-stimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf APCs mit dem T-Zell-Oberflächenrezeptor CD28 ab, welcher nach Stimulation der T-Zellen durch das erste Signal hochreguliert wird [48] [53]. Die aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten stimulieren dann wiederum die APCs durch Bindung ihres CD40-Liganden (CD40L) an den Rezeptor CD40 auf den APCs zur verstärkten Expression ihrer B7-Moleküle und zur Zytokinsekretion [1]. Diese Interaktion zwischen DCs und T-Zellen wird als immunologische Synapse bezeichnet [47] [48]. Differenzierte T-Zellen (Effektor- und Gedächtniszellen) werden deutlich schneller als naive T-Zellen durch auf MHC-Molekülen dargebotene Antigene aktiviert und sind weniger abhängig von der B7-CD28-Co-Stimulation [38].

Die Aktivierung der T-Zellen führt zur Veränderung der Expression von Oberflächenmolekülen und zur Zytokinproduktion [28]. Der IL-2-Rezeptor wird von aktivierten T-Zellen transient exprimiert [1]. Er besteht aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit, wobei die α -Untereinheit (CD25) ausschließlich im IL-2-Rezeptor vorkommt und daher zur Detektion desselben genutzt werden kann [1] [54] [55]. Die Antigen-aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten produzieren IL-2, welches den Wachstums-, Überlebens- und Differenzierungsfaktor für die Effektor-T-Lymphozyten darstellt [31] [38]. Über die Interaktion von IL-2 mit dem IL-2-Rezeptor verstärken die aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten ihre Antwort selbst und leiten die Proliferation und Differenzierung ein [1] [2]. Neben seiner Funktion als Proliferations- und Differenzierungsfaktor für Antigen-aktivierte T-Zellen ist IL-2 für Überleben und Funktion der regulatorischen T-Zellen notwendig, welche den IL-2-Rezeptor konstitutiv exprimieren (s. Kapitel 1.1.6.3) [55] [56] [57].

Die Differenzierungsrichtung der T-Zellen und damit Qualität der Effektorantwort wird durch das Zytokinmilieu beeinflusst, welches auch dem dritten Signal der

T-Zell-Aktivierung zugerechnet wird [31] [53] [58]. Die Zytokine werden von APCs oder anderen Immunzellen bei der unspezifischen Immunreaktion produziert und führen zur Differenzierung der CD4+ T-Zellen zu verschiedenen Subtypen, wie z.B. zu Th1-Zellen, Th2-Zellen oder Th17-Zellen [47] [53] (s. Kapitel 1.1.5).

Bei der Aktivierung der naiven, CD8+ T-Lymphozyten gibt es zwei Besonderheiten: Die Kreuzpräsentation von Antigenen durch spezialisierte DCs sowie die Hilfe durch CD4+ T-Helferzellen [52] [59]. Die infizierten Zellen beziehungsweise (bzw.) deren sezernierte Proteine werden zunächst von spezialisierten DCs ingestiert, welche dann die Peptidfragmente auf MHC-I-Molekülen den CD8+ T-Lymphozyten präsentieren [52] [59]. Dieser Vorgang wird als Kreuzpräsentation der Antigene bezeichnet [52] [60]. Zusätzlich sorgen die DCs durch die Co-Stimulation über B7-Moleküle für das zweite Aktivierungssignal [48] [53]. Bei Infektionen, die starke angeborene Immunreaktionen auslösen, reicht dieser Mechanismus für die Aktivierung der CD8+ Lymphozyten aus [59]. Bei relativ schwachen angeborenen Immunantworten, wie sie z.B. bei latenten Virusinfektionen oder Tumoren vorliegen, wird jedoch für die volle Aktivierung von CD8+ T-Zellen die Beteiligung von T-Helferzellen benötigt [59]. T-Helferzellen realisieren dies zum einen durch Stimulation der CD8+ T-Zellen über Zytokine sowie durch die Bindung ihres CD40-Liganden (CD40L) an den Rezeptor CD40 auf DCs, wodurch die Effizienz der Stimulation der CD8+ T-Zellen durch die APCs erhöht wird [1] [61].

1.1.5 T-Helferzellen und ihre Effektorantworten

CD4+ T-Helferzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Steuerung und Regulation der Immunantwort gegen diverse Keime [62]. Zudem sind sie an der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten sowie allergischen und atopischen Erkrankungen beteiligt [63]. Unterschiedliche T-Helferzell-Subtypen vermitteln pathogenabhängig verschiedenartige Immunreaktionen [26]. Vor über 30 Jahren wurden mit den Th1- und den Th2-Zellen die ersten T-Helferzell-Subtypen beschrieben [64]. Fast zwei Jahrzehnte später kamen mit der Entdeckung der Th17-Zellen und der Tregs weitere Subtypen hinzu, die schließlich durch die Tfh-Zellen (follikuläre T-Helferzellen), Th9- und Th22-Zellen ergänzt wurden [26] [65]. Die Transkriptionsfaktoren, Effektorzytokine und Eigenschaften der am besten untersuchten T-Helferzell-Subpopulationen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: T-Helferzell-Subpopulationen und ihre Eigenschaften (modifiziert nach [1], [2] und [66]).

	Induzierende Zytokine	Transkriptionsfaktoren	Effektorzytokine	Zielzellen und protektive Funktionen	Pathogenetische Bedeutung bezüglich Autoimmunität
Th1	IL-12, IFN γ	T-bet	IFN γ , TNF α	Aktivierung von Makrophagen, Hilfe für CD8+ T-Zellen, Aktivierung von NK-Zellen → Beseitigung von Bakterien und Viren	Autoimmunkrankheiten (z.B. T1DM, MS)
Th2	IL-4, IL-25, IL-33, TSLP	GATA-3	IL-4, IL-5, IL-13	Aktivierung von Eosinophilen → Beseitigung von Würmern und Ektoparasiten	Allergische und atopische Erkrankungen (z.B. Asthma bronchiale)
Th17	IL-6, TGF β , IL-23, IL-1 β	ROR γ t	IL-17, IL-22	Rekrutierung von Neutrophilen → Beseitigung von extrazellulären Bakterien und Pilzen	Autoimmunkrankheiten und autoinflammatorische Erkrankungen (z.B. Psoriasis, RA, MS, CED)
Treg	TGF β , IL-2	FoxP3	IL-10, TGF β	Antiinflammatorische Wirkung, immunologische Selbsttoleranz	Autoimmunkrankheiten bei Dysfunktion oder Mangel (z.B. IPEX-Syndrom)
Th9	TGF β , IL-4	PU.1, IRF4	IL-9	Schutz vor parasitären Erkrankungen	Allergische und atopische Erkrankungen (z.B. Asthma bronchiale)
Th22	TNF α , IL-6	ROR γ t, AHR	IL-22	Aufrechterhaltung der Barrierefunktion in Haut, Darm und Atemwegen, Regeneration von Geweben	Autoimmunerkrankungen (z.B. Psoriasis, RA)
Tfh	IL-6, IL-21, IL-12	Bcl-6	IL-21, IL-4, IL-10	B-Zell-Aktivierung und -Differenzierung zu Plasmazellen und Gedächtniszellen	Autoimmunerkrankungen bei Überwiegen der Tfh-Zellen

Abkürzungen: Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR), engl. B-cell lymphoma (Bcl), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM), folliculäre T-Helferzelle (Tfh), engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), Interferon (IFN), Interleukin (IL), engl. interferon regulatory factor 4 (IRF4), Multiple Sklerose (MS), natürliche Killerzellen (NK-Zellen), positiv (+), regulatorische T-Zelle (Treg), engl. retinoic acid orphan receptor gamma t (ROR γ t), rheumatoide Arthritis (RA), engl. T-box expressed in T cells (T-bet), T-Helferzelle (Th), engl. thymic stromal lymphoprotein (TSLP), engl. transforming growth factor (TGF), Tumornekrosefaktor (TNF), X-chromosomales Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-Syndrom (IPEX-Syndrom).

Die Differenzierung der CD4⁺ naiven T-Zellen zu den Effektorzell-Subpopulationen wird durch das Zytokinprofil beeinflusst, das die APCs Pathogen-abhängig sezernieren (drittes Signal) [31] [53] [67] [58]. So produzieren bei Infektion mit Viren und intrazellulären Bakterien DCs, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) die Zytokine IL-12 und Interferon γ (IFN = Interferon), welche dann die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen induzieren [66] [67] [68]. Bei Infektion mit Helminthen oder Exposition gegenüber Allergenen entstehen im verletzten Epithel die Zytokine IL-25, IL-33 und TSLP (engl. thymic stromal lymphoprotein), zudem wird IL-4 von Mastzellen produziert [65]. Diese Zytokine führen zur Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th2-Zellen [65] [69]. Die Zytokine IL-6, TGF β (engl. transforming growth factor β), IL-1 β und IL-23 führen bei Befall mit extrazellulären Bakterien oder Pilzen zur Entwicklung von Th17-Zellen [70] [71] [72]. Die T-Helferzellen produzieren dann ihrerseits Zytokine, über die sie mit ihren Zielzellen kommunizieren [67]. Verantwortlich für die Zytokinproduktion sind spezifische Transkriptionsfaktoren, die von den T-Helferzellen exprimiert werden [67].

Th1 Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet (engl. T-box expressed in T cells) und produzieren vor allem (v.a.) IFN γ , worüber sie Makrophagen aktivieren, die dann die phagozytieren Mikroben abtöten [53] [65] [67]. Das von den Th1-Zellen produzierte IFN γ führt wiederum über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet zur vermehrten Entstehung von Th1-Zellen und damit zu einer positiven Amplifikation der Th1-Antwort [1] [73]. Gleichzeitig wird durch IFN γ die Differenzierung zu Th2- und Th17-Zellen gehemmt [66]. IFN γ ist ein proinflammatorisches Zytokin und scheint an der Genese verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) und Multipler Sklerose (MS), beteiligt zu sein [65] [74]. Ein weiteres, von den Th1-Zellen produziertes, Zytokin ist der Tumornekrosefaktor α (TNF α), der zur Rekrutierung von Leukozyten und damit zu einer Verstärkung der Immunantwort führt [1] [65]. Th1-Zellen tragen die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 (CXCR = CXC-Chemokinrezeptor) auf ihrer Oberfläche [28] [73]. CCR5 wird neben den Th1-Zellen auch von Monozyten und CD8⁺ T-Zellen exprimiert [73] [75] [76]. Über seine Liganden werden sowohl Th1-Zellen als auch CD8⁺ Effektorzellen und die sich zu Makrophagen differenzierenden Monozyten zum Ort des Entzündungsgeschehens geleitet, wo sie bei der Abwehr der Pathogene zusammenarbeiten [13] [73] [75]. CXCR3 wird neben den Th1-Zellen auch auf CD8⁺ CTLs und NK-Zellen exprimiert [73] [77]. Seine Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 (CXCL = CXC-Chemokinligand) sorgen für die Migration der CXCR3-tragenden Zellen zum Infektionsort, wo sie für die Th1-gerichtete

Immunantwort und die zellvermittelte Tötung der infizierten Zielzellen sorgen [13] [73] [77].

Th2 Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor GATA-3 und produzieren IL-4, IL-5 und IL-13, wodurch Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten aktiviert werden und ein Immunglobulin-Klassenwechsel hin zu IgE-Antikörpern eingeleitet wird [53] [69]. Dadurch wird die Abwehr von Helminthen gewährleistet [1] [53] [69]. Pathogenetisch spielen Th2-Zellen eine Rolle bei allergischen und atopischen Erkrankungen [65] [69]. GATA-3 führt durch eine positive Verstärkung über vermehrte IL-4-Produktion zur Stabilisierung der Th2-Effektorantwort [26]. Gleichzeitig hemmt es die Th1-Antwort über die Repression des IL-12-Rezeptors [26].

Th17-Zellen sind an der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze durch die Rekrutierung von Neutrophilen beteiligt [53] [67]. Zudem spielen sie eine Rolle in der Entstehung von Autoimmunkrankheiten und autoinflammatorischen Erkrankungen, wie Psoriasis, Rheumatoider Arthritis (RA), MS und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) [53] [67] [78]. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR γ t (engl. retinoic acid orphan receptor gamma t) und produzieren die Zytokine IL-17 und IL-22 [70] [79]. Über IL-17 rekrutieren die Th17-Zellen v.a. neutrophile Granulozyten am Ort der Inflammation und führen zusätzlich über eine Erhöhung von G-CSF (engl. granulocyte-colony stimulating factor) zur vermehrten Bildung von neutrophilen Granulozyten [1] [70] [80]. Diese Tragen dann zur Beseitigung von extrazellulären Bakterien und Pilzen bei [2] [65]. Daneben wird IL-17 von weiteren Immunzellen, wie z.B. von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und NK-Zellen gebildet [72] [81] [82]. Über IL-22, welches neben den Th17-Zellen auch von Th22-Zellen und NK-Zellen produziert wird, werden an verschiedenen Zielzellen sowohl Gewebe-protective als auch inflammatorische Wirkungen vermittelt [70] [72] [83]. So führt IL-22 zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden in den Epithelzellen von Haut, Lunge und Gastrointestinaltrakt und ist dadurch an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Epithelien beteiligt [13] [72]. Bei Psoriasis spielt IL-22 allerdings eine pathogenetische Rolle, indem es die Proliferation von Keratinozyten fördert [72] [84] [85]. IL-22 scheint zudem an weiteren Autoimmunkrankheiten, wie RA und MS beteiligt zu sein [65]. Th17-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche den Chemokinrezeptor CCR6 [86]. Dessen Ligand (CCL20) wird von aktivierten Epithelzellen, Synovialzellen bei RA, aber auch von den Th17-Zellen selbst produziert und führt zum Auswandern der Th17-Zellen aus den sekundären Lymphatischen Organen hin zum Ort der Inflammation [13] [73] [86] [87].

Da die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t sowohl zu IL-17-Produktion als auch zur Expression von CCR6 führt, kann dieser Chemokinrezeptor zur Detektion fast aller IL-17-produzierender T-Zellen im peripheren Blut genutzt werden [70] [73] [88] [89]. Ein weiterer Marker für Th17-Zellen ist das Oberflächenmolekül CD161 [70] [88]. Dieses wird ebenfalls von allen IL-17-produzierenden T-Lymphozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert, also auch von einigen CD8⁺ T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen [88] [90]. Außerdem findet sich CD161 auf den meisten natürlichen Killerzellen [91].

Ebenfalls zu den T-Helferzellen gehören die regulatorischen T-Zellen (Tregs), deren Aufgaben die Kontrolle der Immunantworten und die immunologische Selbsttoleranz sind [65] [67]. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor FoxP3 (engl. forkhead box protein 3) und sezernieren die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β [65] [92] [93]. Verantwortlich für die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu peripheren Tregs (pTregs) und für die Aufrechterhaltung der thymischen Tregs (tTregs) ist TGF β [24] [65] [94]. Für das Überleben der Tregs und die Aufrechterhaltung der ihrer Funktion ist IL-2 von Bedeutung, welches an den auf den Tregs konstitutiv exprimierten IL-2-Rezeptor bindet [57] [55] [95]. Die Tregs sind Gegenstand dieser Arbeit und werden im folgenden Kapitel 1.1.6 detaillierter behandelt.

In jüngerer Zeit wurden noch zwei weitere T-Helferzelltypen entdeckt: Die Th22-Zellen und die Th9-Zellen [84] [96] [97] [83]. Th22-Zellen mit ihrem Zytokin IL-22 können, wie oben beschrieben, sowohl Gewebe-protective als auch inflammatorische Wirkungen entfalten [70] [72] [83]. Die Th9-Zellen werden durch IL-4 und TGF β induziert, können aber auch aus Th2-Zellen durch Stimulation mit TGF β entstehen [26] [96] [97]. Sie wirken über IL-9 protektiv gegen parasitäre Infektionen und spielen eine Rolle bei der Pathogenese von allergischen Erkrankungen und Asthma bronchiale [96] [97].

Eine weitere T-Helferzell-Population sind die folliculären T-Helferzellen (Tfh-Zellen) [63] [98]. Diese Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor Bcl-6 (Bcl = engl. B cell lymphoma) und den Chemokinrezeptor CXCR5, migrieren in die B-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Organe und induzieren dort die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen [66] [98] [99]. Dabei spielt v.a. das Zytokin IL-21 eine Rolle [100]. Tfh-Zellen stellen eine sehr plastische Zelllinie dar und können auch die für die Th1, Th2 und Th17 charakteristischen Zytokine IFN γ , IL-4 und Th17 produzieren [100] [101] [102]. Daher gehen manche Autoren mittlerweile davon aus, dass es sich bei den Tfh-Zellen nicht um eine von den übrigen T-Helferzellen

getrennte Zellpopulation handelt, sondern vielmehr um einen Aktivierungsstatus innerhalb der Th1, Th2 und Th17-Zellen [101].

1.1.6 Immunologische Toleranzmechanismen durch regulatorische T-Zellen

Die immunologische Selbsttoleranz ist eine elementare Funktion des Immunsystems [4]. Während fremde Antigene erkannt und eliminiert werden, müssen körpereigene Antigene vom Immunsystem toleriert werden [4]. Funktionieren diese Mechanismen der Selbsttoleranz nicht, kommt es zu Autoimmunerkrankungen [4] [103].

Man kann zwischen zentralen und peripheren Toleranzmechanismen unterscheiden [4]. Zentrale Toleranzmechanismen greifen in die Entwicklung der Lymphozyten in Knochenmark und Thymus ein, bei den peripheren Toleranzmechanismen sind reife Lymphozyten betroffen [4] [23].

1.1.6.1 Zentrale T-Zell-Toleranz

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, werden den unreifen T-Zellen im Thymus Selbst-Antigene über MHC-Moleküle präsentiert [17]. Es kommt zu einem negativen Selektionsprozess, bei dem die Thymozyten, die eine hohe Affinität zu Selbst-Antigenen aufweisen, absterben [5] [17] [18] [20]. Diese negative Selektion wird auch als zentrale Toleranz bezeichnet [23]. Einige Thymozyten mit intermediärer Affinität zu den mit Selbst-Antigenen beladenen MHC-Molekülen gelangen in die Peripherie, wo sie sich zu tTregs differenzieren, die Immunantworten gegen Selbst-Antigene unterdrücken [22] [23] [104].

1.1.6.2 Periphere T-Zell-Toleranz

Die zentrale Toleranz ist nicht absolut effektiv, unter anderem (u.a.), weil den Thymozyten im Thymus nicht alle Autoantigene präsentiert werden [4]. So können einige autoreaktive T-Zellen den Selektionsmechanismen im Thymus entkommen und in die Peripherie gelangen [4] [105]. Daher bedarf es peripheren Toleranzmechanismen, zu denen neben Ignoranz, Deletion und Anergie auch die Immunregulation durch regulatorische T-Zellen gehört [4] [105] [106].

1.1.6.3 Regulatorische T-Zellen und deren Phänotyp

Regulatorische T-Zellen sind CD4+ T-Lymphozyten, die Immunantworten aktiv unterdrücken und eine essenzielle Rolle bei der immunologischen Selbsttoleranz spielen [24] [107] [108] [109]. Sie können sowohl im Thymus aus Thymozyten als auch in der Peripherie aus naiven T-Zellen entstehen [53] [110]. IL-2 ist für die Entstehung der

Tregs und für die Aufrechterhaltung der Treg-Funktion nötig und wird von aktivierten T-Zellen gebildet [38] [55] [95] [111]. Tregs exprimieren den Transkriptionsfaktor FoxP3, welcher für die Funktion der Tregs verantwortlich ist, und den IL-2 Rezeptor mit seiner α -Untereinheit CD25 [92] [107] [112].

Die α -Untereinheit des IL-7-Rezeptors (CD127) wird von den Tregs kaum exprimiert, deshalb geht man davon aus, dass für sie IL-2 und nicht IL-7 den Überlebensfaktor darstellt [57] [55] [113]. Es wurde gezeigt, dass die Expression von CD127 invers mit der FoxP3-Expression korreliert [113] [114]. Daher kann ein negativer CD127-Status, gemeinsam mit der Expression von CD4 und CD25 zur Definition und Isolierung von Tregs genutzt werden [22] [112] [113] [114]. Folglich führt die Hinzunahme eines negativen CD127-Statuses zur ursprünglichen Definition von Tregs (CD4+CD25+) zu Zellen mit höherer FoxP3-Expression und höheren Suppressionsraten [114].

Zudem exprimieren FoxP3+ Tregs das Oberflächenmolekül CTLA-4 (engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) konstitutiv, welches zur CD28-Rezeptorfamilie gehört und eine Bindung mit den co-stimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 auf APCs eingehen kann [24] [115] [116].

Über den CD45RA-Status der Tregs lassen sich naive von Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs unterscheiden [117]. Man geht davon aus, dass die CD45RA+ naiven Tregs dem Thymus entstammende, ruhende Tregs darstellen, die sich nach Aktivierung zu CD45RA- Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs differenzieren und auch als aktivierte Tregs bezeichnet werden [107] [118]. Von manchen Autoren werden die CD45RA+, naiven Tregs auch als ruhende Tregs (rTregs) bezeichnet und die CD45RA- Effektor bzw. Gedächtnis-Tregs werden aktivierte Tregs (aTregs) genannt [119] [120]. Der Anteil der naiven CD45RA+ Tregs nimmt mit fortschreitendem Alter aufgrund der Thymusinvolution ab, die Anzahl der CD45RA- Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs nimmt hingegen zu [107] [117] [121] [122]. Nach Stimulation können die CD45RA+ naiven Tregs proliferieren und sich zu CD45RA- Effektor- und Gedächtnis-Tregs differenzieren [107] [118]. CD45RA+ Tregs zeigen eine stabilere FoxP3-Expression als CD45RA- Tregs [117] [123]. Sowohl die CD45RA+ als auch die CD45RA- Tregs haben in Studien eine gleichwertige Suppressionsfunktion gezeigt [121] [124].

1.1.6.4 Thymische Tregs (tTregs), periphere Tregs (pTregs) und in vitro induzierte Tregs (iTregs)

Die regulatorischen T-Zellen stellen eine heterogene Population dar und lassen sich, je nach Entstehungsort, in zwei Gruppen unterteilen: Die tTregs und die pTregs [108] [110] [125]. In Abbildung 2 ist die Entstehung der Tregs schematisch dargestellt. Die thymischen Tregs (tTregs) werden auch natürliche regulatorische T-Zellen (nTregs) genannt und entstehen im Thymus durch Erkennung von Selbst-Antigenen [63] [94] [126]. Sie machen ca. 70 % der Tregs aus und sind für die Toleranz von körpereigenen Antigenen von Bedeutung [127] [128]. tTregs zeichnen sich durch eine konstitutive Expression von CD25 und FoxP3 aus und stellen eine stabile Zelllinie dar [24] [129] [130]. Ca. 30 % der Tregs entstehen in vivo in der Peripherie aus naiven CD4+ T-Zellen durch Antigen-Stimulation unter dem Einfluss von TGF β und IL-2 und werden periphere regulatorische T-Zellen (pTregs) genannt [22] [128] [131] [132]. Die Entstehung von pTregs kann unter u.a. in den Lymphknoten, in der Lamina propria des Darms und in chronisch entzündeten Geweben stattfinden, hier spielt eine Erkennung von körperfremden Antigenen eine Rolle [94] [133]. Eine große Anzahl von pTregs findet sich im Darm, wo sie bei der Toleranz von Fremdantigenen eine Rolle spielen [133] [134]. Ihre Differenzierung aus naiven CD4+ T-Lymphozyten wird im Darm durch den Kontakt mit kommensalen Bakterien und Nahrungsmittelantigenen induziert [135] [136]. Außerdem können Tregs durch TGF β und IL-2 aus konventionellen T-Zellen in vitro induziert werden und werden dann in vitro induzierte Tregs (iTregs) genannt [111] [134]. Die Begriffe tTreg und nTreg sowie pTreg und iTreg werden häufig synonym verwendet [127] [137]. Abbas et al. empfehlen jedoch, den Begriff nTreg zu vermeiden, da dieser suggeriere, dass es sich bei pTregs um „unnatürliche“ Tregs handle [137]. Zudem wird die Empfehlung ausgesprochen, bei in vivo in der Peripherie entstandenen Tregs von pTregs und bei in vitro induzierten Tregs von iTregs zu sprechen [137]. Im Folgenden halten wir uns an diese Empfehlungen zur Nomenklatur der Tregs. Sowohl tTregs als auch pTregs und iTregs sind CD4+ und CD25+ und exprimieren FoxP3 als ihren Transkriptionsfaktor, der für ihre suppressive Funktion verantwortlich ist [135]. Zwar können auch konventionelle T-Zellen FoxP3 transient exprimieren, jedoch ist eine hohe und stabile FoxP3-Expression eine charakteristische Eigenschaft von Tregs [110] [129] [138] [139] [140]. Es gibt jedoch phänotypische und funktionelle Unterschiede zwischen tTregs und iTregs [135]. So sind iTregs im Vergleich zu tTregs instabiler und können sich zu Effektorzellen differenzieren, welche proinflammatorische Zytokine sezernieren [134] [135] [141]. Die Stabilität der FoxP3-Expression und damit

der Treg-Funktion ist u.a. mit der Demethylierung eines nicht kodierenden Elements im FoxP3-Genlocus assoziiert, welches Treg-spezifische demethylierte Region (TSDR) genannt wird [129] [140] [142] [143]. In den tTregs liegt die TSDR demethyliert vor, daher wird FoxP3 exprimiert und sorgt für eine Stabilität der tTregs [129] [130] [140] [143]. Bei in vitro unter dem Einfluss von TGF β und IL-2 generierten iTregs ist die TSDR partiell methyliert, was im Verlauf zum Verlust der FoxP3-Expression und damit einer Instabilität der Zelllinie führt [103] [129] [130] [140].

Außerdem wurden in Genexpressionsanalysen Unterschiede zwischen nTregs und iTregs festgestellt, u.a. bezüglich der Expression des Transkriptionsfaktors Helios [128] [135]. Dieser scheint keinen Einfluss auf die FoxP3-Expression und damit die Funktion der Tregs zu haben [128] [135]. Er wird von den nTregs exprimiert, nicht aber von den iTregs und bietet so eine Möglichkeit, diese beiden Treg-Populationen voneinander zu unterscheiden [128] [135].

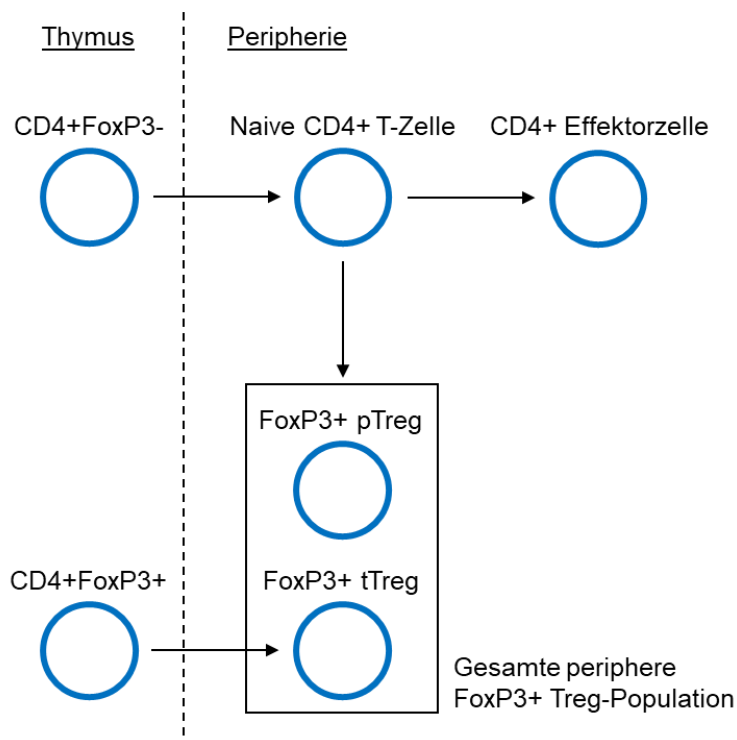


Abbildung 2: Entstehung von FoxP3+ Tregs im Thymus und in der Peripherie (modifiziert nach [94]).

tTregs entstehen im Thymus aus Thymozyten und migrieren in die Peripherie. pTregs entstehen in sekundären lymphatischen Organen und Geweben aus naiven CD4+ T-Lymphozyten. Sowohl tTregs als auch pTregs zeichnen sich durch die Expression von FoxP3 aus. Zusammen spielen die Tregs eine essenzielle Rolle bei der immunologischen Selbsttoleranz. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), periphere regulatorische T-Zellen (pTregs), positiv (+), regulatorische T-Zellen (Tregs), thymische regulatorische T-Zellen (tTregs).*

1.1.6.5 Treg-Funktion

Tregs supprimieren Immunantworten über verschiedene Mechanismen, die von FoxP3 kontrolliert werden [24] [25] [92]. Sie hemmen u.a. die Proliferation und Aktivierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen, die Funktion von Effektor-T-Zellen sowie die Proliferation und Antikörperproduktion der B-Zellen [107] [143] [144]. Auch auf NK-Zellen und DCs wirken die Tregs inhibitorisch [145] [146] [147]. Die vier am besten untersuchten Mechanismen der Treg-Funktion, welche im Folgenden beschrieben werden, sind die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen, die Störung der Reifung und Funktion von APCs durch Zellkontakt-abhängige Suppressions-Mechanismen, die Beeinflussung des Zell-Metabolismus und die Zytolyse von Zielzellen [127] [148].

Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen

Tregs produzieren die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β , welche allerdings auch von anderen Zellen des erworbenen und angeborenen Immunsystems gebildet werden [148] [149] [150] [151] [152]. IL-10 wirkt auf APCs, indem es deren Expression von MHC-II-Molekülen und Co-Stimulatoren herunterreguliert, was zur Hemmung der Aktivierung der T-Zellen und zur Beendigung der zellvermittelten Immunreaktion führt [1] [143] [153] [154] [155]. Außerdem hemmt IL-10 aktivierte Makrophagen und Mastzellen sowie CD8+ T-Lymphozyten und führt zu einer Reduktion ihrer proinflammatorischen Zytokine [1] [156]. TGF β induziert die Expression von FoxP3 und bewirkt so die Differenzierung von naiven Zellen zu pTregs und die Aufrechterhaltung der nTregs [24] [72]. Die Expression von FoxP3 führt wiederum zur TGF β -Produktion, sodass durch diese positive Feedback-Schleife pTregs aus naiven Zellen generiert werden und dadurch die periphere Toleranz aufrechterhalten wird [65] [157]. Über TGF β werden die Proliferation und die Effektorfunktionen von T-Zellen und NK-Zellen gehemmt sowie die Aktivierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen [1] [143] [145]. Außerdem bewirkt TGF β die Reparatur von Geweben nach Ablauf einer lokalen Immunreaktion, indem es u.a. die Kollagensynthese und Angiogenese stimuliert [1] [147]. In vitro scheinen die sezernierten Zytokine IL-10 und TGF β allerdings bei der Suppression von Effektorzellen durch Tregs nicht die ausschlaggebende Rolle zu spielen [56] [158]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass auch bei Inaktivierung von IL-10 und TGF β durch gegen die Zytokine gerichtete Antikörper die Tregs noch eine gute Suppressionsfunktion zeigten [159] [160] [161] [162].

Störung der Reifung und Funktion von APCs durch Zellkontakt-abhängige Suppressions-Mechanismen

Als Zellkontakt-abhängigen Suppressions-Mechanismus können Tregs über CTLA-4 und LAG-3 (Lymphozyten-Aktivierungsgen 3) durch Interaktion mit APCs immunsuppressiv wirken, indem sie die Aktivierung von T-Zellen durch die APCs herabsetzen [148] [150]. Tregs exprimieren CTLA-4 konstitutiv und empfangen über die Bindung von CTLA-4 an die B7-Moleküle (CD80/CD86) auf den APCs co-stimulatorische Signale, was die Aktivierung der Tregs verstärkt [24] [159] [115]. Über die kompetitive Hemmung der CD28-vermittelten Co-Stimulation können sie die Aktivierung von T-Zellen durch APCs herabsetzen [47] [163]. Dabei binden sie über CTLA-4 mit höherer Affinität als CD28 an die B7-Moleküle der APCs, welche dann nicht mehr für die Co-Stimulation der T-Zellen über CD28 bereitstehen [24] [47] [116] [150]. Zudem führt die Bindung von CTLA4 auf Tregs mit CD80/CD86 auf APCs zu einer Herabregulierung von CD80/CD86 bei den APCs [24] [115] [146]. Über LAG-3, ein mit CD4 verwandtes Transmembran-Protein, können Tregs mit MHC-II-Molekülen auf APCs interagieren und so deren Reifung und immunstimulatorische Funktionen hemmen [150] [164] [165].

Beeinflussung des Zell-Metabolismus

Tregs exprimieren das Oberflächenmolekül CD25 (IL-2-R α = α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors) und können darüber den Zellmetabolismus von Effektor-T-Lymphozyten beeinflussen [127] [150]. Die Bindung von IL-2 an CD25 auf den Tregs kann hierbei zu einer Depletion von IL-2 führen, wodurch den übrigen T-Lymphozyten ihr Proliferationsfaktor entzogen wird. Dieser Mechanismus wird allerdings kontrovers diskutiert und konnte bislang nur in murinen Experimenten und nicht bei menschlichen Tregs nachgewiesen werden [56] [118] [150] [166] [167]. Weiterhin können Tregs über die enzymatisch aktiven Oberflächenmoleküle CD39 und CD73 extrazelluläres Adenosintriphosphat zu Adenosin abbauen, welches auf konventionelle T-Zellen und DCs immunsuppressiv wirkt [168] [169].

Zytolyse von Zielzellen

Des Weiteren können Tregs, ähnlich wie die CD8+ CTLs, Granzyme sezernieren und über Perforin zur Zytolyse von Zielzellen wie CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, Monozyten und DCs führen [150] [170] [171].

Wie essenziell die Rolle der Tregs bei der Erhaltung der Selbsttoleranz ist, wird beim IPEX-Syndrom (X-chromosomales Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-Syndrom) deutlich [172] [173] [174] [175]. Hier kommt es durch Mutationen im FoxP3-Gen zu einem Mangel bzw. einer Dysfunktion der Tregs und folglich zu einer schweren Multiorganerkrankung mit blutigen Diarrhöen, Ekzemen und autoimmunen Endokrinopathien verschiedener Organe [172] [173] [174] [175]. Eine zu starke immunsuppressive Funktion der Tregs kann hingegen zur Anfälligkeit gegenüber chronischen Infektionen und Tumoren führen [107] [108]. Deshalb ist es für ein gesundes Immunsystem essenziell, dass sich pro- und antiinflammatorische Faktoren die Waage halten [176] [177]. Die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen T-Helferzellen und die Auswirkungen einer Dysbalance sind in Abbildung 3 veranschaulicht.

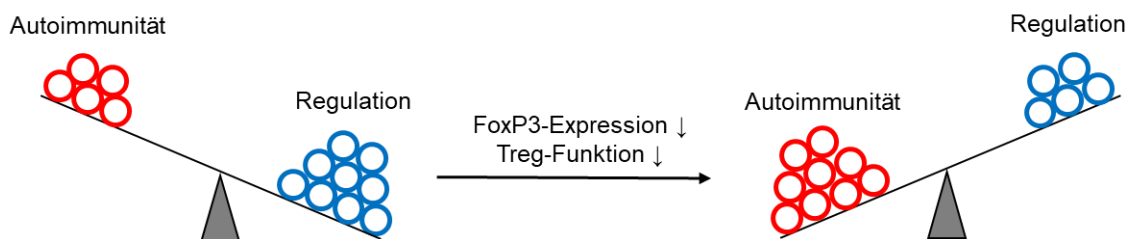


Abbildung 3: Rolle der Tregs bei der Immunhomöostase (modifiziert nach [161]).

Für die Immunhomöostase ist es essenziell, dass sich proinflammatorische und regulatorische Mechanismen die Waage halten. Im gesunden Immunsystem kontrollieren Tregs, die stabil FoxP3 exprimieren, die Immunantworten und verhindern Autoimmunität. Ein Verlust der FoxP3-Expression führt zum Funktionsverlust der Tregs. Die Balance zwischen proinflammatorischen und regulatorischen Faktoren gerät aus dem Gleichgewicht und Autoimmunität wird begünstigt. *Abkürzungen: engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), regulatorische T-Zellen (Tregs).*

1.1.7 T-Helferzell-Plastizität

Wie unter 1.1.5 beschrieben, differenzieren sich die naiven CD4⁺ T-Zellen in den sekundären Lymphatischen Organen zu Effektorzellen mit unterschiedlichen Modalitäten. So entstehen Th1-, Th2-, Th-9, Th17-, Th-22-Zellen, Tfh-Zellen sowie Tregs, die sich durch spezifische Genexpressionsmuster und Funktionen auszeichnen [1] [26] [65].

Seit mehr als 30 Jahren ist bekannt, dass sich T-Helferzellen pathogenabhängig in verschiedene Subtypen differenzieren [64]. Die zuerst entdeckten T-Helferzell-Subpopulationen, waren die Th1- und die Th2-Zellen mit ihren Zytokinen IFN γ (Th1) und IL-4 (Th2) [64] [68] [178] [179]. Zunächst wurde vermutet, dass die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen zu den T-Helferzell-Subpopulationen endgültig sei und zu einem stabilen Phänotyp und Zytokinproduktionsmuster führe [12] [64] [180] [181].

Th1-Zellen wurden für die Abwehr von intrazellulären Pathogenen und die Genese von Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht [74] [180], Th2-Zellen für die Beseitigung von Helminthen und die Ursache von Asthma bronchiale [69] [131]. Diese dichotome Ansicht der T-Helferzell-Antworten hat zum Verständnis der Immunregulation beigetragen, wird jedoch nicht der Komplexität der T-Helferzell-Differenzierung und Immunregulation gerecht [63] [101].

APCs beeinflussen durch die Produktion von Zytokinen die Richtung, in die sich die Effektorantwort der T-Helferzellen richtet [26] [101]. Das Zytokinmilieu wird deshalb auch als „drittes Signal“ der T-Zell-Aktivierung bezeichnet [31] [53] [58]. Hier spielen die DCs eine Rolle, die in den sekundären lymphatischen Organen mit den T-Zellen interagieren [67]. Zusätzlich können weitere Zellen des angeborenen Immunsystems in der Peripherie durch ihre Zytokinproduktion die T-Helferzell-Antwort beeinflussen [67]. Beispielsweise wird die Th1-gerichtete Immunantwort durch IFN γ -produzierende NK-Zellen und IL-12-produzierende Makrophagen begünstigt [66] [67] [68] [182]. Die Th2-Immunantwort wird über die IL-4-Produktion durch Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten gefördert sowie über die Sekretion von TSLP, IL-25 und IL-33 durch Epithelzellen [65] [69].

Der Phänotyp der T-Helferzell-Subtypen ist nicht endgültig festgelegt, sondern kann sich unter bestimmten Voraussetzungen verändern [12] [65]. Die Genexpression und das Zytokinprofil der T-Helferzell-Subtypen unterliegen einer gewissen Plastizität [65]. Hierbei spielen u.a. Transkriptionsfaktoren, das Zytokinmilieu sowie epigenetische Veränderungen eine Rolle [63] [183]. Im Folgenden wird auf die Rolle des Zytokinmilieus näher eingegangen, da dies Gegenstand dieser Arbeit ist. Abbildung 4 veranschaulicht die Plastizität der T-Helferzellen in Abhängigkeit des Zytokinmilieus.

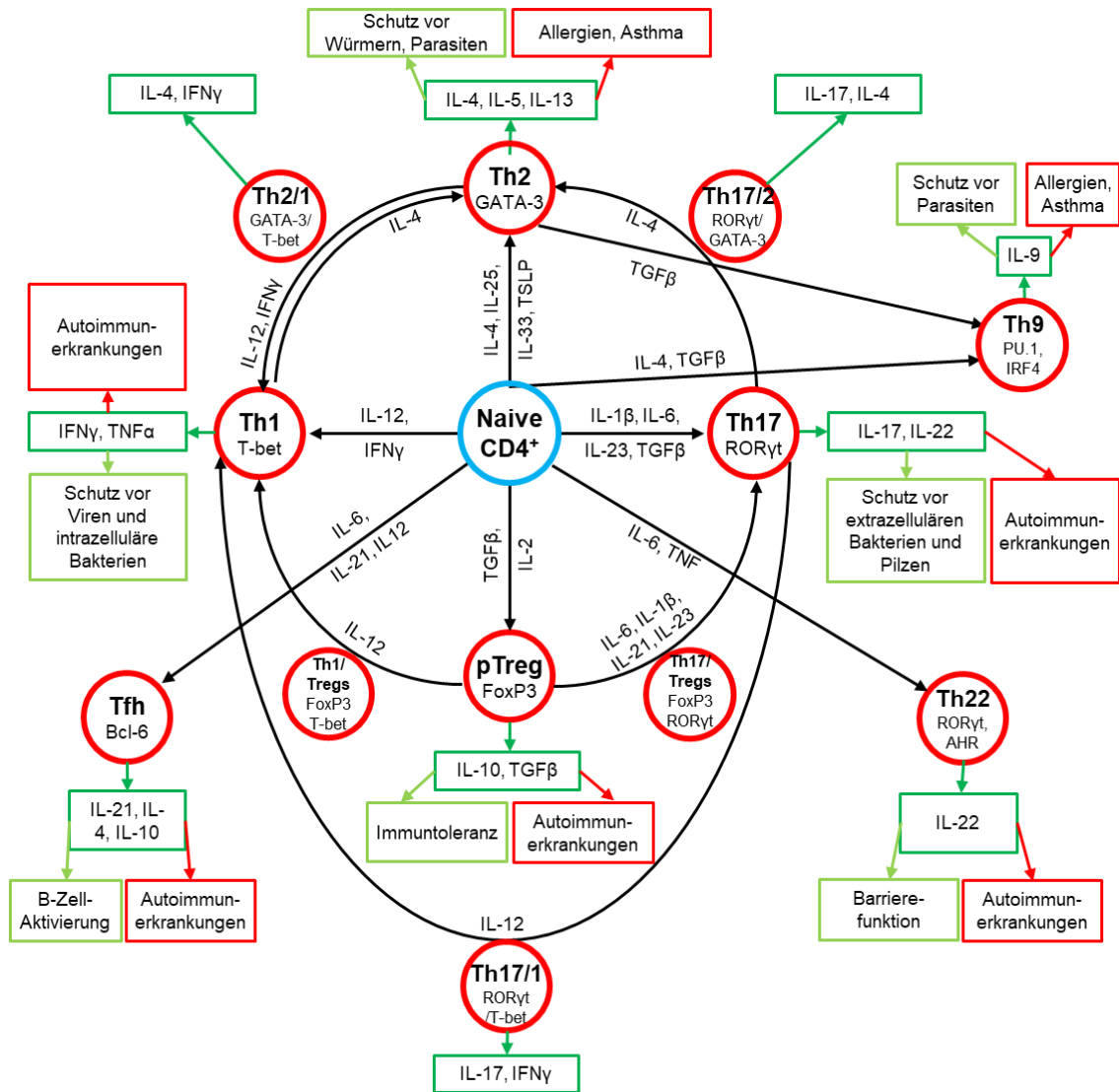


Abbildung 4: Plastizität der T-Helferzellen (modifiziert nach [62]).

Naive CD4⁺ T-Zellen können Zytokin-abhängig zu verschiedenen T-Helferzelltypen polarisiert werden. Auch zwischen den unterschiedlichen CD4⁺ Effektorzellen besteht eine gewisse Plastizität. In dieser Abbildung sind die bisher bekannten T-Helferzelltypen und ihre Verwandtschaftsbeziehungen untereinander gezeigt. Außerdem sind die von ihnen hauptsächlich produzierten Zytokine, ihre Transkriptionsfaktoren sowie ihre Funktion und pathogenetische Bedeutung dargestellt. *Abkürzungen:* Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR), engl. B-cell lymphoma (Bcl), folliculäre T-Helferzelle (Tfh), engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), Interferon (IFN), Interleukin (IL), engl. interferon regulatory factor 4 (IRF4), periphere regulatorische T-Zelle (pTreg), regulatorische T-Zellen (Tregs), engl. retinoic acid orphan receptor gamma t (RORyt), engl. T-box expressed in T cells (T-bet), T-Helferzelle (Th), engl. thymic stromal lymphoprotein (TSLP), engl. transforming growth factor (TGF), Tumornekrosefaktor (TNF).

Wie in Abbildung 4 ersichtlich wird, kann das Zytokinmilieu die Differenzierungsrichtung der T-Helferzellen verändern. So können sich beispielsweise Th17-Zellen unter dem Einfluss von IL-12 zu Th17/Th1-Zellen differenzieren, die sowohl RORyt als auch T-bet

exprimieren [184]. Diese Zellen produzieren somit sowohl IL-17 als auch IFN γ und konnten im Darm von Morbus Crohn-Patienten [184] sowie in der Synovia von Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis (JIA) gefunden werden [185] [186]. Wie die Th17-Zellen exprimieren auch die Th17/Th1-Zellen das Oberflächenmolekül CD161 [91]. Im Verlauf können sich die Th17/Th1-Zellen weiter zu Th1-Zellen differenzieren, die dann kein IL-17 mehr produzieren [185] [186]. Unter dem Einfluss von IL-4 können aus Th17-Zellen Th17/Th2-Zellen werden, die ROR γ t und GATA-3 exprimieren, sowohl IL-17 als auch IL-4 produzieren und bei Asthma-Patienten in erhöhter Zahl vorliegen [187] [188].

Plastizität zwischen der Treg- und der Th17-Zelllinie

Besonders zwischen den proinflammatorischen Th17-Zellen und den antiinflammatorischen iTregs besteht eine hohe Plastizität [26] [189] [192]. Beide T-Helferzell-Typen benötigen TGF β für ihre Differenzierung [53] [74].

In hoher Konzentration fördert TGF β die Differenzierung zu Tregs [1] [190]. TGF β aktiviert den Transkriptionsfaktor SMAD3 und führt dadurch zur Expression des FoxP3-Gens, welches für die Treg-Funktion verantwortlich ist [53] [191] [192]. Die durch TGF β ausgelöste Treg-Differenzierung wird durch IL-2 verstärkt, welches über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 (STAT = engl. signal transducer and activator of transcription) eine Erhöhung der FoxP3-Expression bewirkt [53] [191] [192]. Gleichzeitig wird durch TGF β die Differenzierung naiver CD4 $^+$ T-Zellen zu Th1- und Th2-Zellen und durch IL-2 die Differenzierung hin zu Th17-Zellen gehemmt [192] [193] [194].

In Anwesenheit von IL-6 führt TGF β in geringerer Konzentration jedoch zur Differenzierung zu Th17-Zellen [72] [190] [195]. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-21 und IL-23 verstärken und stabilisieren diesen Differenzierungsweg [53] [72] [195]. IL-6 aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT3, der für eine Expression von ROR γ t sowie IL-17 und des IL-23-Rezeptors sorgt [195] [196]. Durch IL-6 wird ebenfalls über STAT3 die FoxP3-Expression herunterreguliert und damit die Differenzierung von Tregs gehemmt [72] [197].

TGF β kann also sowohl regulatorische als auch proinflammatorische T-Helferzellen induzieren, abhängig davon, in welcher Konzentration und in welcher Kombination mit weiteren Zytokinen es vorliegt [190]. Daraus wird ersichtlich, dass in einer inflammatorischen Umgebung die Balance zwischen Tregs und Th17-Zellen aus dem Gleichgewicht geraten kann [26].

T-Helferzell-ähnliche Tregs

Während der letzten zwei Jahrzehnte war die Plastizität bzw. die Stabilität der regulatorischen T-Zellen Gegenstand der Forschung [21] [198]. Tregs sind keine terminal differenzierte Zelllinie, sondern können unter bestimmten Bedingungen Eigenschaften von Effektorzellen annehmen [21] [22] [143] [192]. Ob diese Differenzierung zu T-Helferzell-ähnlichen Tregs ein Ausdruck von Plastizität oder von Instabilität der Treg-Zelllinie ist, ist noch nicht endgültig geklärt [21] [143] [176].

Tregs können neben FoxP3 auch Transkriptionsfaktoren der Effektor-T-Zell-Subtypen exprimieren und werden dann Th-ähnliche Tregs genannt [22]. Dadurch können sie ihre regulatorische Funktion auf einen speziellen Subtyp lenken, was als funktionelle Plastizität bezeichnet wird [21] [26] [118]. Beispielsweise können sie, durch IL-12 vermittelt, den für Th1-Zellen typischen Transkriptionsfaktor T-bet exprimieren und dadurch speziell Th1-vermittelte Immunantworten kontrollieren [199] [200].

Möglicherweise sind Th-ähnliche Tregs auch an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt [188] [200] [201]. Eine erhöhte Anzahl von IFN γ produzierenden, Th1-ähnlichen Tregs mit reduzierter Suppressionsfunktion wurde bei Patienten mit T1DM und bei Patienten mit MS beschrieben [199] [200]. Th2-ähnliche Tregs, die IL-4 und IL-13 produzierten, konnten in der Haut von Patienten mit Systemischer Sklerose gefunden werden [202]. Bei Psoriasis-Patienten [201] und Patienten mit CED [189] konnten Th17-ähnliche Tregs beschrieben werden, welche sowohl FoxP3 als auch ROR γ t exprimierten, IL-17 produzierten und eine reduzierte Suppressionsfunktion zeigten [203].

Unter bestimmten Bedingungen können Tregs ihre FoxP3-Expression auch verlieren und einen Effektorzell-Phänotyp annehmen [22] [74] [118]. Sie werden dann auch ex-Tregs genannt, da sie keine FoxP3-Expression mehr zeigen, keine Suppressionsfunktion mehr besitzen und inflammatorische Zytokine produzieren [21] [74] [143]. So können sich humane Tregs in Anwesenheit von TGF β und der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β , IL-21 und IL-23 zu Th17-produzierenden Zellen differenzieren [89] [118] [204]. Es wurde auch eine Differenzierung der Tregs hin zu Th1- und Th2-Zellen beschrieben [74] [143]. Dieser Verlust der FoxP3-Expression und damit der regulatorischen Funktion der Tregs muss von der oben beschriebenen funktionellen Plastizität der Tregs unterschieden werden [21].

Eine ausgeglichene Balance zwischen den verschiedenen T-Helferzell-Subtypen ist von enormer Wichtigkeit für die Immunhomöostase [176] [177] [198]. Ein Überwiegen von Th1- und Th17-Zellen kann zu Autoimmunerkrankungen führen [74] [131] [180], ein Überwiegen der Th2-Zellen zu allergischen und atopischen Erkrankungen [69] [131]. Unter einer reduzierten Anzahl oder Funktion der Tregs kann die immunologische Selbsttoleranz leiden, was zu autoimmunen bzw. autoinflammatorischen Erkrankungen führen kann [176] [198] [205]. Ein Überwiegen der Tregs kann jedoch zu Immunsuppression führen und damit eine Suszeptibilität gegenüber Infektionen oder Tumoren zur Folge haben [107] [108]. Daher ist es von großer Bedeutung, die Mechanismen zu verstehen, die die Plastizität der verschiedenen T-Helferzell-Subtypen beeinflussen.

1.1.8 CD8+ T-Zellen und ihre Effektorfunktionen

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) sind die Effektorzellen der CD8+ T-Lymphozyten und für die Beseitigung von viralen und einigen bakteriellen Infektionen sowie Tumorzellen verantwortlich [206] [207]. Dabei wird durch die von DCs gebildeten Zytokine IL-12 und IFN γ sowohl die Differenzierung von CD8+ T-Zellen zu CTLs als auch die Entstehung von Th1-Zellen induziert [1] [59] [65]. Pathogenetisch sind CTLs an der Gewebeschädigung bei manchen Autoimmunkrankheiten beteiligt [208] [209].

Die CTLs erkennen die infizierten Zellen hochspezifisch über die Bindung ihres TCRs an deren MHC-I-Moleküle [206] [210]. Die Bindung wird durch den Co-Rezeptor CD8 und einen Ring aus Integrinen stabilisiert, wodurch eine abgegrenzte „Immun-Synapse“ entsteht [210] [211] [212] [213].

CTLs verfügen über zwei Hauptmechanismen, die zur Apoptose von Zielzellen führen: Die Exkretion von Perforin und Granzymen aus Granula und die Bindung des Fas-Liganden der CTLs an den Todesrezeptor Fas auf den Zielzellen [206] [214].

Perforin und Granzyme sind zytotoxische Proteine, die von den CTLs in Granula gespeichert und bei deren Aktivierung abgegeben werden [210] [214]. Perforin permeabilisiert die Zellmembran der Zielzellen und ermöglicht damit das Eindringen der Granzyme ins Zytoplasma [210] [211]. Granzyme sind Serinproteasen, die Proteine, u.a. Caspasen und BID (engl. BH₃ interacting domain death agonist), ein Mitglied der Bcl-2-Familie spalten und darüber die Apoptose der Zielzelle induzieren [207] [210].

Der Granula-unabhängige und langsamere Mechanismus der Zelltötung ist die Bindung des Fas-Liganden auf CTLs an den Todesrezeptor Fas auf den Zielzellen [206] [213]. Dadurch wird ein Signalweg in Gang gesetzt, über den Kaskaden von Caspasen aktiviert werden, die schließlich zur Apoptose der Zielzelle führen [214] [215].

Neben den beiden oben beschriebenen Mechanismen, die die Apoptose von Zielzellen induzieren, können CD8+ Lymphozyten auch über die Sekretion von Effektorzytokinen immunologische Funktionen wahrzunehmen [65] [77] [216]. Die meisten CTLs sezernieren ein Zytokinprofil, welches dem der Th1-Zellen ähnelt [59] [77]. Wie in den Th1-Zellen ist der Transkriptionsfaktor T-bet aktiv und führt zur IFN γ -Produktion, worüber Makrophagen zur Phagozytose der Pathogene aktiviert werden [1] [77] [217]. Über TNF α führen sie zur Initiierung und Aufrechterhaltung der Inflammation sowie, zusammen mit IFN γ , zur Makrophagen-Aktivierung [217]. Damit unterstützen die CTLs die Th1-gerichtete Immunantwort, die sich gegen Viren und intrazelluläre Bakterien richtet [218]. Daneben wurden auch CD8+ Zellen beschrieben, deren Zytokinexpressionsmuster den Th2- oder Th17-Zellen ähnelt [216] [219]. Im Blut von Kindern mit Asthma bronchiale konnte eine, verglichen mit gesunden Probanden, erhöhte Zahl von IL-4 und IL-13-produzierenden CD8+ T-Lymphozyten beschrieben werden [219]. In Hautläsionen von Patienten mit atopischer Dermatitis fanden sich IL-13-produzierenden CD8+ T-Zellen in erhöhter Zahl [220]. In Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis sowie in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit Psoriasis-Arthritis wurde eine erhöhte Zahl von IL-17-produzierenden CD8+ T-Zellen gefunden [220] [221] [222] [223]. Zudem wurden CD8+ T-Lymphozyten beschrieben, die das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 produzieren und in vitro Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen zeigen [224] [225].

Auch das Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren auf CD8+ T-Zellen ähnelt dem der Th1-Zellen. CXCR3 auf der Oberfläche aktivierter CD8+ Zellen sorgt für eine Migration in die entzündeten Gewebe [73] [77]. Wird CCR5 von Effektor- und Gedächtnis-CD8+ T-Zellen exprimiert, navigiert es diese zu den entzündeten Geweben sowie zu den peripheren lymphatischen Organen, wo die CD4+ T-Zellen mit den DCs interagieren, um eine optimale Aktivierung der CD8+ T-Zellen zu erreichen [226] [227] [228].

Neben den CD4+ Tregs nimmt auch eine kleine, heterogene Subgruppe der CD8+ T-Lymphozyten immunsuppressive Funktionen wahr [224] [229] [230] [231]. Vor über vierzig Jahren wurden erstmals CD8+ regulatorische T-Zellen beschrieben, dennoch sind die Eigenschaften dieser Zellen noch weniger erforscht als die der CD4+ regulatorischen T-Zellen [232]. Die Marker der CD8+ regulatorischen T-Zellen überlappen mit

den Markern der CD4+ Tregs; neben CD25 werden auch FoxP3 und CTLA-4 konstitutiv exprimiert [225] [229] [230] [233]. Zu den Suppressionsmechanismen der CD8+ regulatorischen T-Zellen gehören neben der direkten Lyse von Zielzellen auch zytokinvermittelte und über CTLA-4 vermittelte Mechanismen [231] [232] [234] [225]. So wirken die CD8+ Tregs Autoimmunkrankheiten entgegen, spielen eine Rolle in der immunologischen Selbsttoleranz und ergänzen die immunregulatorische Funktion der CD4+ Tregs [229] [233] [234].

1.1.9 $\gamma\delta$ -T-Zellen

CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten machen zusammen etwa 95 % der T-Zellen im peripheren Blut aus [1] [9] [17]. Sie exprimieren T-Zell-Rezeptoren, die aus α - und β -Ketten bestehen und werden daher als $\alpha\beta$ -T-Zellen bezeichnet [1] [9] [17]. Neben diesen $\alpha\beta$ -T-Zellen gibt es die $\gamma\delta$ -T-Zellen, deren TCR sich aus γ - und δ -Ketten zusammensetzen und die nur eine limitierte Diversität aufweisen [9] [235]. Die Trennung der beiden Zelllinien findet früh im Thymus statt [14] [17]. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen gehören zu den unkonventionellen T-Zellen, da sie MHC-unabhängig von einem breiten Spektrum an Stress-assoziierten Antigenen aktiviert werden können [17] [236]. Während $\gamma\delta$ -T-Zellen bei gesunden Menschen im Blut nur 2-5 % der T-Zellen ausmachen, können sie in epithelialen und mucosalen Geweben wie der Haut und der Schleimhaut von Lunge und Darm in höherer Anzahl vorkommen [235] [237] [238] [239]. Die $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation kann im Rahmen von Infektionen mit Bakterien oder Protozoen stark ansteigen [240] [241].

Sie verfügen über vielfältige, noch nicht vollständig erforschte, immunologische Funktionen, mit denen sie eine Zwischenstellung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem einnehmen [236] [242]. Zu den für die angeborene Immunität typischen Funktionen gehören die frühe Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-17, IFN γ und TNF α bei bakteriellen oder parasitären Infektionen [243] [244] [245] [246] [247] [248] [249] [250]. Ähnlich wie die CTLs und die NK-Zellen können sie über die Sekretion von Perforin und Granzymen sowie über die Interaktion von Liganden mit Todesrezeptoren auf die Zielzellen zytotoxisch wirken [236] [245] [251] [252]. $\gamma\delta$ -T-Zellen können auch als APCs fungieren, indem sie Antigene prozessieren, diese den $\alpha\beta$ -T-Zellen darbieten und so zu deren Aktivierung und Proliferation beitragen [242]. Außerdem sind $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Lage, Gedächtniszellen auszubilden und können ähnlich wie die Tregs immunregulatorische Funktionen wahrnehmen, was für Zellen des erworbenen Immunsystems typisch ist [253] [254].

1.2 Rationale, Zielsetzung und Fragestellung

Für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase ist es essenziell, dass sich proinflammatorische und antiinflammatorische Faktoren die Waage halten [127] [176] [177] [198]. Regulatorische T-Zellen kontrollieren die Immunantworten und spielen eine wichtige Rolle bei der immunologischen Selbsttoleranz [24] [74] [107] [108] [109]. Kommt es zu einer Dysbalance zwischen regulatorischen und proinflammatorischen T-Helferzellen, kann dies zu autoimmunen und autoinflammatorischen Erkrankungen führen [53] [127] [176] [177].

Die initiale Differenzierung der CD4⁺ T-Lymphozyten zu den unterschiedlichen T-Helferzell-Subtypen ist nicht endgültig [12] [62] [65]. Besonders zwischen den Tregs und den Th17-Zellen scheinen enge Verwandtschaftsverhältnisse und eine hohe Plastizität zu bestehen [26] [72] [190] [192]. Für die Differenzierung der T-Helferzellen spielt das Zytokinmilieu eine wesentliche Rolle [26] [101]. So kann ein proinflammatorisches Zytokinmilieu dazu führen, dass Tregs ihre FoxP3-Expression und damit ihre regulatorische Funktion verlieren und sich zu Th17-Zellen differenzieren [89] [118] [204]. Da ein Überwiegen proinflammatorischer T-Helferzellen zur Genese von Autoimmunerkrankungen beitragen kann, ist es von Interesse, ob diese Plastizität auch von proinflammatorischen T-Helferzellen hin zu Tregs existiert [65] [131].

In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass naive CD4⁺CD25⁻ T-Lymphozyten durch Stimulation mit TGF β und IL-2 zu Zellen mit Suppressionsfunktion polarisiert werden können [138] [255] [256] [257] [258]. Die meisten Autoren charakterisierten die naiven CD4⁺CD25⁻ Zellen zusätzlich durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD45RA, andere stimulierten die gesamte CD4⁺CD25⁻ Zellpopulation [138] [255] [256] [257] [258]. CD4⁺CD25⁻ Zellen stellen den überwiegenden Teil der CD4⁺ T-Lymphozyten und damit eine heterogene Zellpopulation dar [257] [259]. In unserer Studie fokussierten wir uns daher auf die Untersuchung der CD4⁺CD25⁻CD127⁻ Zellen, die nur ca. 3-4 % der CD4⁺ T-Lymphozyten ausmachen und damit eine kleinere und definiertere Zellpopulation darstellen [259]. Aufgrund des negativen CD25⁻ und CD127⁻ Status der Zellen gehen wir davon aus, dass es sich bei dieser Zellpopulation um konventionelle ruhende T-Zellen handelt, die nicht an der peripheren Homöostase teilnehmen [32] [258] [259].

Ziel dieser methodischen Arbeit ist es, die Polarisierbarkeit und die Plastizität der CD4+CD25-CD127- T-Lymphozyten in Richtung Treg in einem explorativen in vitro Versuchsansatz an peripheren Lymphozyten von gesunden Probanden mit verschiedenen Zytokin-Stimuli zu untersuchen.

Hauptzielparameter ist die Analyse der Funktionsfähigkeit der polarisierten Tregs durch Untersuchung ihrer Suppressionsfunktion auf autologe Effektor-Leukozyten.

Hierfür wurde zunächst eine Methode zur Isolierung und Funktionsuntersuchung von CD4+CD25+CD127low/- (low = engl. niedrig) Tregs aus menschlichem Blut etabliert. Zudem wurden CD4+CD25-CD127- T-Lymphozyten isoliert, anhand derer die Möglichkeit untersucht wurde, durch ein bestimmtes Zytokinmilieu Tregs zu induzieren. Mittels Suppression-Assays wurde die Funktion der Tregs und der CD4+CD25-CD127- Zellen gemessen. Anschließend wurde der Einfluss eines pro- und eines antiinflammatorischen Zytokinmilieus auf die Suppressions-Funktion untersucht.

Die isolierten Tregs und CD4+CD25-CD127- Zellen wurden zudem bezüglich FoxP3-Expression und Zytokin-Expressionsmuster untersucht. Dies geschah im Rahmen einer durchflusszytometrischen Phänotypisierung der Lymphozyten-Subpopulationen, bei der zusätzlich die Expression verschiedener Zytokine und Chemokinrezeptoren in den isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = engl. peripheral blood mononuclear cells) gemessen wurde.

Die daraus generierten Ergebnisse sollen der Etablierung einer weiteren Untersuchung von Lymphozyten von an T-Zell-medierten Autoimmunkrankheiten leidenden Patienten dienen.

2 Material und Methoden

Im Folgenden sind die verwendeten Geräte und Materialien inklusive der Herstellerangaben aufgelistet. Anschließend findet sich eine ausführliche Beschreibung der durchgeführten experimentellen Methoden.

2.1 Material

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Geräte und Materialien, jeweils mit Produktname, Chargen-Bezeichnung (Ch.-B.) bzw. Katalognummer (Cat.) und Hersteller aufgeführt. Für die verwendeten Antikörper ist zusätzlich jeweils der Fluoreszenzfarbstoff (Synonym: Fluorochrom) und der Klon angegeben. Am Ende des Kapitels finden sich die für die Auswertung verwendeten Softwares.

2.1.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Geräte.

	Produktname	Cat.	Hersteller
Absaugpumpe	Membranabsaugpumpe	AP86	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Durchfluss-zytometer	FACSCanto II Flow Cytometry System		BD Biosciences, New Jersey, USA
	FACS Aria III Cell Sorter		BD Biosciences, New Jersey, USA
Eiswürfelbereiter	AF 103	DL1157	Scotsman Ice, Mailand, I
Inkubator	B 5060 EK-CO2	19476	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Kühlschränke	Liebherr 4-8° C	1000831	Liebherr-International AG, Bulle, CH
	Liebherr Comfort -20° C	A24153	Liebherr-International AG, Bulle, CH
	HERAfreeze™ HFU 586	51019576	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D
	Basic -80°C		
Magnetische Zellseparation (MACS)	VarioMACS™ Separator	130-090-282	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Manueller Zellzähler	Handstückzähler	10126489	Baumer IVO GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen, D
Mehrfachdispenser	Multipette Plus	4981 000.019	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mechanische Pipetten	Research plus 10 µl	492499Z	Eppendorf AG, Hamburg, D
	Research plus 20 µl	2541357	Eppendorf AG, Hamburg, D

	Produktname	Cat.	Hersteller
Mechanische Pipetten	Research plus 100 µl	493057Z	Eppendorf AG, Hamburg, D
	Research plus 200 µl	379067Z	Eppendorf AG, Hamburg, D
	Research plus 1000 µl	494528Z	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mikroskop	Wilovert 30	5610-306-01	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D
Pipettierhilfen	Easypet	3033181	Eppendorf AG, Hamburg, D
	Integra PIPETBOY	101800	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, D
Sterilbank (Laminar Flow Hood)	Gelaire BSB 6A	11031	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, D
Vortex	RetschMixer		A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Waage	Sartorius	CP1245	Denver Instrument, New York, USA
Wasserbad	GFL Typ 1003	10549679	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	ZK13	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Zentrifugen	Rotana/K	19477	A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D
	Universal 32R	1610	A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D
	Biofuge fresco	75005510	Heraeus Instruments, Hanau, D

Abkürzungen: engl fluorescence activated cell sorting (FACS), Katalognummer (Cat.), magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), Mikroliter (µl).

2.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial

Das verwendete Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial.

	Produktname	Cat.	Hersteller
Blutentnahmesystem	S-Monovette NH4-Heparin, 9 ml	02.1064	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
	S-Monovette Serum-Gel, 4,7 ml	03.1524	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
	S-Monovette K3E, 1,8 ml	04.1951	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
	Safety-Multifly-Kanüle 21G	85.1638.200	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D

	Produktname	Cat.	Hersteller
Direktverdränger-Pipettenspitzen	Combitips Plus 50 ml	0030 069.471	Eppendorf AG, Hamburg, D
	Combitips Plus 1,0 ml	0030 069.439	Eppendorf AG, Hamburg, D
Einfrierboxen	Kryoboxen aus Karton	C60W	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Einfrierröhrchen	Kryoröhrchen	10018734	VWR International, Pennsylvania, USA
Entsorgungstüten	Vernichtungsbeutel	VB20	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
FACS-Röhrchen	FACS Round-Bottom, Tubes 5 ml	55.476.005	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Filter	EASYstrainer™ 70 µm, für 50 ml Röhrchen	542 070	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Filter-Röhrchen	BD Falcon® 12 x 75 mm Tube with Cell Strainer Cap (35 µm nylon mesh)	352235	Corning Life Sciences, Tewksbury, USA
Gefrierbehälter	Cryo Freezing Container	51000001	Nalgene, New York, USA
Gestelle für Zentrifugenröhrchen	MINI-Rack	MINI	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
	MIDI-Rack	MIDI	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Glaspipetten	Cellstar Serological Pipette 10 ml	607180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
	Cellstar Serological Pipette 5 ml	606180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Handschuhe	Peha-soft nitrile Handschuhe	942206	P. Hartmann AG, Heidenheim, D
Hautdesinfektionsmittel	Cutasept F	976802	BODE Chemie GmbH, Hamburg, D
Laborfolie	Laboratory Film, Parafilm	60631	American National Can, Chicago, USA

	Produktname	Cat.	Hersteller
MACS Separationssäulen	LS Columns	130-042-401	MACS Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Pipettenspitzen	Biosphere Filter tips 10 µl	70.1130.210	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
	Biosphere Filter tips 200 µl	70.760.211	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
	Biosphere Filter tips 1000 µl	70.762.211	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Reagiergefäße	Reagiergefäße, 1,5 ml, PP	72.690.001	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
	Safe-Lock Tubes 0,5 ml	0030121023	Eppendorf AG, Hamburg, D
Reaktionsgefäßhalter	Reaktionsgefäßhalter	RGFH	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Schraubröhrchen	Mikro-Schraubröhre, 1,5 ml, PP	72.692.005	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Zellkulturplatten	FALCON®, 96-Well, U-Bottom	351177	Corning Life Sciences, Tewksbury, USA
	Tissue Culture Plates, 96 Wells, U-Bottom	734-2328	VWR International, Pennsylvania, USA
	Tissue Culture Plates, 48 Wells, flat bottom	734-2326	VWR International, Pennsylvania, USA
Zentrifugenröhrchen (Tubes)	Cellstar, 15 ml	188271	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
	Cellstar, 50 ml	227261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

Abkürzungen: engl. fluorescence activated cell sorting (FACS), Katalognummer (Cat.), magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), Mikroliter (µl), Mikrometer (µm), Milliliter (ml), Millimeter (mm).

2.1.3 Chemikalien, Puffer, Medien, Lösungen und Kits

Die verwendeten Chemikalien, Lösungen, Puffer und Medien sind in Tabelle 5 aufgelistet. In Tabelle 6 finden sich die verwendeten gebrauchsfertigen Lösungen und in Tabelle 7 die gebrauchsfertigen Kits.

Tabelle 5: Chemikalien, Lösungen, Puffer und Medien.

	Produktname	Cat. /Ch.-B.	Hersteller
Alkohol	2-Propanol	Cat.: 20839.366 Ch.-B.: 17B134020	VWR International, Pennsylvania, USA
	Ethanol 70 % vergällt	Cat.: T913.3 Ch.-B.: 268275078	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Fertig- lösungen	Isotonische Kochsalzlösung	Cat.: 6096595.00.00	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
	Aqua ad iniectabilia (Aqua dest.)	Cat.: 114558061	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Feststoffe	Ammoniumchlorid	Cat.: 39H013015	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
	Kaliumbicarbonat	Cat.: 71K0121	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
	Natriumazid	Cat.: 106H2540	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
	Trypanblau	Cat.: 1.11732	Merck, Darmstadt, D
Medien	FBS Superior	Cat.: S0615	Biochrom GmbH, Berlin, D
	FicoLite-H (Human)	Cat.: GTF1511KYA	Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, D
	Penicillin Streptomycin	Cat.: A2213	Biochrom GmbH, Berlin, D
	RPMI 1640 BioWhittaker® Lonza with L-Glutamine	Cat.: BE12-702F Ch.-B.: 6MB165	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
	Puffer	Albumin aus Rinderserum (BSA)	Cat.: A9647 Ch.-B.: SLBR0418V
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Cat.: A994.2 Ch.-B.: 426247744	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)		Cat.: E5134	Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA
Phosphate-Buffered-Saline (PBS) Tablets		Cat.: 18912-014 Ch.-B.: 1924285	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA

Abkürzungen: Albumin aus Rinderserum (BSA = engl. bovine serum albumin), Chargen-Bezeichnung (Ch.-B.), Deutschland (D), destilliertes Wasser (Aqua dest. = lateinisch Aqua destillata), Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), fötales Kälberserum (FBS = engl. fetal bovine serum), Katalognummer (Cat.), Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS = engl. Phosphate-Buffered-Saline), Roswell Park Memorial Institute (RPMI).

Tabelle 6: Gebrauchsfertige Lösungen.

Gebrauchsfertige Lösung	Zusammensetzung
Einfriermedium	20 % FBS + 10 % DMSO in RPMI
Erythrozyten-Lysepuffer	8,26 g Ammoniumchlorid + 1 g Kaliumbicarbonat + 0,037 g EDTA in 1 l Aqua dest.
FACS-Puffer	0,5 % BSA + 0,01 % Natriumazid in PBS
MACS-Puffer	0,5 % BSA + 2 mM EDTA in PBS
Nährmedium	1 % Penicillin Streptomycin + 10 % FBS in RPMI 1640
PBS-Puffer	1 Tablette in 500 ml Aqua dest.
Trypanblau	0,5 % Trypanblau in 50 ml PBS

Abkürzungen: Albumin aus Rinderserum (BSA = engl. bovine serum albumin), Chargen-Bezeichnung (Ch.-B.), destilliertes Wasser (Aqua dest. = lateinisch Aqua destillata), Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), engl. fluorescence activated cell sorting (FACS), fötales Kälberserum (FBS = engl. fetal bovine serum), Gramm (g), Katalognummer (Cat.), magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), millimolar (mM), Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS = engl. Phosphate-Buffered-Saline), Roswell Park Memorial Institute (RPMI).

Tabelle 7: Gebrauchsfertige Kits.

Handelsname und Zusammensetzung	Cat. /Ch.-B.	Hersteller
CD4+ T Cell Isolation Kit, human - CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail - CD4+ T Cell MicroBead Cocktail	Cat.: 130-096-533 Ch.-B.: 5170518126	MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CFSE Cell Division Tracker Kit - CFSE - DMSO	Cat.: 423801	BioLegend, San Diego, USA
Transcription Factor Buffer Set - Fix/Perm Buffer - Diluent Buffer - Perm/Wash Buffer	Cat.: 562574 Cat.: 519008100 Ch.-B.: 5352537 Cat.: 519008101 Ch.-B.: 5328659 Cat.: 519008102 Ch.-B.: 5328666	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit - Zombie Aqua™ Dye - DMSO	Cat.: 423101 Ch.-B.: B201806	BioLegend, San Diego, USA

Abkürzungen: Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE), Chargen-Bezeichnung (Ch.-B.), engl. cluster of differentiation (CD), Dimethylsulfoxid (DMSO), Katalognummer (Cat.), positiv (+).

2.1.4 Antikörper

Die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Antikörper.

Antikörper gegen	Farbe	Produktname	Clone	Cat.	Ch.-B.	Hersteller
CCR5 (CD195)	APC-Cy7	APC-Cy TM 7 Mouse Anti-Human CD195	2D7/CCR5	557755	2237519	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CCR6	PerCP-Cy 5.5	PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD196 (CCR6) Antibody	G034E3	353406	B205287	BioLegend, San Diego, USA
CCR7	APC-Cy7	APC/Cyanine7 anti-human CD197 (CCR7) Antibody	G043H7	353212	B179025	BioLegend, San Diego, USA
CD127	APC-Cy7	APC/Cyanine7 anti-human CD127 (IL-7R α) Antibody	A019D5	351348	B221188	BioLegend, San Diego, USA
CD127	BV 421	Brilliant Violet 421 TM anti-human CD127 (IL-7R α) Antibody	A019D5	351310	B200827	BioLegend, San Diego, USA
CD161	APC	APC anti-human CD161 Antibody	HP-3G10	339912	B165429	BioLegend, San Diego, USA
CD19	APC	APC anti-human CD19 Antibody	H1B19	302212	B164218	BioLegend, San Diego, USA
CD25	PE-Cy7	PE/Cy7 anti-human CD25 Antibody	BC96	302612	B172656	BioLegend, San Diego, USA
CD27	PE-Cy7	PE/Cy7 anti-mouse/rat/human CD27 Antibody	LG.3A10	124216	B185457	BioLegend, San Diego, USA
CD4	APC	APC anti-human CD4 Antibody	OKT4	317416	B187793	BioLegend, San Diego, USA
CD4	APC Fire 750	APC/Fire TM 750 anti-human CD4 Antibody	SK3	344637	B220169	BioLegend, San Diego, USA
CD4	PE	PE anti-human CD4 Antibody	OKT4	317410	B175512	BioLegend, San Diego, USA
CD45RA	FITC	FITC anti-human	HI100	304106	B164007	BioLegend, San

Antikörper gegen	Farbe	Produktname	Clone	Cat.	Ch.-B.	Hersteller
		CD45RA Antibody				Diego, USA
CD8	APC-H7	APC-H7 Mouse anti-human CD8	SK1	560179	5163821	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD8	PE	PE anti-human CD8 Antibody	SK1	344706	B140247	BioLegend, San Diego, USA
CD8	PE-Cy7	PE/Cy7 anti-human CD8 Antibody	SK1	344712	B196538	BioLegend, San Diego, USA
CD8	PerCP-Cy 5.5	PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD8 Antibody	SK1	344710	200532	BioLegend, San Diego, USA
CXCR3	PE	PE anti-human CD183 (CXCR3) Antibody	G025H7	353706	B197626	BioLegend, San Diego, USA
FoxP3	PerCP-Cy 5.5	PerCP-Cy TM 5.5 Mouse Anti-Human FoxP3	236A/E7	561493	4181986	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
IFN γ	FITC	FITC anti-human IFN- γ Antibody	4S.B3	502506	B179400	BioLegend, San Diego, USA
IFN γ	PE	IFN- γ Detection Antibody (PE), human		130-054-201	5150112-265	MACS Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
IL-10	APC	APC anti-human IL-10 Antibody	JES3-19F1	506807	B193895	BioLegend, San Diego, USA
IL-17	BV 421	Brilliant Violet 421 TM anti-human IL-17A Antibody	BL168	512322	B206593	BioLegend, San Diego, USA
TCR $\gamma\delta$	FITC	FITC Mouse Anti-Human TCR $\gamma\delta$	11F2	347903		BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Abkürzungen: Allophycocyanin (APC), engl. Brilliant Violet (BV), CC-Chemokinrezeptor (CCR), Char- gen-Bezeichnung (Ch.-B.), engl. cluster of differentiation (CD), CXC-Chemokinrezeptor (CXCR), Cyanin (Cy), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), Interferon (IFN), Interleukin (IL), Katalognummer (Cat.), magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), Phycoerythrin (PE), T-Zell-Rezeptor (TCR).

2.1.5 Zytokine/ Stimuli

Die verwendeten Zytokine sind in Tabelle 9 und die Stimuli in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 9: Zytokine.

Zytokin	Produktname	Cat.	Ch.-B.	Hersteller
IL-1β	Recombinant Human IL-1 β	579404	B223360	BioLegend, San Diego, USA
IL-2	Recombinant Human IL-2	589104	B216786	BioLegend, San Diego, USA
IL-23	Recombinant Human IL-23	574102	B215828	BioLegend, San Diego, USA
IL-6	Recombinant Human IL-6	570804	B226168	BioLegend, San Diego, USA
TGFβ	Recombinant Human TGF β 1	580704	B217419	BioLegend, San Diego, USA

Abkürzungen: Chargen-Bezeichnung (Ch.-B.), Interleukin (IL), Katalognummer (Cat.), engl. transforming growth factor (TGF).

Tabelle 10: Stimuli.

Stimulus	Produktname	Cat. /Ch.-B.	Hersteller
Anti-CD3	LEAF™ Purified anti-human CD3, Clone: OKT3	Cat.: 317315 Ch.-B.: B225107	BioLegend, San Diego, USA
BFA	Brefeldin A (BFA) in Ethanol	Cat.: B6542-5MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ionomycin	Ionomycin	Cat.: I9657-1MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in DMSO + RPMI	Cat.: P8139-1MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Abkürzungen: Brefeldin A (BFA), Chargen-Bezeichnung (Ch.-B.), engl. cluster of differentiation (CD), Dimethylsulfoxid (DMSO), Katalognummer (Cat.), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Roswell Park Memorial Institute (RPMI).

2.1.6 Software

Für die Auswertung der Versuche wurde die in Tabelle 11 aufgelistete Software verwendet.

Tabelle 11: Software.

	Software	Version	Hersteller
Durchflusszytometrie	BD FACS Diva Software	Version 6.1.3, Firmware Version 1.47 (BD FACSCanto II)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Statistik und Abbildungen	GraphPad Prism	Version 5.04	GraphPad Software, San Diego, USA

Abkürzungen: engl. fluorescence activated cell sorting (FACS).

2.2 Methoden

2.2.1 Ethische Voraussetzungen

Diese nicht-interventionelle, laborexperimentelle, retrospektive Querschnittsstudie wurde von der Ethikkommission bei der Julius-Maximilians-Universität Würzburg genehmigt (Ethikvotum 239/10) und nach den Kriterien der Deklaration von Helsinki 2013 [260] durchgeführt. Alle Probanden wurden vor der Probengewinnung in einem ausführlichen Gespräch und mithilfe eines Probandeninformationsblattes über die Studieninhalte aufgeklärt und unterzeichneten die Einverständniserklärung, welche sie in Kopie ausgehändigt bekommen hatten.

2.2.2 Zeitlicher Ablauf der durchgeführten Versuche

Für die Versuche wurden zunächst mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) mittels Ficoll-Dichtezentrifugation aus dem Vollblut gesunder Probanden gewonnen.

Im ersten Teil der Studie erfolgte eine umfassende, durchflusszytometrische Phänotypisierung der isolierten PBMCs bezüglich ihrer Oberflächenmoleküle, ihrer Zytokinproduktion und der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3.

Der zweite Teil der Studie bestand aus einer Funktionsuntersuchung und Polarisation von Tregs (CD4+CD25+CD127low/-) und CD4+CD25-CD127- Zellen. Hierfür erfolgte im ersten Schritt die Isolierung von CD4+ T-Lymphozyten mittels magnetischer Zellseparation (MACS® Cell Separation der Firma Miltenyi Biotec). Die CD4+ Zellen wurden in einem weiteren Isolationschritt mittels durchflusszytometrischem Zell-Sorting (FACS Aria III der Firma BD Biosciences) in CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen unterteilt. Im Anschluss folgte die Funktionsuntersuchung der beiden isolierten Zellpopulationen mittels Suppression-Assays vor und nach Stimulation mit verschiedenen Zytokin-Cocktails.

In Abbildung 5 ist der Aufbau der durchgeführten Versuche schematisch dargestellt.

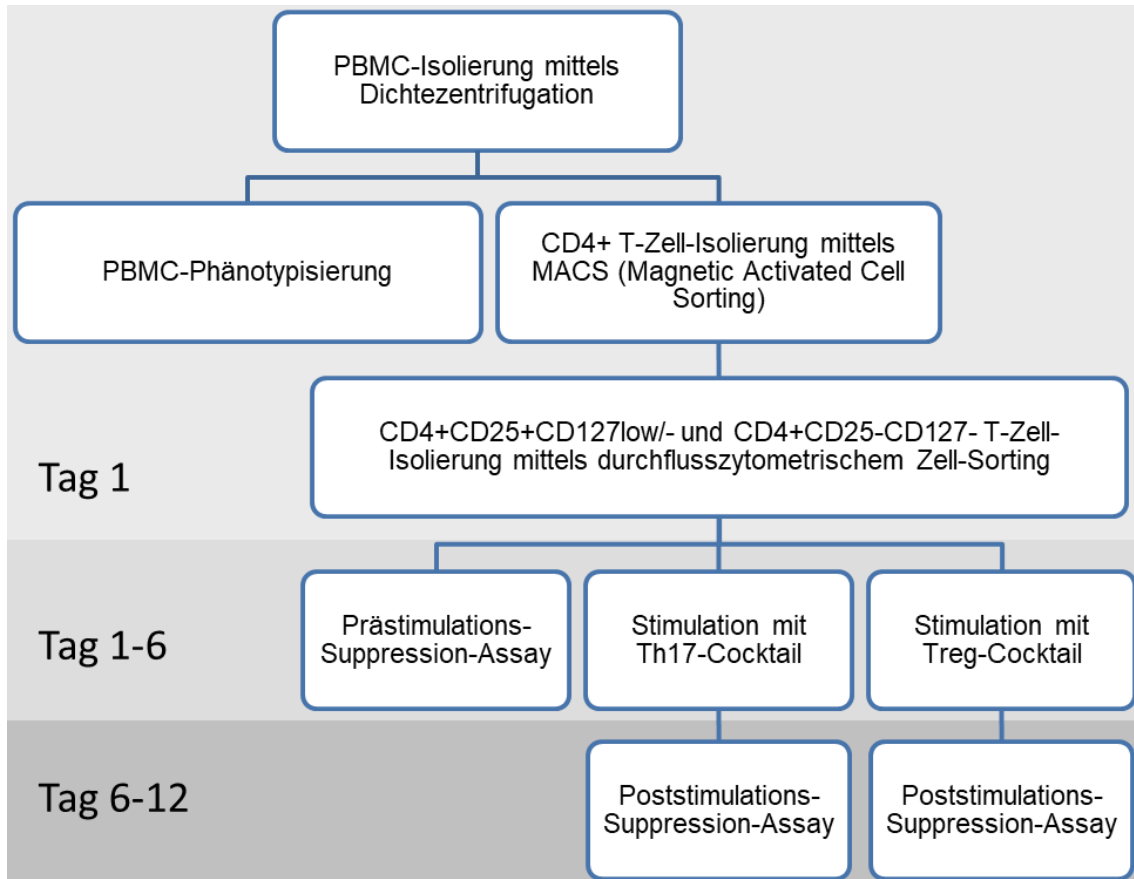


Abbildung 5: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der durchgeführten Versuche.

Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = engl. peripheral blood mononuclear cells), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), regulatorische T-Zelle (Treg), T-Helferzelle (Th).

2.2.3 Probanden, Ein- und Ausschlusskriterien

Es wurden Vollblutproben von sechs weiblichen und fünf männlichen gesunden Erwachsenen im Alter zwischen 23 und 25 Jahren gewonnen. In Tabelle 12 sind Anzahl, Alter und Geschlecht der einzelnen Probanden aufgeführt. Die PBMC-Phänotypisierung erfolgte mit den Zellen aller elf Probanden. Mit den Zellen von sechs Probanden wurde zusätzlich die Polarisation und Funktionsuntersuchung der regulatorischen T-Zellen und der CD4+CD25-CD127- Zellen mittels Suppression-Assays durchgeführt.

Tabelle 12: Charakterisierung der Studienpopulation.

	PBMC-Phänotypisierung	Polarisierung und Funktionsuntersuchung von Tregs und CD4+CD25-CD127- Zellen
Anzahl der Probanden (n)	11	6
Anzahl männlicher Probanden absolut (n) in Prozent der gesamten Probanden	5 45,5 %	5 83,3 %
Anzahl weiblicher Probanden absolut (n) in Prozent der gesamten Probanden	6 54,5 %	1 16,7 %
Alter bei Studieneinschluss in Jahren (Mean ± SD)	23,6 ± 0,8	23,7 ± 1,0

Abkürzungen: Mittelwert (engl. Mean), mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = engl. peripheral blood mononuclear cells), Anzahl (n), regulatorische T-Zellen (Tregs), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).

Da die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen altersabhängig ist [41], wurde eine möglichst altersgleiche Studienpopulation gewählt. Chronische immunologische und nichtimmunologische Erkrankungen, maligne Erkrankungen sowie Infektionen und Impfungen in den vergangenen vier Wochen wurden als Ausschlusskriterium für die Studienteilnahme definiert. Auch die Einnahme von Medikamenten mit der Ausnahme oraler Kontrazeptiva stellte ein Ausschlusskriterium dar. Da das Rauchen von Zigaretten den PBMC-Phänotyp beeinflussen kann [261], wurden zudem Raucher von der Studie ausgeschlossen. Von allen Probanden wurde ein Differenzialblutbild angefertigt und auf Abweichungen von den Normwerten überprüft. Die gesamten Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie.

Einschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> - Gesunde Erwachsene zwischen 20 und 30 Jahren - Weibliches und männliches Geschlecht - Normwertiges Differenzialblutbild
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> - Malignome - Transplantationen - Genetische Syndrome (DiGeorge-Syndrom, Trisomie 21 u.a.) - Immundefekte - Klinisch relevante Infektionen in den letzten vier Wochen - Impfungen in den letzten vier Wochen - Schwere, behandlungsbedürftige Allergien - Autoimmun-bedingte entzündlich-rheumatische Erkrankungen - Jegliche chronischen Erkrankungen - Medikamenteneinnahme (Ausnahme: orale Kontrazeption) - Nikotinkonsum

2.2.4 Gewinnung von PBMCs aus dem Blut gesunder Probanden

2.2.4.1 Blutentnahme und Weiterverarbeitung der Blutproben

Für die Isolierung der PBMCs wurden von den Probanden 50 Milliliter (ml) venöses Vollblut in Heparin-Röhrchen entnommen. Zusätzlich wurde ein Serum-Röhrchen (2 ml) und ein EDTA-Röhrchen (1 ml) (EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure) entnommen. Das Serum der Probanden wurde bei -21°C asserviert. Aus dem EDTA-Röhrchen wurde ein Blutbild mit Leukozytendifferenzierung angefertigt und dieses auf Auffälligkeiten überprüft.

2.2.4.2 Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Isolierung der PBMCs wurde die Dichtegradientenzentrifugation angewandt. Hierbei werden die Zellbestandteile des venösen Vollblutes nach ihrer spezifischen Dichte sortiert [262] [263]. Dies wird über die Auftrennung anhand ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit unter dem Einfluss der Zentrifugalkraft erreicht [262]. Die Ficoll-Lösung, die ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer beinhaltet, dient dabei als Trennmedium [264]. Blutbestandteile mit hoher Dichte wie Erythrozyten und Granulozyten sammeln sich unterhalb der Ficoll-Lösung [262] [265] [266]. Die PBMCs, die eine ähnliche Dichte wie die Ficoll-Lösung aufweisen, ordnen sich direkt über dem Trennmedium ringförmig an und werden im Englischen als „buffy coat“ bezeichnet [262] [265] [266]. Bestandteile mit geringerer Dichte, wie das Blutplasma, sammeln sich oberhalb der Ficoll-Lösung [262] [265].

Zunächst wurden in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen (engl. Tubes) je 12,5 ml Ficoll-Lösung vorgelegt. Anschließend wurden je 25 ml heparinisiertes Vollblut des Probanden vorsichtig aus einer Einmalpipette aufgeschichtet. Somit ergab sich ein Verhältnis von 1/3 Ficoll-Lösung zu 2/3 Blut (Abbildung 6 a). Im Anschluss wurde die Probe 25 Minuten lang bei 1700 Umdrehungen pro Minute (rpm = engl. revolutions per minute) ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation lagen, wie in Abbildung 6 b dargestellt, von oben nach unten folgende Schichten vor: Plasma, PBMCs, Ficoll-Lösung, Granulozyten und Erythrozyten.

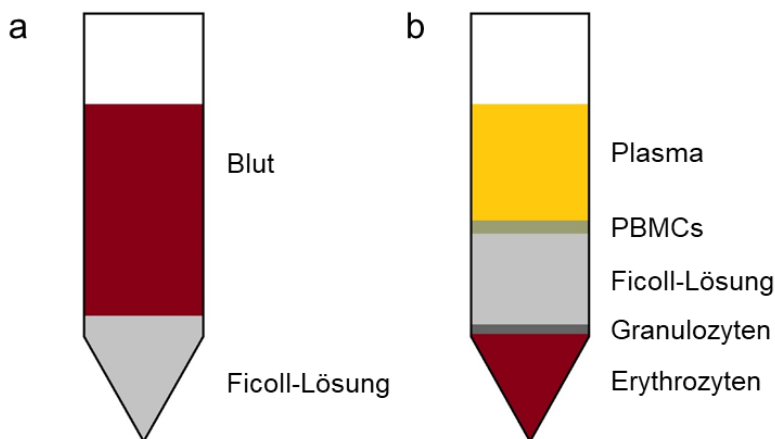


Abbildung 6: Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMCs (modifiziert nach [266]).

Abbildung 6 a zeigt die Ficoll-Vollblut-Schichtung vor der Zentrifugation. In Abbildung 6 b sind die nach ihrer Dichte aufgetrennten Blutbestandteile nach der Zentrifugation zu sehen. *Abkürzungen: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = engl. peripheral blood mononuclear cells).*

Anschließend wurde der Ring aus PBMCs mit einer Glaspipette vorsichtig abgesaugt und in ein neues 50 ml-fassendes Tube transferiert. Dieses wurde auf 50 ml mit 0,9-prozentiger Natriumchlorid-Lösung aufgefüllt und anschließend 10 Minuten lang bei 1700 rpm zentrifugiert, um die Rückstände der Ficoll-Lösung zu entfernen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert, um eventuell (evtl.) vorhandene Erythrozyten zu eliminieren. Die Lösung wurde 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und nach Ablauf der Zeit wurden 10 ml Nährmedium (1 % Penicillin Streptomycin + 10 % FBS (engl. fetal bovine serum = fötales Kälberserum) in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640) hinzugegeben. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 1500 rpm und im Anschluss das Absaugen des Überstandes. Das Pellet wurde nun in 5 ml Nährmedium resuspendiert.

2.2.4.3 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Zellzählung wurden in einem Reagiergefäß 10 Mikroliter (μl) der Zellsuspension mit 90 μl Trypanblau gemischt. 10 μl dieser Zellsuspension wurden nun in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen werden unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Trypanblau wird von Zellen mit intakter Zellmembran nicht aufgenommen, daher stellen sich vitale Zellen als nicht gefärbte rundliche Strukturen vor einem blauen Hintergrund dar [267]. Es wurden zwei gegenüberliegende Großquadrate der Zählkammer ausgezählt, deren Mittelwert gebildet und die Zellzahl anhand folgender Formel bestimmt:

$$\begin{aligned} & \text{Gezählte Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen der Probe [ml]} \\ & = \text{Gesamte Zellzahl der Probe} \end{aligned}$$

Dieses Verfahren wurde bei allen anderen Zählritten in dieser Studie verwendet. Durch die beschriebene Methode konnten ca. $1\text{-}2 \times 10^6$ PBMCs pro ml Blut gewonnen werden, was $50\text{-}100 \times 10^6$ PBMCs pro Proband entspricht.

2.2.4.4 Kryokonservierung

Die isolierten PBMCs wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, damit sie längerfristig gelagert werden und zu einem anderen Zeitpunkt für die folgenden Versuche wieder aufgetaut werden konnten.

Zunächst wurden die sich in 5 ml Nährmedium befindenden PBMCs erneut zentrifugiert (5 Minuten, 1500 rpm) und der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml Einfriermedium je 5×10^6 Zellen aufgenommen und es wurde jeweils 1 ml der Suspension in ein Einfrier Röhrchen pipettiert. Das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein organisches Lösungsmittel, welches bei der Kryokonservierung von Zellen als eine Art Gefrierschutzmittel dient, indem es die Bildung von Eiskristallen verhindert [268] [269]. Allerdings ist es in flüssigem Zustand zytotoxisch und kann zur Verminderung der Zellzahl der Proben führen [270]. Deshalb wurde darauf geachtet, die Zellen nur sehr kurz dem flüssigen Einfriermedium auszusetzen.

Die Einfrier Röhrchen wurden in einem Gefrierbehälter für drei Tage bei -80°C eingefroren. Im Gefrierbehälter wurden die Tubes von 2-Propanol umspült, was für einen graduellen Einfrierprozess sorgte [271]. Nach Ablauf der drei Tage wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff mit einer Temperatur von -197°C überführt.

2.2.5 PBMC-Phänotypisierung

Zunächst erfolgte die durchflusszytometrische Analyse des PBMC-Phänotyps bei den elf an der Studie teilnehmenden gesunden Probanden mittels Immunfluoreszenzfärbung. Dafür wurden an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper gegen Oberflächenantigene sowie gegen intrazelluläre Zytokine und den Transkriptionsfaktor FoxP3 verwendet. Die Zellen wurden in zwei Inkubationsschritten zunächst mit den extrazellulären Antikörpern und darauffolgend mit den intrazellulären Antikörpern markiert. Anschließend wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen vorgenommen.

2.2.5.1 Durchflusszytometrie – Hintergrund

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das in der Immunologie und Hämatologie routinemäßig zur Phänotypisierung einzelner Zellen verwendet wird [272]. Hierbei werden verschiedene physikalische Eigenschaften von Partikeln oder Zellen gemessen, während diese in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen Lichtstrahl fließen [273]. Gemessen werden zum einen die Brechung des einstrahlenden Laserlichtes und zum anderen die emittierte Fluoreszenz der Zellen [274] [275]. Faktoren wie Größe und Körnung der Zelle beeinflussen die Brechung des einstrahlenden Lichtes [274]. Mit fluoreszierenden Antikörpern können bestimmte Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Zellbestandteile markiert werden, anhand derer die untersuchte Probe in Subpopulationen unterteilt werden kann [275].

Ein Durchflusszytometer besteht aus drei Systemen: Einem Flüssigkeitssystem, in welchem die Zellen transportiert werden, einem optischen System, das aus Lasern, optischen Filtern und Detektoren besteht und einem elektronischen System, welches die Lichtsignale in elektronische Signale überführt [263] [273] [274]. Abbildung 7 gibt einen Überblick über den technischen Ablauf der Durchflusszytometrie.

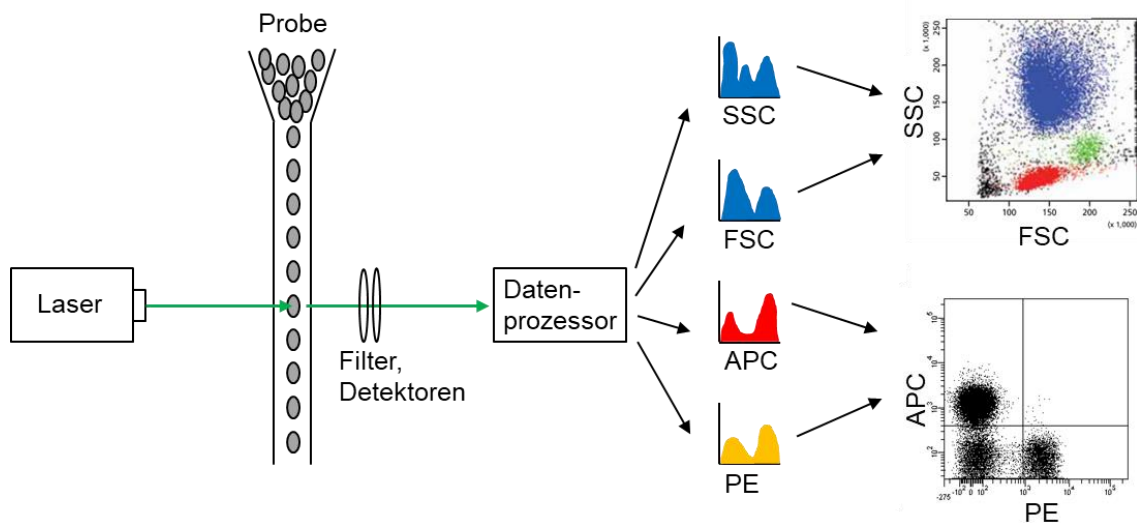


Abbildung 7: Technischer Ablauf der Durchflusszytometrie (modifiziert nach [267]).

Zellen der Probe fließen einzeln durch einen von einem Laser erzeugten Lichtstrahl. Die dabei entstehenden Streulichtsignale werden in elektrische Impulse umgewandelt, die von einem Computer verarbeitet und anschließend graphisch dargestellt werden. Werden die Zellen vor der Messung mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert, können durch Detektion der emittierten Fluoreszenz die Zellen weiter charakterisiert werden. *Abkürzungen: Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE), Seitwärtsstreuung (SSC = engl. side-scattered light), Vorwärtsstreuung (FSC = engl. forward-scattered light).*

Die Lichtbrechung ist abhängig von der Zellgröße und der inneren Komplexität der Zelle [273]. Weiterhin wirken sich Zellmembran, Zellkern, Zellorganellen und Speichergranula auf die Lichtbrechung aus [273]. Man unterscheidet zwischen Vorwärtsstreuung (FSC = engl. Forward-scattered light) und Seitwärtsstreuung (SSC = engl. Side-scattered light) [273] [274]. Das Vorwärtsstreuung ist proportional zur Zellgröße und wird in der Achse des einfallenden Laserlichtes von einem Detektor registriert [273] [274]. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die Größe der Zelle schließen und z.B. größere Monozyten von kleineren Lymphozyten unterscheiden [1]. Seitwärtsstreuung ist proportional zur inneren Komplexität der Zelle bzw. zu ihrer Körnung und wird im 90°-Winkel zum einfallenden Laserlichtstrahl detektiert [274]. Neutrophile Granulozyten erzeugen beispielsweise aufgrund ihrer intrazellulären Granula, verglichen mit Lymphozyten, ein erhöhtes Seitwärtsstreuung [1]. Indem Vorwärtsstreuung und Seitwärtsstreuung gegeneinander aufgetragen werden, lassen sich die einzelnen Subpopulationen der gemessenen PBMCs unterscheiden und für die weitere Analyse die Lymphozyten selektionieren [273] [275] (s. Abbildung 8).

Fluoreszenz ist die spontane Emission von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie [273]. Beim FACS (engl.

fluorescence-activated cell sorting), einer Form der Durchflusszytometrie, macht man sich Fluoreszenz zu Nutze [273] [276]. Bei der Immunphänotypisierung von Leukozyten können Zellen, durch Verwendung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, anhand ihrer Oberflächenantigene oder intrazellulärer Moleküle in Subpopulationen unterteilt werden [274]. Mittels Vitalitätsfarbstoffen werden tote von lebendigen Zellen unterschieden und für Proliferationsversuche können Zellen mit Proliferationsfarbstoffen wie Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE) gefärbt werden [274]. Wird ein Fluoreszenzfarbstoff mit Licht charakteristischer Wellenlängen bestrahlt, absorbiert er Lichtenergie [273] [276]. Durch diese wird ein Elektron des Fluoreszenzfarbstoffes in einen höheren Energiezustand versetzt [273] [276]. Beim Zurückfallen des angeregten Elektrons in seinen Grundzustand wird die dabei abgegebene Energie als Lichtenergie emittiert [276]. Dieser Prozess wird vom Durchflusszytometer über verschiedene Filter und Detektoren gemessen und von der Software als Ereignis in Form von Dot Plots (engl. Streudiagramme) aufgezeichnet [273]. Jeder Fluoreszenzfarbstoff hat, abhängig von den aufgenommenen bzw. abgegebenen Wellenlängen, ein charakteristisches Absorptionsspektrum und Emissionsspektrum [276].

Bei Verwendung des FACSCanto II der Firma BD Biosciences können gleichzeitig acht verschiedene, Fluorochrom-gekoppelte Antikörper detektiert werden [277]. Durch Kombination verschiedener Antikörper in unterschiedlichen Proben kann der Phänotyp einer Zellpopulation genauer bestimmt werden und es können Aussagen über bestimmte Subpopulationen getroffen werden [275]. Die Zellen werden nach der Messung verworfen und stehen nicht mehr für weitere Versuche zur Verfügung [273].

Mit dem Zell-Sorter FACS Aria III der Firma BD Biosciences können die Zellen anhand ihrer Fluorochrom-markierten Antigene nicht nur detektiert, sondern auch anhand ihrer gefärbten Oberflächenmoleküle sortiert und in unterschiedlichen Röhren aufgefangen werden [278]. So können bestimmte reine Zellpopulationen isoliert werden und stehen für die folgenden Versuche zur Verfügung [274].

Die Analyse der mittels Durchflusszytometrie erhobenen Daten erfolgt durch die graphische Selektion von Subpopulationen in Koordinatensystemen, dem sog. Gating [273] [274]. Hierbei wird zunächst auf der X-Achse das Vorwärtsstreulicht dem Seitwärtsstreulicht auf der Y-Achse gegenübergestellt, sodass im entstehenden Dot Plot die Zellen anhand ihrer Größe und inneren Komplexität, wie in Abbildung 8 dargestellt, aufgetragen werden [273]. Hierbei entspricht ein Punkt im Dot Plot einer gemessenen Zelle [273].

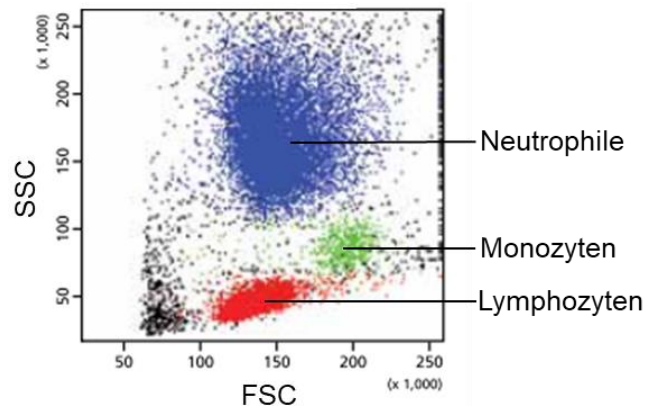


Abbildung 8 Unterscheidung der Subpopulationen der PBMCs anhand ihrer Größe und inneren Komplexität (modifiziert nach [277]).

Durch die Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes können die PBMCs nach ihrer Größe und inneren Komplexität unterschieden werden. Jeder Punkt im Dot Plot steht für eine gemessene Zelle. Verglichen mit Lymphozyten, erzeugen Monozyten aufgrund ihrer Größe ein vermehrtes Vorwärtsstreulicht und neutrophile Granulozyten aufgrund ihrer zytoplasmatischen Granula ein vermehrtes Seitwärtsstreulicht. *Abkürzungen: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = engl. peripheral blood mononuclear cells), Seitwärtsstreulicht (SSC = engl. side-scattered light), Vorwärtsstreulicht (FSC = engl. forward-scattered light).*

Eine Zellpopulation wird selektioniert, in dem ein Gate (engl. gate = Gatter) um die Zellpopulation gezeichnet wird [273]. Diese selektionierte Zellpopulation kann im Folgenden weiter analysiert werden, indem die gemessenen Fluoreszenzfarbstoffe, die an Antikörper gekoppelt sind, in einem Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen werden [273]. In Abbildung 9 ist die Lymphozyten-Population dargestellt, die anhand ihrer Fluorochrom-gekoppelten Antikörper PE anti-human CD8 und APC anti-human CD4 bezüglich ihrer Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 analysiert wurde. So können CD4⁺ T-Lymphozyten von CD8⁺ T-Lymphozyten unterschieden und durch Gating selektioniert werden. Nachfolgend können an den Zellpopulationen weitere Analysen bezüglich ihrer Oberflächenmarker, Transkriptionsfaktoren und Zytokinexpressionsmuster durchgeführt werden.

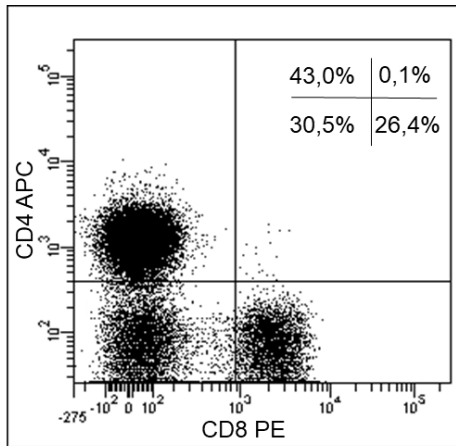


Abbildung 9: Gating Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenmoleküle CD4 und CD8.

Auf der X-Achse ist der mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE markierte Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD8 aufgetragen, auf der Y-Achse der mit dem Fluoreszenzfarbstoff APC markierte Antikörper gegen CD4. Die Prozentwerte stehen für den Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten an der gesamten Zellpopulation. Im dargestellten Dot Plot eines exemplarischen Probanden handelte es sich bei 43,0 % der Lymphozyten um CD4+ T-Lymphozyten und bei 26,4 % um CD8+ T-Lymphozyten. *Abkürzungen: Allophycocyanin (APC), engl. cluster of differentiation (CD), Phycoerythrin (PE).*

2.2.5.2 Auftauprozess

Zur Vorbereitung des Auftauprozesses wurde je Proband ein 50 ml fassendes Tube mit 10 ml Nährmedium befüllt und im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Für die PBMC-Phänotypisierung wurde ein Einfriereröhrchen mit 5×10^6 Zellen aus dem Stickstofftank entnommen. Es wurde in einer Styroporbox mit Eis gelagert und unverzüglich ins Labor transportiert. Hier wurde es schnellstmöglich durch Schwenken im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Das Einfriermedium mit den sich darin befindenden Zellen wurde in das angewärmte Nährmedium pipettiert und anschließend 5 Minuten lang bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Nährmedium aufgenommen.

2.2.5.3 Stimulation der PBMCs mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, Ionomycin und Brefeldin A

Das Nährmedium mit den aufgetauten Zellen wurde zunächst durch ein Filterröhrchen mit einer Porengröße von 35 μm filtriert, um zusammenhängende Zellkonglomerate zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in ein Well (engl. Schacht, Vertiefung einer Zellkulturplatte) einer 48-Well-Platte mit flachem Boden verbracht.

Um die Zytokinproduktion zu induzieren, wurden die Zellen mit den synergistisch wirkenden, unspezifischen Zellstimulatoren Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (30 ng/ml, ng = Nanogramm) und Ionomycin (1 µg/ml, µg = Mikrogramm) unter Umgehung des T-Zell-Rezeptors stimuliert. PMA ist ein Phorbol-ester, der über Proteinkinase C vermittelte Signalwege die Zellaktivierung und von Lymphozyten stimuliert [48] [279]. Ionomycin ist ein Ca²⁺-Ionophor und führt in Kombination mit PMA über verschiedene intrazelluläre Signalwege zur Aktivierung der T-Zellen und zur intrazellulären Zytokinproduktion [279] [280].

Um die gebildeten Zytokine in den Zellen zu halten und mittels Durchflusszytometrie messen zu können, wurde dem Nährmedium außerdem Brefeldin A (BFA) (5 µg/ml) zugegeben. BFA zerstört die Struktur und Funktion des Golgi-Apparates und verhindert dadurch die Proteinsekretion der Zellen [281] [263]. Da die Proteinsynthese nicht beeinflusst wird, führt BFA zu einer Akkumulation der gebildeten Zytokine im Zytoplasma der Zellen [274].

Die stimulierten Zellen wurden 4 Stunden lang im Inkubator bei 37°C und 5 % Kohlendioxid (CO₂) inkubiert.

2.2.5.4 Immunfluoreszenzfärbung – Übersicht

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die in Tabelle 14 dargestellten Färbepanel verwendet. Im ersten Schritt wurden die Oberflächenantigene mittels Fluorochromgekoppelter Antikörper markiert und zeitgleich eine Vitalitätsfärbung mittels Zombie-Aqua™ Fixable Viability Kit (BioLegend) durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurden intrazelluläre Antigene, wie Zytokine und der Transkriptionsfaktor FoxP3 mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper markiert.

Tabelle 14: Färbepanel zur Phänotypisierung der PBMCs.

An- satz	Fluoreszenzfarbstoffe									
	FITC	PE	PerCP 5.5	APC	APC- Cy7	APC- H7	APC Fire 750	BV421	PE- Cy7	BV 500
1	CD45RA	<i>IFNγ</i>	CD8	CD4	CCR7	-	-	<i>IL-17</i>	CD27	Z
2	CD45RA	CD4	<i>FoxP3</i>	<i>IL-10</i>	-	CD8	-	CD127	CD25	Z
3	<i>IFNγ</i>	CD8	<i>FoxP3</i>	CD4	CD12 7	-	-	<i>IL-17</i>	CD25	Z
4	<i>IFNγ</i>	CXCR3	CCR6	CD161	-	-	CD4	<i>IL-17</i>	CD8	Z
5	TCR $\gamma\delta$	<i>IFNγ</i>	CCR6	CD19	-	-	CD4	<i>IL-17</i>	CD8	Z
6	<i>IFNγ</i>	CXCR3	CCR6	CD4	CCR5	-	-	<i>IL-17</i>	CD8	Z
7	Ungefärbte Kontrolle									

Gezeigt ist das Färbepanel zur Phänotypisierung der PBMCs anhand ihrer Oberflächenantigene sowie zur Messung der Zytokinproduktion und der FoxP3-Expression. Die intrazellulären Antigene sind in kursiver Schrift gekennzeichnet. Ansatz 7 stellte die Kontrolle dar und enthielt keine Antikörper. *Abkürzungen: Allophycocyanin (APC), engl. Brilliant Violet (BV), CC-Chemokinrezeptor (CCR), engl. cluster of differentiation (CD), CXC-Chemokinrezeptor (CXCR), Cyanin (Cy), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), Interferon (IFN), Interleukin (IL), mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC = engl. peripheral blood mononuclear cells), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), Phycoerythrin (PE), T-Zell-Rezeptor (TCR), Zombie (Z).*

Panel 1 stellte das T-Zell-Differenzierungspanel dar. Anhand der Oberflächenmoleküle CD45RA, CD27 und CCR7 konnte, jeweils innerhalb der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, zwischen naiven Zellen (CD45RA+CD27+CCR7+), zentralen Gedächtniszellen (CD45RA-CD27+CCR7+), Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA-CD27+CCR7-), Effektorzellen (CD45RA-CD27-CCR7-) und TEMRA-Zellen (CD45RA+CD27-CCR7-) unterschieden werden [28]. Zudem waren Antikörper gegen die proinflammatorischen Zytokine IFN γ und IL-17 im Panel enthalten [53] [70].

Panel 2 war ein Panel zur Charakterisierung der Tregs, die anhand der der Oberflächenmoleküle CD4, CD25 und CD127 (CD4+CD25+CD127low/-) definiert wurden (low = engl. niedrig) [55] [92]. Zusätzlich waren im Panel Antikörper gegen CD45RA enthalten, um zwischen naiven Tregs und Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs unterscheiden zu können [117]. Zudem waren Antikörper gegen den für die Tregs charakteristischen Transkriptionsfaktor FoxP3 und gegen das antiinflammatorische Zytokin IL-10 enthalten [149]. Die zweite, in dieser Studie untersuchte Zellpopulation, die CD4+CD25-CD127- Zellen, konnten ebenfalls in Panel 2 charakterisiert werden.

In Panel 3 wurden die zur Treg-Definition benötigten Marker (CD4, CD25, CD127 und FoxP3) mit dem Th1-Zytokin IFN γ und dem Th17-Zytokin IL-17 kombiniert [53] [55] [70] [92].

In Panel 4 waren Antikörper gegen die für die Th1-Zellen typischen Marker CXCR3 und IFN γ sowie die Th17-assoziierten Marker CCR6, CD161 und IL-17 enthalten [53] [70] [73].

Panel 5 beinhaltete Antikörper gegen die zur Charakterisierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen (TCR $\gamma\delta$) und B-Zellen (CD19) nötigen Oberflächenmarker. Zusätzlich waren Antikörper gegen die Zytokine IFN γ und IL-17 sowie gegen den Chemokinrezeptor CCR6 enthalten [8] [9].

Panel 6 enthielt Antikörper gegen die für die Migration der T-Zellen an den Ort des Entzündungsgeschehen wichtigen Chemokinrezeptoren. CXCR3 und CCR5 werden u.a. auf Th1-Zellen exprimiert, CCR6 auf Th17-Zellen [73].

Panel 7 stellt die nicht gefärbte Negativkontrolle dar, anhand derer die Populationsgrenzen in der durchflusszytometrischen Auswertung abgeschätzt werden können.

2.2.5.5 Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung und Vitalitätsfärbung

Die extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung und die Vitalitätsfärbung mittels des ZombieAqua™ Fixable Viability Kit erfolgten zeitgleich.

Zunächst wurde die Vitalitätsfärbung vorbereitet und anschließend bei 4°C maximal 4 Stunden lang bis zur Verwendung gelagert. ZombieAqua™ Dye ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der Zellen mit beschädigten Zellmembranen färbt [274]. Die intakte Zellmembran vitaler Zellen kann der Farbstoff nicht passieren und die Zellen bleiben daher ungefärbt [263] [274]. Durch diese Färbung können lebende von toten Zellen unterschieden werden und bei der Auswertung werden nur die lebenden Zellen berücksichtigt [274]. Zu Beginn erfolgte die Präparation des ZombieAqua™ Fixable Viability Kits gemäß Angaben des Herstellers: 100 μ l DMSO wurden in ein Fläschchen ZombieAqua™ Dye gegeben und die Farbe darin aufgelöst. Anschließend wurde eine 1:500-Verdünnung der ZombieAqua™ Dye-Lösung mit PBS-Puffer angefertigt (PBS = engl. phosphate-buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung).

Für die extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung wurden 7 Reagiergefäße vorbereitet und anschließend bei 4°C maximal 4 Stunden lang bis zur Verwendung gelagert. Es kamen Fluorochrom-gekoppelte Antikörper gegen zelluläre Oberflächen-Antigene zum

Einsatz. Die Ansätze enthielten die in Tabelle 14 gezeigten Kombinationen aus Antikörpern gegen Oberflächenantigene. In jedem Reagiergefäß wurden 50 µl PBS-Puffer vorgelegt und jeweils 0,3 µl der Antikörperlösungen hinzugefügt, mit Ausnahme der Antikörper PE (Phycoerythrin) anti-human CD8 und FITC (Fluoresceinisothiocyanat) Mouse Anti-Human TCR γ/δ , von denen 1,0 µl verwendet wurde. Anschließend wurden die Lösungen mittels Vortex gründlich gemischt. Ansatz 7 stellte die Kontrolle dar und beinhaltete ausschließlich PBS-Puffer.

Nach Ablauf der vierstündigen Stimulation der PBMCs wurden die sich in 1 ml Nährmedium befindenden Zellen aus dem Inkubator entnommen und auf 7 FACS-Röhrchen aufgeteilt (143 µl Zellsuspension pro Röhrchen). Die Zellen wurden mit je 1 ml PBS-Puffer gewaschen (d.h. 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt).

Nun wurden zu Tube 1-6 je 50 µl der ZombieAqua™ Dye-Verdünnung und 50 µl der jeweiligen Antikörper-Mischung hinzugefügt. Tube 7 stellte die ungefärbte Kontrollprobe dar, hier wurden 100 µl PBS-Puffer zugegeben. Mittels Vortex wurden die Zellen in der Färbelösung resuspendiert. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei Dunkelheit und Raumtemperatur zur Fixierung der extrazellulären Färbung.

2.2.5.6 Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung

Ziel der intrazellulären Immunfluoreszenzfärbung war die Quantifizierung der produzierten Zytokine der Lymphozyten-Subpopulationen sowie die Messung der FoxP3-Expression.

Die Zellen wurden nach Ablauf der 20-minütigen Inkubation mit je 1 ml PBS-Puffer pro Tube gewaschen (5 Minuten, 1500 rpm).

Um die intrazellulären Zytokine und Transkriptionsfaktoren für die Färbung zugänglich zu machen, mussten die Zellmembranen permeabilisiert werden. Dafür kam das Transcription Factor Buffer Set (BD Biosciences) zum Einsatz. Die Fix/Perm Working Solution und die Perm/Wash Working Solution wurden nach Angaben des Herstellers präpariert. In jedes Röhrchen wurden 200 µl Fix/Perm Working Solution gegeben, welche die Zellen fixiert und die Zellmembranen permeabilisiert. Nach dem Mischen durch den Vortex folgte eine 20-minütige Inkubation bei Dunkelheit und Raumtemperatur.

Während dieser 20-minütigen Inkubation wurden die Antikörpermischungen für die intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung vorbereitet. Hierfür wurden wiederum 7 Reagiergefäße benötigt, in die jeweils 50 µl Perm/Wash Working Solution gegeben wurden. Anschließend wurden in die Reagiergefäße 1-6 je 0,8 µl der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen intrazelluläre Zytokine und Transkriptionsfaktoren hinzugefügt und mittels Vortex gründlich gemischt. Die Zusammensetzung der Antikörper gegen intrazelluläre Antigene ist in Tabelle 14 gezeigt. Ansatz 7 stellte die Kontrolle dar und enthielt ausschließlich Perm/Wash Working Solution.

Nach Ablauf der 20-minütigen Inkubation der Zellen mit der Fix/Perm Working Solution wurde jedes Röhrchen mit 1 ml Perm/Wash Working Solution gewaschen (5 Minuten, 1500 rpm). Nun wurden in die Tubes 1-6 je 50 µl der jeweiligen Antikörper-Mischung gegen intrazelluläre Antigene hinzugegeben und mittels Vortex die Zellen in der Färbung resuspendiert. In Tube 7 wurde 50 µl Perm/Wash Working Solution gegeben. Es folgte eine letzte 20-minütige Inkubation bei Dunkelheit und Raumtemperatur, in der die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper an die intrazellulären Antigene binden konnten.

2.2.5.7 Durchflusszytometrische Messung des PBMC-Phänotyps

Nach Ablauf der Inkubation mit der intrazellulären Antikörperfärbung wurden die Tubes mit je 1 ml Perm/Wash Working Solution gewaschen (5 Minuten, 1500 rpm). Im Anschluss wurden je Tube 200 µl FACS-Puffer hinzugefügt und die Zellen wurden mittels Vortex resuspendiert. Die somit für die durchflusszytometrische Messung präparierten Tubes wurden in einer Styroporbox auf Eis zum FACSCanto II transportiert und unverzüglich gemessen.

2.2.5.8 Auswertung mit FACS-Diva-Software

Die Auswertung der durchflusszytometrischen PBMC-Phänotypisierung erfolgte in der FACS-Diva-Software (Version 6.1.3). Im Folgenden wird die Gating-Strategie gezeigt, die bei der Auswertung aller Ansätze erfolgte. Zunächst wurde mittels des Vorwärtsstreulichtes und des Seitwärtsstreulichtes die Lymphozytenpopulation selektioniert – dieser Dot-Plot ist in Abbildung 10 dargestellt.

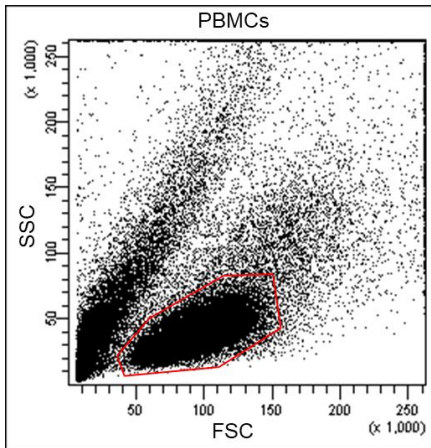


Abbildung 10: Gating und damit Selektion der Lymphozytenpopulation innerhalb der PBMCs.

In einem Dot-Plot, in dem Vorwärtsstreulicht gegen Seitwärtsstreulicht aufgetragen wurde, wurde die Lymphozytenpopulation selektioniert, die sich auf der X-Achse zwischen 50.000 und 150.000 Einheiten befand. *Abkürzungen: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = engl. peripheral blood mononuclear cells), Seitwärtsstreulicht (SSC = engl. side-scattered light), Vorwärtsstreulicht (FSC = engl. forward-scattered light).*

Anschließend wurde der ungefärbte Kontrollansatz betrachtet (Ansatz 7). Es wurden Dot-Plots aus allen Kombinationen der vorhandenen Kanäle erstellt und überprüft, ob sich die Zellpopulation jeweils im linken unteren Quadranten befand. Ein exemplarischer Dot-Plot ist in Abbildung 11 dargestellt.

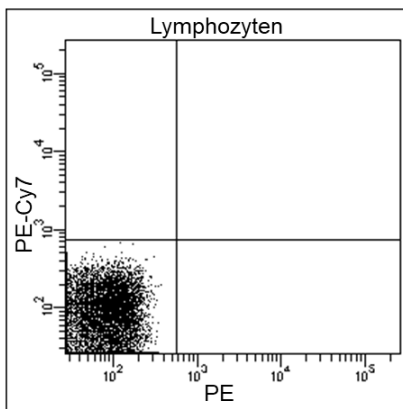


Abbildung 11: Dot-Plot des ungefärbten Kontrollansatzes.

In diesem Dot-Plot des ungefärbten Kontrollansatzes eines exemplarischen Probanden sind die Fluoreszenzfarbstoffe PE und PE-Cy7 aufgetragen. Da die Zellen nicht gefärbt sind, befindet sich die gesamte Zellpopulation im linken unteren Quadranten. *Abkürzungen: Cyanin (Cy), Phycoerythrin (PE).*

Dann wurden in allen Ansätzen die über die Vitalitätsfärbung mit der ZombieAqua™ Dye-Lösung markierten, toten Zellen durch Gating selektioniert und damit eliminiert.

So wurde sichergestellt, dass in der nachfolgenden Auswertung ausschließlich die vitalen Lymphozyten berücksichtigt wurden. Dieser Vorgang ist in Abbildung 12 dargestellt.

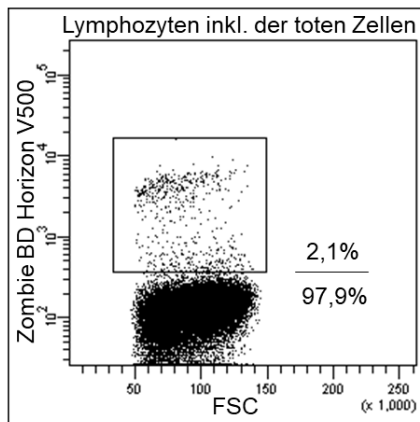


Abbildung 12: Gating und damit Eliminierung der toten Zellen.

Die Prozentwerte stellen den Anteil der mittels der ZombieAqua™ Dye-Lösung markierten toten Zellen (oben) und der vitalen Zellen (unten) eines exemplarischen Patienten dar. *Abkürzungen: Vorwärtsstreuung (engl. forward-scattered light, FSC).*

Nachfolgend wurden, wie in Abbildung 13 gezeigt, in allen Ansätzen die CD4+ und die CD8+ Lymphozyten selektioniert, an denen dann im Anschluss die weitere Auswertung vorgenommen wurde.

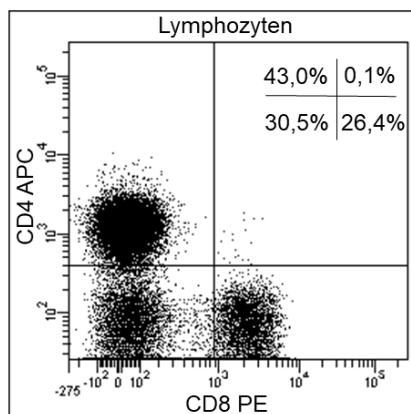


Abbildung 13: Gating der CD4+ und der CD8+ Lymphozyten.

Das Oberflächenmolekül CD4 wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff APC markiert und das Oberflächenmolekül CD8 mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE. Die Prozentwerte stellen den Anteil der Zellen an den vitalen Lymphozyten in den jeweiligen Quadranten dar. *Abkürzungen: Allophycocyanin (APC), engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), Phycoerythrin (PE), positiv (+).*

Bei der übrigen Auswertung wurden alle gemessenen Parameter in Dot-Plots gegeneinander aufgetragen. Hierbei wurde innerhalb der Auswertung der Zellen eines Probanden darauf geachtet, dass die Gates jedes gemessenen Parameters in der

gesamten Auswertung konstant gesetzt wurden. Auch bei den korrespondierenden Analysen der unterschiedlichen Probanden wurden die Gates konstant angewendet. Die Dot Plots ausgewählter Subpopulationen sind im Ergebnisteil unter 3.1 dargestellt.

2.2.5.9 Statistik

Beim Großteil der Auswertung der PBMC-Phänotypisierung handelte es sich um eine rein deskriptive Statistik. Die prozentualen Anteile der Subpopulationen wurden mit der FACS-Diva-Software (Version 6.1.3) generiert. Lediglich die FoxP3-Expression und die Zytokinproduktion in den unterschiedlichen Treg-Subpopulationen wurde mittels Wilcoxon-Rank-Test für verbundene Stichproben in GraphPad Prism (Version 5.04) ausgewertet.

2.2.6 Polarisierung und Funktionsuntersuchung regulatorischer T-Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen mittels Suppression-Assays

2.2.6.1 Zusammenfassung des Versuchsaufbaus

Ziel der durchgeführten Versuche war es, CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) aus den PBMCs zu isolieren und deren Suppressionsfähigkeit direkt nach der Isolation sowie nach sechstägiger Stimulation mit verschiedenen Zytokin-Cocktails zu untersuchen. Analog dazu wurden die Funktionsversuche mit den isolierten CD4+CD25-CD127- Zellen durchgeführt. Untersucht wurden die Zellen von sechs der elf an der Studie teilnehmenden gesunden Probanden.

Da die Expression von CD127 invers mit der FoxP3-Expression korreliert, wurden die Tregs durch den Phänotyp CD4+CD25+CD127low/- definiert [113] [114]. Der Vorteil der Verwendung des Oberflächenmoleküls CD127 im Gegensatz zum intrazellulär vorliegenden FoxP3 zur Identifikation der Tregs bestand darin, dass so keine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen notwendig war [282]. Dadurch blieben die isolierten Zellen vital und standen für die folgenden Suppressionsversuche zur Verfügung.

Um aus den PBMCs CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen zu gewinnen, mussten zwei verschiedene Isolationsschritte erfolgen: Die magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), die mittels VarioMACS™ Separator der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt wurde und das durchflusszytometrische Zell-Sorting, das mittels FACS Aria III Cell Sorter der Firma BD Biosciences stattfand. Diese Abfolge dieser Isolationsschritte ist in Abbildung 14 dargestellt.

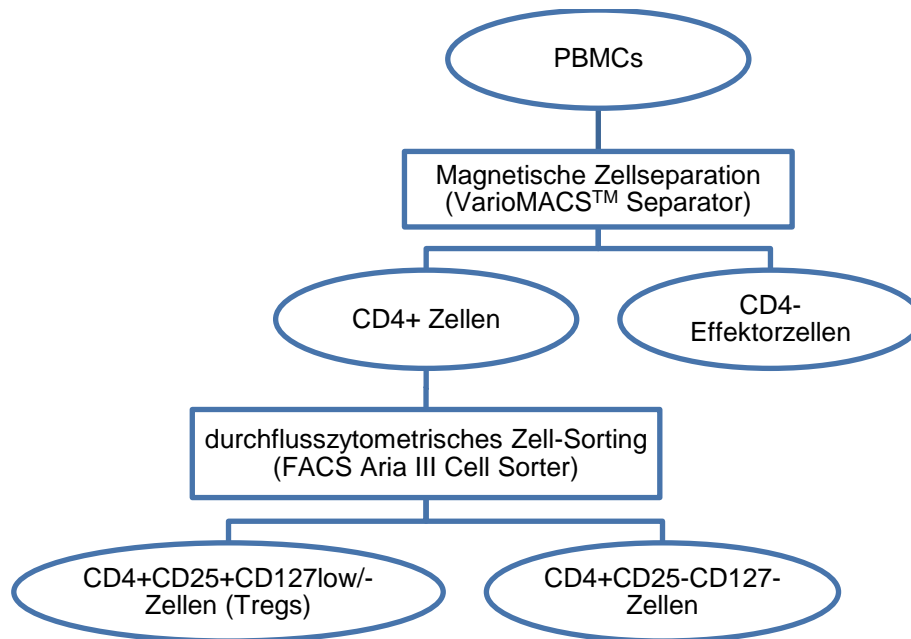


Abbildung 14: Isolation von CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) und CD4+CD25-CD127- Zellen. Aus den PBMCs wurden mittels magnetischer Zellseparation (VarioMACS™ Separator, Miltenyi Biotec) CD4+ Zellen durch Depletion der CD4- Zellen isoliert. Die CD4- Zellfraktion diente in den Folgeversuchen als CD4- Effektorzellen. Aus den CD4+ Zellen wurden in einem weiteren Isolationsschritt mittels durchflusszytometrischem Zell-Sorting (FACS Aria III Cell Sorter, BD Biosciences) CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) und CD4+CD25-CD127- Zellen isoliert. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), engl. fluorescent activated cell sorting (FACS), magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = engl. peripheral blood mononuclear cells), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), regulatorische T-Zellen (Tregs).*

Als Effektorzellen, deren Proliferation in den Suppression-Assays gemessen wurde, dienten die, aus dem ersten Isolationsschritt stammenden, CD4- Zellen. Diese Zellen werden im Folgenden als CD4- Effektorzellen bezeichnet.

Am ersten Tag des Versuchsaufbaus wurden die Suppression-Assays als sechstägige Co-Kultur mit CD4- Effektorzellen mit je einem Drittel der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen angesetzt (Ansatz 1: Prästimulations-Suppression-Assay). An Tag 6 des Versuchsaufbaus wurde die Proliferation der CD4- Effektorzellen aus den Prästimulations-Suppression-Assays durchflusszytometrisch gemessen.

An Tag 1 Des Versuchsaufbaus wurde außerdem je ein Drittel der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen mit dem Th17-Cocktail stimuliert (Ansatz 2). Je ein weiteres Drittel der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen wurde mit dem Treg-Cocktail stimuliert (Ansatz 3).

Nach sechstägiger Stimulation wurden mit den stimulierten CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen die Poststimulations-Suppression-Assays als sechstägige Co-Kultur mit CD4- Effektorzellen angesetzt. Die Proliferation der CD4- Effektorzellen aus den Poststimulations-Suppression-Assays wurde an Tag 12 des Versuchsaufbaus durchflusszytometrisch gemessen.

Der zeitliche Ablauf der durchgeführten Versuche ist in Abbildung 15 dargestellt.

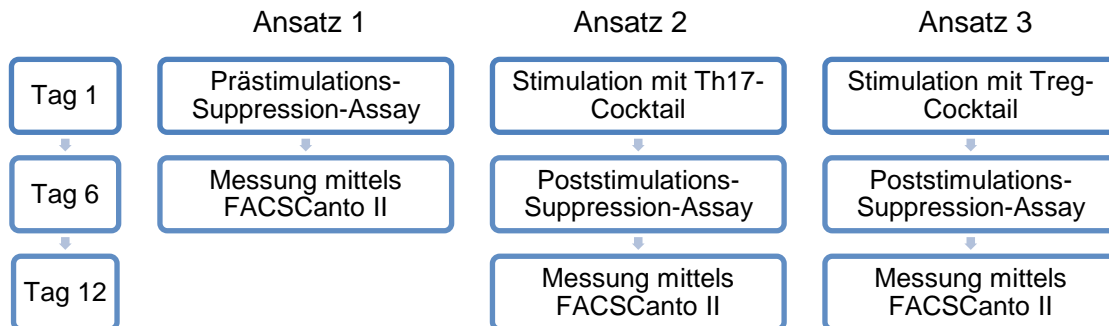


Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf der Suppression-Assays und Stimulationen.

An Tag 1 der Versuchsreihe fand nach Isolierung der CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen mit je einem Drittel der Zellen der Suppression Assay ohne vorherige Stimulation als sechstägige Co-Kultur mit CD4- Effektorzellen statt (Ansatz 1: Prästimulations-Suppression-Assay). Je ein Drittel der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen wurden 6 Tage lang mittels eines Th17-Cocktails stimuliert (Ansatz 2). Das letzte Drittel der CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen wurde 6 Tage lang mittels eines Treg-Cocktails stimuliert (Ansatz 3). Im Anschluss an die Stimulation wurden auch hier Suppression-Assays (Poststimulations-Suppression-Assays) als sechstägige Co-Kultur mit CD4- Effektorzellen angesetzt. Durchflusszytometrisch gemessen wurde der Suppression-Assay mit den unstimulierten Zellen (Ansatz 1) an Tag 6 und die Poststimulations-Suppression-Assays (Ansätze 2 und 3) an Tag 12. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), engl. fluorescent activated cell sorting (FACS), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), regulatorische T-Zellen (Tregs).*

2.2.6.2 Auftauprozess

Zur Vorbereitung des Auftauprozesses wurde pro Proband ein 50 ml fassendes Tube mit 25 ml Nährmedium befüllt und im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Für die folgenden Versuche wurden die zuvor isolierten PBMCs aus dem Stickstofftank entnommen. Die aus dem Tank entnommenen Einfrierröhrchen wurden in einer Styroporbox mit Eis gelagert und unverzüglich ins Labor transportiert. Hier wurden sie schnellstmöglich durch Schwenken im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Das Einfriermedium, in dem sich die Zellen befanden, wurde in das angewärmte Nährmedium pipettiert und anschließend 5 Minuten lang bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen wurde das Zellpellet in 10 ml Nährmedium aufgenommen.

2.2.6.3 Isolierung von CD4+ T-Lymphozyten mittels magnetischer Zellseparation

Magnetische Zellseparation – Hintergrund

Die magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting) ist ein Verfahren, bei dem an magnetische MicroBeads gekoppelte Antikörper genutzt werden, um bestimmte Zellpopulationen zu isolieren [283] [284]. Zunächst werden die Zellen mit spezifischen Antikörpern inkubiert, welche an die korrespondierenden Epitope auf der ihrer Zelloberfläche binden [284]. Im hier verwendeten Verfahren der indirekten Markierung sind an die Antikörper Biotinmoleküle gebunden, die als Binde-moleküle fungieren [285]. Es folgt ein Inkubationsschritt mit Anti-Biotin-Antikörpern, die an 50 Nanometer (nm) große, magnetische Partikel, die sogenannten MicroBeads, gekoppelt sind [284]. Diese Anti-Biotin MicroBeads binden indirekt über die Biotinmoleküle an die primären Antikörper auf den Zielzellen und markieren diese magnetisch. Die so behandelte Zellsuspension lässt man nun durch eine in einem Magnetfeld platzierte Säule fließen [284]. In dieser Säule werden nun diejenigen Zellen zurückgehalten, die mit magnetischen MicroBeads markiert sind [283] [284]. Die unmarkierten Zellen fließen durch die Säule hindurch und werden in einem Röhrchen aufgefangen [283] [285]. Nach der Separation kann die Säule aus dem Magnetfeld entfernt werden, um die magnetisch markierte Zellfraktion zu erhalten [285].

Isolierung von CD4+ T-Lymphozyten mittels CD4+ T Cell Isolation Kit human

Aus den PBMCs wurden nun zunächst mittels magnetischer Zellseparation CD4+ T-Lymphozyten isoliert. Dafür kam das CD4+ T Cell Isolation Kit human der Firma Miltenyi Biotec zum Einsatz und es wurde das Protokoll des Herstellers für die manuelle Separation angewendet [285]. Es handelte sich hierbei um die Isolation unmarkierter CD4+ Zielzellen durch Depletion markierter CD4- Zellen, also um eine Negativselektion [285]. Die CD4- Zellen wurden durch magnetische Markierung verschiedener Oberflächenantigene in der Säule zurückgehalten [285]. Im verwendeten Antikörpercocktail befanden sich Biotin-konjugierte Antikörper gegen CD8a, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma\delta$ und CD235a [285]. So wurden CD8+ T-Zellen, Monozyten, Granulozyten, B-Zellen, NK-Zellen, DCs, $\gamma\delta$ -T-Zellen und Erythrozyten eliminiert und die CD4+ unmarkierten Zellen, die durch die Säule hindurchflossen, konnten aufgefangen werden [274] [285]. Nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld konnten die markierten CD4- Zellen extrahiert werden [285]. Das Funktionsprinzip dieser Negativselektion im MACS ist in Abbildung 16 veranschaulicht.

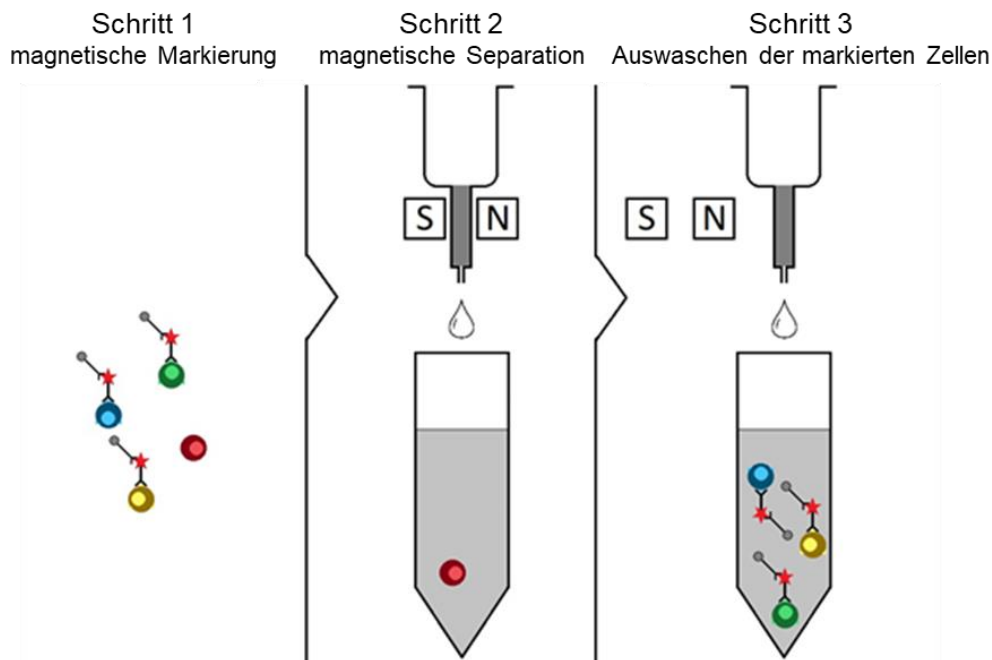


Abbildung 16: Magnetische Zellseparation (MACS) (modifiziert nach [284]).

Negativselektion unmarkierter CD4⁺ Zielzellen durch Depletion markierter CD4⁻ Zellen.

Schritt 1: Die mit magnetischen MicroBeads markierten Antikörper binden indirekt über an Biotinmoleküle gekoppelte Antikörper an die Oberflächenmoleküle der CD4⁻ Zellen. Schritt 2: Die mit MicroBeads markierten CD4⁻ Zellen werden durch das Magnetfeld in der Säule zurückgehalten. Schritt 3: Nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld werden die markierten CD4⁻ Zellen ausgewaschen. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), negativ (-), positiv (+).*

Sämtliche für die magnetische Zellseparation verwendeten Reagenzien wurden auf Eis gelagert. Die aufgetauten und sich an diesem Punkt des Protokolls in 10 ml Nährmedium befindenden PBMCs wurden zunächst durch ein Zellfilter mit einer Porengröße von 70 Mikrometer (μm) filtriert, um zusammenhängende Zellaggregate zu eliminieren. Anschließend wurden sie mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt (s. 2.2.4.3) und die Zellzahl wurde auf 10^7 aufgerundet. Nun wurden die Zellen zentrifugiert (5 Minuten, 1500 rpm), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 40 μl MACS-Puffer je 10^7 Zellen resuspendiert. Nachfolgend wurden 10 μl CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail je 10^7 Zellen hinzugefügt, die Suspension wurde gemischt und 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 30 μl MACS-Puffer je 10^7 Zellen und anschließend 20 μl CD4⁺ T Cell MicroBead Cocktail je 10^7 Zellen hinzugegeben. Die Suspension wurde gemischt und dann für weitere 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Da für die Zellseparation ein Volumen von mindestens 500 μl nötig ist, wurde nun, abhängig von der Ausgangszellzahl und den hinzugefügten Mengen, mit MACS-Puffer auf ein Volumen von 500 μl aufgefüllt.

Die magnetische Zellseparation erfolgte nun mittels VarioMACS™ Separator der Firma Miltenyi Biotec GmbH. Die LS-Säule wurde im Magnetfeld positioniert und zur Vorbereitung mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und die CD4+ Zellen wurden in einem unterhalb der Säule platzierten 15 ml Tube aufgefangen. Nachfolgend wurden 3-mal je 1 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben um in der Säule verbliebene CD4+ Zellen auszuwaschen. Aus den so isolierten CD4+ Zellen wurden in den folgenden Schritten die CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) und die CD4+CD25-CD127- Zellen isoliert. Aufgrund der geringen Zellzahlen, die limitierend für die Folgeversuche waren, wurde die Reinheit der CD4+ Zellfraktion nicht bei jedem einzelnen Probanden gemessen, sondern nur exemplarisch in den Vorversuchen. Hier hatte sich eine Reinheit von 97-99 % gezeigt.

Um die CD4- Fraktion aus der Säule zu extrahieren, wurde diese aus dem Magnetfeld entfernt und auf einem 15 ml Tube platziert. Es wurden 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und das Volumen schnell mittels des beiliegenden Stempels durch die Säule gedrückt. Die CD4- Zellen dienten in den später folgenden Suppression-Assays als CD4- Effektorzellen, anhand deren Proliferation die Funktion der regulatorischen T-Zellen gemessen wurde.

2.2.6.4 Durchflusszytometrische Isolierung der CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) und CD4+CD25-CD127- Zellen

Der nächste Isolationsschritt wurde mithilfe des Zell-Sorters FACS Aria III der Firma BD Biosciences durchgeführt. Ziel war es CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) und CD4+CD25-CD127- Zellen zu erhalten, um deren Funktion und Polarisierbarkeit in den darauffolgenden Versuchen zu untersuchen.

Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung der CD4+ Zellen

An dieser Stelle des Protokolls lagen die mittels magnetischem Zell-Sorting aus den PBMCs isolierten CD4+ Lymphozyten in 3 ml MACS-Puffer vor. Nach der Zentrifugation (5 Minuten, 1500 rpm) und dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 µl MACS-Puffer aufgenommen. Es wurde je 3 µl der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen CD127 (Fluorochrom: BV 421 = Brilliant Violet 421) und CD25 (Fluorochrom: PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cyanine7) hinzugegeben und die Zellen wurden 20 Minuten lang bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen (5 Minuten, 1500 rpm) und in 500 µl Nährmedium resuspendiert.

Durchflusszytometrisches Zell-Sorting der CD4+ Zellen

Beim Zell-Sorting wurden die CD4+ Lymphozyten im Zell-Sorter FACS Aria III anhand der markierten Oberflächenantigene CD25 und CD127 in zwei Fraktionen aufgeteilt und gleichzeitig gezählt. Die beiden isolierten Zellpopulationen waren die regulatorischen T-Zellen mit dem Phänotyp CD4+CD25+CD127low/- und die CD4+CD25-CD127- Zellen, die in den folgenden Versuchsschritten durch Zytokin-Stimulation in Richtung Treg polarisiert werden sollten. Jede Zellfraktion wurde in einem 2 ml Nährmedium beinhaltenden 15 ml Tube aufgefangen.

Die beim Zell-Sorting verwendete Gating-Strategie ist in Abbildung 17 dargestellt.

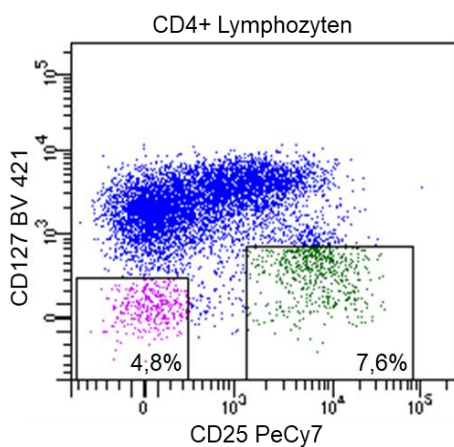


Abbildung 17: Gating-Strategie zur Isolierung von CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen durch Zell-Sorting.

Dargestellt ist die Gating-Strategie beim Isolieren der CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen mittels des Zell-Sorters FACS Aria III anhand eines exemplarischen Probanden. Die Prozentwerte geben den Anteil der CD4+CD25+CD127low/- Zellen (7,6 %) und der CD4+CD25-CD127- Zellen (4,8 %) an den, zuvor mittels MACS-Isolation aus den PBMCs isolierten, CD4+ Zellen an. *Abkürzungen: engl. brilliant violet (BV), engl. cluster of differentiation (CD), Cyanin (Cy), engl. fluorescent activated cell sorting (FACS), magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = engl. peripheral blood mononuclear cells), negativ (-), niedrig (engl. low), Phycoerythrin (PE), positiv (+).*

2.2.6.5 Vorbereitungen für die Suppression-Assays

Die Funktion der regulatorischen T-Zellen kann mittels Suppression-Assays in einer Co-Kultur mit anderen Immunzellen überprüft werden [286].

Ziel des folgenden Prästimulations-Suppression-Assays war es, die Funktion der isolierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) und der CD4+CD25-CD127- Zellen in einer Co-Kultur mit den CD4- Effektorzellen zu untersuchen. Hierbei diente die

Fähigkeit der Tregs, die Proliferation der CD4- Effektorzellen zu supprimieren als Messinstrument für ihre Funktionalität.

Zudem wurde die Auswirkung des Zytokinmilieus auf die Funktion der CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen und damit deren Polarisierbarkeit untersucht. Dafür wurden die beiden Zellpopulationen über 6 Tage mit je einem proinflammatorischen (Th17-Cocktail) und einem antiinflammatorischen Zytokin-Cocktail (Treg-Cocktail) behandelt. Anschließend wurde ihre Funktionalität im Poststimulations-Suppression-Assay gemessen.

Um diese zwei Versuchsansätze durchführen zu können, wurden die durchflusszytometrisch isolierten CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen zunächst aufgeteilt. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- Zellen bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zu CD4- Effektorzellen, in dem die Suppression-Assays angesetzt wurden, wurde mit 0:1, 0,5:1 und 1:1 festgelegt und streng eingehalten. Die angestrebten absoluten Zellzahlen für die Ansätze waren 0:40.000, 20.000:40.000 und 40.000:40.000 Zellen. Demnach wurden für den Prästimulations-Suppression-Assay 60.000 CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen benötigt und für die beiden Poststimulations-Suppression-Assays nach der Stimulation mit dem Th17- bzw. dem Treg-Cocktail ebenfalls je 60.000 CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen. Bei vier Probanden waren nach der Isolierung durch den Zell-Sorter weniger als die benötigten 180.000 CD4+CD25-CD127- Zellen vorhanden (minimal 120.000 Zellen). Hier wurden die Suppressions-Assays mit je einem Drittel der CD4+CD25-CD127- Zellen angesetzt (minimal 40.000 Zellen). Die Anzahl der CD4- Effektorzellen wurde dementsprechend angepasst. Daher resultierten für die CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen unterschiedliche Kontrollansätze.

2.2.6.6 Prästimulations-Suppression-Assay

Um die Funktionalität der frisch isolierten CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen zu untersuchen, wurden direkt nach deren Isolierung Suppression-Assays angesetzt. Hierfür wurde eine Konzentration von 40.000 Zellen in 50 µl Nährmedium benötigt, was einer Konzentration von 800.000 Zellen pro ml entspricht. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (5 Minuten, 1500 rpm), der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets wurden in die entsprechende Menge Nährmedium aufgenommen, um eine Konzentration von 800.000 Zellen pro ml zu erhalten.

Die CD4- Effektorzellen mussten zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE gefärbt werden, damit später ihre Proliferation durchflusszytometrisch gemessen werden konnte. CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die Zellmembran passieren kann und sich permanent an intrazelluläre Strukturen anlagert [274] [287]. Mit CFSE gefärbte Zellen geben den Farbstoff bei der Proliferation gleichmäßig an ihre Tochterzellen weiter [287] [288] [289]. Die CFSE-Konzentration in den Zellen nimmt daher von Generation zu Generation ab und der Farbstoff kann somit genutzt werden, um bis zu 8 aufeinanderfolgende Generationen proliferierter Zellen zu detektieren [287] [288]. Hierfür wurde das CFSE Cell Division Tracker Kit von BioLegend verwendet und die 5 millimolare (mM) Stock-Konzentration wurde nach Angaben des Herstellers präpariert [290]. 1 µl des 5 mM CFSE wurden dann in 2 ml PBS gelöst, um eine 2,5 µM CFSE-Lösung zu erhalten. Nun wurden von den zuvor gezählten CD4- Effektorzellen 5×10^6 Zellen für die Färbung entnommen. Die übrigen CD4- Effektorzellen wurden nach der unter 2.2.4.4 beschriebenen Methode kryokonserviert, sodass sie zu einem späteren Zeitpunkt für die Poststimulations-Suppression-Assays zur Verfügung standen. Die 5×10^6 CD4- Effektorzellen, die für den Prästimulations-Suppression-Assay benötigt wurden und sich in Suspension mit MACS-Puffer befanden, wurden zentrifugiert (5 Minuten, 1500 rpm). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Dann wurde zur Zellsuspension 1 ml der zuvor präparierten CFSE-Lösung hinzugegeben und die Lösungen miteinander vermischt. Die Zellen wurden nun 5 Minuten lang bei Dunkelheit und Raumtemperatur mit CFSE inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Färbung mit 10 ml Nährmedium gestoppt und die Zellen wurden erneut gezählt, da CFSE aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften zu einer Reduktion der Zellzahl führen kann [287]. Die Zellsuspension wurde nun erneut zentrifugiert (5 Minuten, 1500 rpm) und der Überstand abgesaugt. Dann wurden die CD4-negativen, nun CFSE gefärbten Zellen in die nötige Menge Nährmedium aufgenommen, sodass eine Konzentration von 800.000 Zellen pro ml erreicht wurde.

Nun wurden in einer 96-Well-Zellkulturplatte mit runden Böden die Co-Kulturen angesetzt. In jedem der 6 Wells wurden 50 µl der CFSE-gefärbten CD4- Effektorzellen (Konzentration 800.000 Zellen/ml) mit CD4+CD25+CD127low/- oder CD4+CD25-CD127- Zellen (Konzentration 800.000 Zellen/ml) und/ oder Nährmedium zusammengebracht, sodass die in Abbildung 18 dargestellten Mengenverhältnisse von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zu CD4- Effektorzellen von 0:1, 0,5:1 und 1:1 entstanden.

Zusätzlich wurden in alle Wells 100 µl einer Anti-CD3-Lösung der Konzentration 1 µg/ml pipettiert, sodass in den nun 200 µl beinhaltenden Wells eine Anti-CD3-Konzentration von 0,5 µg/ml herrschte. Diese Anti-CD3-Lösung war durch Lösen von Anti-CD3 (Stock-Konzentration: 1 mg/ml) in Nährmedium hergestellt worden. Anti-CD3 induziert über die Bindung an den T-Zell-Co-Rezeptor CD3 eine Aktivierung aller T-Zellen [1]. Da sich innerhalb der CD4- Effektorzellen auch APCs befanden, welche mit ihren Oberflächenmolekülen CD80/CD86 an CD28 auf den T-Zellen binden konnten, reichte das lösliche Anti-CD3 für die Stimulation aus und Anti-CD28 wurde nicht benötigt [56].

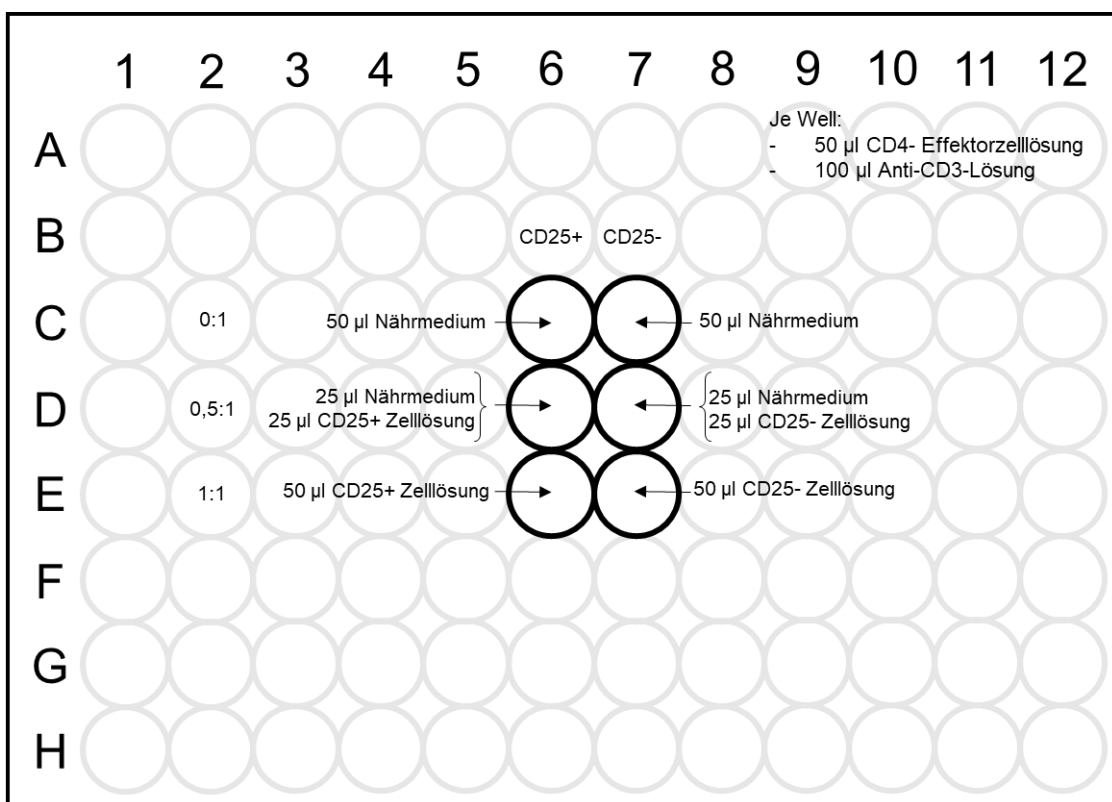


Abbildung 18: Zusammensetzung der Ansätze des Prästimulations-Suppression-Assays.

In jedes der 6 Wells wurden 50 µl Lösung der CFSE-gefärbte CD4- Effektorzellen (Konzentration: 800.000 Zellen/ml) sowie 100 µl der Anti-CD3-Lösung (Konzentration: 1 µg/ml) pipettiert. Zusätzlich wurden in jedes Well die in der Abbildung dargestellten Mengen an Nährmedium und der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zelllösung (Konzentration: 800.000 Zellen/ml) hinzugegeben. Bei den vier Probanden, bei denen nach den beiden Isolationschritten weniger als 180.000 CD4+CD25-CD127- Zellen vorgelegen hatten, wurden die Suppression-Assays mit entsprechend geringeren Zellzahlen angesetzt, also mit je einem Drittel der nach der Isolation vorhandenen Zellen. So entstanden Ansätze, in denen CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit CD4- Effektorzellen im Verhältnis 0:1, 0,5:1 und 1:1 vorlagen. *Abkürzungen: Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE), engl. cluster of differentiation (CD), Mikrogramm (µg), Mikroliter (µl), Milliliter (ml), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+).*

Die Zellkulturplatte wurde nun für 6 Tage im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die CFSE-Konzentration der CD4- Effektorzellen mit dem Durchflusszytometer FACSCanto II gemessen.

2.2.6.7 Stimulation

In Vorbereitung auf die Stimulation wurden die Wells einer 96-Well-Zellkulturplatte mit runden Böden mit je 150 µl einer Anti-CD3-Lösung der Konzentration 5 µg/ml gefüllt. Diese Anti-CD3-Lösung war durch Lösen von Anti-CD3 (Stock-Konzentration: 1 mg/ml) in Nährmedium hergestellt worden. Beim hier verwendeten Coating-Verfahren verblieb die Lösung im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ für eine Stunde in den Wells der Zellkulturplatte.

In der Zwischenzeit wurden die Zytokin-Cocktails für die Stimulation hergestellt, indem die Zytokine in Nährmedium gelöst wurden. Der proinflammatorische Th17-Cocktail bestand aus IL-1β, IL-6, IL-23 und TGFβ. Im Treg-Cocktail waren IL-2 und TGFβ enthalten. In Tabelle 15 sind die Zytokin-Konzentrationen beschrieben, die nach Mischen der Zytokin-Cocktails mit der Zellsuspension in der Zellkultur vorlagen. Die für die Stimulation optimalen Konzentrationen der Zytokine waren zuvor in laborinternen Vorversuchen ermittelt worden.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Stimulationscocktails.

Stimulationscocktails	Zytokine	Konzentration in der Zellkultur
Th17-Cocktail	IL1β	10 ng/ml
	IL-6	20 ng/ml
	TGFβ	5 ng/ml
	IL-23	100 ng/ml
Treg-Cocktail	IL-2	10 ng/ml
	TGFβ	50 ng/ml

Abkürzungen: Interleukin (IL), Milliliter (ml), Nanogramm (ng), regulatorische T-Zelle (Treg), T-Helferzelle (Th), engl. transforming growth factor (TGF).

Für jeden Stimulationsansatz waren 60.000 CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen pro 100 µl Nährmedium erwünscht. Zu den Zellen wurde also die nötige Menge Nährmedium hinzugegeben, um eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 600.000 Zellen/ml zu erhalten. Bei den vier Probanden, bei denen nach den beiden Isolationsschritten weniger als 180.000 CD4+CD25-CD127- Zellen vorgelegen hatten, wurden die Ansätze mit entsprechend geringeren Zellzahlen angesetzt, also mit

je einem Drittel der nach der Isolation vorhandenen Zellen pro Stimulationsansatz (minimal 40.000 Zellen pro Ansatz).

Nach Ablauf des einstündigen Coatings der Zellkulturplatte mit Anti-CD3 wurde die Anti-CD3-Lösung mittels einer 200 µl Pipette entfernt. Es wurden dann in jedes Well 100 µl der vorbereiteten Zellsuspension und 100 µl des jeweiligen Stimulations-Cocktails zugegeben. So wurden in vier verschiedenen Stimulationsansätzen die CD4+CD25+CD127low/- und die CD4+CD25-CD127- Zellen sowohl mit dem Th17- als auch mit dem Treg-Cocktail stimuliert.

Es schloss sich eine sechstägige Inkubation der Zellkulturplatte im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ an.

2.2.6.8 Poststimulations-Suppression-Assay

Nach Ablauf der sechstägigen Inkubation der CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Stimulations-Cocktails wurden die Poststimulations-Suppression-Assays angesetzt.

Hierfür wurden zunächst die CD4- Effektorzellen aus dem Stickstofftank entnommen und analog zu dem in 2.2.5.2 beschriebenen Auftauprozess im Wasserbad aufgetaut, in vorgewärmtes Nährmedium pipettiert, gewaschen und anschließend in 10 Nährmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt (s. 2.2.4.3). Es wurden 5×10^6 Zellen entnommen und analog zu dem in 2.2.6.6 beschriebenen Prozess mit CFSE gefärbt. Nach dem Färbeprozess wurden die CD4- Effektorzellen erneut gezählt und durch Zugabe von Nährmedium eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 800.000 Zellen/µl hergestellt.

Nun wurde die Zellkulturplatte mit dem Stimulationsansatz aus dem Inkubator entnommen und der Inhalt jedes der 4 Wells in ein 0,5 ml Reagiergefäß pipettiert. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (5 Minuten, 2000 rpm) und anschließend wurden die Überstände in 4 weitere Reagiergefäße pipettiert. Diese wurden bei -21 °C eingefroren, um in Folgeversuchen die Möglichkeit zu haben, die sich im Medium befindlichen Zytokine mittels ELISA (engl. Enzyme-linked immunosorbent assay) nachzuweisen. Die CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen wurden für den folgenden Suppression-Assay in einer Suspension mit einer Konzentration von 800.000 Zellen/ml benötigt. Das 60.000 Zellen beinhaltende Zellpellet wurde folglich in 75 µl Nährmedium aufgenommen. Es wurde sich aufgrund der geringen Zellzahl an

dieser Stelle aktiv gegen eine erneute Zellzählung entschieden, um den Zellverlust durch erneutes Zentrifugieren und Absaugen zu umgehen.

Nun wurden in einer 96-Well-Zellkulturplatte mit runden Böden die Poststimulations-Suppression-Assays angesetzt. In jedem der 12 Wells wurden analog zum in 2.2.6.6 beschriebenen Protokoll 50 µl CFSE-gefärbte CD4⁻ Effektorzellen (Konzentration 800.000 Zellen/ml) mit stimulierten CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} oder CD4⁺CD25⁻CD127⁻ Zellen (Konzentration 800.000 Zellen/ml) und/oder Nährmedium zusammengebracht, sodass die Verhältnisse von CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} bzw. CD4⁺CD25⁻CD127⁻ Zellen zu CD4⁻ Effektorzellen von 0:1, 0,5:1 und 1:1 entstanden. Bei den vier Probanden, bei denen nach den beiden Isolationsschritten weniger als 180.000 CD4⁺CD25⁻CD127⁻ Zellen vorgelegen hatten, wurden die Suppression-Assays mit entsprechend geringeren Zellzahlen angesetzt, also mit je einem Drittel der nach der Isolation vorhandenen Zellen. Die Konzentration der CFSE-gefärbten CD4⁻ Effektorzellen wurde entsprechend angepasst, um die Verhältnisse von CD4⁺CD25⁻CD127⁻ Zellen zu CD4⁻ Effektorzellen von 0:1, 0,5:1 und 1:1 zu erhalten.

Zusätzlich wurde analog zum im 2.2.6.6 beschriebenen Vorgang eine Anti-CD3 Lösung der Konzentration 1 µg/ml hergestellt. Von dieser Lösung wurden in jedes Well 100 µl zugegeben, sodass in den nun 200 µl beinhaltenden Wells die Anti-CD3-Konzentration 0,5 µg/ml betrug.

Abbildung 19 zeigt die Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten.

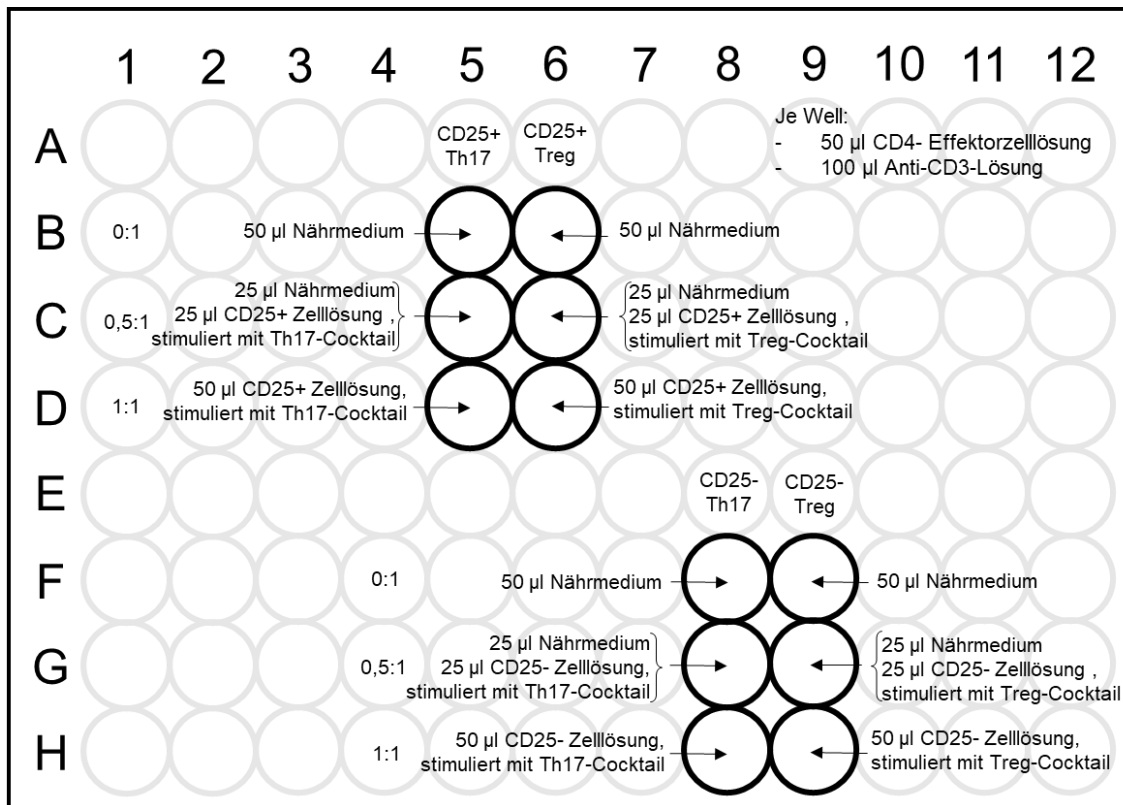


Abbildung 19: Zusammensetzung der Ansätze der Poststimulations-Suppression-Assays.

In jedes der 12 Wells wurden 50 µl Lösung der CFSE-gefärbte CD4- Effektorzellen (Konzentration: 800.000 Zellen/ml) sowie 100 µl der Anti-CD3-Lösung (Konzentration: 1 µg/ml) pipettiert. Zusätzlich wurden in jedes Well die in der Abbildung dargestellten Mengen an Nährmedium und der mittels Zytokin-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zelllösung (Konzentration: 800.000 Zellen/ml) hinzugegeben. Der Th17-Cocktail beinhaltet die Zytokine IL1β, IL-6, TGFβ und IL-23; der Treg-Cocktail enthielt die Zytokine TGFβ und IL-2. Bei den vier Probanden, bei denen nach den beiden Isolations-schritten weniger als 180.000 CD4+CD25-CD127- Zellen vorgelegen hatten, wurden die Suppression-Assays mit entsprechend geringeren Zellzahlen angesetzt, also mit je einem Drittel der nach der Isolation vorhandenen Zellen. So entstanden Ansätze, in denen CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit CD4- Effektorzellen im Verhältnis 0:1, 0,5:1 und 1:1 vorlagen. *Abkürzungen: Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE), engl. cluster of differentiation (CD), Interleukin (IL), Mikrogramm (µg), Mikroliter (µl), Milliliter (ml), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), regulatorische T-Zelle (Treg), T-Helferzelle (Th), engl. transforming growth factor (TGF).*

Die Zellkulturplatte mit den Poststimulations-Suppression-Assays wurde nun für 6 Tage im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die CFSE-Konzentration der Indikatorzellen durchflusszytometrisch mit dem FACSCanto II gemessen.

2.2.6.9 Auswertung mit der FACSDiva-Software

Die Proliferation der CD4- Effektorzellen wurde über die CFSE-Färbung durchflusszytometrisch gemessen. Hierfür wurde das FACSCanto II Gerät der Firma BD Biosciences genutzt. Die Auswertung erfolgte in der FACSDiva-Software.

Im Folgenden wird die Gating-Strategie gezeigt und es werden repräsentative Dot Plots dargestellt. Zunächst wurde, analog zur Auswertung der PBMC-Phänotypisierung, mittels des Vorwärtsstreulichtes und des Seitwärtsstreulichtes die Lymphozytenpopulation selektioniert (s. Abbildung 20).

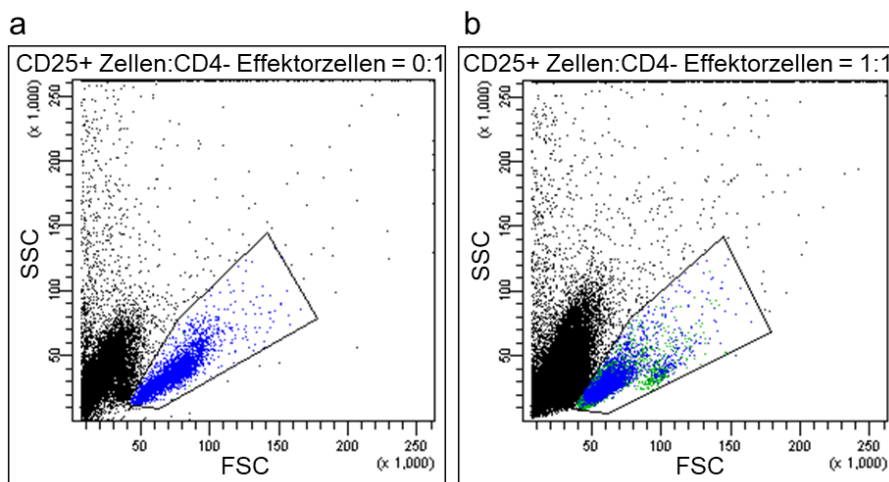


Abbildung 20: Gating der Lymphozytenpopulation bei der Auswertung der Suppression-Assays.

Jeder Punkt im Dot Plot repräsentiert eine durchflusszytometrisch gemessene Zelle eines exemplarischen Probanden. Abbildung 20 a zeigt einen Kontrollansatz, in dem sich ausschließlich CD4- Effektorzellen befanden. Abbildung 20 b zeigt einen Ansatz, in dem sich CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4- Effektorzellen in einem Verhältnis von 1:1 befanden. Hier erkennt man im Vergleich zu Abbildung 20 a eine zusätzliche Zellpopulation, die die CD4+CD25+CD127low/- Zellen repräsentiert. *Abkürzungen: CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Seitwärtsstreulicht (SSC = engl. side-scattered light), Vorwärtsstreulicht (FSC = engl. forward-scattered light).*

Nachfolgend wurde, wie in Abbildung 21 gezeigt, die CFSE-Konzentration gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen. Diese Darstellung wurde gewählt, um die nicht CFSE-gefärbten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen von der Proliferationsanalyse zu eliminieren.

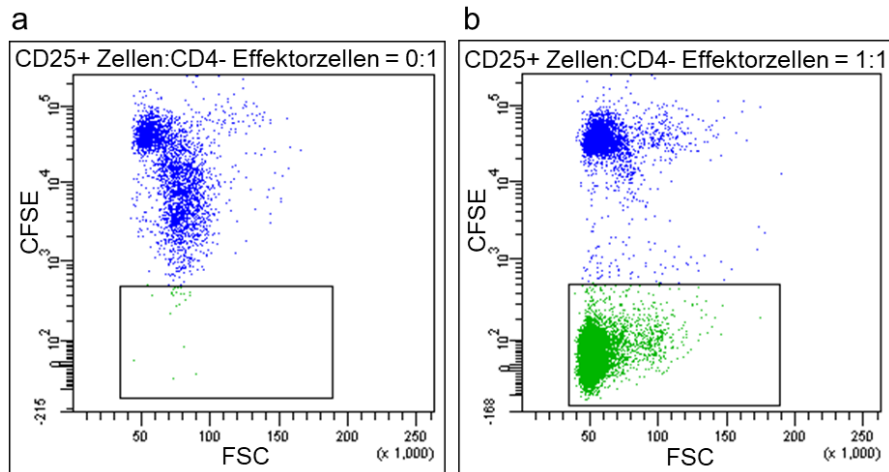
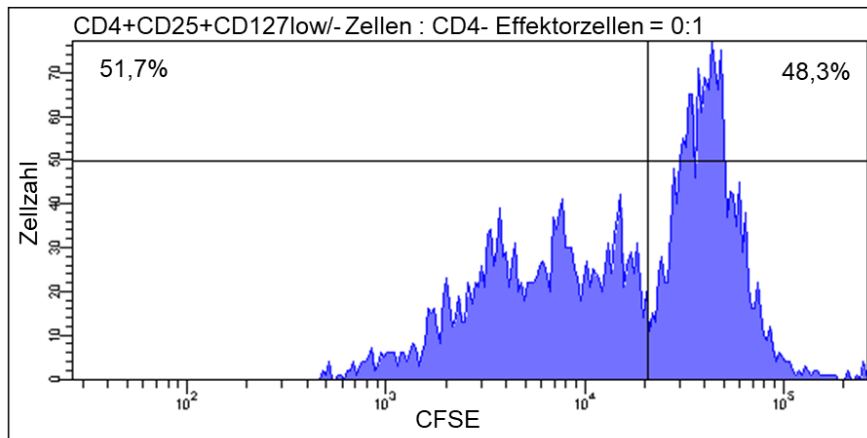


Abbildung 21: Darstellung der Proliferation der CD4- Effektorzellen durch Gegenüberstellung der CFSE-Konzentration zum Vorwärtsstreulicht.

Jeder Punkt im Dot Plot repräsentiert eine durchflusszytometrisch gemessene Zelle eines exemplarischen Probanden. Abbildung 21 a zeigt den Kontrollansatz, der ausschließlich CD4- Effektorzellen beinhaltet. Man erkennt die nicht-proliferierte CD4- Effektorzell-Population mit hohem CFSE-Gehalt und die nachfolgenden Zell-Generationen mit sukzessiver Minderung der CFSE-Konzentration. Abbildung 21 b zeigt den Ansatz, in dem CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4- Effektorzellen in einem Verhältnis von 1:1 vorlagen. Die nicht mit CFSE gefärbten CD4+CD25+CD127low/- Zellen wurden durch Gating von der Proliferationsanalyse eliminiert. *Abkürzungen: Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE), CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Vorwärtsstreulicht (FSC = engl. forward-scattered light).*

Um die Proliferation zu visualisieren, wurde nun, wie in Abbildung 22 gezeigt, eine Histogrammdarstellung gewählt, in der die CFSE-Konzentration gegenüber der Anzahl der Zellen aufgetragen wird. Da CFSE bei den Zellteilungen der CD4- Effektorzellen gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben wird, entstehen im Histogramm nach links verschobene Zacken (engl. Peaks) mit geringerer Intensität des Fluoreszenz-Farbstoffes. Der rechte Peak repräsentiert die Zellen, die nicht proliferiert haben. Die übrigen, nach links verschobenen Peaks repräsentieren die Generationen von Tochterzellen, die bei der Zellteilung entstanden sind.

a



b

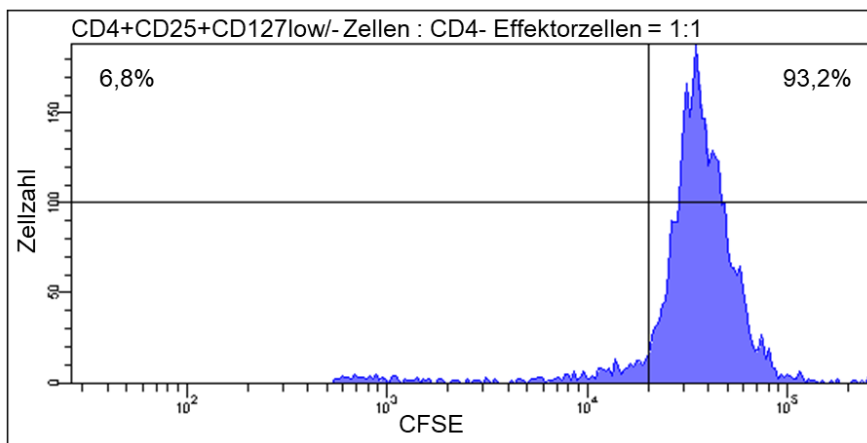


Abbildung 22: Histogrammdarstellung der CFSE-Konzentration zur Messung der Proliferation der CD4-Effektorzellen.

Gezeigt ist eine Histogrammdarstellung eines exemplarischen Probanden, in der die CFSE-Konzentration gegenüber der Zellzahl aufgetragen ist. Gemessen wurden nach sechstägiger Zellkultur unter Stimulation mit Anti-CD3. Jeder Peak repräsentiert eine Generation CFSE-markierter CD4- Effektorzellen. Abbildung 22 a zeigt den Kontrollansatz. Hier waren ausschließlich CD4- Effektorzellen enthalten, von denen 51,7 % proliferiert hatten. Abbildung 22 b zeigt den Ansatz, in dem CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4- Effektorzellen im Verhältnis 1:1 vorlagen. Hier hatten nur 6,8 % der CD4- Effektorzellen proliferiert. Abkürzungen: Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE), engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+).

2.2.6.10 Ermittlung der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen

Es wurde die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den unterschiedlichen Versuchsansätzen gemessen. Da Tregs die Fähigkeit besitzen, die Proliferation von Effektorzellen zu hemmen, konnte aus der Proliferation der Effektorzellen auf die Funktion der Tregs geschlossen werden [24].

Um die Suppressionsfunktion von Tregs zu beurteilen, hat es sich etabliert, die durch die Tregs herbeigeführte Reduktion der Proliferation der Effektorzellen zu berechnen [289] [291] [292]. Die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen bzw. der CD4+CD25-CD127- Zellen wurde in unserer Studie mittels folgender Formel ermittelt:

Suppressionsfunktion [%] =

$$\left(1 - \frac{\text{Proliferation der CD4- Effektorzellen [\%] in der Co-Kultur mit Tregs bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen}}{\text{Proliferation der CD4- Effektorzellen [\%] im Kontrollansatz}} \right) \times 100$$

Hierbei wurde die Proliferation der CD4- Effektorzellen [%] in der Co-Kultur mit CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zu der Proliferation der CD4- Effektorzellen [%] im Kontrollansatz in Relation gesetzt. Die Subtraktion dieser Ratio von 1 ergab die durch die CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen herbeigeführte Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen. Multipliziert mit 100 ergab sich die Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent, welche als Maß für die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen herangezogen wurde. Resultierte ein negativer Wert, so bedeutete dies, dass die Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur mit CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen höher war als im Kontrollansatz und es demnach zu einer Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen gekommen war.

Der Vorteil dieses Rechenschrittes ist, dass die interindividuell variierenden Proliferationsraten anhand des Kontrollansatzes normalisiert werden, indem die Proliferation der CD4- Effektorzellen [%] in der Co-Kultur mit CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zu der Proliferation der CD4- Effektorzellen [%] im Kontrollansatz in Relation gesetzt wird. Dadurch wird die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zwischen den verschiedenen Probanden besser vergleichbar.

2.2.6.11 Statistik

Für die Durchführung der statistischen Tests sowie für die Erstellung der Grafiken wurde das Programm GraphPad Prism (Version 5.04) verwendet. Es erfolgte eine ausführliche statistische Beratung von Dr. Rebecca Roth, die am Institut für klinische Epidemiologie und Biometrie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg für die statistische Beratung bei medizinischen Promotionen zuständig ist.

Aufgrund der geringen Probandenzahl ($n = 6$) war eine Normalverteilung der erhobenen Daten nicht anzunehmen. Auf Normalverteilung getestet wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Testes. Die statistische Auswertung erfolgte daher mittels eines nichtparametrischen Testes.

Es wurde die Proliferation der CD4- Effektorzellen sowie die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen und Co-Kultur-Zusammensetzungen jeweils innerhalb eines individuellen Probanden miteinander verglichen. Daher handelte es sich um abhängige Daten innerhalb der einzelnen Spenderperson und der Wilcoxon-Rank-Test für verbundene Stichproben wurde gewählt.

Beim Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen war das Ziel des statistischen Tests, die Hypothese zu überprüfen, dass die Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur mit CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen anders sein würde als im Kontrollansatz. Von besonderem Interesse war, ob die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen geringer als im Kontrollansatz sein würde, da dies auf eine Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen hindeuten könnte. Um aber auch die Co-Kulturen mit gesteigerter Proliferation abzubilden, wurde der zweiseitige Wilcoxon-Rank-Test verwendet.

Bei der Betrachtung der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen wurde überprüft, ob die Suppressionsfunktion signifikant von Null abwich. Im Weiteren wurde die Suppressionsfunktion der unterschiedlichen unstimulierten und mittels Zytokin-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen, jeweils innerhalb eines Probanden, miteinander verglichen. Auch hier wurde der zweiseitige Wilcoxon-Rank-Test verwendet.

Auf eine Korrektur hinsichtlich multiplen Testens wurde verzichtet, da es sich um einen explorativen und nicht um einen konfirmatorischen Ansatz handelte. Das Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert $< 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil untergliedert sich in zwei Abschnitte. Im Kapitel 3.1 werden die Ergebnisse der PBMC-Phänotypisierung beschrieben. Im Kapitel 3.2 wird auf die Resultate der Prä- und Poststimulations-Suppression-Assays eingegangen.

3.1 PBMC-Phänotypisierung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der PBMC-Phänotypisierung beschrieben. Die in diesem Kapitel genannten Prozentwerte geben den Mittelwert für die jeweilige Population an. In Tabelle 16 sind die Probanden, deren PBMCs phänotypisiert wurden, aufgeführt und hinsichtlich ihres Alters und Geschlechts charakterisiert.

Tabelle 16: Charakterisierung der in der PBMC-Phänotypisierung untersuchten Probanden hinsichtlich ihres Alters und Geschlechts.

Proband Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht
1	25	m
2	23	m
3	23	w
4	25	m
5	23	m
6	23	m
7	24	w
8	23	w
9	24	w
10	23	w
11	24	w

Abkürzungen: männlich (m), Nummer (Nr.), weiblich (w).

3.1.1 Gating der Lymphozyten und Eliminierung der toten Zellen

Zunächst wurde in allen Ansätzen in einem Dot-Plot Seitwärtsstreulicht gegenüber Vorwärtsstreulicht aufgetragen und die Lymphozyten-Population, wie in Abbildung 10 in Kapitel 2.2.5.8 dargestellt, selektioniert.

Anschließend wurden die über die Vitalitätsfärbung detektierten toten Zellen eliminiert (s. Abbildung 12, Kapitel 2.2.5.8). Im Mittel waren 97,5 % der gemessenen Lymphozyten vital. Tabelle 17 zeigt die prozentuale Verteilung der durchflusszytometrisch gemessenen Ereignisse, aufgeteilt in vitale und tote Zellen.

Tabelle 17: Verteilung der gemessenen Ereignisse anhand der Vitalitätsfärbung.

Gemessene Ereignisse	Mean ± SD	Median	Min – Max
Vitale Zellen	97,5 ± 1,0	97,6	95,1 – 98,7
Tote Zellen	2,5 ± 1,0	2,4	1,3 – 4,9

Alle Werte sind Prozentwerte der insgesamt gemessenen Ereignisse und werden als Mittelwert ± Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. *Abkürzungen: maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).*

3.1.2 Proportionale Zusammensetzung der Lymphozyten und Zytokinproduktion innerhalb der T-Lymphozyten-Populationen

3.1.2.1 Proportionale Zusammensetzung der Lymphozyten

Anschließend wurde die Zusammensetzung der Lymphozyten, wie in Abbildung 23 veranschaulicht, analysiert. Für die Gating-Strategie bezüglich CD4, CD8, CD19 und TCRγδ verweisen wir auf Abbildung 24 in Kapitel 3.1.2.2.

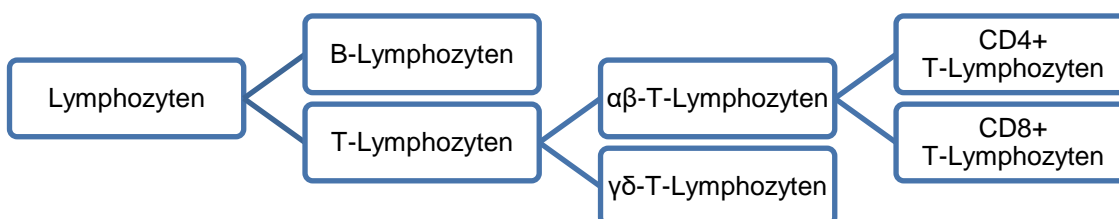


Abbildung 23: Schema zur Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen.

Markiert wurden die Oberflächenantigene CD19 (B-Lymphozyten), CD4 (CD4+ T-Lymphozyten), CD8 (CD8+ T-Lymphozyten) und TCRγδ (γδ-T-Lymphozyten). *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), positiv (+), T-Zell-Rezeptor (TCR).*

In Tabelle 18 ist die prozentuale Verteilung der Lymphozyten-Populationen dargestellt.

Tabelle 18: Proportionale Verteilung der Lymphozyten.

Lymphozyten	Mean ± SD	Median	Min – Max
B-Lymphozyten	9,7 ± 4,6	8,3	4,1 – 18,0
CD4+ T-Lymphozyten	47,4 ± 11,3	48,1	27,3 – 67,8
CD8+ T-Lymphozyten	18,1 ± 4,3	16,8	12,7 – 27,0
γδ-T-Lymphozyten	2,3 ± 1,4	1,8	0,8 – 4,9

Alle Werte sind Prozentwerte der gesamten Lymphozyten-Population und werden als Mittelwert ± Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. Bei den γδ-T- Zellen wurden die Messwerte zweier Probanden ausgeschlossen, da bei unwahrscheinlich hohen Werten von einer Fehlmessung ausgegangen wurde. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).*

Die B-Lymphozyten wurden anhand ihres Oberflächenmarkers CD19 definiert und machten im Mittel 9,7 % der Lymphozyten aus. 47,4 % der Lymphozyten waren CD4+ T-Zellen und 18,1 % waren CD8+ T-Zellen, was eine CD4/CD8-Ratio von 2,6 ergab. Die Population der $\gamma\delta$ -T-Zellen machte 2,3 % der Lymphozyten aus. Bei den $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden die Messwerte zweier Probanden von der Auswertung ausgeschlossen, da sie sich mit 15,5 % und 25,6 % der Lymphozyten für gesunde Probanden als unwahrscheinlich hoch darstellten und daher von einer Fehlmessung ausgegangen wurde [237].

3.1.2.2 Zytokinproduktion innerhalb der T-Lymphozyten-Subpopulationen

Die Zytokinproduktion der analysierten Lymphozyten-Populationen ist in Tabelle 19 gezeigt.

Tabelle 19: Zytokinproduktion innerhalb der Lymphozyten-Populationen.

	Mean \pm SD	Median	Min – Max
B-Lymphozyten			
IFN γ	1,0 \pm 1,6	0,5	0,0 – 6,0
IL-17	2,0 \pm 1,8	1,3	0,5 – 5,2
CD4+ T-Lymphozyten			
IFN γ	13,6 \pm 7,5	11,7	5,2 – 28,2
IL-17	2,4 \pm 1,5	1,8	1,0 – 5,7
IFN γ und IL-17	0,5 \pm 0,3	0,4	0,1 – 1,0
IL-10	0,3 \pm 0,2	0,2	0,1 – 0,8
CD8+ T-Lymphozyten			
IFN γ	43,8 \pm 17,4	40,0	17,9 – 69,2
IL-17	1,2 \pm 0,9	0,8	0,2 – 3,4
IFN γ und IL-17	0,5 \pm 0,4	0,4	0,0 – 1,3
IL-10	0,6 \pm 1,0	0,3	0,0 – 3,4
$\gamma\delta$-T-Lymphozyten			
IFN γ	65,8 \pm 2,03	74,5	30,6 – 90,6
IL-17	2,3 \pm 1,8	1,4	0,2 – 4,9

Alle Werte sind Prozentwerte und geben den Anteil der IFN γ -, IL-17- bzw. IL-10-produzierenden Zellen an den übergeordneten Lymphozyten-Population wieder. Sie werden als Mittelwert \pm Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. Bei den $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden die Messwerte zweier Probanden ausgeschlossen, da von einer Fehlmessung ausgegangen wurde. *Abkürzungen:* engl. cluster of differentiation (CD), Interferon (IFN), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).

Die IFN γ -Produktion war in der Population der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten mit 65,8 % am höchsten. 43,8 % der CD8+ T-Lymphozyten und 13,6 % der CD4+ T-Lymphozyten produzierten IFN γ . Bei den B-Lymphozyten war die IFN γ -Produktion mit 1,0 % gering.

IL-17 wurde von 2,4 % der CD4+ Lymphozyten und von 1,2 % der CD8+ T-Lymphozyten gebildet. In der Population der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten produzierten 2,3 % der Zellen IL-17. 2,0 % der B-Lymphozyten zeigten eine IL-17-Produktion.

0,5 % der CD4+ und der CD8+ Lymphozyten produzierten sowohl IFN γ als auch IL-17.

IL-10 wurde nur innerhalb der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten gemessen. Bei 0,6 % der CD8+ T-Lymphozyten und bei 0,3 % der CD4+ T-Lymphozyten konnte eine IL-10-Produktion nachgewiesen werden.

Abbildung 24 zeigt die Gating-Strategie der Analyse der Lymphozyten-Populationen und der Analyse der Zytokine IFN γ und IL-17 innerhalb der Lymphozyten-Populationen. Für die Gating-Strategie bezüglich der IL-10-Produktion verweisen wir auf Kapitel 3.1.4.3, Abbildung 31.

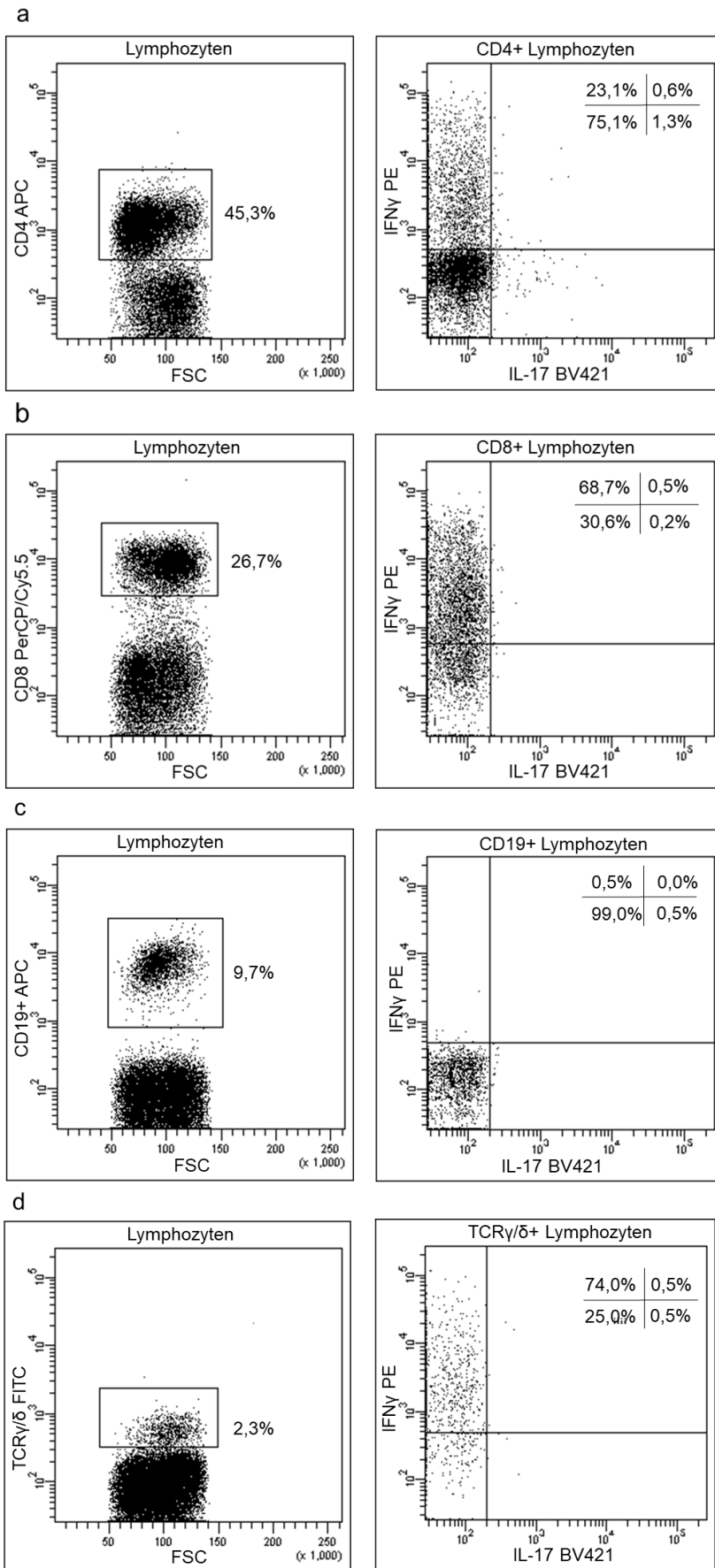


Abbildung 24: Gating-Strategie der Lymphozyten-Populationen und der Messung der Zytokine IFN γ und IL-17 innerhalb der Lymphozyten-Populationen.

Abbildung 24 a zeigt die Gating-Strategie der CD4⁺ Lymphozyten und die Zytokinproduktion innerhalb der CD4⁺ T-Lymphozyten, Abbildung 24 b die Gating-Strategie der CD8⁺ T-Lymphozyten und die Zytokinproduktion innerhalb der CD8⁺ Lymphozyten, Abbildung 24 c die Gating-Strategie der CD19⁺ B-Lymphozyten und die Zytokinproduktion innerhalb der CD19⁺ B-Lymphozyten und Abbildung 24 d die Gating-Strategie der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und die Zytokinproduktion innerhalb der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten. Die Prozentwerte stellen in den linken Dot Plots den Anteil der Lymphozyten-Population an den gesamten Lymphozyten dar und in den rechten Dot-Plots die IFN γ - und IL-17-produzierenden Zellen der jeweiligen Quadranten an der übergeordneten Lymphozyten-Population eines exemplarischen Probanden. *Abkürzungen: Allophycocyanin (APC), engl. brilliant violet (BV), engl. cluster of differentiation (CD), Cyanin (Cy), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Interferon (IFN), Interleukin (IL), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), Phycoerythrin (PE), positiv (+), T-Zell-Rezeptor (TCR), Vorwärtsstreulicht (FSC = engl. forward-scattered light).*

3.1.3 T-Zell-Differenzierung

Im Anschluss wurden die verschiedenen Lymphozyten-Subgruppen der T-Zell-Differenzierung näher betrachtet. Abbildung 25 veranschaulicht das Analyse-Schema der Subpopulationen. Die Einteilung der T-Lymphozyten in naive Zellen (N: CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺), zentrale Gedächtniszellen (CM: CD45RA⁻CCR7⁺CD27⁺), Effektor-Gedächtniszellen (EM: CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁺), Effektorzellen (Eff: CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁻) und TEMRA-Zellen (TEMRA: CD45RA⁺CCR7⁻CD27⁻) erfolgte sowohl innerhalb der CD4⁺ T-Zellen als auch innerhalb der CD8⁺ T-Zellen.

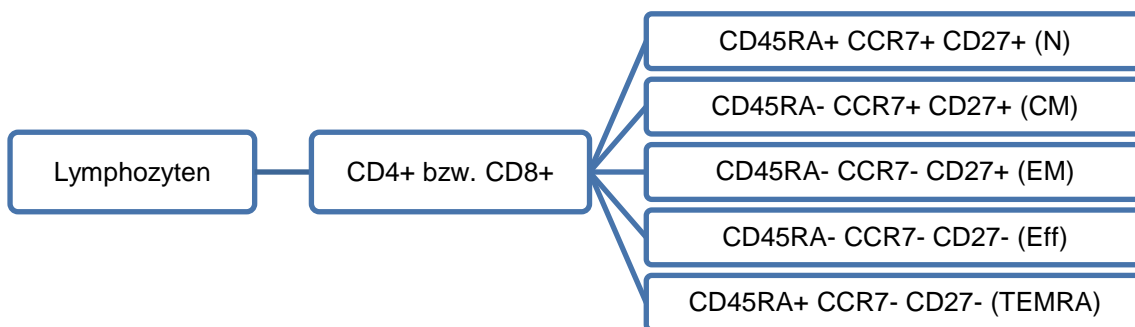


Abbildung 25: Schema zur Analyse der Subpopulationen der T-Zell-Differenzierung.

Die Einteilung der Lymphozyten in naive Zellen, zentrale Gedächtniszellen, Effektor-Gedächtniszellen, Effektorzellen und TEMRA-Zellen erfolgte anhand der Oberflächenantigene CD45RA, CCR7 und CD27 innerhalb der CD4⁺ Lymphozyten-Population und der CD8⁺ Lymphozyten-Population. *Abkürzungen: CC-Chemokinrezeptor (CCR), engl. cluster of differentiation (CD), Effektor-Gedächtniszellen (EM = engl. effector memory cells), Effektorzellen (Eff), naive Zellen (N), negativ (-), positiv (+), engl. terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA (TEMRA), zentrale Gedächtniszellen (CM = engl. central memory cells).*

Die prozentuale Verteilung der Subpopulationen ist Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: Proportionale Verteilung der Subpopulationen der T-Zell-Differenzierung.

	Mean ± SD	Median	Min – Max
CD4+ N CD45RA+ CCR7+ CD27+	26,6 ± 15,6	22,2	9,0 – 56,2
CM CD45RA- CCR7+ CD27+	14,5 ± 10,9	11,9	3,2 – 41,5
EM CD45RA- CCR7- CD27+	30,5 ± 14,4	32,3	7,1 – 56,3
Eff CD45RA- CCR7- CD27-	9,7 ± 4,6	9,3	3,5 – 17,2
TEMRA CD45RA+ CCR7- CD27-	0,3 ± 0,2	0,2	0,0 – 0,9
CD8+ N CD45RA+ CCR7+ CD27+	25,4 ± 14,4	23,8	4,7 – 45,6
CM CD45RA- CCR7+ CD27+	5,3 ± 2,9	4,7	1,7 – 10,5
EM CD45RA- CCR7- CD27+	20,0 ± 11,0	20,7	4,9 – 38,0
Eff CD45RA- CCR7- CD27-	13,5 ± 11,4	10,7	1,2 – 33,7
TEMRA CD45RA+ CCR7- CD27-	13,0 ± 8,3	12,7	2,2 – 27,5

Gezeigt ist die proportionale Verteilung der naiven Zellen, zentralen Gedächtniszellen, Effektor-Gedächtniszellen, Effektorzellen und TEMRA-Zellen innerhalb der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten anhand der Oberflächenantigene CD45RA, CCR7 und CD27. Alle Werte sind Prozentwerte der CD4+ bzw. CD8+ Lymphozyten und werden als Mittelwert ± Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. *Abkürzungen: CC-Chemokinrezeptor (CCR), engl. cluster of differentiation (CD), Effektor-Gedächtniszellen (EM = engl. effector memory cells), Effektorzellen (Eff), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), naive Zellen (N), negativ (-), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation), engl. terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA (TEMRA), zentrale Gedächtniszellen (CM = engl. central memory cells).*

Innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten waren 26,6 % der Zellen naive Zellen, 14,5 % zentrale Gedächtniszellen, 30,5 % Effektor-Gedächtniszellen, 9,7 % Effektorzellen und die TEMRA-Zellen machten mit 0,3 % den geringsten Anteil aus. Die Population der CD8+ T-Lymphozyten bestand zu 25,4 % aus naiven Zellen, zu 5,3 % aus zentralen Gedächtniszellen, zu 20,0 % aus Effektor-Gedächtniszellen, zu 13,5 % aus Effektorzellen und zu 13,0 % aus TEMRA-Zellen.

Im Folgenden wird die Gating-Strategie der naiven Zellen, zentralen Gedächtniszellen, Effektor-Gedächtniszellen, Effektorzellen und TEMRA-Zellen anhand von Dot Plots eines exemplarischen Patienten gezeigt. In Abbildung 26 ist als erster Schritt das Gating bezüglich der Oberflächenmarker CD45RA und CD27 innerhalb der CD4+ und der CD8+ T-Lymphozyten dargestellt. Für die CD45RA-Expression wurde der Cut-Off (engl. cut off = Grenzwert) so gewählt, dass nur die Zellen mit hoher CD45RA-

Expression den CD45RA+ Zellen zugeordnet wurden. Die CD45RA-intermediären Zellen fielen in die CD45RA- Population. Abbildung 27 zeigt den zweiten Schritt, der das Oberflächenmolekül CCR7 miteinbezieht, innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten. Das Gating innerhalb der CD8+ T-Lymphozyten erfolgte analog dazu.

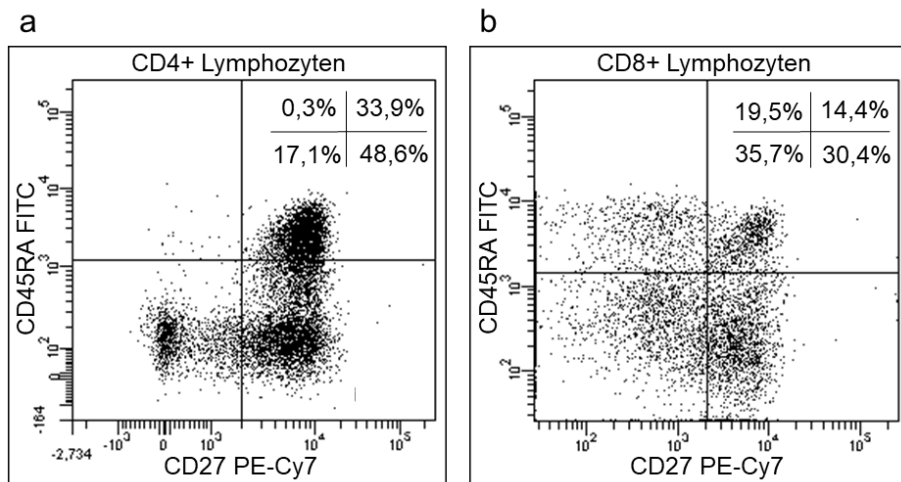


Abbildung 26: Gating-Strategie der Subpopulationen der T-Zell-Differenzierung. Schritt 1: Gating anhand der Oberflächenantigene CD45RA und CD27.

Abbildung 26 a zeigt die Unterteilung der CD4+ T-Lymphozyten und Abbildung 26 b die Unterteilung der CD8+ T-Lymphozyten anhand der Oberflächenantigene CD45RA und CD27. Die Prozentwerte stellen den Anteil der Zellen an den CD4+ bzw. CD8+ Lymphozyten eines exemplarischen Probanden in den jeweiligen Quadranten dar. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), Cyanin (Cy), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), positive (+).*

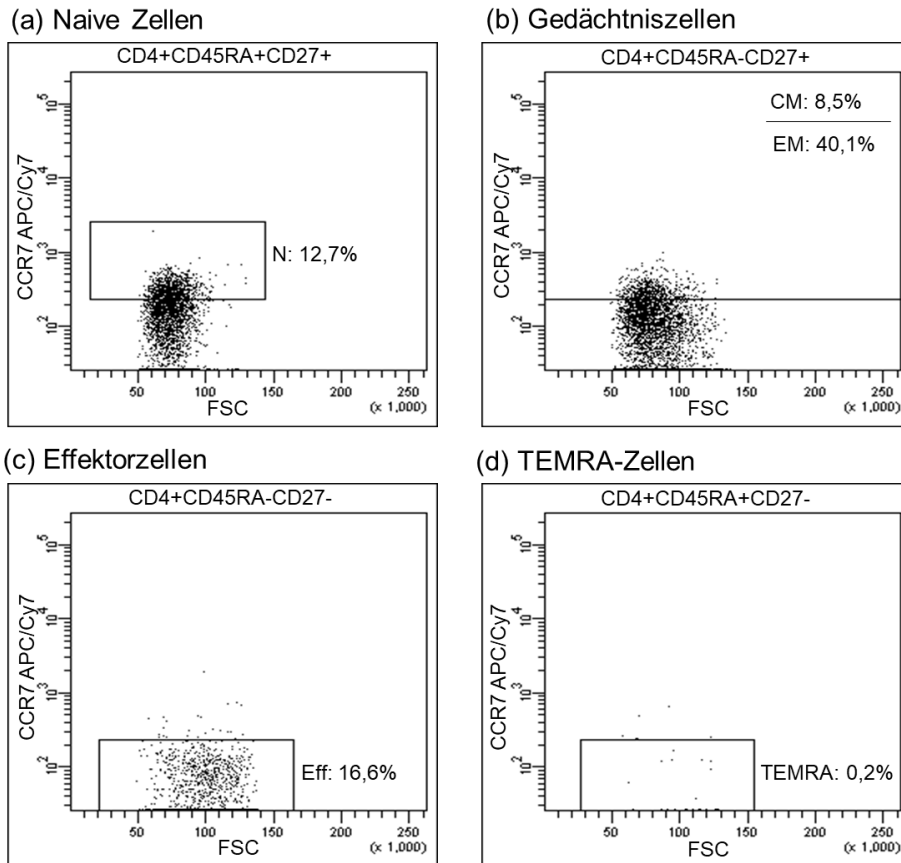


Abbildung 27: Gating-Strategie der Subpopulationen der T-Zell-Differenzierung innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten. Schritt 2: Einbeziehung des Oberflächenantigens CCR7 zusätzlich zu CD45RA und CD27. In Abbildung 27 a ist der Anteil der naiven Zellen an den CD4+ T-Lymphozyten dargestellt. Abbildung 27 b zeigt den Anteil der zentralen Gedächtniszellen und der Effektor-Gedächtniszellen an den CD4+ T-Lymphozyten. In Abbildung 27 c ist der Anteil der Effektorzellen und in Abbildung 27 d der Anteil der TEMRA-Zellen an den CD4+ Lymphozyten dargestellt. Die Prozentwerte stellen den Anteil der jeweiligen Zellpopulation an den gesamten CD4+ T-Lymphozyten eines exemplarischen Probanden dar. *Abkürzungen: Allophycocyanin (APC), engl. cluster of differentiation (CD), CC-Chemokinrezeptor (CCR), Cyanin (Cy), Effektor-Gedächtniszellen (EM = engl. effector memory cells), Effektorzellen (Eff), naive Zellen (N), negativ (-), positiv (+), engl. terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA (TEMRA), Vorwärtsstreulicht (FSC = engl. forward-scattered light), zentrale Gedächtniszellen (CM = engl. central memory cells).*

In den CD4+ und CD8+ Lymphozyten sowie den fünf Subpopulationen naive Zellen, zentrale Gedächtniszellen, Effektor-Gedächtniszellen, Effektorzellen und TEMRA-Zellen wurde die Produktion der Zytokine IFN γ und IL-17 gemessen. Tabelle 21 zeigt die erhobenen Werte.

Tabelle 21: Zytokinproduktion der Subpopulationen der T-Zell-Differenzierung.

	Mean ± SD	Median	Min – Max
CD4+			
N CD45RA+ CCR7+ CD27+			
IFN γ	1,9 ± 1,3	1,8	0,5 – 4,4
IL-17	1,6 ± 1,3	1,1	0,5 – 4,7
CM CD45RA- CCR7+ CD27+			
IFN γ	11,0 ± 5,2	10,1	3,4 – 22,2
IL-17	2,3 ± 1,9	1,7	0,0 – 5,9
EM CD45RA- CCR7- CD27+			
IFN γ	23,5 ± 8,4	22,5	9,0 – 37,7
IL-17	2,8 ± 1,6	2,4	1,4 – 6,8
Eff CD45RA- CCR7- CD27-			
IFN γ	33,6 ± 12,2	34,0	14,0 – 56,0
IL-17	5,0 ± 1,8	5,4	2,3 – 8,6
CD8+			
N CD45RA+ CCR7+ CD27+			
IFN γ	6,2 ± 3,1	6,0	3,1 – 14,5
IL-17	1,6 ± 1,5	1,0	0,0 – 4,3
CM CD45RA- CCR7+ CD27+			
IFN γ	55,6 ± 14,6	60,0	22,9 – 74,2
IL-17	1,6 ± 2,0	1,3	0,0 – 5,9
EM CD45RA- CCR7- CD27+			
IFN γ	64,5 ± 14,6	66,8	33,3 – 80,1
IL-17	1,1 ± 0,9	0,9	0,0 – 3,2
Eff CD45RA- CCR7- CD27-			
IFN γ	74,5 ± 16,9	81,6	41,7 – 87,9
IL-17	1,6 ± 1,2	1,7	0,0 – 3,6
TEMRA CD45RA+ CCR7- CD27-			
IFN γ	72,6 ± 13,5	74,1	43,6 – 86,0
IL-17	1,0 ± 1,2	0,5	0,0 – 3,2

Gezeigt ist die Zytokinproduktion der naiven Zellen, zentralen Gedächtniszellen, Effektor-Gedächtniszellen, Effektorzellen und TEMRA-Zellen innerhalb der CD4+ bzw. CD8+ Lymphozyten. Alle Werte sind Prozentwerte der übergeordneten, fett markierten, Subpopulationen und werden als Mittelwert ± Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. *Abkürzungen:* engl. cluster of differentiation (CD), CC-Chemokinrezeptor (CCR), Effektor-Gedächtniszellen (EM = engl. effector memory cells), Effektorzellen (Eff), Interferon (IFN), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), naive Zellen (N), negativ (-), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation), engl. terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA (TEMRA), zentrale Gedächtniszellen (CM = engl. central memory cells).

Die größten IFN γ - und IL-17-Produzenten innerhalb der CD4+ sowie der CD8+ T-Lymphozyten waren die Effektorzellen. Die TEMRA-Zellen wurden bislang innerhalb der CD4+ Lymphozyten nicht sicher nachgewiesen [27] und auch in unserer Studie machen sie mit 0,3 % einen sehr geringen Anteil aus. Daher lieferte die Auswertung der Zytokinproduktion für diese Zellpopulation keine aussagekräftigen Werte und ist in Tabelle 21 nicht dargestellt. Das Gating für IFN γ und IL-17 erfolgte analog zu der in Abbildung 25 dargestellten Gating-Strategie.

3.1.4 Regulatorische T-Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen

3.1.4.1 Definition der Subpopulationen

In diesem Kapitel wird die Charakterisierung der bei den Suppression-Assays verwendeten CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) und CD4+CD25-CD127- Zellen dargestellt. Da die Suppressionsfunktion und Plastizität der CD4+ T-Lymphozyten Hauptaugenmerk dieser Arbeit war, wird im Folgenden auf die Darstellung der innerhalb der CD8+ Zellpopulation gemessenen Ergebnisse verzichtet.

Der Vollständigkeit halber wurde der Phänotyp der CD4+CD25+CD127- und CD4+CD25-CD127- Zellen sowohl inklusive als auch exklusive der CD127low Zellen bestimmt. Folglich ergaben sich die in

Abbildung 28 dargestellten vier Zellpopulationen: CD4+CD25+CD127low/-, CD4+CD25+CD127-, CD4+CD25-CD127low/- und CD4+CD25-CD127-.

Zusätzlich wurde das Oberflächenantigen CD45RA in die Analyse einbezogen, da hierüber zwischen naiven und Gedächtnis- bzw. Effektor-Tregs unterschieden werden kann [117]. Innerhalb der untersuchten Populationen war die FoxP3-Expression sowie die Produktion der Zytokine IFN γ , IL-17 und IL-10 von Interesse.

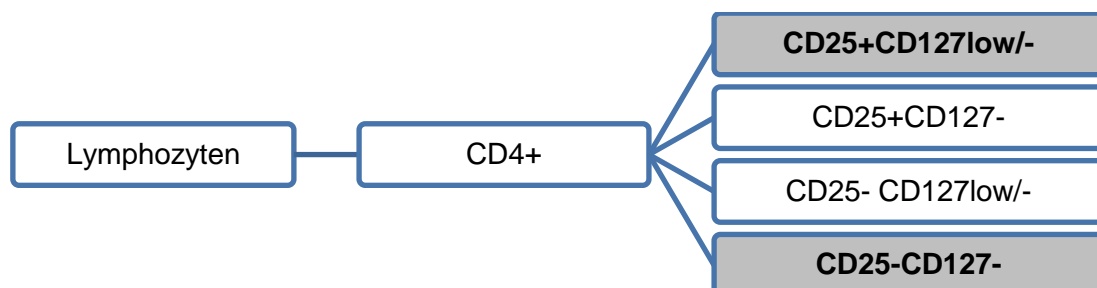


Abbildung 28: Schema zur Analyse der Subpopulationen anhand der Antigene CD4, CD25 und CD127. Die in den Suppression-Assays untersuchten Zellpopulationen sind fett markiert und grau hinterlegt. Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+).

In Tabelle 22 ist jeweils der prozentuale Anteil der verschiedenen Subpopulationen an den CD4+ Lymphozyten dargestellt.

Tabelle 22: Anteil der Treg-Subpopulationen an den CD4+ Lymphozyten.

	Mean ± SD	Median	Min – Max
CD4+ CD25+	3,4 ± 0,9	3,5	1,8 – 4,8
CD25+ CD127low/-	2,1 ± 0,6	2,0	1,4 – 3,9
CD25+ CD127-	0,7 ± 0,1	0,7	0,4 – 0,9
CD25-	96,6 ± 0,9	96,5	95,1 – 98,2
CD25- CD127low/-	20,1 ± 8,8	20,7	7,5 – 32,6
CD25- CD127-	3,2 ± 1,3	3,4	1,2 – 4,7

Gezeigt ist der proportionale Anteil der CD25+, CD25+CD127low/-, CD25+CD127-, CD25-, CD25-CD127low/- und CD25-CD127- Zellen an den CD4+ Lymphozyten. Alle Werte sind Prozentwerte und geben den Anteil der Zellen an den CD4+ Lymphozyten wieder. Sie werden als Mittelwert ± Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. Die in den Suppression-Assays untersuchten Zellpopulationen sind fett markiert und grau hinterlegt. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).*

3,4 % der CD4+ T-Lymphozyten exprimierten das Oberflächenmolekül CD25. In den Suppression-Assays wurden die Tregs als CD4+CD25+CD127low/- Zellen definiert und bezüglich ihrer Funktion untersucht. Die CD4+CD25+CD127low/- Zellpopulation schloss neben den CD127-negativen Zellen auch die Zellen ein, die einer geringe CD127-Expression zeigten. So machten die CD4+CD25+CD127low/- Zellen im Mittel 2,1 % innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten aus. Die CD4+CD25+CD127- Zellen, die nur CD127-negative Zellen beinhalteten, machten nur 0,7 % der CD4+ T-Lymphozyten aus.

96,6 % der CD4+ T-Lymphozyten waren CD25-. 20,1 % der CD4+ Zellen waren CD25- und exprimierten CD127 nicht oder nur in geringem Ausmaß (CD4+CD25-CD127low/- Zellen). Die zweite, in den Suppression-Assays untersuchte Zellpopulation war die CD4+CD25-CD127- Zellpopulation. Diese Zellen exprimierten weder CD25 noch CD127 und machten im Mittel 3,2 % der CD4+ T-Lymphozyten aus.

In Abbildung 29 ist die Gating-Strategie der CD4+ Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenantigene CD25 und CD127 dargestellt. Im vorhergegangenen Schritt waren die CD4+ T-Lymphozyten zunächst, wie in Abbildung 13 im Kapitel 2.2.5.8 dargestellt, selektioniert worden.

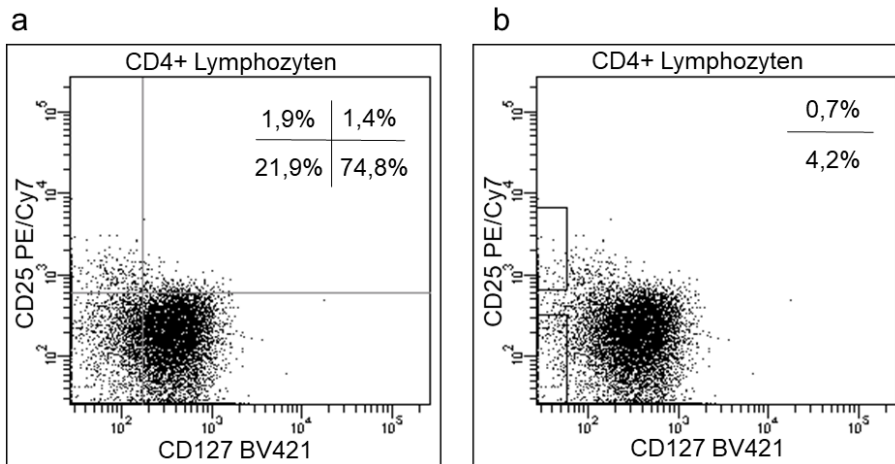


Abbildung 29: Gating-Strategie für die Oberflächenantigene CD25 und CD127 innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten.

In der in Abbildung 29 a gezeigten Gating-Strategie wurden die CD127^{low} Zellen und die CD127⁻ Zellen zusammengefasst. Die In dieser Abbildung dargestellten CD4+CD25+CD127^{low/-} Zellen im linken oberen Quadranten wurden als Tregs für die Suppression-Assays verwendet und machten im hier gezeigten Dot-Plot eines exemplarischen Probanden 1,9% der CD4+ T-Lymphozyten aus. Abbildung 29 b zeigt die Gating-Strategie, bei der die CD127^{low} Zellen nicht zur CD127⁻ Population gezählt wurden. Die sich im unteren Gate befindenden CD4+CD25⁻CD127⁻ Zellen wurden in den Suppression-Assays untersucht und machten im Dot-Plot des hier gezeigten exemplarischen Probanden 4,2 % der CD4+ T-Lymphozyten aus. Die Prozentwerte stellen den Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten bzw. Gates an der übergeordneten Lymphozyten-Population dar. *Abkürzungen: engl. brilliant violet (BV), engl. cluster of differentiation (CD), Cyanin (Cy), negativ (-), niedrig (engl. low), Phycoerythrin (PE), positiv (+), regulatorische T-Zellen (Tregs).*

3.1.4.2 Naive und Effektor- bzw. Gedächtnis- Tregs

Über den CD45RA-Status können naive von Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs unterschieden werden [117]. Der Anteil der CD45RA⁺ bzw. CD45RA⁻ Zellen an den CD4+CD25+CD127^{low/-} Zellen (Tregs) ist Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: CD45RA-Status innerhalb der CD4+CD25+CD127^{low/-} Zellen (Tregs).

		Mean ± SD	Median	Min – Max
CD4+CD25+ CD127^{low/-} (Tregs)	CD45RA ⁺	14,3 ± 7,0	11,6	7,3 – 28,3
	CD45RA ⁻	85,7 ± 7,1	88,5	71,8 – 92,8

Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Tregs, welche CD45RA⁺ bzw. CD45RA⁻ sind. Alle Werte sind Prozentwerte und werden als Mittelwert ± Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), regulatorische T-Zellen (Tregs), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).*

In unserer Studie waren 14,3 % der Tregs CD45RA+ und zählten damit zu den naiven Tregs. 85,7 % exprimierten das Oberflächenantigen CD45RA nicht und können damit den Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs zugeordnet werden.

In Abbildung 30 ist die Gating-Strategie bezüglich der CD45RA- und FoxP3-Expression innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten sowie innerhalb der CD4+CD25+CD127low/-, CD4+CD25+CD127-, CD4+CD25-CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Subpopulationen gezeigt.

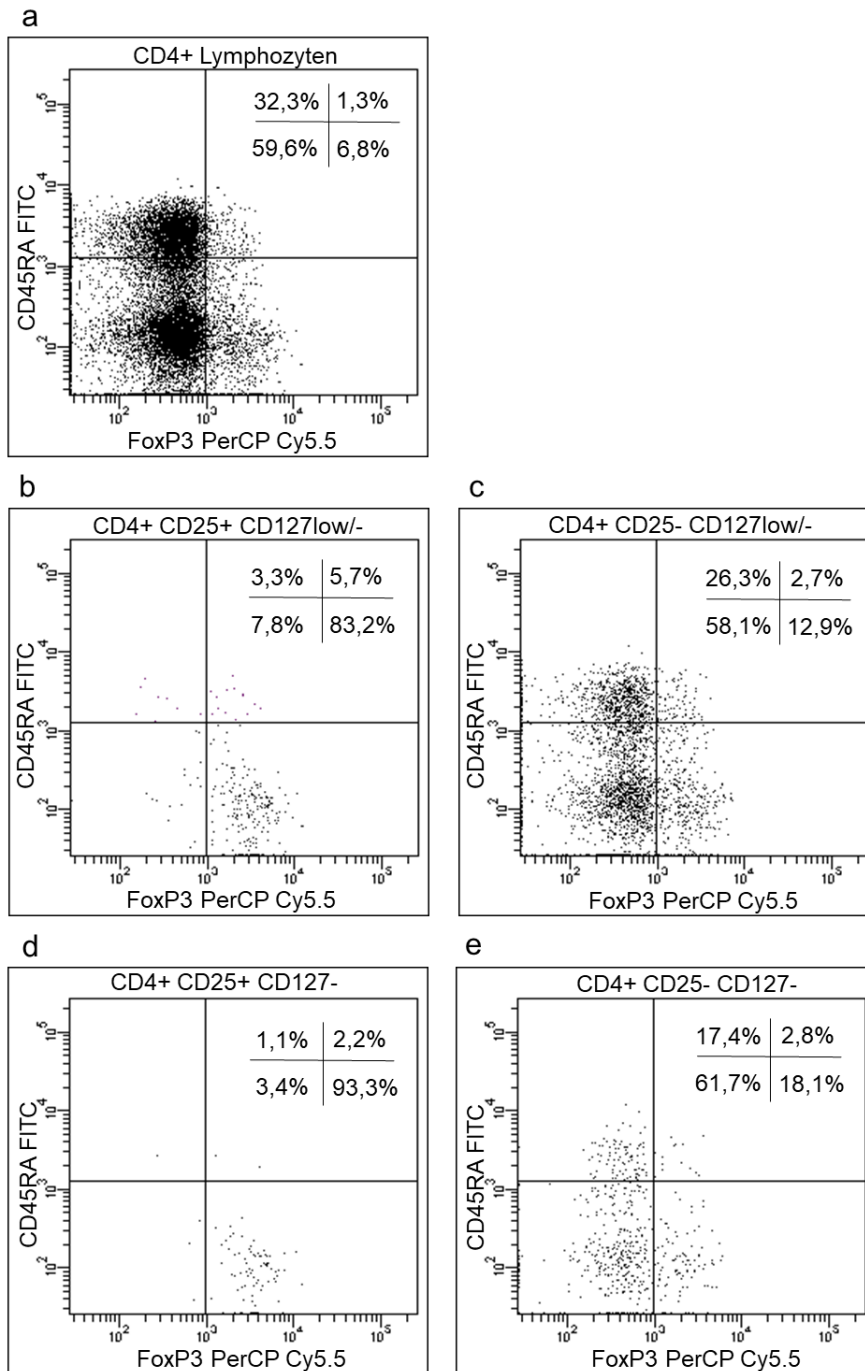


Abbildung 30: Gating-Strategie der CD4+ Lymphozyten und deren Subpopulationen für die CD45RA- und FoxP3-Expression.

Dargestellt ist die Expression von CD45RA und FoxP3 in den CD4+ Lymphozyten (a) und in den Subpopulationen CD4+CD25+CD127low/- (b) und CD4+CD25-CD127low/- (c) sowie CD4+CD25+CD127- (d) und CD4+CD25-CD127- (e) eines exemplarischen Probanden. Die Prozentwerte stellen den Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten an der übergeordneten Lymphozyten-Population dar. *Abkürzungen:* engl. cluster of differentiation (CD), Cyanin (Cy), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), negativ (-), niedrig (engl. low), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), positiv (+).

3.1.4.3 FoxP3-Expression innerhalb der Treg-Subpopulationen

In den CD4+ T-Lymphozyten sowie in deren Subpopulationen war die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 von Interesse, da dieser für die Treg-Funktion eine große Rolle spielt. Der prozentuale Anteil der FoxP3-exprimierenden Zellen innerhalb der Subpopulationen ist in Tabelle 24 gezeigt.

Tabelle 24: Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 innerhalb der Treg-Subpopulationen.

		Mean ± SD	Median	Min – Max
FoxP3+ in	CD4+	7,7 ± 2,3	7,4	4,6 – 13,4
	CD4+CD25+	53,7 ± 12,7	55,6	28,6 – 69,4
	CD4+CD25+ CD127low/-	81,4 ± 9,5	84,9	57,5 – 88,9
	CD4+CD25+ CD127-	89,4 ± 6,1	90,4	76,2 – 95,5
	CD4+CD25+CD127low/-CD45RA+	65,9 ± 19,7	68,6	28,4 – 86,8
	CD4+CD25+CD127low/-CD45RA-	83,9 ± 8,0	87,0	64,1 – 91,4
	CD4+CD25+CD127+	26,0 ± 10,6	29,4	9,1 – 42,4
	CD4+CD25-	5,9 ± 1,7	5,4	4,2 – 10,4
	CD4+CD25- CD127low/-	16,6 ± 5,5	15,2	10,2 – 29,2
	CD4+CD25- CD127-	21,0 ± 4,8	19,5	13,3 – 29,1

Gezeigt ist die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 innerhalb der CD4+ Lymphozyten sowie in deren Subpopulationen. Grau hinterlegt sind die, in den Suppression-Assays untersuchten, Zellpopulationen. Alle Werte sind Prozentwerte und geben an, welcher Anteil der jeweiligen Subpopulation FoxP3 exprimiert. Sie werden als Mittelwert ± Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).*

7,7 % der CD4+ T-Lymphozyten exprimierten den Transkriptionsfaktor FoxP3. Bei 53,7 % der CD4+CD25+ T-Lymphozyten konnte eine FoxP3-Expression nachgewiesen werden. 81,4 % der, für die Suppression-Assays isolierten CD4+CD25+CD127low/- Tregs exprimierten FoxP3. Einen noch höheren Anteil machten die FoxP3-exprimierenden Zellen mit 89,4 % in der CD4+CD25+CD127- Zellpopulation aus. Von den CD4+CD25+CD127+ Zellen exprimierten 26,0 % FoxP3. Die Zellen der Effektor- bzw. Gedächtnis-Treg-Population (CD4+CD25+CD127low/-CD45RA-) zeigten mit 83,9 % eine höhere FoxP3-Expression als die naiven Tregs (CD4+CD25+CD127low/-CD45RA+), von denen nur 65,9 % FoxP3 exprimierten.

5,9 % der CD4+CD25- Zellen und 16,6 % der CD4+CD25-CD127low/- Zellen exprimierten FoxP3. Innerhalb der in den Suppression-Assays untersuchten CD4+CD25-CD127- Zellen wiesen 21,0 % der Zellen eine FoxP3-Expression auf.

In Abbildung 31 ist die Gating-Strategie der FoxP3-Expression gegenüber der IL-10-Produktion für die Subpopulationen CD4+, CD4+CD25+CD127low/-, CD4+CD25+CD127-, CD4+CD25-CD127low/- und CD4+CD25-CD127- in Form von Dot Plots dargestellt. Auf die Ergebnisse der IL-10-Produktion wird im folgenden Kapitel eingegangen.

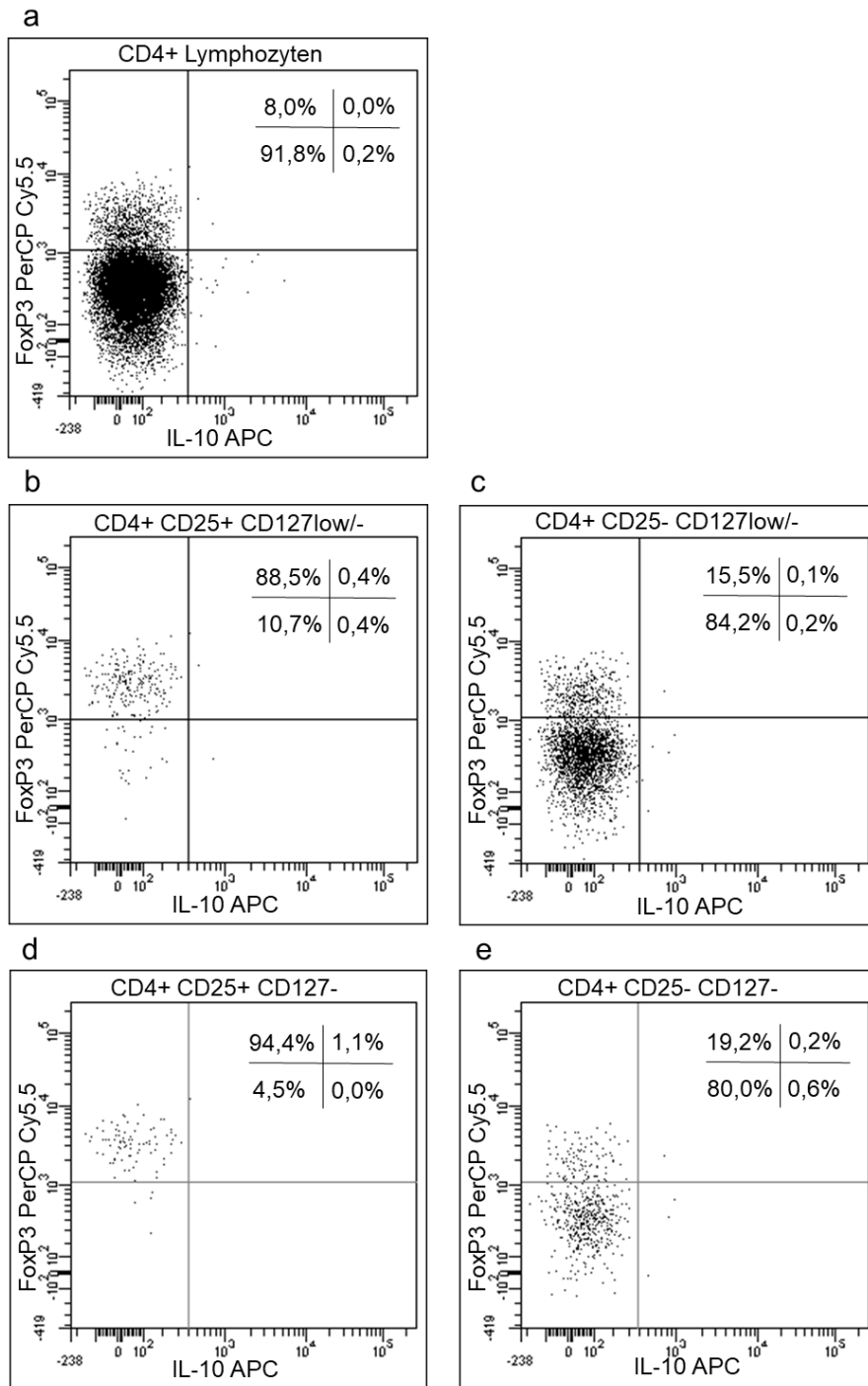


Abbildung 31: Gating-Strategie der CD4+ Lymphozyten und deren Subpopulationen für die FoxP3-Expression und die IL-10-Produktion.

Dargestellt ist die FoxP3-Expression und die IL-10-Produktion in den CD4+ Lymphozyten (a) und in den Subpopulationen CD4+CD25+CD127low/- (b) und CD4+CD25-CD127low/- (c) sowie CD4+CD25+CD127- (d) und CD4+CD25-CD127- (e) eines exemplarischen Probanden. Die Prozentwerte stellen den Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten an der übergeordneten Lymphozyten-Population dar. *Abkürzungen:* Allophycocyanin (APC), engl. cluster of differentiation (CD), Cyanin (Cy), engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), Interleukin (IL), negativ (-), niedrig (engl. low), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), positiv (+).

Die Unterschiede bezüglich der FoxP3-Expression ausgewählter Subpopulationen wurden mittels Wilcoxon-Rank-Test verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Vergleich der FoxP3-Expression innerhalb der Treg-Subpopulationen.

								p-Wert
	Mean ± SD	Median	Min – Max		Mean ± SD	Median	Min – Max	
FoxP3-Expression								
CD4+CD25+ CD127low/-	81,4 ± 9,5	84,9	57,5 – 88,9	CD4+CD25- CD127-	21,0 ± 4,8	19,5	13,3 – 29,1	0,001 **
CD4+CD25+ CD127low/-	81,4 ± 9,5	84,9	57,5 – 88,9	CD4+CD25+ CD127-	89,4 ± 6,1	90,4	76,2 – 95,5	0,001 **
CD4+CD25- CD127low/-	16,6 ± 5,5	15,2	10,2 – 29,2	CD4+CD25- CD127-	21,0 ± 4,8	19,5	13,3 – 29,1	0,002 **
CD4+CD25+ CD127low/-	81,4 ± 9,5	84,9	57,5 – 88,9	CD4+CD25+ CD127+	26,0 ± 10,6	29,4	9,1 – 42,4	0,004 **
CD4+CD25+ CD127low/- CD45RA+	65,9 ± 19,7	68,6	28,4 – 86,8	CD4+CD25+ CD127low/- CD45RA-	83,9 ± 8,0	87,0	64,1 – 91,4	0,005 **

Dargestellt sind die Ergebnisse des Wilcoxon-Rank-Testes, die durch den Vergleich der FoxP3-Expression in den genannten Subpopulationen generiert wurden. Jede Zeile zeigt den Vergleich der FoxP3-Expression zwischen zwei Subpopulationen, jeweils in Prozent mit Mittelwert ± Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum. Die p-Werte sind in der letzten Spalte dargestellt und mit Sternchen markiert und grau hinterlegt, sofern eine signifikant unterschiedliche FoxP3-Expression zwischen den beiden Populationen vorlag. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), regulatorische T-Zelle (Treg), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).*

Zunächst wurde die FoxP3-Expression in den beiden, in den Suppression-Assays verwendeten Zellpopulationen miteinander verglichen. Die CD4+CD25+CD127low/- Zellen exprimierten mit 81,4 % signifikant mehr FoxP3 als die CD4+CD25-CD127- Zellen, von denen nur 21,0 % FoxP3 exprimierten (p = 0,001). Beim Vergleich der CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit den CD4+CD25+CD127- Zellen zeigte sich, dass ein Einschluss der CD127low-Zellen in die Population zu einer signifikant geringeren FoxP3-Expression führte (p = 0,001). Ebenso zeigte sich in der CD4+CD25-CD127low/- Zellpopulation eine signifikant geringere FoxP3-Expression als in der CD4+CD25-CD127- Zellpopulation (p = 0,002). Der Zusammenhang zwischen der

Expression des Oberflächenmoleküls CD127 und der FoxP3-Expression wurde beim Vergleich der CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit den CD4+CD25+CD127+ Zellen deutlich. Hier zeigen die Zellen mit niedriger und fehlender CD127-Expression eine mit 81,4 % signifikant höhere FoxP3-Expression als die CD127+ Zellen, von denen nur 26,0 % FoxP3 exprimieren ($p = 0,004$). Zudem analysierten wir die FoxP3-Expression innerhalb der Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs und der naiven Tregs. Hier zeigten die CD45RA- Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs mit 83,9 % eine signifikant höhere FoxP3-Expression als die CD45RA+ naiven Tregs, von denen nur 65,9 % FoxP3 exprimierten ($p = 0,005$).

Graphisch veranschaulicht ist der Vergleich der FoxP3-Expression in Abbildung 32.

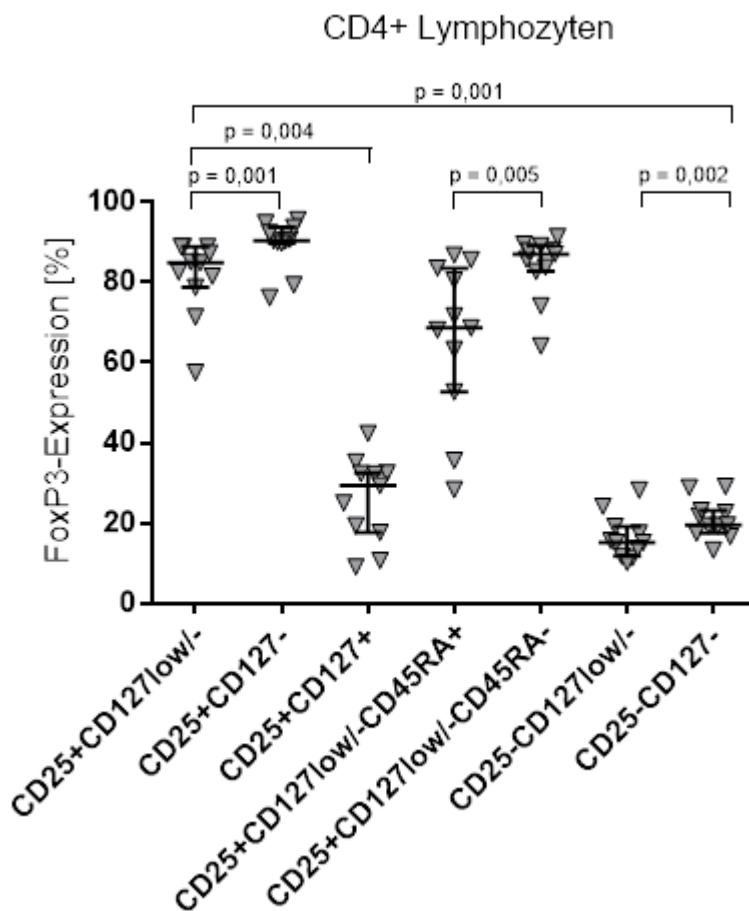


Abbildung 32: Vergleich der FoxP3-Expression innerhalb der jeweiligen Subpopulationen.

Verglichen wurde die FoxP3-Expression zwischen den jeweiligen Subpopulationen. Auf der Y-Achse ist der Anteil der FoxP3-exprimierenden Zellen innerhalb der jeweiligen Subpopulation in Prozent dargestellt. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Subpopulationen innerhalb der CD4+ Lymphozyten aufgetragen. Für die signifikanten Unterschiede bezüglich der FoxP3-Expression in den jeweiligen Zellpopulationen sind die p-Werte angegeben. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), engl. forkhead box protein 3 (FoxP3), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+).*

3.1.4.4 Zytokinproduktion innerhalb der Treg-Subpopulationen

Es wurde die Zytokinproduktion der Subpopulationen CD4+CD25+CD127low/-, CD4+CD25+CD127-, CD4+CD25-CD127low/- und CD4+CD25-CD127- gemessen. IL-10 ist dabei ein klassisches anti-inflammatorisches Zytokin, während IFN γ ein Schlüsselzytokin von Th1 Zellen und IL-17 von Th17 darstellt [150] [65] [53] [70]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Zytokinproduktion innerhalb der Treg-Subpopulationen.

		Mean \pm SD	Median	Min – Max
CD4+CD25+CD127low/-	IFN γ	2,8 \pm 1,7	2,4	0,6 – 5,7
	IL-17	1,9 \pm 0,9	1,8	0,6 – 3,3
	IL-10	0,5 \pm 0,3	0,5	0,0 – 0,8
CD4+CD25+CD127-	IFN γ	1,0 \pm 1,3	0,0	0,0 – 3,6
	IL-17	0,9 \pm 1,5	0,0	0,0 – 4,8
	IL-10	0,3 \pm 0,5	0,0	0,0 – 1,1
CD4+CD25-CD127low/-	IFN γ	8,2 \pm 5,1	6,0	2,1 – 17,4
	IL-17	1,6 \pm 0,9	1,4	0,7 – 3,0
	IL-10	0,3 \pm 0,2	0,3	0,1 – 0,7
CD4+CD25-CD127-	IFN γ	10,1 \pm 6,9	8,2	2,9 – 23,7
	IL-17	1,9 \pm 1,2	1,8	0,4 – 4,8
	IL-10	0,5 \pm 0,5	0,4	0,0 – 1,5

Gezeigt ist die Zytokinproduktion innerhalb der Subpopulationen CD4+CD25+CD127low/-, CD4+CD25+CD127-, CD4+CD25-CD127low/- und CD4+CD25-CD127-. Grau hinterlegt sind die in den Suppression-Assays untersuchten Zellpopulationen. Alle Werte sind Prozentwerte und geben an, welcher Anteil der jeweiligen Subpopulation das entsprechende Zytokin produziert. Sie werden als Mittelwert \pm Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. *Abkürzungen:* engl. cluster of differentiation (CD), Interferon (IFN), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), regulatorische T-Zelle (Treg), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).

Innerhalb der isolierten Tregs (CD4+CD25+CD127low/-) produzierten 2,8 % der Zellen IFN γ , 1,9 % produzierten IL-17 und 0,5 % wiesen eine IL-10-Produktion auf. Die CD4+CD25-CD127- Zellen wiesen eine IFN γ -Produktion von 10,1 %, eine IL-17-Produktion von 1,9 % und eine IL-10-Produktion von 0,5 % auf.

Die Gating-Strategie von IFN γ und IL-17 ist in Abbildung 33 dargestellt. Die Gating-Strategie für IL-10 ist im vorangegangenen Kapitel 3.1.4.3 in Abbildung 31 gegenüber der FoxP3-Expression aufgetragen.

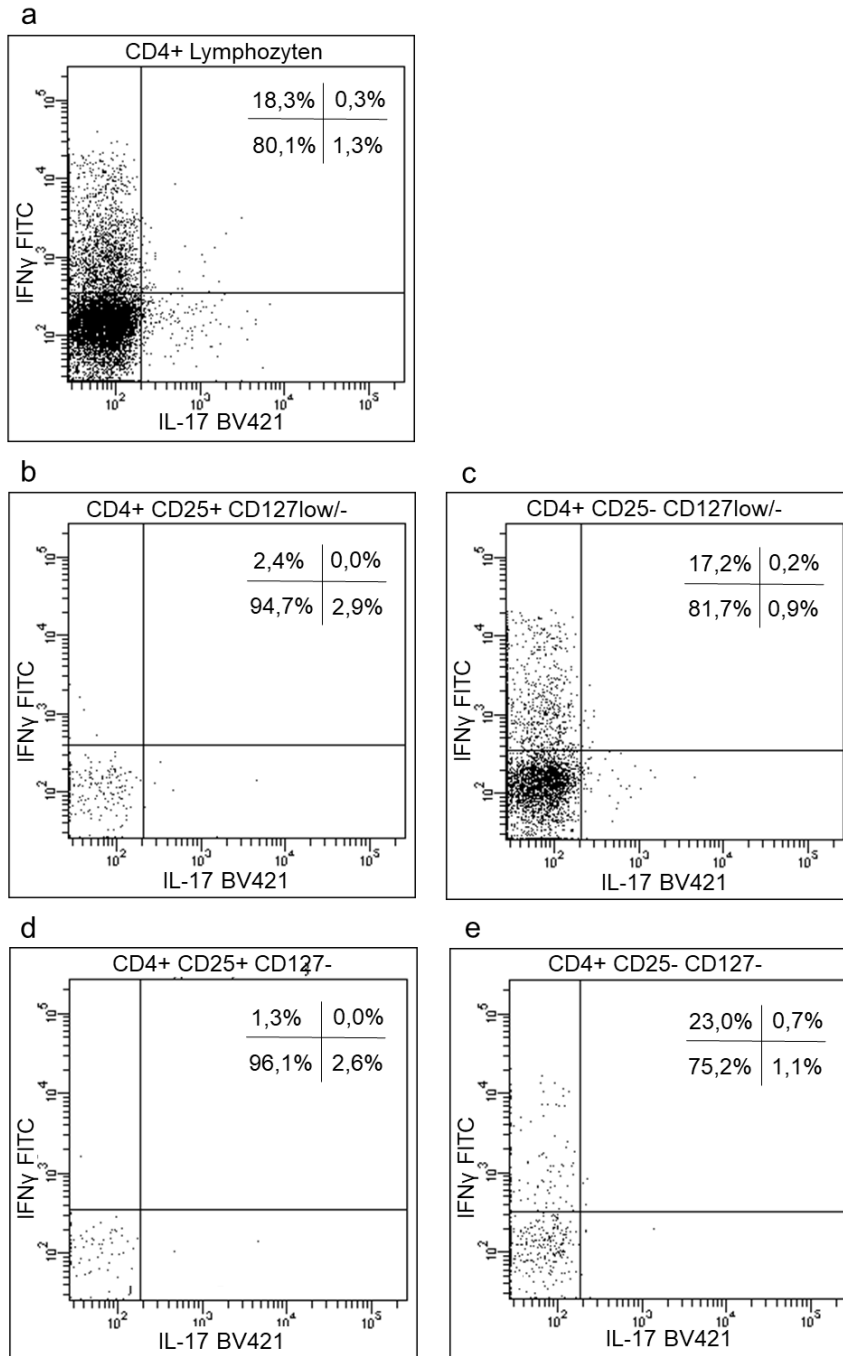


Abbildung 33: Gating-Strategie der CD4+ Lymphozyten und deren Subpopulationen für IFN γ und IL-17. Dargestellt ist die IFN γ - und die IL-17-Produktion in den CD4+ Lymphozyten (a) sowie in den Subpopulationen CD4+CD25+CD127low/- (b), CD4+CD25-CD127low/- (c), CD4+CD25+CD127- (d) und CD4+CD25-CD127- (e) eines exemplarischen Probanden. Die Prozentwerte stellen den Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten an der übergeordneten Lymphozyten-Population dar. *Abkürzungen: engl. brilliant violet (BV), engl. cluster of differentiation (CD), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Interferon (IFN), Interleukin (IL), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+).*

Die Zytokinproduktion ausgewählter Subpopulationen wurden mittels Wilcoxon-Rank-Test verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Vergleich der Zytokinproduktion innerhalb der Treg-Subpopulationen.

								p-Wert
	Mean ± SD	Median	Min – Max		Mean ± SD	Median	Min – Max	
IFNγ-Produktion								
CD4+CD25+ CD127low/-	2,8 ± 1,7	2,4	0,6 – 5,7	CD4+CD25- CD127-	10,1 ± 6,9	8,2	2,9 – 23,7	0,001 **
CD4+CD25+ CD127low/-	2,8 ± 1,7	2,4	0,6 – 5,7	CD4+CD25+ CD127-	1,0 ± 1,3	0,0	0,0 – 3,6	0,005 **
CD4+CD25- CD127low/-	8,2 ± 5,1	6,0	2,1 – 17,4	CD4+CD25- CD127-	10,1 ± 6,9	8,2	2,9 – 23,7	0,148
IL-17-Produktion								
CD4+CD25+ CD127low/-	1,9 ± 0,9	1,8	0,6 – 3,3	CD4+CD25- CD127-	1,9 ± 1,2	1,8	0,4 – 4,8	0,594
CD4+CD25+ CD127low/-	1,9 ± 0,9	1,8	0,6 – 3,3	CD4+CD25+ CD127-	0,9 ± 1,5	0,0	0,0 – 4,8	0,023 *
CD4+CD25- CD127low/-	1,6 ± 0,9	1,4	0,7 – 3,0	CD4+CD25- CD127-	1,9 ± 1,2	1,8	0,4 – 4,8	0,610
IL-10-Produktion								
CD4+CD25+ CD127low/-	0,5 ± 0,3	0,5	0,0 – 0,8	CD4+CD25- CD127-	0,5 ± 0,5	0,4	0,0 – 1,5	0,735
CD4+CD25+ CD127low/-	0,5 ± 0,3	0,5	0,0 – 0,8	CD4+CD25+ CD127-	0,3 ± 0,5	0,0	0,0 – 1,1	0,057
CD4+CD25- CD127low/-	0,3 ± 0,2	0,3	0,1 – 0,7	CD4+CD25- CD127-	0,5 ± 0,5	0,4	0,0 – 1,5	0,264

Dargestellt sind die Ergebnisse des Wilcoxon-Rank-Testes, die durch den Vergleich Zytokinproduktion in den genannten Subpopulationen generiert wurden. Jede Zeile zeigt den Vergleich der Zytokinproduktion zwischen zwei Subpopulationen, jeweils in Prozent mit Mittelwert ± Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum. Die p-Werte sind in der letzten Spalte dargestellt und mit Sternchen markiert und grau hinterlegt, sofern eine signifikant unterschiedliche Zytokinproduktion vorlag. Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), Interferon (IFN), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), regulatorische T-Zelle (Treg), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).

Zunächst wurde die Zytokinproduktion in den beiden in den Suppression-Assays untersuchten Zellpopulationen miteinander verglichen. Die CD4+CD25+CD127low/- Zellen produzierten mit 2,8 % signifikant weniger IFN γ als die CD4+CD25-CD127- Zellen, von denen 10,1 % IFN γ produzierten ($p = 0,001$). Für die Zytokine IL-17 und IL-10 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den CD4+CD25+CD127low/- Zellen

und den CD4+CD25-CD127- Zellen. Beim Vergleich der CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit den CD4+CD25+CD127- Zellen zeigte sich, dass ein Einschluss der CD127low- Zellen in die Population zu einer signifikant höheren Produktion von IFN γ ($p = 0,005$) und IL-17 ($p = 0,023$) führte. Für den Vergleich der IL-10-Produktion innerhalb der beiden Populationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Der Vergleich der Zytokinproduktion zwischen den CD4+CD25-CD127low/- und den CD4+CD25-CD127- Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Graphisch veranschaulicht ist der Vergleich der IFN γ -Produktion in Abbildung 34, der Vergleich der IL-17-Produktion in Abbildung 35 und der Vergleich der IL-10-Produktion in Abbildung 36.

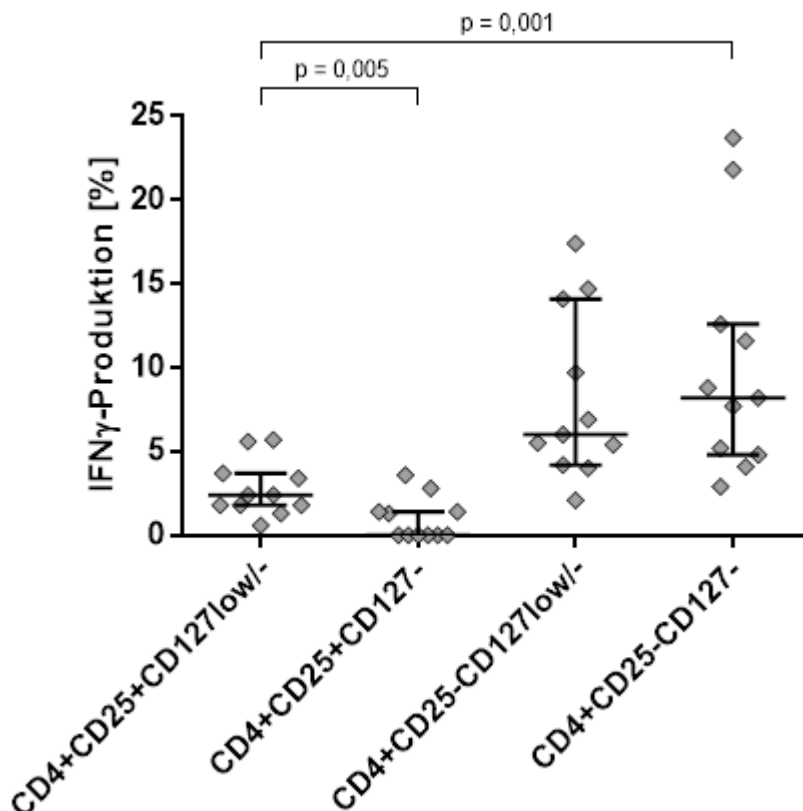


Abbildung 34: Vergleich der intrazellulären IFN γ -Produktion innerhalb der Treg-Subpopulationen. Verglichen wurde die IFN γ -Produktion zwischen den jeweiligen Subpopulationen. Auf der Y-Achse ist der Anteil der IFN γ -produzierenden Zellen an der jeweiligen Subpopulationen in Prozent dargestellt. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Subpopulationen innerhalb der CD4+ Lymphozyten aufgetragen. Für die signifikanten Unterschiede bezüglich der IFN γ -Produktion in den jeweiligen Zellpopulationen sind die p-Werte angegeben. *Abkürzungen:* engl. cluster of differentiation (CD), Interferon (IFN), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+).

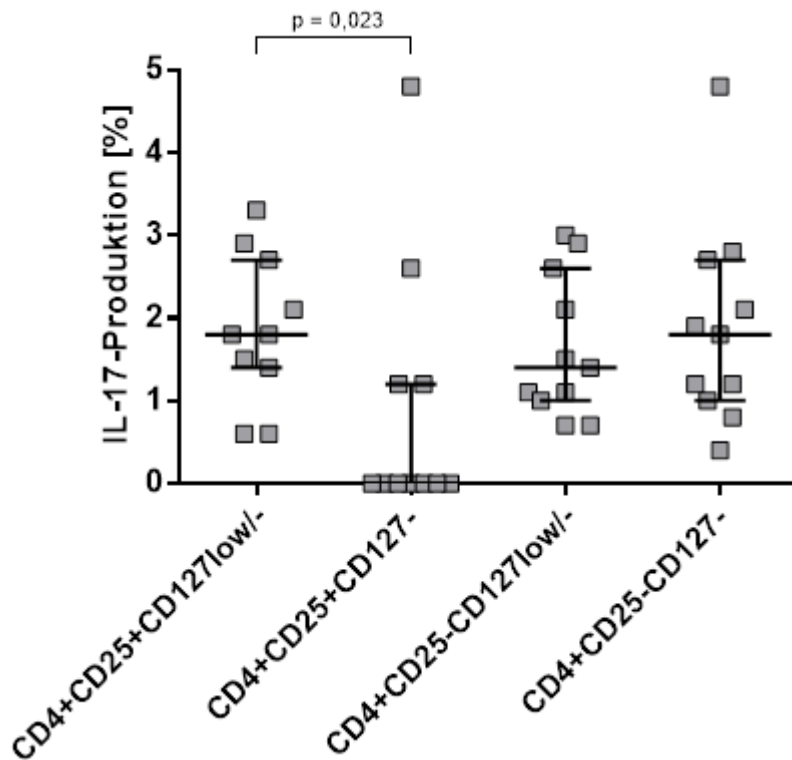


Abbildung 35: Vergleich der intrazellulären IL-17-Produktion innerhalb der Treg-Subpopulationen. Verglichen wurde die IL-17-Produktion zwischen den jeweiligen Subpopulationen. Auf der Y-Achse ist der Anteil der IL-17-produzierenden Zellen an der jeweiligen Subpopulationen in Prozent dargestellt. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Subpopulationen innerhalb der CD4+ Lymphozyten aufgetragen. Für den signifikanten Unterschied bezüglich der IL-17-Expression zwischen den CD4+CD25+CD127low/- Zellen und den CD4+CD25+CD127- Zellen ist der p-Wert angegeben. Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), Interleukin (IL), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+).

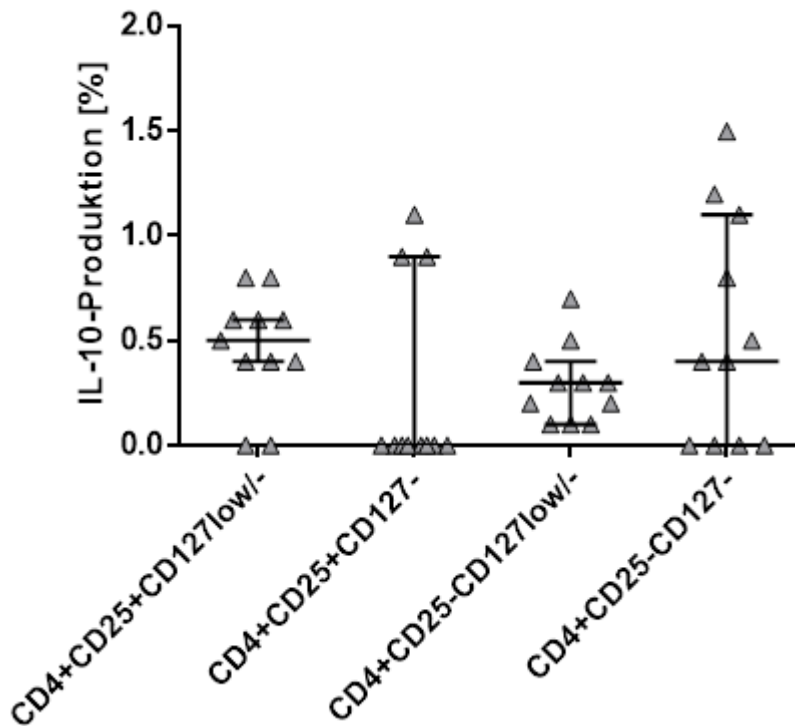


Abbildung 36: Vergleich der intrazellulären IL-10-Produktion innerhalb der Treg-Subpopulationen. Verglichen wurde die IL-10-Produktion zwischen den jeweiligen Subpopulationen. Auf der Y-Achse ist der Anteil der IL-10-produzierenden Zellen an der jeweiligen Subpopulationen in Prozent dargestellt. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Subpopulationen innerhalb der CD4+ Lymphozyten aufgetragen. Bezüglich der IL-10-Produktion ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), Interleukin (IL), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+).*

3.1.5 Chemokinrezeptoren und CD161

Es wurden die Expression der extrazellulären Domäne der Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR6 und CCR5 sowie die Expression des Oberflächenmoleküls CD161 analysiert. Auf die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 wurde in Kapitel 3.1.3 im Rahmen der T-Zell-Differenzierung eingegangen. CXCR3 und CCR5 sind dabei typische Chemokinrezeptoren für Th1 Zellen, CCR6+ für den Th17 Phänotyp und CD161+ wird mit Th17/Th1-Zellen assoziiert [28] [86] [91]. In Tabelle 28 ist der Anteil der Zellen, die die einzelnen Chemokinrezeptoren bzw. den Marker CD161 exprimieren, an den gesamten CD4+ bzw. CD8+ Lymphozyten dargestellt.

Tabelle 28: Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR6 und CCR5 sowie des Oberflächenmoleküls CD161.

		Mean ± SD	Median	Min – Max
CD4+	CXCR3+	6,5 ± 4,7	5,5	0,3 – 14,3
	CCR5+	2,3 ± 0,7	2,1	1,2 – 3,6
	CCR6+	17,5 ± 9,5	16,9	5,0 – 38,9
	CD161+	9,0 ± 3,5	9,1	3,0 – 13,4
CD8+	CXCR3+	21,5 ± 10,7	24,1	0,8 – 31,7
	CCR5+	49,4 ± 20,0	45,5	27,0 – 97,6
	CCR6+	10,0 ± 4,0	10,1	4,2 – 16,5
	CD161+	4,1 ± 3,3	2,6	1,5 – 12,8

Gezeigt ist die Expression der extrazellulären Domäne der Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR6 und CCR5 sowie des Oberflächenmoleküls CD161 innerhalb der CD4+ bzw. der CD8+ Zellen. Alle Werte sind Prozentwerte und geben an, welcher Anteil der CD4+ bzw. der CD8+ Zellen den angegebenen Marker exprimiert. Sie werden als Mittelwert ± Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), CC-Chemokinrezeptor (CCR), CXC-Chemokinrezeptor (CXCR), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), naive Zellen (N), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).*

Innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten exprimierten 6,5 % der Zellen den Chemokinrezeptor CXCR3. 2,3 % der CD4+ T-Lymphozyten exprimierten CCR5. Bei 17,5 % der CD4+ T-Lymphozyten konnten wir eine CCR6-Expression nachweisen und bei 9,0 % der CD4+ T-Lymphozyten eine Expression von CD161.

Die Expression von CXCR3 innerhalb der CD8+ T-Lymphozyten lag bei 21,5 %. Der Chemokinrezeptor CCR5 wurde von 49,4 % der CD8+ T-Lymphozyten exprimiert. 10,0 % der CD8+ T-Lymphozyten exprimierten CCR6 und bei 4,1 % der CD8+ T-Lymphozyten konnten wir die Expression des Oberflächenmarkers CD161 messen.

Tabelle 29 zeigt die Produktion der Zytokine IFN γ und IL-17 in den jeweiligen Chemokinrezeptor-tragenden Subpopulationen.

Tabelle 29: Zytokinproduktion innerhalb der Chemokinrezeptor-tragenden und CD161-exprimierenden Zellen.

		Mean ± SD	Median	Min – Max
CD4+	CXCR3+			
	IFN γ	32,6 ± 11,6	42,6	20,0 – 62,2
	IL-17	2,7 ± 2,0	2,2	0,0 – 6,3
	CCR5+			
	IFN γ	23,8 ± 12,0	22,2	4,8 – 43,5
	IL-17	3,8 ± 2,6	3,7	0,0 – 8,3
	CCR6+			
	IFN γ	22,0 ± 9,6	21,8	6,9 – 38,8
	IL-17	5,6 ± 1,3	5,9	3,7 – 8,3
	CD161+			
IFN γ	31,2 ± 12,3	32,3	13,0 – 54,4	
IL-17	6,0 ± 2,5	5,2	3,0 – 10,5	
CD8+	CXCR3+			
	IFN γ	42,6 ± 15,7	39,8	20,0 – 66,1
	IL-17	2,5 ± 4,0	1,3	0,0 – 14,3
	CCR5+			
	IFN γ	36,3 ± 16,3	35,8	13,4 – 59,4
	IL-17	0,9 ± 0,6	0,6	0,2 – 1,8
	CCR6+			
	IFN γ	44,4 ± 17,4	40,2	19,0 – 73,3
	IL-17	1,7 ± 0,7	1,9	0,8 – 2,4
	CD161+			
IFN γ	62,0 ± 18,8	60,0	21,2 – 84,0	
IL-17	1,6 ± 2,0	0,0	0,0 – 5,6	

Gezeigt ist der Anteil der IFN γ bzw. IL-17-produzierenden Zellen an den Chemokinrezeptor-tragenden und CD161-exprimierenden CD4+ bzw. CD8+ T-Lymphozyten. Alle Werte sind Prozentwerte und geben an, welcher Anteil der Zellen das angegebene Zytokin produzierte. Sie werden als Mittelwert ± Standardabweichung, Median, minimaler und maximaler Wert angegeben. *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), CC-Chemokinrezeptor (CCR), CXC-Chemokinrezeptor (CXCR), Interferon (IFN), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), Mittelwert (engl. Mean), minimaler Wert (Min), naive Zellen (N), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).*

Bei den CD4+ T-Lymphozyten war die IFN γ -Produktion mit 32,6 % am höchsten innerhalb der CD4+CXCR3+ Zellen, gefolgt von 31,2 % innerhalb der CD4+CD161+ Zellen. 23,8 % der CD4+CCR5+ Zellen und 22,0 % der CD4+CCR6+ Zellen produzierten IFN γ . Die IL-17-Produktion war mit 6,0 % am höchsten innerhalb der CD4+CD161+ Zellen, gefolgt von 5,6 % innerhalb der CD4+CCR6+ Zellen. 3,8 % der CD4+CCR5+ Zellen und 2,7 % der CD4+CXCR3+ Zellen zeigten eine IL-17-Produktion.

Innerhalb der CD8+ T-Lymphozyten zeigten die CD8+CD161+ Zellen mit 62,0 % die höchste IFN γ -Produktion. 44,4 % der CD8+CCR6+ Zellen, 42,6 % der CD8+CXCR3+ Zellen und 36,3 % der CD8+CCR5+ Zellen produzierten IFN γ . IL-17 wurde von 2,5 % der CD8+CXCR3+ Zellen, von 1,7 % der CD8+CCR6+ Zellen, von 1,6 % der CD8+CD161+ Zellen und von 0,9 % der CD8+CCR5+ Zellen produziert.

In Abbildung 37 ist die Gating-Strategie der untersuchten Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR5 und CCR6 innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten und die Zytokinproduktion von IFN γ und IL-17 innerhalb der Chemokinrezeptor-tragenden Subpopulationen dargestellt. Das Gating innerhalb der CD8+ T-Lymphozyten erfolgte analog dazu.

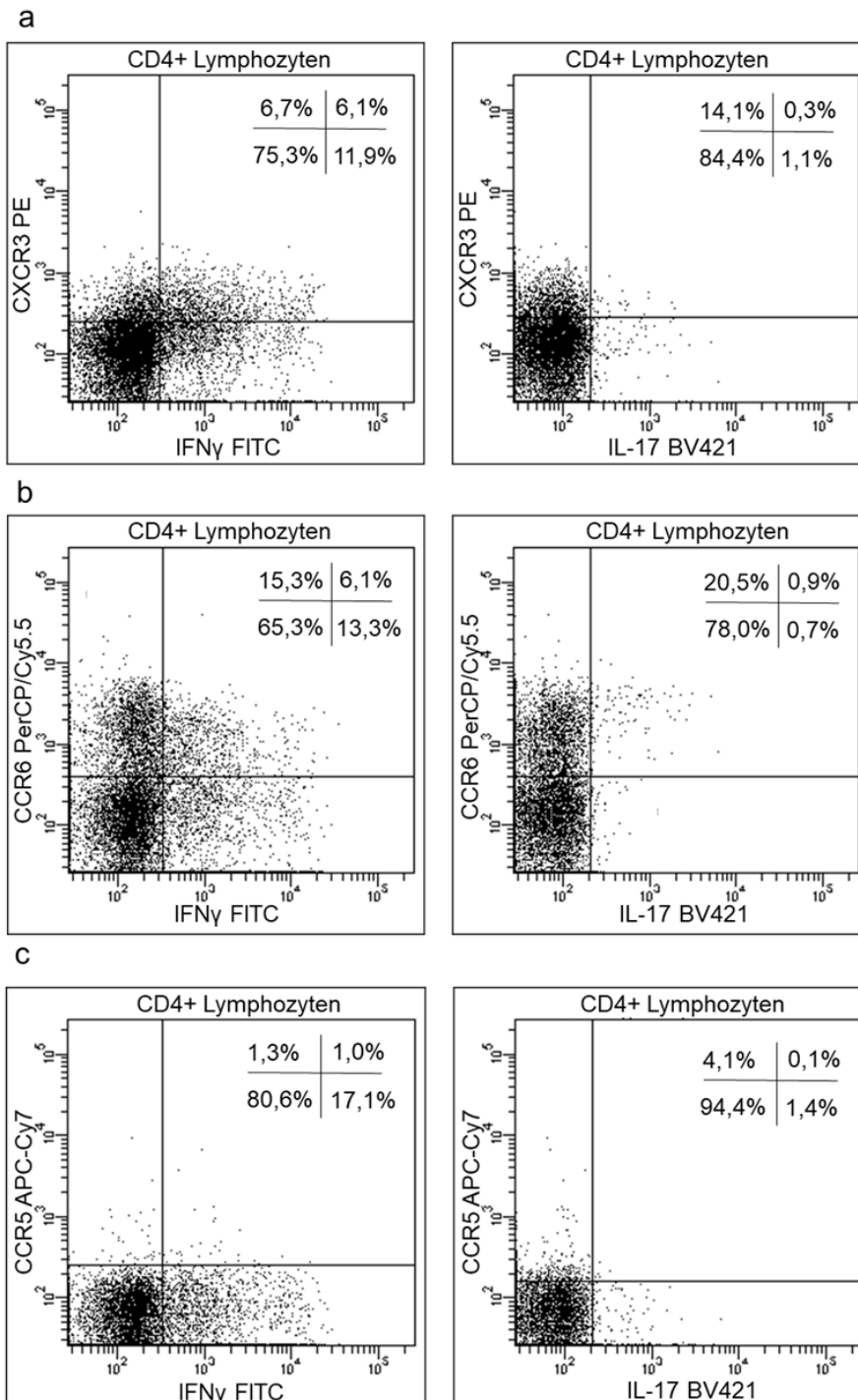


Abbildung 37: Gating-Strategie der Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR6 und CCR5 in Verbindung mit den Zytokinen IFN γ und IL-17 innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten.

Abbildung 37 a zeigt die Gating-Strategie für CXCR3, IFN γ und IL-17, Abbildung 37 b die Gating-Strategie für CCR6, IFN γ und IL-17 und Abbildung 37 c die Gating-Strategie für CCR5, IFN γ und IL-17. Die Prozentwerte stellen den Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten an den CD4+ T-Lymphozyten eines exemplarischen Probanden dar. *Abkürzungen: Allophycocyanin (APC), engl. cluster of differentiation (CD), CC-Chemokinrezeptor (CCR), CXC-Chemokinrezeptor (CXCR), Cyanin (Cy), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Interferon (IFN), Interleukin (IL), positiv (+).*

Abbildung 38 zeigt die Gating-Strategie für das Oberflächenmolekül CD161 innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten und die Produktion von IFN γ und IL-17 innerhalb der CD4+CD161+ Zellpopulation. Das Gating von CD161 erfolgte in der CD8+ Zellpopulation analog dazu.

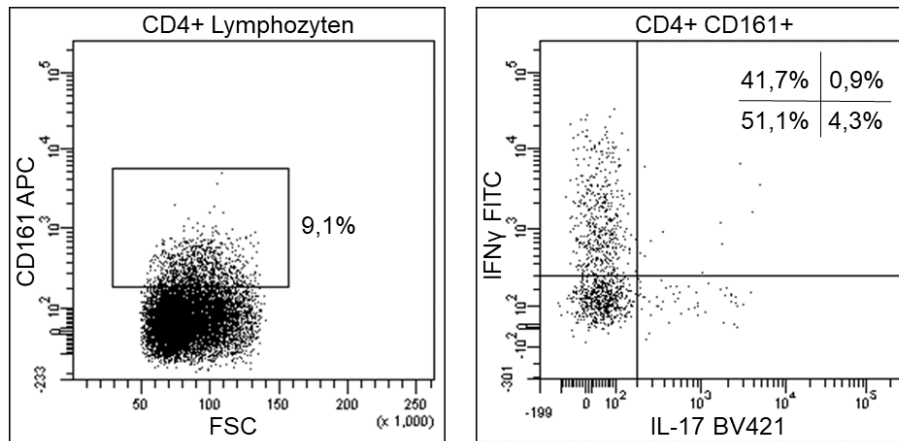


Abbildung 38: Gating-Strategie des Oberflächenmoleküls CD161 innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten und der Zytokinproduktion von IFN γ und IL-17 innerhalb der CD4+CD161+ Zellen.

Die Prozentwerte stellen den Anteil der Zellen im Gate bzw. in den jeweiligen Quadranten an der übergeordneten Lymphozyten-Population eines exemplarischen Probanden dar. Abkürzungen: Allophycocyanin (APC), engl. brilliant violet (BV), engl. cluster of differentiation (CD), Fluoresceinisothiocyant (FITC), Interferon (IFN), Interleukin (IL), positiv (+), Vorwärtstreulich (FSC = engl. forward-scattered light).

3.2 Polarisierung und Funktionsuntersuchung regulatorischer T-Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen mittels Suppression-Assays

Die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen wurde anhand ihrer Fähigkeit gemessen, die Proliferation der CFSE-gefärbten autologen CD4- Effektorzellen zu hemmen.

Es wurde die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen direkt nach deren Isolation untersucht (PreStim = Prästimulations-Suppression-Assays) sowie nach Stimulation mittels Th17- und Treg-Zytokin-Cocktails (PostStim = Poststimulations-Suppression-Assays).

Gemessen wurde die Proliferation der CD4- Effektorzellen. Die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen wurde mittels der in Kapitel 2.2.6.10 beschriebenen Formel ermittelt.

Die Abkürzung CD25+ steht in den folgenden Tabellen und Grafiken für die CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) und die Abkürzung CD25- für die CD4+CD25-CD127- Zellen. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zu CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen, wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben.

In Tabelle 30 sind die Probanden, deren CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen polarisiert und mittels Suppression-Assays untersucht wurden, aufgeführt und hinsichtlich ihres Alters und Geschlechts charakterisiert.

Tabelle 30: Charakterisierung der in Suppression-Assays untersuchten Probanden hinsichtlich ihres Alters und Geschlechts.

Proband Nr.	Alter in Jahren	Geschlecht
1	25	m
2	23	m
3	23	w
4	25	m
5	23	m
6	23	m

Abkürzungen: männlich (m), Nummer (Nr.), weiblich (w).

3.2.1 Zellzahlen nach den verschiedenen Isolationsprozessen

Bevor die Suppression-Assays durchgeführt werden konnten, mussten zwei verschiedene Isolationssschritte erfolgen. Die Zellzahlen nach den verschiedenen Isolationsprozessen sind in Tabelle 31 aufgelistet.

Tabelle 31: Zellzahlen nach den verschiedenen Isolationsprozessen.

		Mean ± SD	Median	Min – Max
PBMCs	gezählt nach Isolierung mittels Ficoll [$\times 10^6$]	58,2 ± 12,1	57,5	46 – 78
	gezählt nach Kryokonservierung [$\times 10^6$]	42,8 ± 15,3	42	17 – 62
CD4+	gezählt nach MACS-Isolierung [$\times 10^6$]	9,0 ± 4,3	7,1	4,9 – 14,8
	vom Sorter registriert [$\times 10^6$]	5,4 ± 2,7	4,5	2,8 – 9,2
CD4+CD25+ CD127low/- (Tregs)	gezählt nach Zell-Sorting	286.500 ± 102697	248.000	180.000 – 415.000
	vom Sorter registrierter Anteil an den CD4+ Zellen [%]	6,2 ± 1,1	6,0	5,1 – 8,2
CD4+CD25- CD127-	gezählt nach Zell-Sorting	144.500 ± 46.008	142.000	76.000 – 200.000
	vom Sorter registrierter Anteil an den CD4+ Zellen [%]	3,3 ± 2,4	2,4	1,5 – 7,8

Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), maximaler Wert (Max), minimaler Wert (Min), Mittelwert (engl. Mean), mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = engl. peripheral blood mononuclear cells), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), regulatorische T-Zellen (Tregs), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation).

Die Isolation der PBMCs aus 50 ml Vollblut ergab im Mittel $58,2 \times 10^6$ Zellen. Nach Kryokonservierung und Auftauen waren noch $42,8 \times 10^6$ PBMCs vorhanden. Daraus konnten mittels MACS-Isolation durchschnittlich $9,0 \times 10^6$ CD4+ T-Lymphozyten gewonnen werden. Vom Sorter wurden im Mittel $5,4 \times 10^6$ CD4+ Lymphozyten registriert. Nach dem durchflusszytometrischen Zell-Sorting lagen im Mittel 286.500 CD4+CD25+CD127low/- Zellen und 144.500 CD4+CD25-CD127- Zellen vor. Im durchflusszytometrischen Zell-Sorting machte die Population der CD4+CD25+CD127low/- Zellen durchschnittlich 6,2 % der CD4+ Zellen aus und die Population der CD4+CD25-CD127- Zellen machte 3,3 % der CD4+ Zellen aus.

3.2.2 Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den unterschiedlichen Versuchsansätzen

3.2.2.1 Deskriptive Statistik der Prä- und Poststimulations-Suppression-Assays

In der folgenden Tabelle 32 sind die Ergebnisse der Prä- und Poststimulations-Suppression-Assays beschrieben. Die Zahlenwerte stehen für die Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent im Kontrollansatz (0:1) sowie in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen (0,5:1 und 1:1).

Die unterschiedlichen Proliferationswerte der Kontrollansätze für die CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen kamen zustande, da bei vier Probanden die angestrebte Ausgangszellzahl von 180.000 CD4+CD25-CD127- Zellen nach dem Zell-Sorting nicht vorlag. Daher wurden in diesen Fällen, um das Verhältnis von CD4+CD25-CD127- Zellen zu CD4- Effektorzellen von 0:1, 0,5:1 und 1:1 einzuhalten, Kontrollansätze mit geringeren Zellzahlen gewählt (s. Kapitel 2.2.6.5).

Tabelle 32: Deskriptive Darstellung der Ergebnisse der Prä- und Poststimulations-Suppression-Assays.

	Versuchsansatz	Mean ± SD	Median	Min – Max
Prästimulations-Suppression-Assay	CD25+ 0:1	32,22 ± 17,20	31,15	14,40 – 51,70
	CD25+ 0,5:1	8,53 ± 6,52	6,80	3,90 – 21,40
	CD25+ 1:1	6,77 ± 4,07	5,20	3,40 – 12,90
	CD25- 0:1	30,05 ± 15,10	31,15	13,80 – 49,00
	CD25- 0,5:1	33,82 ± 17,36	51,68	14,70 – 55,80
	CD25- 1:1	40,07 ± 18,32	36,40	17,30 – 67,90
Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail (IL-1β, IL-6, IL-23, TGFβ)	CD25+ 0:1	38,82 ± 16,05	36,95	21,30 – 57,30
	CD25+ 0,5:1	34,15 ± 18,45	30,70	9,80 – 59,70
	CD25+ 1:1	33,03 ± 18,23	32,10	9,30 – 58,60
	CD25- 0:1	40,78 ± 16,39	40,55	25,20 – 58,00
	CD25- 0,5:1	45,50 ± 20,33	42,80	25,90 – 72,30
	CD25- 1:1	42,35 ± 25,79	39,50	16,20 – 72,90
Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail (IL-2, TGFβ)	CD25+ 0:1	38,82 ± 16,05	36,95	21,30 – 57,30
	CD25+ 0,5:1	15,42 ± 7,78	14,45	4,90 – 24,90
	CD25+ 1:1	14,63 ± 6,52	13,55	6,70 – 24,10
	CD25- 0:1	40,78 ± 16,39	40,55	25,20 – 58,00
	CD25- 0,5:1	20,08 ± 9,12	17,85	9,10 – 34,40
	CD25- 1:1	21,43 ± 10,24	18,20	9,30 – 35,40

Die Zahlenwerte stehen für die Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent, jeweils mit Mittelwert \pm Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zu CD4- Effektorzellen, wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. *Abkürzungen: CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), CD4+CD25-CD127- Zellen (CD25-), engl. cluster of differentiation (CD), Interleukin (IL), magnetische Zellseparation (MACS = engl. magnetic activated cell sorting), maximaler Wert (Max), minimaler Wert (Min), Mittelwert (engl. Mean), mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = engl. peripheral blood mononuclear cells), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), regulatorische T-Zellen (Tregs), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation), T-Helferzelle (Th), engl. transforming growth factor (TGF).*

In Abbildung 22 im Kapitel 2.2.6.9 ist die Messung der Proliferation der CD4- Effektorzellen eines exemplarischen Probanden im Kontrollansatz sowie in der Co-Kultur mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen in einer Histogrammdarstellung der gemessenen CFSE-Konzentration veranschaulicht.

3.2.2.2 Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Proliferation in den Kontrollansätzen

Es wurde jeweils die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen (CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit CD4- Effektorzellen) mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Kontrollansätzen (ausschließlich CD4- Effektorzellen) mittels Wilcoxon-Rank-Testes verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 dargestellt. Besonderes Interesse galt der Frage, ob die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen geringer als im Kontrollansatz sein würde, da dies auf eine Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen hindeuten könnte.

Tabelle 33: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen zwischen den Co-Kulturen und den Kontrollansätzen.

Kontroll- ansatz	Proliferation der CD4- Ef- faktorzellen [%]			Co-Kultur	Proliferation der CD4- Ef- faktorzellen [%]			p-Wert
	Mean ± SD	Median	Min – Max		Mean ± SD	Median	Min – Max	
Prästimulations-Suppression-Assay								
CD25+ 0:1	32,22 ± 17,20	31,15	14,40 – 51,70	CD25+ 0,5:1	8,53 ± 6,52	6,80	3,90 – 21,40	0,031 *
CD25+ 0:1	32,22 ± 17,20	31,15	14,40 – 51,70	CD25+ 1:1	6,77 ± 4,07	5,20	3,40 – 12,90	0,031 *
CD25- 0:1	30,05 ± 15,10	31,15	13,80 – 49,00	CD25- 0,5:1	33,82 ± 17,36	51,68	14,70 – 55,80	0,094
CD25- 0:1	30,05 ± 15,10	31,15	13,80 – 49,00	CD25- 1:1	40,07 ± 18,32	36,40	17,30 – 67,90	0,063
Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail (IL-1β, IL-6, IL-23, TGFβ)								
CD25+ 0:1	38,82 ± 16,05	36,95	21,30 – 57,30	CD25+ 0,5:1	34,15 ± 18,45	30,70	9,80 – 59,70	0,313
CD25+ 0:1	38,82 ± 16,05	36,95	21,30 – 57,30	CD25+ 1:1	33,03 ± 18,23	32,10	9,30 – 58,60	0,156
CD25- 0:1	40,78 ± 16,39	40,55	25,20 – 58,00	CD25- 0,5:1	45,50 ± 20,33	42,80	25,90 – 72,30	0,031 *
CD25- 0:1	40,78 ± 16,39	40,55	25,20 – 58,00	CD25- 1:1	42,35 ± 25,79	39,50	16,20 – 72,90	1,000
Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail (IL-2, TGFβ)								
CD25+ 0:1	38,82 ± 16,05	36,95	21,30 – 57,30	CD25+ 0,5:1	15,42 ± 7,78	14,45	4,90 – 24,90	0,031 *
CD25+ 0:1	38,82 ± 16,05	36,95	21,30 – 57,30	CD25+ 1:1	14,63 ± 6,52	13,55	6,70 – 24,10	0,031 *
CD25- 0:1	40,78 ± 16,39	40,55	25,20 – 58,00	CD25- 0,5:1	20,08 ± 9,12	17,85	9,10 – 34,40	0,031 *
CD25- 0:1	40,78 ± 16,39	40,55	25,20 – 58,00	CD25- 1:1	21,43 ± 10,24	18,20	9,30 – 35,40	0,031 *

Dargestellt sind die Ergebnisse des zweiseitigen Wilcoxon-Rank-Testes, die aus den Proliferationswerten in Prozent der CD4- Effektorzellen generiert wurden. Jede Zeile zeigt den Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in einer Co-Kultur mit CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit dem jeweiligen Kontrollansatz (nur CD4- Effektorzellen). Für die einzelnen Ansätze ist die Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent dargestellt, jeweils mit Mittelwert ± Standardabweichung, Medi-

an, Minimum und Maximum. Die p-Werte sind in der rechten Spalte dargestellt und mit Sternchen markiert und grau hinterlegt, sofern es zu einer signifikanten Reduktion oder Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur im Vergleich zum Kontrollansatz gekommen war. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zu CD4- Effektorzellen, wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. *Abkürzungen: CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), CD4+CD25-CD127- Zellen (CD25-), engl. cluster of differentiation (CD), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), minimaler Wert (Min), Mittelwert (engl. Mean), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation), engl. transforming growth factor (TGF).*

Im Folgenden sind die Ergebnisse des Vergleichs der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Kontrollansätzen veranschaulicht. Abbildung 39 zeigt die Ergebnisse für die Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen, Abbildung 40 für die Co-Kulturen mit CD4+CD25-CD127- Zellen.

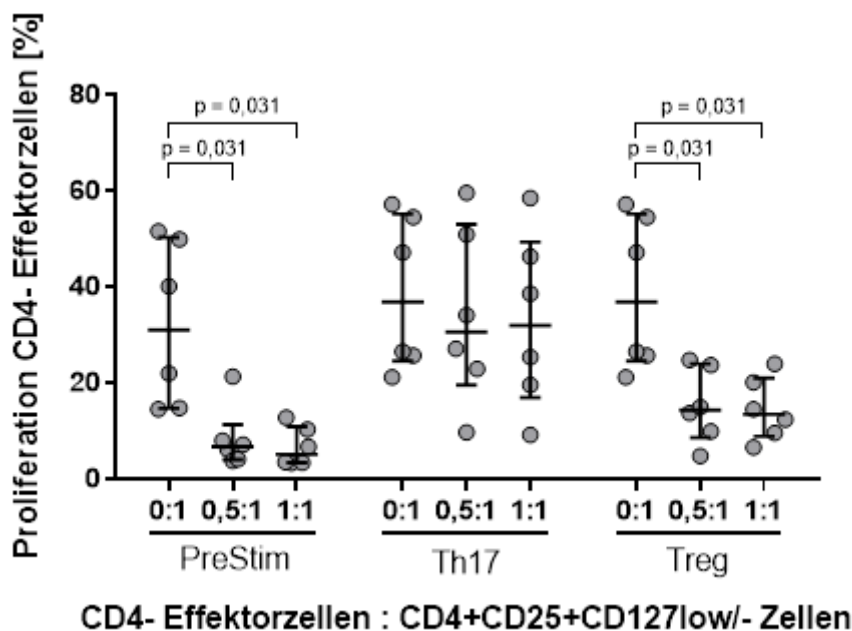


Abbildung 39: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Kontrollansätzen.

Auf der Y-Achse ist die Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent dargestellt. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsansätze aufgetragen. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- zu CD4- Effektorzellen in den Kulturen wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Für die Versuchsansätze, bei denen es zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz gekommen war, sind die p-Werte angegeben (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim).*

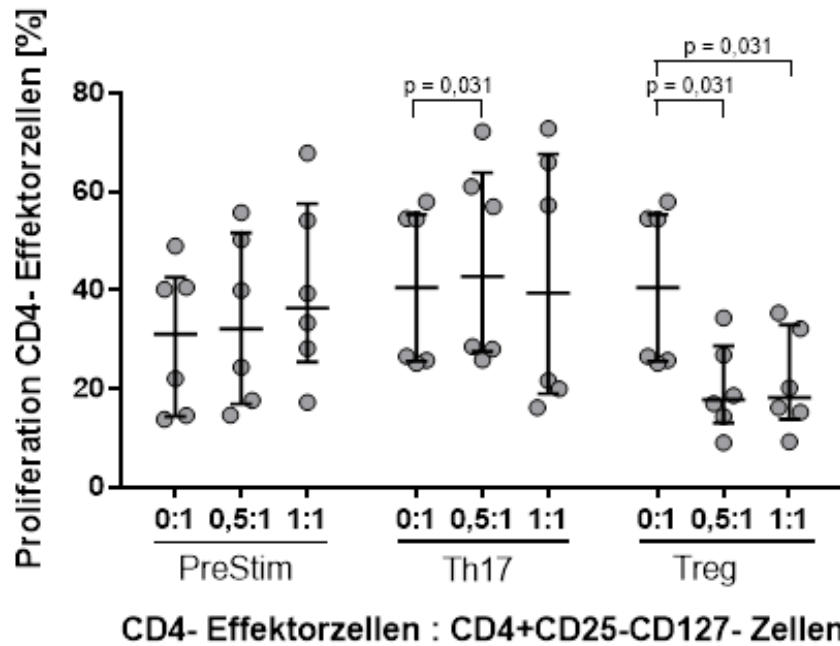


Abbildung 40: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Kontrollansätzen.

Auf der Y-Achse ist die Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent dargestellt. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsansätze aufgetragen. Das Verhältnis von CD4+CD25-CD127- zu CD4- Effektorzellen in den Kulturen wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Für die Versuchsansätze, bei denen es zu einer signifikanten Reduktion oder Erhöhung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur mit CD4+CD25-CD127- Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz gekommen war, sind die p-Werte angegeben (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim).*

Im Prästimulations-Suppression-Assay hatten in der Co-Kultur mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen 6,77 % (Verhältnis 1:1) bzw. 8,53 % (Verhältnis 0,5:1) der CD4- Effektorzellen proliferiert. Damit war die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen signifikant geringer als im Kontrollansatz, in dem 32,22 % der Zellen proliferiert hatten ($p = 0,031$).

Das Vorhandensein von CD4+CD25-CD127- Zellen in der Co-Kultur mit CD4- Effektorzellen führte im Prästimulations-Suppression-Assay zu keiner erkennbaren Veränderung der Proliferation der CD4- Effektorzellen.

In der Poststimulations-Analyse war die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit den mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen nicht signifikant geringer als im Kontrollansatz. Die mit dem Th17-Cocktail stimulierten

CD4+CD25-CD127- Zellen führten in der Co-Kultur, in der sie mit CD4- Effektorzellen in einem Verhältnis von 1:1 vorlagen, zu keiner signifikant unterschiedlichen Proliferation der CD4- Effektorzellen. In der Co-Kultur, in der die mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen mit CD4- Effektorzellen im Verhältnis 0,5:1 vorlagen, war die Proliferation der CD4- Effektorzellen mit 45,5 % signifikant höher als im Kontrollansatz, in dem 40,78 % der CD4- Effektorzellen proliferiert hatten ($p = 0,031$).

Die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit den mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen war mit 15,42 % (Verhältnis 0,5:1) bzw. 14,63 % (Verhältnis 1:1) signifikant geringer als die Proliferation der CD4- Effektorzellen im Kontrollansatz, in dem 38,82 % der CD4- Effektorzellen proliferiert hatten ($p = 0,031$). In den Co-Kulturen, in denen mittels Treg-Cocktails stimulierte CD4+CD25-CD127- Zellen mit CD4-Effektorzellen vorlagen war die Proliferation der CD4- Effektorzellen ebenfalls signifikant geringer (20,08 % im Verhältnis 0,5:1 und 21,43 % im Verhältnis 1:1) als im Kontrollansatz, wo sie bei 40,78 % lag ($p = 0,031$).

3.2.2.3 Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit unstimulierten oder stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen

Auch für den Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen wurde der zweiseitige Wilcoxon-Rank-Test verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 34 dargestellt.

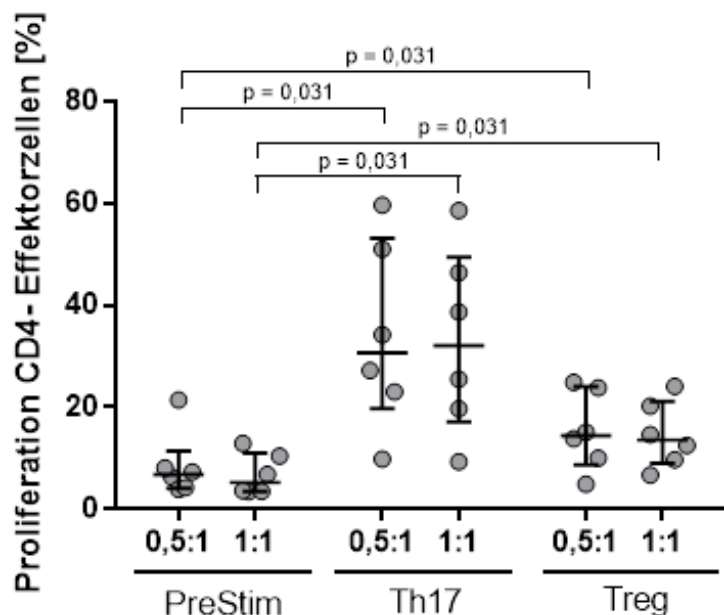
Tabelle 34: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit unstimulierten oder stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen.

Co-Kultur PreStim	Proliferation der CD4- Ef- fektorzellen [%]			Co-Kultur PostStim	Proliferation der CD4- Effektorzellen [%]			p-Wert
	Mean ± SD	Median	Min – Max		Mean ± SD	Median	Min – Max	
PreStim				PostStim (Th17)				
CD25+ 0,5:1	8,53 ± 6,52	6,80	3,90 – 21,40	CD25+ 0,5:1	34,15 ± 18,45	30,70	9,80 – 59,70	0,031 *
CD25+ 1:1	6,77 ± 4,07	5,20	3,40 – 12,90	CD25+ 1:1	33,03 ± 18,23	32,10	9,30 – 58,60	0,031 *
CD25- 0,5:1	33,82 ± 17,36	51,68	14,70 – 55,80	CD25- 0,5:1	45,50 ± 20,33	42,80	25,90 – 72,30	0,031 *
CD25- 1:1	40,07 ± 18,32	36,40	17,30 – 67,90	CD25- 1:1	42,35 ± 25,79	39,50	16,20 – 72,90	0,688
PreStim				PostStim (Treg)				
CD25+ 0,5:1	8,53 ± 6,52	6,80	3,90 – 21,40	CD25+ 0,5:1	15,42 ± 7,78	14,45	4,90 – 24,90	0,031 *
CD25+ 1:1	6,77 ± 4,07	5,20	3,40 – 12,90	CD25+ 1:1	14,63 ± 6,52	13,55	6,70– 24,10	0,031 *
CD25- 0,5:1	33,82 ± 17,36	51,68	14,70 – 55,80	CD25- 0,5:1	20,08 ± 9,12	17,85	9,10 – 34,40	0,031 *
CD25- 1:1	40,07 ± 18,32	36,40	17,30 – 67,90	CD25- 1:1	21,43 ± 10,24	18,20	9,30 – 35,40	0,031 *

Dargestellt sind die Ergebnisse des zweiseitigen Wilcoxon-Rank-Testes, die aus den Proliferationswerten in Prozent der CD4- Effektorzellen generiert wurden. Jede Zeile zeigt den Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in einer Co-Kultur mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in einer Co-Kultur mit mittels Th17- oder Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen. Für die einzelnen Ansätze ist die Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent dargestellt, jeweils mit Mittelwert ± Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zu CD4- Effektorzellen, wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Die p-Werte sind in der rechten Spalte dargestellt und mit einem Sternchen markiert und grau hinterlegt, sofern es zu einer signifikanten Reduktion oder Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen im Vergleich zu der Co-Kultur mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen gekommen war (Wilcoxon-Rank-Test). Abkürzungen: CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), CD4+CD25-CD127- Zellen (CD25-), engl. cluster of differentiation (CD), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), minimaler Wert (Min), Mittelwert (engl. Mean), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation

mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation), engl. transforming growth factor (TGF).

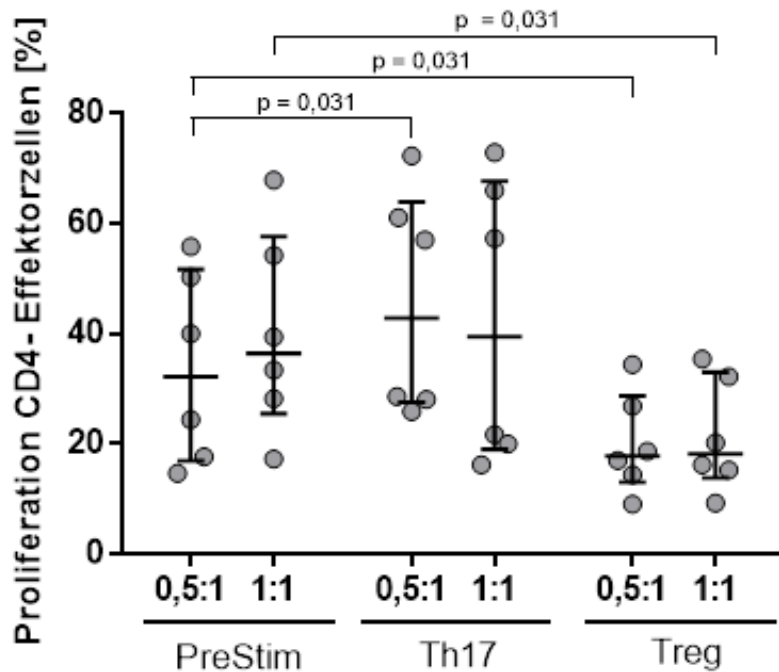
Im Folgenden sind die Ergebnisse des Vergleichs der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen graphisch dargestellt. Abbildung 41 zeigt die Ergebnisse für die Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen, Abbildung 42 die Ergebnisse für die Co-Kulturen mit CD4+CD25-CD127- Zellen.



CD4- Effektorzellen : CD4+CD25+CD127low/- Zellen

Abbildung 41: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen.

Dargestellt ist auf der Y-Achse die Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsansätze aufgetragen. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- zu CD4- Effektorzellen in den Kulturen wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Für die Versuchsansätze, bei denen es zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen im Vergleich zur Proliferation der CD4- Effektorzellen im Ansatz mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen gekommen war, sind die p-Werte angegeben (Wilcoxon-Rank-Test). Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim).



CD4- Effektorzellen : CD4+CD25-CD127- Zellen

Abbildung 42: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen.

Dargestellt ist auf der Y-Achse die Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsansätze aufgetragen. Das Verhältnis von CD4+CD25-CD127- zu CD4- Effektorzellen in den Kulturen wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Für die Versuchsansätze, bei denen es zu einer signifikanten Erhöhung oder Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen im Vergleich zur Proliferation der CD4- Effektorzellen im Ansatz mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen gekommen war, sind die p-Werte angegeben (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim).*

Die Proliferation der CD4- Effektorzellen war in der Co-Kultur mit mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen signifikant höher (34,21 % im Verhältnis 0,5:1 und 33,03 % im Verhältnis 1:1) als in den Ansätzen mit den unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen (8,53 % im Verhältnis 0,5:1 und 6,77 % im Verhältnis 1:1) ($p = 0,031$).

Auch in den Co-Kulturen mit mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen war die Proliferation der CD4- Effektorzellen signifikant höher (15,42 % im Verhältnis 0,5:1 und 14,63 % im Verhältnis 1:1) als in den Co-Kulturen mit den unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen (8,53 % im Verhältnis 0,5:1 und 6,77 % im Verhältnis 1:1) ($p = 0,031$).

Die Ergebnisse des Vergleichs der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen im Vergleich zu den Ansätzen mit unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen waren vom in der Co-Kultur vorliegenden Verhältnis von CD4- Effektorzellen zu CD4+CD25-CD127- Zellen abhängig. Bei einem Verhältnis von 0,5:1 ergab sich mit 45,50 % eine signifikant höhere Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur mit mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen im Vergleich zum Ansatz mit unstimulierten Zellen, in dem die Proliferation der CD4- Effektorzellen 33,82 % betrug ($p = 0,031$). Lagen die CD4+CD25-CD127- Zellen mit den CD4- Effektorzellen in einem Verhältnis von 1:1 vor, so ergab sich keine signifikant unterschiedliche Proliferation der CD4- Effektorzellen (40,07 % in der Co-Kultur mit unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen vs. 42,35 % in der Co-Kultur mit mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen).

Beim Ansatz der mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen zeigte sich eine signifikant niedrigere Proliferation der CD4- Effektorzellen (20,8 % im Verhältnis 0,5:1 und 21,43 % im Verhältnis 1:1) im Vergleich zur Proliferation der CD4- Effektorzellen im Ansatz mit unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen (33,82 % im Verhältnis 0,5:1 und 40,07 % im Verhältnis 1:1) ($p = 0,031$).

3.2.2.4 Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25-CD127- Zellen

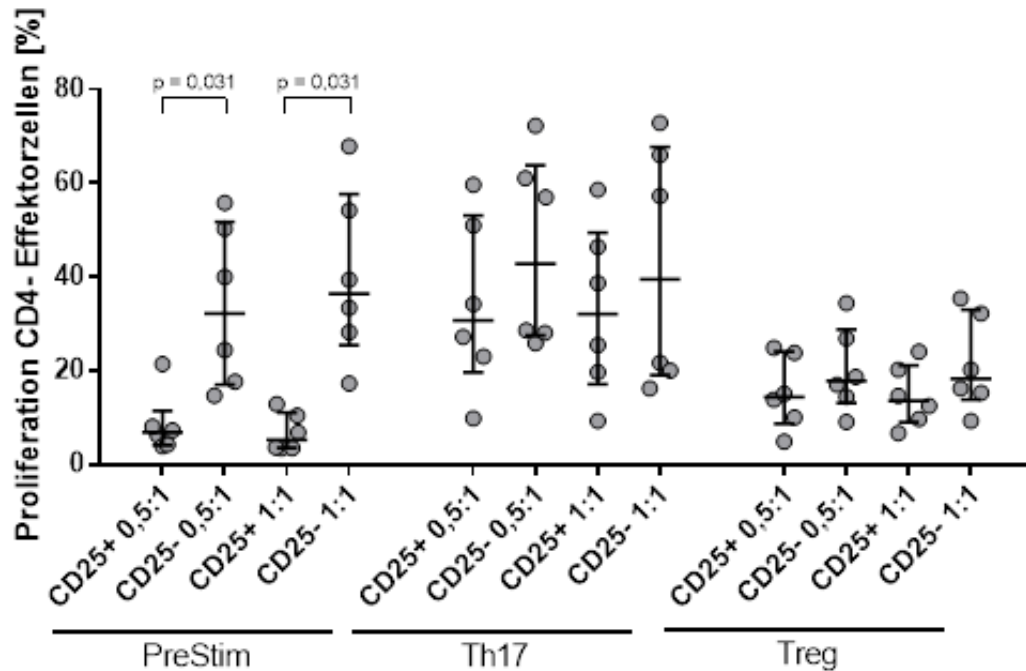
Im Folgenden wird die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den korrespondierenden Versuchsansätzen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen mittels Wilcoxon-Rank-Tests analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 dargestellt.

Tabelle 35: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den korrespondierenden Ansätzen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen und mit CD4+CD25-CD127- Zellen.

Co-Kultur	Proliferation der CD4-Effektorzellen [%]			Co-Kultur	Proliferation der CD4-Effektorzellen [%]			p-Wert
	Mean ± SD	Median	Min – Max		Mean ± SD	Median	Min – Max	
Prästimulations-Suppression-Assay								
CD25+ 0,5:1	8,53 ± 6,52	6,80	3,90 – 21,40	CD25- 0,5:1	33,82 ± 17,36	51,68	14,70 – 55,80	0,031 *
CD25+ 1:1	6,77 ± 4,07	5,20	3,40 – 12,90	CD25- 1:1	40,07 ± 18,32	36,40	17,30 – 67,90	0,031 *
Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail (IL-1β, IL-6, IL-23, TGFβ)								
CD25+ 0,5:1	34,15 ± 18,45	30,70	9,80 – 59,70	CD25- 0,5:1	45,50 ± 20,33	42,80	25,90 – 72,30	0,063
CD25+ 1:1	33,03 ± 18,23	32,10	9,30 – 58,60	CD25- 1:1	42,35 ± 25,79	39,50	16,20 – 72,90	0,156
Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail (IL-2, TGFβ)								
CD25+ 0,5:1	15,42 ± 7,78	14,45	4,90 – 24,90	CD25- 0,5:1	20,08 ± 9,12	17,85	9,10 – 34,40	0,156
CD25+ 1:1	14,63 ± 6,52	13,55	6,70 – 24,10	CD25- 1:1	21,43 ± 10,24	18,20	9,30 – 35,40	0,094

Dargestellt sind die Ergebnisse, die mittels des zweiseitigen Wilcoxon-Rank-Testes aus den Proliferationswerten in Prozent der CD4- Effektorzellen generiert wurden. Jede Zeile zeigt den Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den jeweils korrespondierenden Versuchsansätze mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen und mit CD4+CD25-CD127- Zellen. Für die einzelnen Ansätze ist die Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent dargestellt, jeweils mit Mittelwert ± Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zu CD4- Effektorzellen, wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Die p-Werte sind in der rechten Spalte dargestellt und mit einem Sternchen markiert und grau hinterlegt, sofern sich eine signifikant unterschiedliche Proliferation der CD4- Effektorzellen im Vergleich der beiden Co-Kulturen gezeigt hatte (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen: CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), CD4+CD25-CD127- Zellen (CD25-), engl. cluster of differentiation (CD), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), minimaler Wert (Min), Mittelwert (engl. Mean), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation), engl. transforming growth factor (TGF).*

In Abbildung 43 sind die Ergebnisse des Vergleichs der korrespondierenden Versuchsansätze der CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen graphisch veranschaulicht.



CD4- Effektorzellen : CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen

Abbildung 43: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Ansätzen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den korrespondierenden Ansätzen mit CD4+CD25-CD127- Zellen.

Dargestellt ist auf der Y-Achse die Proliferation der CD4- Effektorzellen in Prozent. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsansätze aufgetragen. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127-Zellen zu CD4-Effektorzellen in den Kulturen wird durch die Formulierungen 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Für die signifikant niedrigere Proliferation der CD4- Effektorzellen im Prästimulations-Suppression-Assay in der Co-Kultur mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen verglichen mit der Proliferation in der Co-Kultur mit CD4+CD25-CD127- Zellen sind die p-Werte angegeben (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen:* CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), CD4+CD25-CD127- Zellen (CD25-), engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim).

Beim Vergleich der korrespondierenden Versuchsansätze ergaben sich im Prästimulations-Suppression-Assay signifikant niedrigere Proliferationswerte der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen (8,53 % im Verhältnis 0,5:1 und 6,77 % im Verhältnis 1:1), verglichen mit den Co-Kulturen mit CD4+CD25-CD127- Zellen (33,82 % im Verhältnis 0,5:1 und 40,07 % im Verhältnis 1:1) ($p = 0,031$). Für die korrespondierenden Versuchsansätze der Co-Kulturen in den Poststimulations-Suppression-Assays ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation der CD4- Effektorzellen.

3.2.3 Vergleich der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen in den unterschiedlichen Versuchsansätzen

Zur Beurteilung der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) bzw. der CD4+CD25-CD127- Zellen wurde die in Kapitel 2.2.6.10 genauer erläuterte Formel verwendet:

Suppressionsfunktion [%] =

$$\left(1 - \frac{\text{Proliferation der CD4- Effektorzellen [\%] in der Co-Kultur mit Tregs bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen}}{\text{Proliferation der CD4- Effektorzellen [\%] im Kontrollansatz}} \right) \times 100$$

3.2.3.1 Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen

In der folgenden Tabelle 36 ist die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen dargestellt. Es wurde die Suppressionsfunktion der untersuchten Zellen mit der Suppressionsfunktion im Kontrollansatz verglichen. Da im Kontrollansatz keine CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen vorhanden waren, wurde hierfür eine Suppressionsfunktion von Null festgelegt. Verwendet wurde der zweiseitige Wilcoxon-Rank-Test. Die untersuchte Fragestellung lautete: Wie die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen signifikant von Null ab? Positive Werte verdeutlichen dabei eine Suppression, während negative Werte das Gegenteil, eine erhöhte Proliferation verdeutlichen.

Tabelle 36: Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen.

	Versuchsansatz	Mean \pm SD	Median	Min – Max	p-Wert
Prästimulations-Suppression-Assay	CD25+ 0,5:1	72 \pm 14	73	47 – 85	0,031 *
	CD25+ 1:1	78 \pm 7	78	68 – 87	0,036 *
	CD25- 0,5:1	-16 \pm 23	-7	-57 – 1	0,141
	CD25- 1:1	-45 \pm 44	-35	-104 – 3	0,063
Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (IL-1β, IL-6, IL-23, TGFβ)	CD25+ 0,5:1	7 \pm 39	11	-44 – 63	0,752
	CD25+ 1:1	11 \pm 37	19	-41 – 65	0,688
	CD25- 0,5:1	-36 \pm 40	-17	-100 – -5	0,031 *
	CD25- 1:1	-15 \pm 32	-9	-72 – 25	0,313
Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (IL-2, TGFβ)	CD25+ 0,5:1	52 \pm 18	47	33 – 82	0,031 *
	CD25+ 1:1	54 \pm 15	52	35 – 75	0,031 *
	CD25- 0,5:1	45 \pm 12	43	33 – 68	0,036 *
	CD25- 1:1	40 \pm 19	37	20 – 74	0,031 *

Dargestellt ist die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen und der CD4+CD25-CD127- Zellen in Prozent. Für die einzelnen Ansätze ist die Suppressionsfunktion jeweils mit Mittelwert \pm Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum angegeben. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127-Zellen zu CD4- Effektorzellen in den Kulturen wird durch die Formulierungen 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Ein positiver Prozentwert entspricht einer Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Ein negativer Prozentwert steht für eine Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Wenn die Suppressionsfunktion im Wilcoxon-Rank-Test signifikant von Null ab, ist der p-Wert mit einem Sternchen markiert. Bei den Co-Kulturen, bei denen die CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127-Zellen eine signifikant von Null abweichende, positive Suppressionsfunktion gezeigt hatten, die Zellen also zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen geführt hatten, sind die p-Werte fett markiert und grau hinterlegt (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen: CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), CD4+CD25-CD127-Zellen (CD25-), engl. cluster of differentiation (CD), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), minimaler Wert (Min), Mittelwert (engl. Mean), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation), engl. transforming growth factor (TGF).*

In der folgenden Abbildung 44 ist die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen, in Abbildung 45 die Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen in Prozent der supprimierten CD4- Effektorzellen graphisch dargestellt.

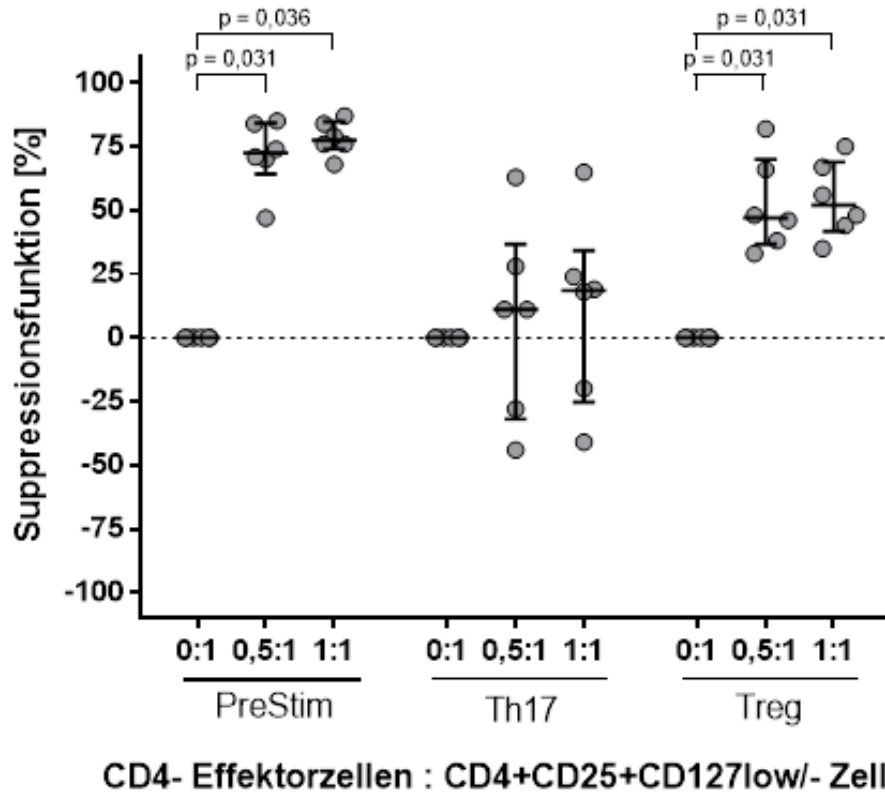


Abbildung 44: Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen in Prozent der supprimierten CD4- Effektorzellen.

Mittels Wilcoxon-Rank-Test wurde ermittelt, ob die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen signifikant von Null abwich. Auf der Y-Achse ist die Suppressionsfunktion in Prozent aufgetragen. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Ein positiver Wert für die Suppressionsfunktion entspricht einer Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Ein negativer Wert für die Suppressionsfunktion steht für eine Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsansätze aufgetragen. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- zu CD4- Effektorzellen in den Kulturen, wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Für die Co-Kulturen, bei denen die CD4+CD25+CD127low/- Zellen eine signifikant von Null abweichende Suppressionsfunktion gezeigt hatten, sind die p-Werte angegeben (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen:* engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim).

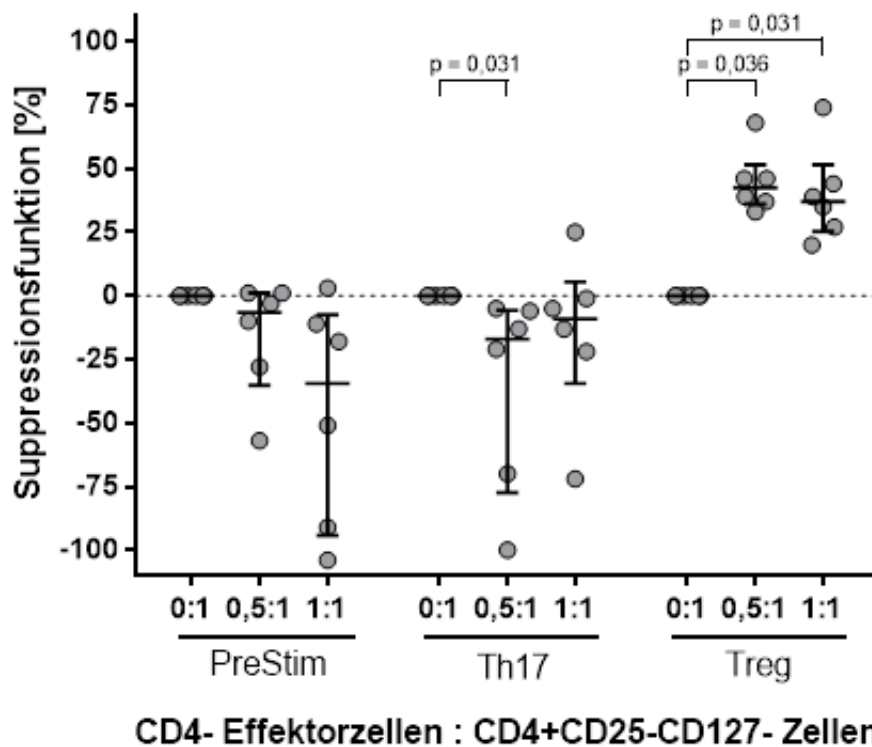


Abbildung 45: Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen in Prozent der supprimierten CD4-Effektorzellen.

Mittels Wilcoxon-Rank-Test wurde ermittelt, ob die Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen signifikant von Null abwich. Auf der Y-Achse ist die Suppressionsfunktion in Prozent aufgetragen. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Ein positiver Wert für die Suppressionsfunktion entspricht einer Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Ein negativer Wert für die Suppressionsfunktion steht für eine Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsansätze aufgetragen. Das Verhältnis von CD4+CD25-CD127- zu CD4- Effektorzellen in den Kulturen, wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Für die Co-Kulturen, bei denen die CD4+CD25-CD127- Zellen eine signifikant von Null abweichende Suppressionsfunktion gezeigt hatten, sind die p-Werte angegeben (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen:* engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim).

Es konnte gezeigt werden, dass die unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen eine signifikant von Null abweichende, positive Suppressionsfunktion aufwiesen ($p = 0,031$ für das Verhältnis CD4+CD25+CD127low/- Zellen zu CD4- Effektorzellen von 0,5:1 und $p = 0,036$ für das Verhältnis 1:1). Sie reduzierten die Proliferation der CD4- Effektorzellen im Mittel um 72 % (Verhältnis CD4+CD25+CD127low/- Zellen zu CD4- Effektorzellen 0,5:1) bzw. 78 % (Verhältnis 1:1). Nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail war bei den CD4+CD25+CD127low/- Zellen keine signifikant von Null

abweichende Suppressionsfunktion mehr erkennbar. Nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail zeigten die CD4+CD25+CD127low/- Zellen eine signifikant von Null abweichende Suppressionsfunktion ($p = 0,031$) und reduzierten die Proliferation der CD4- Effektorzellen im Mittel um 47 % (Verhältnis 0,5:1) bzw. 52 % (Verhältnis 1:1).

Die CD4+CD25-CD127- Zellen wiesen im unstimulierten Zustand keine signifikant von Null abweichende Suppressionsfunktion auf. Nach Stimulation der CD4+CD25-CD127- Zellen mit dem Th17-Cocktail zeigten die Zellen in der Co-Kultur, in der CD4+CD25-CD127- Zellen und CD4- Effektorzellen im Verhältnis 0,5:1 vorlagen, eine signifikant von Null abweichende, negative Suppressionsfunktion ($p = 0,031$). Hier war es also in Anwesenheit der CD4+CD25-CD127- Zellen zu einer höheren Proliferation der CD4- Effektorzellen gekommen als im Kontrollansatz. In der Co-Kultur, in der die CD4+CD25-CD127- Zellen und CD4- Effektorzellen Zellen im Verhältnis 1:1 vorlagen, war keine signifikant von Null abweichende Suppressionsfunktion zu verzeichnen. Nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail wiesen die CD4+CD25-CD127- Zellen eine signifikant von Null abweichende, positive Suppressionsfunktion auf ($p = 0,036$ für das Verhältnis CD4+CD25-CD127- Zellen zu CD4- Effektorzellen von 0,5:1 und $p = 0,031$ für das Verhältnis 1:1) und reduzierten die Proliferation der CD4- Effektorzellen im Mittel um 44 % (Verhältnis 0,5:1) bzw. 40 % (Verhältnis 1:1).

3.2.3.2 Vergleich der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen

Mittels Wilcoxon-Rank-Test wurde die Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der mittels Zytokin-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37: Vergleich der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen.

Co-Kultur PreStim	Suppressionsfunktion			Co-Kultur PostStim	Suppressionsfunktion			p-Wert
	Mean ± SD	Me- dian	Min – Max		Mean ± SD	Me- dian	Min – Max	
PreStim				PostStim (Th17)				
CD25+ 0,5:1	72 ± 14	73	47 – 85	CD25+ 0,5:1	7 ± 39	11	-44 – 63	0,031 *
CD25+ 1:1	78 ± 7	78	68 – 87	CD25+ 1:1	11 ± 37	19	-41 – 65	0,036 *
CD25- 0,5:1	-16 ± 23	-7	-57 – 1	CD25- 0,5:1	-36 ± 40	-17	-100 – -5	0,115
CD25- 1:1	-45 ± 44	-35	-104 – 3	CD25- 1:1	-15 ± 32	-9	-72 – 25	0,156
PreStim				PostStim (Treg)				
CD25+ 0,5:1	72 ± 14	73	47 – 85	CD25+ 0,5:1	52 ± 18	47	33 – 82	0,156
CD25+ 1:1	78 ± 7	78	68 – 87	CD25+ 1:1	54 ± 15	52	35 – 75	0,036 *
CD25- 0,5:1	-16 ± 23	-7	-57 – 1	CD25- 0,5:1	45 ± 12	43	33 – 68	0,031 *
CD25- 1:1	-45 ± 44	-35	-104 – 3	CD25- 1:1	40 ± 19	37	20 – 74	0,031 *

Dargestellt ist in jeder Zeile der Vergleich der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der mittels Zytokin-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen. Für die einzelnen Ansätze ist die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen in Prozent, jeweils mit Mittelwert ± Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum angegeben. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127-Zellen zu CD4- Effektorzellen in den Kulturen wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Ein positiver Prozentwert entspricht einer Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Ein negativer Prozentwert steht für eine Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Die p-Werte sind in der letzten Spalte dargestellt und mit Sternchen markiert und grau hinterlegt, sofern es zu einer signifikant höheren oder signifikant geringeren Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen nach Stimulation mit dem jeweiligen Zytokin-Cocktail im Vergleich zur Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen gekommen war (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen: CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), CD4+CD25-CD127- Zellen (CD25-), engl. cluster of differentiation (CD), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), minimaler Wert (Min), Mittelwert (engl. Mean), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation), engl. transforming growth factor (TGF).*

Im Folgenden ist der Vergleich der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der mittels Th17- bzw. Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen graphisch dargestellt. Abbildung 46 zeigt die Ergebnisse für die CD4+CD25+CD127low/- Zellen, Abbildung 47 die Ergebnisse für die CD4+CD25-CD127- Zellen.

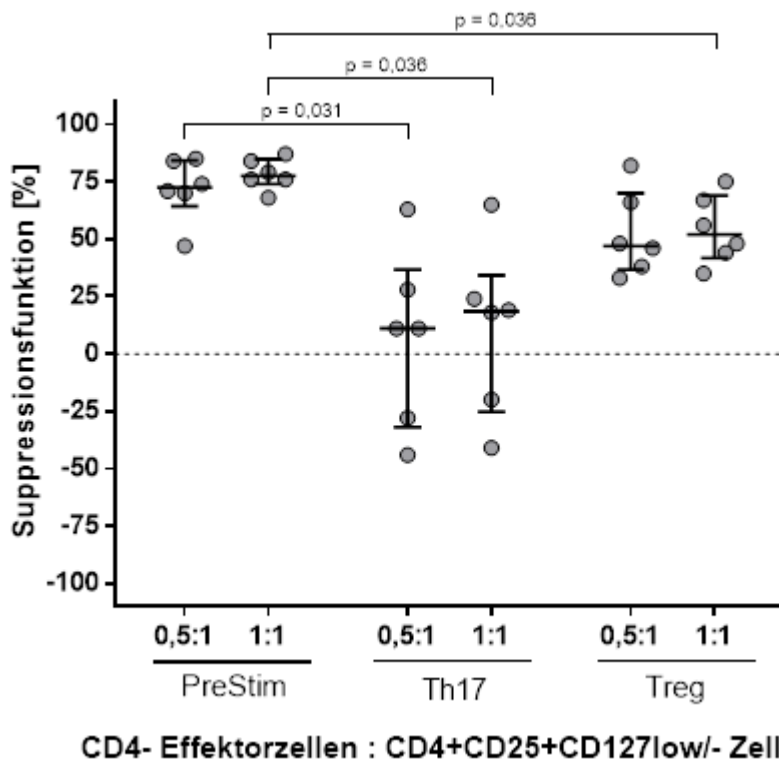


Abbildung 46: Vergleich der Suppressionsfunktion der stimulierten mit der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen.

Mittels Wilcoxon-Rank-Test wurde die Suppressionsfunktion der mittels Th17- bzw. Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen verglichen. Dargestellt ist auf der Y-Achse die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen in Prozent. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Ein positiver Wert für die Suppressionsfunktion entspricht einer Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Ein negativer Wert für die Suppressionsfunktion steht für eine Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsansätze aufgetragen. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- zu CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen wird durch die Formulierungen 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Für die Versuchsansätze, bei denen die stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen eine signifikant niedrige Suppressionsfunktion gezeigt hatten, als die unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen, sind die p-Werte angegeben (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim).*

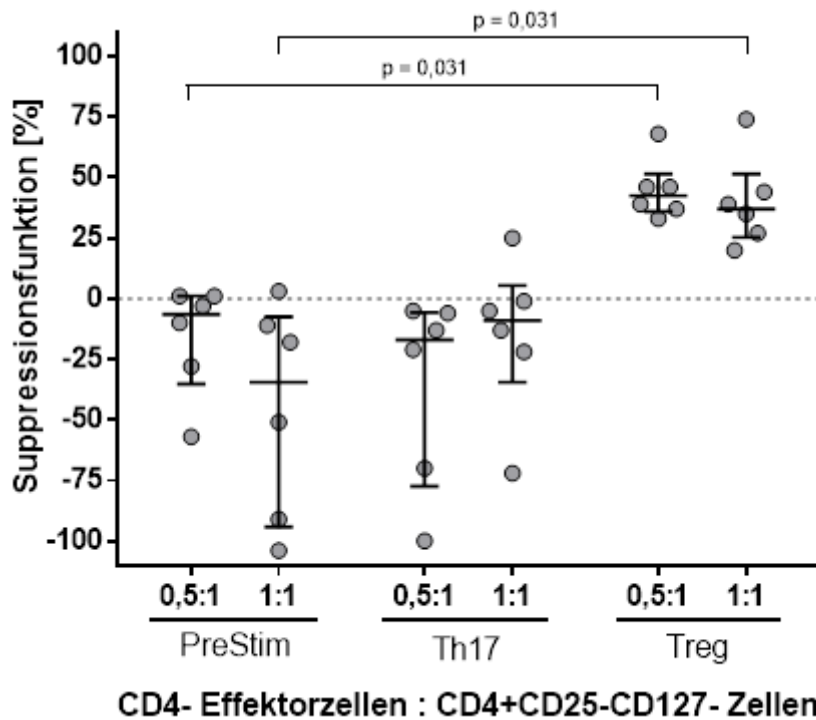


Abbildung 47: Vergleich der Suppressionsfunktion der stimulierten mit der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen.

Mittels Wilcoxon-Rank-Test wurde die Suppressionsfunktion der mittels Th17- bzw. Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen verglichen. Dargestellt ist auf der Y-Achse die Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Ein positiver Wert für die Suppressionsfunktion entspricht einer Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Ein negativer Wert für die Suppressionsfunktion steht für eine Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsansätze aufgetragen. Das Verhältnis von CD4+CD25-CD127- zu CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen wird durch die Formulierungen 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Für die Versuchsansätze, bei denen die stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen eine signifikant höhere Suppressionsfunktion gezeigt hatten als die unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen, sind die p-Werte angegeben (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen: engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim).*

Die CD4+CD25+CD127low/- Zellen hatten im unstimulierten Zustand und nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail eine signifikant von Null abweichende, positive Suppressionsfunktion gezeigt. Nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail hatten sie keine signifikant von Null abweichende Suppressionsfunktion mehr gezeigt (s. Kapitel 3.2.3.1). Nun wurde die Suppressionsfunktion der mittels Zytokin-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen verglichen. Es zeigte sich, dass die Suppressionsfunk-

tion der mittels Th17-Cocktails stimulierten Zellen signifikant geringer ausfiel (7 % im Verhältnis 0,5:1 und 11 % im Verhältnis 1:1) als die Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen (72 % im Verhältnis 0,5:1 und 78 % im Verhältnis 1:1) ($p = 0,031$ für das Verhältnis 0,5:1 und $p = 0,036$ für das Verhältnis 1:1). Die mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen zeigten ebenfalls eine geringere Suppressionsfunktion als die unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen. Eine signifikant geringere Suppressionsfunktion war allerdings nur bei den mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen zu verzeichnen, die in der Co-Kultur im Verhältnis von 1:1 mit CD4- Effektorzellen vorlagen (54 % bei den mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen vs. 78 % bei den unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen) ($p = 0,036$).

Die CD4+CD25-CD127- Zellen hatten im unstimulierten Zustand sowie nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail eine signifikant von Null abweichende negative Suppressionsfunktion, was bedeutet, dass in ihrem Beisein die Proliferation der CD4- Effektorzellen höher war als die Proliferation der CD4- Effektorzellen im Kontrollansatz (s. Kapitel 3.2.3.1). Nach Stimulation der CD4+CD25-CD127- Zellen mit dem Treg-Cocktail wiesen diese eine signifikant von Null abweichende positive Suppressionsfunktion auf (s. Kapitel 3.2.3.1). Nun wurde die Suppressionsfunktion der mittels Zytokin-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen verglichen. Die Stimulation der CD4+CD25-CD127- Zellen mit dem Th17-Cocktail führte zu keiner signifikanten Änderung der Suppressionsfunktion im Vergleich zu den unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen. Die mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen hatten eine positive und signifikant höhere Suppressionsfunktion gezeigt (45 % im Verhältnis 0,5:1 und 40 % im Verhältnis 1:1) als die unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen (-16 % im Verhältnis 0,5:1 und -45 % im Verhältnis 1:1) ($p = 0,031$).

3.2.3.3 Vergleich der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen

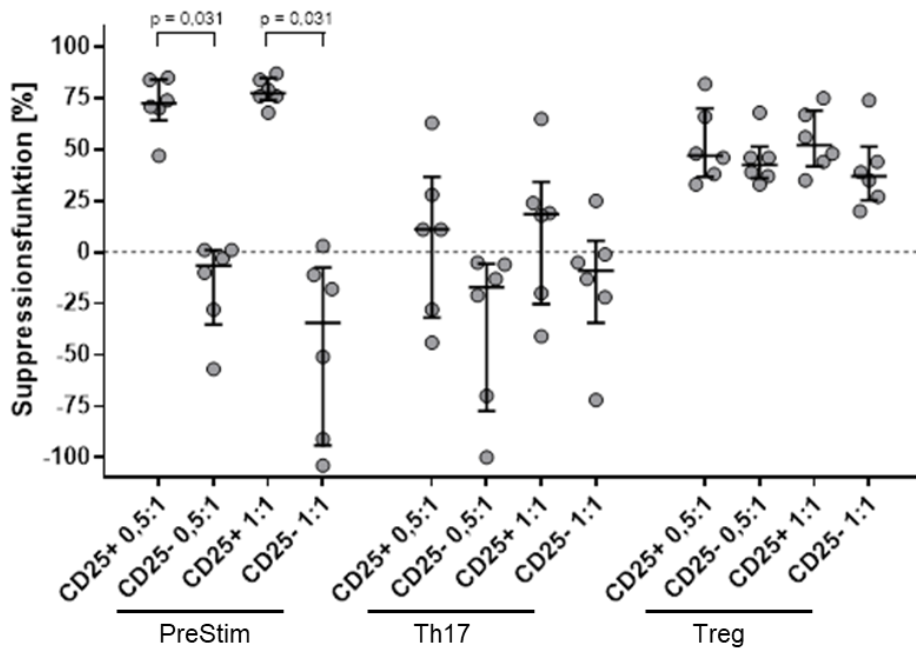
Die korrespondierenden Ansätze der CD4+CD25+CD127low/- Zellen und der CD4+CD25-CD127- Zellen wurden ebenfalls mittels Wilcoxon-Rank-Testes analysiert. Verglichen wurde die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen, jeweils in den korrespondierenden Versuchsansätzen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 38 dargestellt.

Tabelle 38: Vergleich der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen und der CD4+CD25-CD127- Zellen in den korrespondierenden Versuchsansätzen.

Co-Kultur	Suppressionsfunktion			Co-Kultur	Suppressionsfunktion			p-Wert
	Mean ± SD	Median	Min – Max		Mean ± SD	Median	Min – Max	
Prästimulations-Suppression-Assay								
CD25+ 0,5:1	72 ± 14	73	47 – 85	CD25- 0,5:1	-16 ± 23	-7	-57 – 1	0,031 *
CD25+ 1:1	78 ± 7	78	68 – 87	CD25- 1:1	-45 ± 44	-35	-104 – 3	0,031 *
Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail (IL-1β, IL-6, IL-23, TGFβ)								
CD25+ 0,5:1	7 ± 39	11	-44 – 63	CD25- 0,5:1	-36 ± 40	-17	-100 – -5	0,063
CD25+ 1:1	11 ± 37	19	-41 – 65	CD25- 1:1	-15 ± 32	-9	-72 – 25	0,063
Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail (IL-2, TGFβ)								
CD25+ 0,5:1	52 ± 18	47	33 – 82	CD25- 0,5:1	45 ± 12	43	33 – 68	0,438
CD25+ 1:1	54 ± 15	52	35 – 75	CD25- 1:1	40 ± 19	37	20 – 74	0,125

Dargestellt ist in jeder Zeile der Vergleich der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen in den korrespondierenden Versuchsansätzen. Für die einzelnen Ansätze ist die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen in Prozent, jeweils mit Mittelwert ± Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum angegeben. Ein positiver Prozentwert entspricht einer Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Ein negativer Prozentwert steht für eine Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127-Zellen zu CD4- Effektorzellen in den Kulturen wird durch die Formulierungen 0:1, 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Die p-Werte sind in der letzten Spalte dargestellt und mit Sternchen markiert und grau hinterlegt, sofern eine signifikant höhere oder signifikant geringere Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen im Vergleich zur Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen vorgelegen hatte (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen: CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), CD4+CD25-CD127- Zellen (CD25-), engl. cluster of differentiation (CD), Interleukin (IL), maximaler Wert (Max), minimaler Wert (Min), Mittelwert (engl. Mean), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Standardabweichung (SD = engl. standard deviation), engl. transforming growth factor (TGF).*

In Abbildung 48 ist der Vergleich der Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen in den korrespondierenden Versuchsansätzen graphisch veranschaulicht.



CD4- Effektorzellen : CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen

Abbildung 48: Vergleich der Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen in den korrespondierenden Versuchsansätzen.

Dargestellt ist auf der Y-Achse die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127-Zellen in Prozent. Angegeben ist jeweils der Median sowie der Interquartilsabstand. Ein positiver Wert für die Suppressionsfunktion entspricht einer Reduktion der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl, ein negativer Wert steht für eine Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in der Co-Kultur um die entsprechende Prozentzahl. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsansätze aufgetragen. Das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127-Zellen zu CD4- Effektorzellen in den Kulturen wird durch die Formulierungen 0,5:1 und 1:1 wiedergegeben. Für die Versuchsansätze, bei denen die Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen im Vergleich zur Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen in den korrespondierenden Versuchsansätzen signifikant geringer war, sind die p-Werte angegeben (Wilcoxon-Rank-Test). *Abkürzungen: CD4+CD25+CD127low/- Zellen (CD25+), CD4+CD25-CD127- Zellen (CD25-), engl. cluster of differentiation (CD), negativ (-), niedrig (engl. low), positiv (+), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Th17-Cocktail (Th17), Poststimulations-Suppression-Assay nach Stimulation mit Treg-Cocktail (Treg) Prästimulations-Suppression-Assay (PreStim).*

Beim Vergleich der Suppressionsfunktionen in den korrespondierenden Versuchsansätzen zeigten sich in den Prästimulations-Suppression-Assays signifikant geringere Suppressionsfunktionen bei den CD4+CD25-CD127- Zellen (-16 % im Verhältnis 0,5:1 und -45 % im Verhältnis 1:1), verglichen mit den CD4+CD25+CD127low/- Zellen (72 % im Verhältnis 0,5:1 und 78 % im Verhältnis 1:1) ($p = 0,031$). In den Poststimulations-Suppression-Assays nach Stimulation mit dem Th17- und dem Treg-Cocktail wiesen die CD4+CD25-CD127- Zellen und die CD4+CD25+CD127low/- Zellen keine signifikant unterschiedlichen Suppressionsfunktionen auf.

4 Diskussion

Es gibt keinen Goldstandard, um iTregs in vitro zu induzieren [138]. So existieren viele Studien sowohl mit murinen als auch mit humanen Zellen, die unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen die Generierung von iTregs untersuchen [138] [293]. Die Polarisierbarkeit peripherer T-Helferzellen gesunder Probanden hin zu regulatorischen und proinflammatorischen T-Zellen in vitro zu untersuchen, ist das zentrale Thema dieser Arbeit. Hierfür wurden CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen isoliert und deren Funktionsfähigkeit in Suppression-Assays in Anwesenheit verschiedener Zytokin-Stimuli untersucht. Ziel war es, sowohl die Plastizität von Tregs zu demonstrieren als auch periphere Lymphozyten hin zu regulatorischen T-Zellen zu polarisieren. Diese methodische Arbeit hilft, einen Standard für die Polarisierung von humanen CD4+CD25-CD127- Zellen zu iTregs mit Suppressionsfunktion zu etablieren, der als Grundlage für nachfolgende Versuche dienen soll. Als Folgestudien sind zunächst Versuche angedacht, in denen die Zellen von an Autoimmunerkrankungen leidenden Patienten den Zellen gesunder Probanden anhand des in dieser Studie etablierten Versuchsaufbaus gegenübergestellt werden sollen. Langfristig soll diese Studie einen Beitrag zur Behandlung von Patienten mit Autoimmunkrankheiten durch den Transfer von iTregs leisten.

Außerdem wurde eine umfassende durchflusszytometrische Phänotypisierung der PBMCs der Probanden durchgeführt, wobei das Augenmerk besonders auf der FoxP3-Expression und auf dem Zytokin-Expressionsmuster der untersuchten CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen lag.

Die folgende Diskussion befasst sich, analog zum Ergebnisteil, im Kapitel 4.1 mit den Ergebnissen der PBMC-Phänotypisierung und im Kapitel 4.2 mit den Ergebnissen der Suppression-Assays. In Kapitel 4.3 werden die Methoden-abhängigen Faktoren und Limitationen dieser Studie diskutiert. Kapitel 4.4 ordnet die Ergebnisse unserer Studie in die aktuelle Forschung ein und in Kapitel 4.5 wird ein Ausblick auf die Studien gegeben, die nötig wären, um die von uns untersuchte Thematik in Bezug auf Autoimmunerkrankungen voranzubringen.

4.1 PBMC-Phänotypisierung

Der Phänotyp der PBMCs von elf gesunden jungen Erwachsenen wurde bestimmt. Es erfolgte ein Vergleich der FoxP3-Expression und der Zytokinproduktion in den unterschiedlichen Treg-Subpopulationen. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse diskutiert und mit bestehenden Forschungsergebnissen verglichen.

4.1.1 Proportionale Zusammensetzung der Lymphozyten

Die Lymphozyten der gesunden Probanden bestanden zu 9,7 % aus B-Lymphozyten, zu 47,4 % aus CD4⁺ T-Lymphozyten und zu 18,1 % aus CD8⁺ T-Lymphozyten, was in einer CD4/CD8-Ratio von 2,6 resultiert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von J. Yi et al. in der Altersgruppe der 19-29-jährigen Probanden [294]. Die Population der $\gamma\delta$ -T-Zellen machte 2,3 % der PBMCs und 3,4 % der T-Lymphozyten aus, was den in der Literatur angegebenen Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen an den gesamten T-Lymphozyten von 2-5 % bestätigt [237]. Die $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation kann im Rahmen von Infektionen mit Bakterien oder Protozoen stark ansteigen [240] [241] [243] [295]. Die Messwerte zweier Probanden für die $\gamma\delta$ -T-Zellen waren mit 15,5 % und 25,6 % verglichen mit den übrigen Probanden sowie mit den in der Literatur beschriebenen Werten sehr hoch [237]. Die PBMC-Phänotypisierung dieser beiden Patienten war parallel am selben Tag durchgeführt worden. Da bei den Probanden klinisch keine Infektion vorlag und auch das durchgeführte Differentialblutbild keinen Hinweis auf eine Infektion zeigte, interpretierten wir die erhöhten Werte am ehesten als Fehlmessung und schlossen sie von der Analyse aus. 22,5 % der PBMCs exprimierten weder CD4 noch CD8 oder CD19. Diese Zellen, zu denen DCs, Monozyten und NK-Zellen zählen, waren nicht Gegenstand dieser Arbeit und wurden nicht weiter phänotypisiert [296].

4.1.2 Zytokinproduktion innerhalb der T-Lymphozyten-Subpopulationen

Gemessen wurde mit IFN γ ein Th1-Zytokin, mit IL-17 ein Th17-Zytokin und mit IL-10 ein Zytokin, welches u.a. von regulatorischen T-Zellen produziert wird [65] [70] [93].

In unserer Arbeit konnte bei 13,6 % der CD4⁺ T-Lymphozyten und bei 43,8 % der CD8⁺ T-Lymphozyten eine IFN γ -Produktion nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit vorliegenden Studien zur IFN γ -Produktion innerhalb der $\alpha\beta$ -T-Zellen. So beschreiben beispielsweise De Castro Cunha et al. eine IFN γ -Produktion bei 13 % der CD4⁺ T-Zellen und bei 40 % der CD8⁺ T-Zellen gesunder Probanden [297]. IFN γ wird von Th1-Zellen produziert, die über IFN γ und TNF α u.a. für die Aktivierung von Makrophagen verantwortlich sind [65]. Die meisten CD8⁺ CTLs sezernieren ein ähnliches

Zytokinprofil wie die Th1-Zellen und führen ebenfalls über IFN γ und TNF α zur Makrophagenaktivierung [77] [217]. Bei 74,5 % der $\gamma\delta$ -T-Zellen konnten wir eine IFN γ -Produktion nachweisen. Auch dies fügt sich in vorliegende Studien ein, wonach $\gamma\delta$ -T-Zellen hauptsächlich die Zytokine IFN γ und TNF α produzieren [298] [299].

Die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-17 war bei 2,4 % der CD4+ T-Zellen, bei 1,2 % der CD8+ T-Zellen und bei 2,3 % der $\gamma\delta$ -T-Zellen nachweisbar und war damit etwas höher als in den meisten vorhandenen Studien. Kondo et al. beschreiben bei 1,8 % der CD4+ Zellen und bei 0,4 % der CD8+ Zellen gesunder Erwachsener eine IL-17-Produktion [300]. Allerdings wurden die Zellen hier vor Stimulation mit PMA und Ionomycin in einer 5-tägigen Zellkultur mit Anti-CD3 und Anti-CD28 stimuliert [300]. Lenarczyk et al. beschreiben in ihrer Studie, in der ebenfalls mit PMA, Ionomycin, Anti-CD3 und Anti-CD28 stimuliert wurde, bei 0,3-0,6 % der gesamten T-Lymphozyten eine IL-17-Produktion [301]. In einer Studie von Muls et al., in der ausschließlich mit PMA und Ionomycin stimuliert wurde, allerdings in anderer Konzentration als in unserer Studie, produzierten 0,48 % der CD4+ T-Zellen IL-17 [302]. Voo et al. beschreiben, nach 24-stündiger Stimulation mit PMA und Ionomycin mit 2,95 % eine höhere IL-17-Produktion innerhalb der CD4+ Zellen [89]. Singh et al. beschreiben eine IL-17-Produktion bei 0,5 % der $\gamma\delta$ -T-Zellen [299]. Auch hier wurde mit PMA und Ionomycin in anderer Konzentration als in unserer Studie stimuliert [299]. Ursache für die abweichende IL-17-Produktion in unserer Studie im Vergleich zu den vorliegenden Studien könnte in den unterschiedlichen Stimulationsmethoden und Messzeitpunkten liegen. Alternativ könnte eine, von Studie zu Studie leicht abweichende, Gating-Strategie für IL-17 für die abweichenden Ergebnisse verantwortlich sein. Da bei dieser Arbeit die Lymphozyten aus dem Blut junger gesunder Probanden untersucht wurden, war insgesamt mit einer geringen Anzahl IL-17-produzierender Zellen zu rechnen [299] [301] [302]. Die Differenzierung von CD4+ T-Zellen zu IL-17-produzierenden Th17-Zellen findet v.a. in entzündeten Geweben und Schleimhäuten statt [33] [72]. Auch die $\gamma\delta$ -T-Zellen können sich, ebenfalls v.a. in entzündeten Geweben, in Abhängigkeit des Zytokinmilieus zu IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ -T17-Zellen differenzieren [246] [247]. IL-17-produzierenden CD8+ T-Zellen wurden z.B. in Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis und in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit Psoriasis-Arthritis in erhöhter Zahl gefunden [216] [223].

IL-10 wurde sowohl bei den CD4+ T-Zellen als auch bei den CD8+ T-Zellen nur in geringem Maß detektiert. So produzierten in unserer Studie 0,3 % der CD4+ T-Zellen

und 0,6 % der CD8+ T-Zellen IL-10. Dies fügt sich in die Ergebnisse, vorhandene Studien ein, bei denen die Stimulation mit PMA und Ionomycin erfolgte [280] [303]. Je nach Stimulationsmethode finden sich in der Literatur jedoch sehr heterogene Angaben für die IL-10-Produktion. So wird der Anteil der IL-10-produzierenden CD4+ T-Lymphozyten zwischen 0,26 % und 9,25 % angegeben [219] [280] [303] [304]. Auf die Auswirkung der Stimulationsmethode und die daraus resultierende erschwerte Vergleichbarkeit der Studien wird in Kapitel 4.3.8 eingegangen.

4.1.3 T-Zell-Differenzierung

Die Einteilung der T-Zellen in die fünf Subpopulationen naive Zellen (N: CD45RA+CCR7+CD27+), zentrale Gedächtniszellen (CM: CD45RA-CCR7+CD27+), Effektor-Gedächtniszellen (EM: CD45RA-CCR7-CD27+), Effektorzellen (Eff: CD45RA-CCR7-CD27-) und TEMRA-Zellen (TEMRA: CD45RA+CCR7-CD27-) wurde sowohl innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten als auch innerhalb der CD8+ T-Lymphozyten anhand der Oberflächenmoleküle CCR7, CD45RA und CD27 vorgenommen. In der Literatur existieren unterschiedliche Definitionen für die o.g. Subpopulationen, was die Vergleichbarkeit unserer Daten mit bestehenden Studien erschwert [31] [296]. Häufig werden, wie in unserer Arbeit, die Oberflächenmoleküle CCR7, CD45RA und CD27 für die Definition der Subpopulationen verwendet [27]. Einige Autoren nutzen jedoch ausschließlich CD45RA und CCR7 und verzichten auf die Berücksichtigung des CD27-Status, sodass sich andere prozentuale Verteilungen ergeben [294]. Andere Autoren verwenden CD28 oder CD62L anstatt CD27 und CD45RO statt CD45RA für die Festlegung der Subpopulationen [28] [36] [296] [305].

Die Verteilung der Populationen ändert sich im Laufe des Lebens, da durch Antigen-Kontakte die Anzahl der Gedächtniszellen ansteigt, wohingegen die Anzahl der naiven Lymphozyten aufgrund der Thymusinvolution abnimmt [31] [39] [40] [294]. Bei dem in unserer Studie untersuchten Probandenkollektiv handelte es sich um junge Erwachsene zwischen 23 und 25 Jahren. Innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten waren in unserer Studie 26,6 % naive Zellen, 14,5 % zentrale Gedächtniszellen, 30,5 % Effektor-Gedächtniszellen, 9,7 % Effektorzellen und 0,3 % TEMRA-Zellen. Innerhalb der CD8+ Lymphozyten-Population waren 25,4 % der Zellen naive Zellen, 5,3 % zentrale Gedächtniszellen, 20,0 % Effektor-Gedächtniszellen, 13,5 % Effektorzellen und 13,0 % TEMRA-Zellen. Diese Verteilung der T-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut unserer Probanden reiht sich in die Ergebnisse vorhandener Studien ein [33] [46].

Hauptunterschied der Verteilung der Subpopulationen innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten, verglichen mit der Verteilung innerhalb der CD8+ T-Lymphozyten war das Vorhandensein von TEMRA-Zellen innerhalb der CD8+ T-Lymphozyten. 13,0 % der CD8+ T-Lymphozyten exprimierten CD45RA, nicht jedoch CCR7 und CD27 und waren damit TEMRA-Zellen. Innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten konnte eine solche Population nicht sicher nachgewiesen werden, da nur 0,3 % der CD4+ Zellen der TEMRA-Population zugeordnet werden konnten. Dieses Ergebnis deckt sich mit vorhandenen Studien, in denen TEMRA-Zellen innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten bislang nicht beschrieben werden konnten [27] [33].

4.1.4 Regulatorische T-Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen

4.1.4.1 Definition des Phänotyps der regulatorischen T-Zellen

Tregs sind CD4+ T-Lymphozyten, die den IL-2-Rezeptor mit seiner α -Untereinheit CD25 hoch exprimieren [306]. CD25 wird jedoch auch auf aktivierten T-Helferzellen exprimiert und ist daher zur Differenzierung zwischen aktivierten T-Helferzellen und Tregs alleine nicht ausreichend [103]. In unserer Studie wurden in der PBMC-Phänotypisierung nur diejenigen Zellen, die CD25 hoch exprimieren (CD25^{high}) den CD25+ Zellen zugeordnet, um die aktivierten Effektor- und Gedächtniszellen, die CD25 intermediär exprimieren und nur eine FoxP3-Expression von 5-15 % aufweisen, aus der Population auszuschließen [22] [117].

Der Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich die Zelllinie der Tregs definiert, ist FoxP3 [92]. Auch FoxP3 ist nicht spezifisch für Tregs und kann ebenfalls von konventionellen T-Zellen transient exprimiert werden [92] [110] [129] [138] [139] [140]. Da FoxP3 ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor ist, kann dieser zwar in der PBMC-Phänotypisierung gefärbt und damit detektiert werden, allerdings ist dafür die Fixierung der Zellen und Permeabilisation der Zellmembran nötig [103] [263] [282]. Auf diese Weise behandelte Zellen können nicht mehr für Suppression-Assays genutzt werden, da hier vitale Zellen mit intakten Zellmembranen und funktionierendem Proteinsyntheseapparat benötigt werden [282].

Daher hat es sich etabliert, zur Definition der Tregs auf das Oberflächenmolekül CD127 zurückzugreifen, dessen Expression invers mit der FoxP3-Expression korreliert [112] [113] [114] [307]. In unserer Studie wurden die Tregs durch die Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD25 sowie durch die fehlende oder geringe Expression von CD127 charakterisiert (CD4+CD25+CD127^{low/-}). Die CD127^{low}-Zellen wurden,

in Anlehnung an vorausgegangene Studien, in denen sie sich als funktionale Tregs erwiesen hatten, in die Treg-Definition mit eingeschlossen [123] [286] [308] [309]. Durch die Hinzunahme des Oberflächenmarkers CD127 können die Tregs von konventionellen T-Zellen, v.a. Gedächtniszellen und einigen Effektorzellen, unterschieden werden, welche CD127 in höherem Ausmaß exprimieren [113] [123]. Die Einbeziehung der niedrigen CD127-Expression in die Treg-Definition wird allerdings erst ungefähr seit dem Jahre 2006 vorgenommen, was beim Vergleich unserer Ergebnisse mit älteren Studien berücksichtigt werden muss [114] [289] [307].

4.1.4.2 Anteil der Tregs an den CD4+ T-Lymphozyten

Die regulatorischen T-Zellen wurden in dieser Arbeit als CD4+CD25+CD127low/- Zellen definiert und machten in der PBMC-Phänotypisierung 2,1 % der CD4+ T-Lymphozyten aus.

Für den Anteil der Tregs an den CD4+ T-Lymphozyten finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Dies liegt zum einen an der heterogenen Definition der Tregs, zum anderen an der unterschiedlichen Wahl der Cut-Off-Werte für CD25+ Zellen [310].

Kanjana et al. beschreiben den Anteil der Tregs (CD4+CD25high/+CD127low/-) an den PBMCs mit 1,46 – 1,97 % [286]. Bei Beyer et al. machen die Tregs (CD4+CD25high/+CD127low/-) 2,9 % der CD4+ T-Lymphozyten aus [311]. Auch Studien von Baecher-Allan et al. und Sedikki et al., die CD127 nicht in die Treg-Definition mit einbeziehen, geben einen Anteil der Tregs an den CD4+ T-Lymphozyten von 1-2 % an [124] [306]. Der Cut-Off für CD25 wurde in den genannten Studien so gewählt, dass nur die Zellen in die Treg-Population eingeschlossen wurden, die CD25 hoch exprimierten. In der in unserer Arbeit durchgeführten PBMC-Phänotypisierung wurde der Cut-Off für CD25 ebenfalls so gewählt, dass nur die CD25-hochexprimierende Zellpopulation in die Treg-Population eingeschlossen wurde.

In anderen Studien, in denen die Tregs als CD4+CD25+CD127low/- Zellen definiert wurden, wird der Anteil der Tregs an den CD4+ T-Lymphozyten mit 6-8 % höher angegeben [113] [114] [122] [294] [312] [313]. Eine genaue Betrachtung der in den Studien angewandten Cut-Off-Grenzen für CD25 zeigt jedoch, dass in den o.g. Studien mehr Zellen, die CD25 intermediär exprimieren (CD25int), in die positive Fraktion mit eingeschlossen wurde, als bei der von uns durchgeführten PBMC-Phänotypisierung [113] [114] [122] [294] [312] [313].

4.1.4.3 CD4+CD25-CD127- Zellen: Vorläuferzellen von iTregs?

Die zweite Zellpopulation, deren Funktion und Polarisierbarkeit in den Suppression-Assays untersucht wurden, waren die CD4+CD25-CD127- Zellen. Hier wurden die CD127^{low}-Zellen nicht in die Definition miteingeschlossen, da es sich bei der CD4+CD25-CD127^{low}-/- Zellpopulation um eine, mit einem Anteil von 20,1 % an den CD4+ T-Lymphozyten, große und vermutlich heterogene Zellpopulation handelte. Exklusive der CD127^{low}-Zellen machten die CD4+CD25-CD127- Zellen in unserer Arbeit in der PBMC-Phänotypisierung 3,2 % der CD4+ T-Lymphozyten aus. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Dunham et al., welche bei jungen gesunden Probanden einen Anteil der CD4+CD25-CD127- Zellen an den CD4+ T-Lymphozyten von 3,7 % beschreiben [259]. Die Hypothese unserer Studie war, dass es sich bei den CD4+CD25-CD127- Zellen um T-Lymphozyten ohne Suppressionsfunktion handelte, die durch Behandlung mit einem Zytokin-Cocktail, bestehend aus IL-2 und TGFβ, zu iTregs mit Suppressionsfunktion polarisiert werden konnten.

In Studien konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, CD4+CD25- Zellen zu CD4+CD25+ Zellen mit Suppressionsfunktion zu polarisieren [138] [255] [256] [257] [258]. Die CD4+CD25- Zellen stellten jedoch mit 96,6 % in unserer Studie den Hauptanteil der CD4+ T-Lymphozyten und damit vermutlich eine sehr heterogene Zellpopulation dar. Wir fokussierten uns in dieser Studie daher auf die Untersuchung der enger definierten CD4+CD25-CD127- Zellpopulation. Hierbei handelte es sich um nicht aktivierte T-Zellen (CD25⁻), die nicht an der peripheren Homöostase teilnehmen (CD127⁻) [32] [258].

4.1.4.4 CD45RA-Status innerhalb der Tregs

Im Laufe des Lebens nimmt der Anteil der naiven Tregs (CD45RA⁺) aufgrund der Thymusinvolution ab, der Anteil der Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs (CD45RA⁻) nimmt zu [117] [121] [122] [314]. Im Nabelschnurblut wird ein Anteil der CD45RA⁺ Zellen an den Tregs mit 75 % beschrieben, wohingegen bei jungen Erwachsenen nur noch ca. 10-20 % der Tregs CD45RA exprimieren [121] [315]. In unserer Studie exprimierten 14,3 % der Tregs CD45RA auf ihrer Oberfläche und zählten damit zu den naiven Tregs, 85,7 % waren CD45RA⁻ und damit Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs, was sich in die Ergebnisse o.g. Studie einfügt [121] [315]. Allerdings existieren in der Literatur zur Verteilung von naiven und Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs heterogene Angaben. So finden sich auch Studien, welche einen den Anteil der naiven CD45RA⁺ Tregs an den gesamten Tregs bei gesunden Erwachsenen mit 30-40 % angeben [117] [124] [313].

Dies liegt zum einen an der unterschiedlichen Definition der Tregs, die teilweise als CD4+CD25+, als CD4+CD25+FoxP3+ oder als CD4+CD25+CD127- Zellen definiert werden [117] [121] [124] [313] [315]. Zudem trägt die unterschiedliche Gating-Strategie für CD45RA dazu bei, dass in der Literatur unterschiedliche Angaben für die Verteilung der naiven und Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs gemacht werden. Bei der Analyse des Oberflächenmoleküls CD45RA existiert eine Zellpopulation, die CD45RA hoch exprimiert (CD45RA^{high}), eine CD45RA-intermediär exprimierende Population (CD45RA^{int}) und eine Population, die CD45RA nicht exprimiert (CD45RA⁻). In unserer Studie wurde der Cut-Off für CD45RA so gewählt, dass nur die Zellen mit hoher CD45RA-Expression (CD45RA^{high}) den CD45RA⁺ Zellen zugeordnet wurden und die CD45RA^{int}-Zellen in die CD45RA⁻ Population fielen. Andere Studien schließen die CD45RA^{int}-Zellpopulation in die CD45RA⁺ Zellfraktion ein und kommen so auf einen höheren Anteil naiver Tregs an den gesamten Tregs [310] [313]. Sowohl die naiven als auch Gedächtnis-Tregs haben in Studien eine gleichwertige Suppressionsfunktion gezeigt [121] [124]. Bei der Sortierung der Zellen für die Suppression-Assays verzichteten wir daher auf eine Berücksichtigung des CD45RA-Status.

4.1.4.5 FoxP3-Expression innerhalb der Treg-Subpopulationen

FoxP3 ist der Transkriptionsfaktor, der für die Zelllinie der Tregs und deren Funktion verantwortlich ist [92]. tTregs zeichnen sich durch eine hohe und stabile FoxP3-Expression aus [110] [140]. Wie die tTregs exprimieren auch die iTregs FoxP3, jedoch ist die FoxP3-Expression bei iTregs instabiler und kann im Verlauf wieder verloren gehen [134] [140]. FoxP3 ist jedoch kein spezifischer Marker für Tregs, da auch konventionelle T-Zellen FoxP3 transient exprimieren können [110] [129] [138] [139] [140].

Die von uns gemessene FoxP3-Expression in den unterschiedlichen Subpopulationen fügt sich in die Ergebnisse aus vorhergehenden Studien ein. So konnte in unserer Studie, wie auch in einer Arbeit von Liu et al. bei 7,7 % der CD4+ T-Lymphozyten eine FoxP3-Expression nachgewiesen werden [114]. Bevor man begann, den CD127-Status in die Definition der Tregs einzuschließen, wurden regulatorische T-Zellen anhand der Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 charakterisiert [106] [306] [316]. In unserer Arbeit wiesen 53,7 % der CD4+CD25+ T-Lymphozyten eine FoxP3-Expression auf. Liu et al. beschreiben in dieser Zellpopulation den Anteil FoxP2-exprimierender Zellen mit 27,0 – 52,7 % [114]. Von den für die Suppression-Assays verwendeten CD4+CD25+CD127^{low/-} Tregs exprimierten in unserer Studie 81,4 % FoxP3. Für diese Population wird in der Literatur ein Anteil von 79 – 92,3 % angegeben [112] [114]

[120] [259] [311]. Wurden die CD127low-Zellen aus der Analyse ausgeschlossen, so kamen wir auf 89,4 % FoxP3-exprimierende Zellen innerhalb der CD4+CD25+CD127-Population und damit auf eine signifikant höhere FoxP3-Expression als bei den CD4+CD25+CD127low/- Zellen ($p = 0,001$).

Innerhalb der zweiten in den Suppression-Assays untersuchten CD4+CD25-CD127-Zellpopulation wiesen in unserer Arbeit 21,0 % der Zellen eine FoxP3-Expression auf. Die FoxP3-Expression innerhalb der CD4+CD25-CD127- Zellen war damit signifikant geringer als die FoxP3-Expression innerhalb der CD4+CD25+CD127low/- Zellen ($p = 0,001$). Dies war zu erwarten, da es sich bei den CD4+CD25-CD127- Zellen im Gegensatz zu den CD4+CD25+CD127low/- Zellen nicht um Tregs handelte. Dennoch ist bemerkenswert, dass auch innerhalb der CD4+CD25-CD127- Zellen, die im Suppression-Assay keine Suppressionsfunktion zeigten, immerhin 21,0 % der Zellen FoxP3 exprimierten. Innerhalb der CD4+CD25-CD127low/- Population exprimierten 16,6 % der Zellen FoxP3 und damit signifikant weniger Zellen als innerhalb der CD4+CD25-CD127- Zellpopulation ($p = 0,002$). In der Literatur wird für die CD4+CD25-CD127low/- Population eine variable FoxP3-Expression von 13,6 – 25,5 % beschrieben [112] [114].

26,0 % der CD4+CD25+CD127+ Zellen exprimierten FoxP3, was sich in die Ergebnisse von Liu et al. einfügt, die eine FoxP3-Expression von 22,9 % in dieser Zellpopulation beschreiben [114]. Vergleicht man die FoxP3-Expression innerhalb der CD4+CD25+CD127low/- Zellen (81,4 %) mit der FoxP3-Expression innerhalb der CD4+CD25+CD127+ Zellen (26,0 %), so zeigt sich eine signifikant höhere FoxP3-Expression bei den CD4+CD25+CD127low/- Zellen ($p = 0,004$).

Unsere Ergebnisse bestätigen, dass der Ausschluss von CD127+ Zellen sowie auch CD127low-Zellen von der Analyse mit einer deutlich höheren FoxP3-Expression in den untersuchten Zellpopulationen einhergeht [113] [114].

In unserer Arbeit zeigten die Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs (CD4+CD25+CD127low/-CD45RA-) mit 83,9 % eine signifikant höhere FoxP3-Expression als die naiven Tregs (CD4+CD25+CD127low/-CD45RA+), von denen nur 65,9 % FoxP3 exprimierten ($p = 0,005$). Hoffmann et al. beschreiben bei 90 % der CD4+CD25+CD45RA- Effektor- bzw. Gedächtnis-Tregs eine FoxP3-Expression, welche jedoch im Verlauf einer zwei- bis dreiwöchigen Zellkultur verloren ging [117]. Im Gegensatz dazu wird in der Literatur bei den CD4+CD25+CD45RA+ naiven Tregs auch nach Expansion

eine demethylierte TSDR und damit eine stabile FoxP3-Expression beschrieben [117] [123].

4.1.4.6 Zytokinproduktion innerhalb der Treg-Subpopulationen

2,8 % der CD4+CD25+CD127low/- Tregs produzierten IFN γ . Dies stimmt mit vorhandenen Studien überein, in denen ebenfalls eine kleine, IFN γ -produzierende Zellpopulation innerhalb der Tregs beschrieben wurde [199] [256]. Die IFN γ -Produktion war in der CD4+CD25+CD127- Zellpopulation mit 1,0 % signifikant geringer als in der CD4+CD25+CD127low/- Population ($p = 0,005$). Mit 10,1 % lag die IFN γ -Produktion bei den CD4+CD25-CD127- Zellen signifikant höher als bei den CD4+CD25+CD127low/- Zellen ($p = 0,001$).

IL-17 wurde sowohl von 1,9 % der CD4+CD25+CD127low/- Zellen als auch von 1,9 % der CD4+CD25-CD127- Zellen produziert. Die CD4+CD25+CD127- Zellen zeigten mit 0,9 % eine signifikant geringere IL-17-Produktion als die CD4+CD25+CD127low/- Zellen ($p = 0,023$). Somit konnten wir die aus vorherigen Studien bekannte, im Blut gesunder Probanden existierende kleine Population von IL-17-produzierenden Tregs bestätigen [201] [203].

Die IL-10-Produktion war in allen untersuchten Zellpopulationen gering (0,3 – 0,5 %). Signifikante Unterschiede zwischen den Zellpopulationen ergaben sich bezüglich der IL-10-Produktion nicht. Generell sind die Ergebnisse für die IL-10-Produktion bei sehr geringen gemessenen Ereignissen unter Vorbehalt zu betrachten, da die Gating-Strategie hierbei fehleranfällig ist. Für die Messung von IL-10 ist die verwendete Stimulationsmethode mit PMA, Ionomycin und BFA nicht die optimale Methode (s. Kapitel 4.3.8). Bei einem Vergleich der IL-10 Produktion zwischen verschiedenen Probandenkollektiven, z.B. zwischen gesunden Probanden und an Autoimmunerkrankungen leidenden Patienten, könnten sich dennoch auch mit der hier verwendeten Methode interessante Unterschiede ergeben.

Abschließend kann man feststellen, dass der Einschluss der CD127low-Zellen in die Treg-Population zu einer signifikant höheren IFN γ - und IL-17-Produktion führte, verglichen mit den CD4+CD25+CD127- Zellen. Dies ist relevant, wenn – wie in unserer Studie – auch CD4+CD25+CD127low/- Zellen in Untersuchungen eingeschlossen werden. Außerdem stellten wir fest, dass sich die CD4+CD25-CD127- Zellpopulation von der CD4+CD25+CD127low/- Zellpopulation durch eine signifikant höhere IFN γ -Produktion unterschied.

4.1.5 Chemokinrezeptoren und CD161

Wir konnten nach vierstündiger Stimulation der PBMCs mit PMA, Ionomycin und BFA in der anschließend durchgeführten Phänotypisierung bei 6,5 % der CD4+ T-Lymphozyten eine CXCR3-Expression, bei 2,3 % eine CCR5-Expression, bei 17,5 % eine CCR6-Expression und bei 9,0 % eine Expression von CD161 nachweisen.

Innerhalb der CD8+ T-Lymphozyten konnten wir bei 21,5 % der Zellen eine CXCR3-Expression, bei 49,4 % eine CCR5-Expression, bei 10,0 % eine CCR6-Expression und bei 4,1 % eine Expression von CD161 messen.

Die Expression der Chemokinrezeptoren und auch die Zytokinproduktion innerhalb der Chemokinrezeptoren-exprimierenden Subpopulationen sind abhängig von den vor der PBMC-Phänotypisierung durchgeführten Kultur- und Stimulationsbedingungen [317]. In der Literatur finden sich sehr heterogene Angaben für die Expression der Chemokinrezeptoren zwischen den einzelnen Studien, die teilweise höher und teilweise niedriger liegen als die in unserer Studie gemessenen Werte [318] [319] [320]. Aufgrund der unterschiedlichen Methodik ist es an dieser Stelle wenig sinnvoll, unsere Ergebnisse mit den vorliegenden Daten zu vergleichen. Die in unserer Studie generierten Werte sollen als Datengrundlage für Folgestudien dienen, in denen zusätzlich zu gesunden Probanden die PBMCs von an Autoimmunerkrankungen leidenden Patienten untersucht werden sollen.

4.2 Polarisierung und Funktionsuntersuchung regulatorischer T-Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen mittels Suppression-Assays

Bei der Interpretation der Ergebnisse der Suppression-Assays waren insbesondere folgende Fragestellungen von Interesse:

- Waren die isolierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen funktionsfähige Tregs, die in einer Co-Kultur die Proliferation der CD4- Effektorzellen supprimieren konnten?
- Besaßen die isolierten CD4+CD25-CD127- Zellen supprimierende Eigenschaften?
- Beeinträchtigte die Stimulation mit dem Th17-Cocktail die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen?
- War es möglich, die CD4+CD25-CD127- Zellen durch die Stimulation mit dem Treg-Cocktail hin zu Zellen mit Suppressionsfunktion zu polarisieren?

4.2.1 Vergleich der Co-Kulturen von CD4- Effektorzellen mit CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Kontrollansätzen

Es wurde sowohl die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Proliferation in den Kontrollansätzen verglichen als auch die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion in den Kontrollansätzen. Da sich in den Kontrollansätzen nur CD4- Effektorzellen befanden, wurde die Suppressionsfunktion hier auf Null festgelegt. Ziel dieser Analyse war es, zu untersuchen, ob die CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen die Fähigkeit zur Suppression der Proliferation von CD4- Effektorzellen besaßen, also ob deren Suppressionsfunktion signifikant von Null abwich.

Im Folgenden wird das Verhältnis von CD4+CD25+CD127low/- Zellen bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen zu CD4- Effektorzellen mit 0:1, 0,5:1 und 1:1 angegeben.

4.2.1.1 Vergleich der Co-Kulturen von CD4- Effektorzellen mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Kontrollansätzen (Prästimulations-Suppression-Assays)

In Anwesenheit der CD4+CD25+CD127low/- Zellen fiel die Proliferation der CD4-Effektorzellen mit 8,53 % (Verhältnis 0,5:1) bzw. 6,77 % (Verhältnis 1:1) signifikant geringer aus als im Kontrollansatz (32,22 %), in dem nur CD4- Effektorzellen enthalten waren ($p = 0,031$). Die unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen zeigten eine Suppressionsfunktion von durchschnittlich 72 % (Verhältnis 0,5:1) bzw. 78 % (Verhältnis 1:1), welche signifikant von Null abwich ($p = 0,031$ für Verhältnis 0,5:1 und $p = 0,036$ für Verhältnis 1:1). Die Proliferation der CD4- Effektorzellen war also in Anwesenheit der CD4+CD25+CD127low/- Zellen in der Co-Kultur um 72 % (Verhältnis 0,5:1) bzw. 78 % (Verhältnis 1:1) geringer im Vergleich zur Proliferation der CD4-Effektorzellen im Kontrollansatz. Dieses Ergebnis bestätigt, dass es sich bei den isolierten Zellen um funktionsfähige Tregs handelte und reproduziert die Ergebnisse zahlreicher Studien, die gezeigt haben, dass Tregs die Fähigkeit besitzen, die Proliferation von Effektorzellen *in vitro* zu hemmen [158] [162] [306]. So beschreiben beispielsweise Crellin et al. bei einem Verhältnis von Tregs zu Effektorzellen von 0,5:1 Reduktion der Proliferation der Effektorzellen um 70-80 % [321].

Das Vorhandensein von CD4+CD25-CD127- Zellen in der Co-Kultur mit CD4- Effektorzellen führte zu keiner erkennbaren Veränderung der Proliferation dieser Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz. Im unstimulierten Zustand wich die Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen nicht signifikant von Null ab, sie besaßen also nicht die Fähigkeit, die Proliferation der CD4- Effektorzellen zu hemmen. Diese Erkenntnis diente als Ausgangspunkt für die Folgeversuche, deren Ziel es war, die CD4+CD25-CD127- Zellen hin zu Treg-ähnlichen Zellen zu polarisieren. Interessant ist, dass die CD4+CD25-CD127- Zellen keine Suppressionsfunktion zeigten, obwohl immerhin 21 % unter ihnen FoxP3 exprimierten. Baecher-Allan et al. konnten zeigen, dass CD4+CD25- Zellen keine Suppressionsfunktion besaßen, jedoch beachteteten sie nicht den CD127-Status der untersuchten Zellen [306].

4.2.1.2 Vergleich der Co-Kulturen von CD4- Effektorzellen mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Kontrollansätzen (Poststimulations-Suppression-Assays)

In der Poststimulations-Analyse nach Stimulation der CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit dem Th17-Cocktail war die Proliferation der CD4- Effektorzellen mit 34,15 % (Verhältnis 0,5:1) bzw. 33,03 % (Verhältnis 1:1) nicht signifikant geringer als im Kontrollansatz (38,82 %). Die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen wich nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail nicht signifikant von Null ab. Die durch den Th17-Cocktail behandelten CD4+CD25+CD127low/- Zellen besaßen also nicht die Fähigkeit, die Proliferation der CD4- Effektorzellen zu hemmen. Dies lässt vermuten, dass die CD4+CD25+CD127low/- Zellen durch die Stimulation mit dem proinflammatorischen Th17-Cocktail die Fähigkeit verloren hatten, die Proliferation der CD4- Effektorzellen zu hemmen. Im folgenden Kapitel wird diese Vermutung durch den Vergleich der stimulierten mit den unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen erhärtet.

Die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit den mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen fiel, verglichen mit dem Kontrollansatz signifikant geringer aus (15,42 % im Verhältnis 0,5:1 bzw. 14,63 % im Verhältnis 1:1 vs. 38,82 % im Kontrollansatz; $p < 0,05$). Die CD4+CD25+CD127low/- Zellen hatten also auch nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail die Fähigkeit, die Proliferation der CD4- Effektorzellen zu hemmen. Die mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen zeigten weiterhin eine Suppressionsfunktion, welche signifikant von Null abwich (52 % im Verhältnis 0,5:1; 54 % im Verhältnis 1:1; $p < 0,05$). Die Ergebnisse zeigen, dass die CD4+CD25+CD127low/- Zellen in einem IL-2- und TGF β -beinhaltenden Zytokinmilieu ihre Suppressionsfunktion aufrechterhielten. In Studien konnte gezeigt werden, dass IL-2 wichtig für die Aufrechterhaltung der FoxP3-Expression und damit der Treg-Funktion ist [55] [193] und dass TGF β , gemeinsam mit IL-2, die Differenzierung von T-Helferzellen in Richtung Treg begünstigt [190] [191] [192].

Die mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen konnten die Proliferation der CD4- Effektorzellen nicht supprimieren. Sie hatten, je nach Verhältnis der beiden Zellpopulationen in der Co-Kultur zueinander, zu einer gleichbleibenden (42,35 %, Verhältnis 1:1) oder sogar zu einer signifikant höheren Proliferation der CD4- Effektorzellen (45,50 %, Verhältnis 0,5:1, $p < 0,05$), verglichen mit dem Kontrollansatz (40,78 %) geführt. Die Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen lag nach

Stimulation mit dem Th17-Cocktail im negativen Bereich und wich bei einem CD4+CD25-CD127- zu CD4- Effektorzell-Verhältnis von 0,5:1 signifikant von Null ab, was bedeutet, dass es durch die CD4+CD25-CD127- Zellen in dieser Co-Kultur zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen gekommen war ($p < 0,05$). Diese Steigerung der Proliferation der CD4- Effektorzellen könnte möglicherweise daraus resultieren, dass der Th17-Cocktail bei den CD4+CD25-CD127- Zellen eine Differenzierung in Richtung proinflammatorische Th17-Zellen ausgelöst haben könnte. Dem gegenüber steht der fehlende Effekt der Th17-Stimulation der CD4+CD25-CD127- Zellen in der Co-Kultur, in der CD4+CD25-CD127- Zellen mit CD4- Effektorzellen im Verhältnis 1:1 vorlagen. Es wäre wünschenswert, diese Vermutung in einer größer angelegten Studie, die eine Phänotypisierung der CD4+CD25-CD127- Zellen nach der Zytokin-Stimulation mit einschließt, zu bestätigen oder zu widerlegen.

In der Co-Kultur der CD4- Effektorzellen mit den mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen zeigte sich eine signifikant geringere Proliferation der CD4- Effektorzellen, verglichen mit dem Kontrollansatz (20,08 % im Verhältnis 0,5:1 bzw. 21,43 % im Verhältnis 1:1 vs. 40,78 % im Kontrollansatz; $p < 0,05$). Nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail konnte bei den CD4+CD25-CD127- Zellen eine signifikant von Null abweichende Suppressionsfunktion nachgewiesen werden (45 % im Verhältnis 0,5:1 und 40 % im Verhältnis 1:1; $p < 0,05$). Die mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen reduzierten also die Proliferation der CD4- Effektorzellen um 45 % (Verhältnis 0,5:1) bzw. um 40 % (Verhältnis 1:1) im Vergleich zum Kontrollansatz.

4.2.2 Vergleich der Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen

4.2.2.1 Vergleich der Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen

Die Proliferation der CD4- Effektorzellen war in der Co-Kultur mit mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen signifikant höher als in der Co-Kultur, in der sich unstimulierte Tregs befanden (34,15 % vs. 8,53 % im Verhältnis 0,5:1; 33,03 % vs. 6,77 % im Verhältnis 1:1; $p = 0,031$). Die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen war nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail signifikant

geringer als die Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen (7 % vs. 72 % im Verhältnis 0,5:1, $p = 0,031$; 11 % vs. 78 % im Verhältnis 1:1, $p = 0,036$). Bezieht man die in 4.2.1 diskutierten Ergebnisse aus dem Vergleich der Co-Kulturen mit den Kontrollansätzen mit ein, kann man feststellen, dass die Tregs nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail die Fähigkeit, die Proliferation der CD4-Effektorzellen zu unterdrücken und damit ihre Suppressionsfunktion, verloren hatten. In Studien konnte gezeigt werden, dass Tregs in Anwesenheit von TGF β in Kombination mit den proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-23 ihre Suppressionsfunktion verlieren und sich zu Th17-Zellen differenzieren können [89] [118] [204]. Wir vermuten, dass in unserer Studie durch den TGF β , IL-1 β , IL-6 und IL-23 beinhaltenden Th17-Cocktail eine Differenzierung der CD4+CD25+CD127low/- Zellen hin zu Th17-Zellen ohne Suppressionsfunktion ausgelöst wurde. Um diese Hypothese zu überprüfen wäre eine Phänotypisierung der CD4+CD25+CD127low/- Zellen nach der Stimulation mit besonderem Augenmerk auf die Marker CD25, FoxP3, ROR γ t, IL-10 und IL-17 von großem Interesse. Da nach der Zytokin-Stimulation keine erneute Charakterisierung der Zellen stattgefunden hat, ist der Phänotyp der stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen unbekannt. Eine alternative Hypothese wäre, dass das Fehlen von IL-2 im Th17-Cocktail, welches den wesentlichen Überlebensfaktor von Tregs darstellt [38] [57] [55] [95] [111], zum Verlust der Treg-Funktion oder sogar zum Absterben der Tregs geführt haben könnte und so die nach der Stimulation fehlende Suppressionsfunktion erklären würde. Ein IL-2-Mangel in vivo bei Mäusen korreliert mit dem Verlust der FoxP3-Expression und einer reduzierten Treg-Funktion [322] [323]. Sakaguchi et al. beschrieben, dass das Fehlen von IL-2 in Standard-Zellkulturen die Ursache für die Anergie der Tregs in vitro darstellt [324]. Bei in vitro-Zellkulturen mit humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von IL-2 die Polarisation von Tregs durch IL-6 und IL-1 β hin zu Th17-Zellen verhinderte [204]. Um festzustellen, ob der Th17-Cocktail oder das Fehlen von IL-2 zum Verlust der Suppressionsfunktion der Tregs geführt hatte, sollte man zusätzlich einen Versuchsansatz wählen, in dem die Stimulation mit dem Th17-Cocktail in Anwesenheit von IL-2 erfolgt und die Ergebnisse vergleichen [204] [289].

Nach Stimulation der CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit dem Treg-Cocktail war die Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen signifikant höher als in den Co-Kulturen mit unstimulierten Tregs (15,42 % vs. 8,53 % im Verhältnis 0,5:1; 14,63 % vs. 6,77 % im Verhältnis 1:1; $p = 0,031$). Die mit dem Treg-Cocktail stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen zeigten eine geringere Suppressionsfunktion, verglichen den unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen. Signifikant war der

Unterschied allerdings nur bei den CD4+CD25+CD127low/- Zellen, die in einer Co-Kultur im Verhältnis von 1:1 mit den CD4- Effektorzellen vorlagen (54 % vs. 78 %, $p = 0,036$). Die CD4+CD25+CD127low/- Zellen wiesen nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail zwar weiterhin eine Suppressionsfähigkeit auf (s. Kapitel 4.2.1), diese war jedoch geringer als die Suppressionsfähigkeit der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen. Die Ursache für diese geringere Suppressionsfunktion der Tregs nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail könne der Untergang von Zellen in der sechstägigen Zellkultur sein. Um diese Theorie zu verifizieren, müsste nach der Stimulation der CD4+CD25+CD127low/- Zellen eine erneute Zählung der Zellen erfolgen. Wir hatten uns jedoch aufgrund der geringen Zellzahl an dieser Stelle aktiv gegen eine erneute Zellzählung entschieden, um den Zellverlust durch erneutes Zentrifugieren und Absaugen zu vermeiden.

4.2.2.2 Vergleich der Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen mit den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen

Im Ansatz, in dem die CD4- Effektorzellen mit mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen im Verhältnis 0,5:1 vorlagen, zeigten die CD4- Effektorzellen eine signifikant höhere Proliferation als in der Co-Kultur mit unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen (45,5 % vs. 33,82 %, $p = 0,031$). Hierfür könnte eine durch die Stimulation mit dem Th17-Cocktail induzierte Differenzierung der CD4+CD25-CD127- Zellen hin zu proinflammatorischen Th17-Zellen verantwortlich gewesen sein [53]. Lagen die CD4- Effektorzellen im Verhältnis 1:1 mit den CD4+CD25-CD127- Zellen vor, so ergab sich keine signifikante Änderung der Proliferation der CD4- Effektorzellen. Auch die Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen im unstimulierten Zustand wich nicht signifikant von der Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail ab. In beiden Fällen befand sie sich im negativen Bereich, was bedeutet, dass im Beisein der CD4+CD25-CD127- Zellen die Proliferation der CD4- Effektorzellen höher war als deren Proliferation im Kontrollansatz. Um zu erfahren, ob der Th17-Cocktail eine Veränderung der CD4+CD25-CD127- Zellen bewirkt hatte, wäre auch hier eine Phänotypisierung nach Zytokin-Stimulation der Zellen hilfreich.

Beim Ansatz der mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen zeigte sich eine signifikant niedrigere Proliferation der CD4- Effektorzellen im Vergleich zum Ansatz mit unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen (20,08 % vs. 33,82 % im Verhältnis 0,5:1; 21,43 % vs. 40,07 % im Verhältnis 1:1; $p = 0,031$). Im Vergleich zur

Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen, kam es nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail zu einer signifikanten Erhöhung der Suppressionsfunktion auf Werte im positiven Bereich (45 % vs. -16 % im Verhältnis 0,5:1; 40 % vs. -45 % im Verhältnis 1:1; $p = 0,031$). Durch die Stimulation mit dem Treg-Cocktail hatten die CD4+CD25-CD127- Zellen also eine Suppressionsfunktion erlangt und somit die Fähigkeit erhalten, die Proliferation der CD4- Effektorzellen zu hemmen. Da diese Fähigkeit regulatorischen T-Zellen zugesprochen wird, spricht dieses Ergebnis für unsere Hypothese, dass die CD4+CD25-CD127- Zellen durch die Stimulation mit dem Treg-Cocktail zu iTregs mit Suppressionsfunktion polarisiert worden waren. Dies fügt sich in die Ergebnisse von Studien ein, in denen gezeigt werden konnte, dass aus CD4+CD25- Zellen durch Stimulation mit TGF β und IL-2 regulatorische T-Zellen mit Suppressionsfunktion generiert werden können [138] [255] [256] [257] [258]. Allerdings wurde in genannten Studien der CD127-Status der Zellen nicht berücksichtigt. Die PBMC-Phänotypisierung hatte gezeigt, dass innerhalb der unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellpopulation 21,0 % der Zellen FoxP3 exprimierten. Von großem Interesse wäre auch hier eine Phänotypisierung der CD4+CD25-CD127- Zellen nach der Stimulation mit dem Treg-Cocktail, um die Fragen zu klären, ob die Stimulation mit TGF β und IL-2 zu einer CD25-Expression sowie zu einer erhöhten FoxP3-Expression in den stimulierten Zellen geführt hatte.

4.2.3 Vergleich der korrespondierenden Versuchsansätze von CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen

4.2.3.1 Vergleich der korrespondierenden Versuchsansätze von unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen (Prästimulations-Suppression-Assays)

Beim Vergleich der korrespondierenden Versuchsansätze zeigten sich im Prästimulations-Suppression-Assay eine signifikant niedrigere Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen, verglichen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25-CD127- Zellen (8,53 % vs. 33,82 % im Verhältnis 0,5:1; 6,77 % vs. 40,07 % im Verhältnis 1:1; $p = 0,031$). Die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen war signifikant höher als die Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen (72 % vs. -16 % im Verhältnis 0,5:1; 78 % vs. -45 % im Verhältnis 1:1, $p = 0,031$). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den in Kapitel 4.2.1 diskutierten Ergebnissen, in denen gezeigt werden konnte, dass die CD4+CD25+CD127low/- Zellen eine Suppressionsfähigkeit

aufwiesen, wohingegen die CD4+CD25-CD127- Zellen nicht die Fähigkeit hatten, die Proliferation der CD4- Effektorzellen zu supprimieren.

4.2.3.2 Vergleich der korrespondierenden Versuchsansätze von stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen (Poststimulations-Suppression-Assays)

In den Co-Kulturen mit mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen zeigten die CD4+ Effektorzellen keine signifikant unterschiedliche Proliferation, verglichen mit der Proliferation der CD4+ Effektorzellen in den Co-Kulturen mit mittels Th17-Cocktails stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen (34,15 % vs. 45,50 % im Verhältnis 0,5:1, 33,03 % vs. 42,35 % im Verhältnis 1:1). Die CD4+CD25+CD127low/- Zellen und die CD4+CD25-CD127- Zellen wiesen nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail keine signifikant unterschiedliche Suppressionsfunktion auf (-7 % vs. -17 % im Verhältnis 0,5:1; 11 % vs. -15 % im Verhältnis 1:1). Beide Zellpopulationen besaßen nach Stimulation mit dem Th17-Cocktail nicht die Fähigkeit, die Proliferation der CD4- Effektorzellen zu supprimieren. In Zusammenschau mit den in den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.2 diskutierten Ergebnissen kann man daraus schließen, dass die CD4+CD25+CD127low/- Zellen durch die Stimulation mit dem Th17-Cocktail ihre Suppressionsfähigkeit verloren hatten und sich in der Co-Kultur mit CD4- Effektorzellen nicht mehr von den CD4+CD25-CD127- Zellen unterscheiden ließen. Alternativ könnte, wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben, das Fehlen von IL-2 in der Zellkultur mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen zu einem Funktionsverlust oder Absterben der CD4+CD25+CD127low/- Zellen geführt haben.

Auch nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail zeigte sich keine signifikant unterschiedliche Proliferation der CD4- Effektorzellen in den korrespondierenden Versuchsansätzen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen verglichen mit den Ansätzen mit CD4+CD25-CD127- Zellen (15,42 % vs. 20,08 % im Verhältnis 0,5:1; 14,63 % vs. 21,43 % im Verhältnis 1:1). Die CD4+CD25-CD127- Zellen zeigen nach Stimulation mit dem Treg-Cocktail eine Suppressionsfunktion, die sich nicht signifikant von der Suppressionsfunktion der mittels Treg-Cocktails stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen unterschied (45 % vs. 52 % im Verhältnis 0,5:1; 40 % vs. 54 % im Verhältnis 1:1). Dies fügt sich in die Ergebnisse von Studien ein, die bei iTregs eine mit tTregs vergleichbare Suppressionsfunktion nachweisen konnten [325] [326]. Beide Zellpopulationen besaßen die Fähigkeit, die Proliferation der CD4- Effektorzellen zu supprimieren. Hieraus kann man, in Zusammenschau mit den in den Kapiteln 4.2.1 und

4.2.2 diskutierten Ergebnissen konstatieren, dass die CD4+CD25-CD127- Zellen durch die Stimulation mit dem Treg-Cocktail die Fähigkeit zur Suppression von CD4-Effektorzellen erlangt hatten. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl naive T-Zellen als auch Th17-Zellen zu iTregs konvertiert werden können [134] [256] [257] [326]. Eine Stimulation mit TGF β führte bei CD4+CD25- Zellen zu einer Erhöhung der FoxP3-Expression und zu einem mit Tregs vergleichbaren Zytokinprofil [327]. Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass auch CD4+CD25-CD127- Zellen durch Zytokin-Stimulation mit TGF β und IL-2 zu Zellen mit Suppressionsfunktion und damit vermutlich zu iTregs polarisiert werden können. Um die Hypothese, dass die CD4+CD25-CD127- Zellen durch den Treg-Cocktail zu iTregs polarisiert worden waren, zu bestätigen, wäre eine nachfolgende Phänotypisierung wünschenswert und sollte in einer Folgestudie durchgeführt werden.

4.3 Methoden-abhängige Faktoren und Limitationen

4.3.1 In vitro Verhältnisse

In vitro-Versuche stellen ein Modell für Vorgänge in vivo dar, können diese aber nie vollständig und realitätsgetreu abbilden [26] [158]. Bei der Interpretation von in vitro-Versuchen muss daher immer die mögliche Diskrepanz zu den Vorgängen in vivo berücksichtigt werden [205] [328]. In vitro herrscht ein Versuchsaufbau mit einzelnen Zellpopulationen, was im Gegensatz zum in vivo herrschenden multizellulären Milieu steht [289] [329]. Die Stimulation der Zellen mit unspezifischen Antigenen wie Anti-CD3 und unphysiologischen Stimulatoren wie PMA und Ionomycin ist ein etabliertes Verfahren, um eine Immunantwort auszulösen, kann eine physiologische Reaktion der Immunzellen auf bestimmte Pathogene oder körpereigene Antigene aber nur bedingt nachbilden [263] [280].

Vorteile der in vitro-Versuche sind, dass die Ergebnisse leichter auf die einzelnen durchgeführten Schritte zurückgeführt werden können als bei in vivo Versuchen [158] [289]. Es können mit geringem Aufwand und insbesondere geringem Risiko Versuche an menschlichen Zellen durchgeführt werden, um physiologische und pathologische Vorgänge im menschlichen Körper besser zu verstehen [158]. In vitro Suppression-Assays stellten in den letzten zwei Jahrzehnten die gängige Methode zur Untersuchung der Treg-Funktion bei menschlichen Zellen dar, sodass die Eigenschaften von humanen Tregs in vitro mittlerweile gut untersucht sind [205] [289] [293] [330]. Die komplexen Mechanismen der Immunregulation durch Tregs sind jedoch durch in vitro Versuche nicht vollständig abbildbar und bleiben in vivo weiterhin relativ unklar [118] [293] [331].

In vivo wird aus ethischen Gründen häufig auf Tierversuche, insbesondere auf Experimente an Mäusen, zurückgegriffen, wo sich zwar die komplexen in einem lebenden Organismus ablaufenden Vorgänge sehr gut abbilden lassen, allerdings bei der Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen interspezifische Unterschiede berücksichtigt werden müssen [328]. Gerade in der Treg-Forschung sind mittlerweile etliche Unterschiede zwischen murinen und humanen Zellen bekannt, sodass sich die Ergebnisse nicht ohne weiteres von der Maus auf den Menschen übertragen lassen [110]. Daher haben wir in unserer Arbeit, bis auf eine Ausnahme, in der explizit von murinen Experimenten die Rede ist, nur Studien mit humanen Zellen als Quellen herangezogen.

4.3.2 Kryokonservierung der Zellen

Die PBMCs wurden nach ihrer Gewinnung durch Dichtegradientenzentrifugation zunächst bei -197°C kryokonserviert. Für die PBMC-Phänotypisierung sowie für die Isolation der $\text{CD4}+\text{CD25}+\text{CD127}^{\text{low}}/-$ Zellen, der $\text{CD4}+\text{CD25}-\text{CD127}-$ Zellen und der $\text{CD4}-$ Effektorzellen und die nachfolgenden Suppression-Assays wurden die PBMCs wieder aufgetaut. Die Kryokonservierung kann prinzipiell zur verminderten Vitalität, zur Funktionsbeeinträchtigung der Zellen, zu veränderter Zytokinproduktion und zu verminderten Zell-Antworten führen [268] [270] [332] [333] [334]. Auch die Expression einiger Oberflächenmoleküle, wie beispielsweise CCR5, kann nach Kryokonservierung signifikant verändert sein [335]. In anderen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die PBMCs nach der Kryokonservierung eine mit frisch isolierten PBMCs vergleichbare Vitalität, Genexpression, Zytokinproduktion und Proliferation aufweisen [48] [269] [335] [336]. Grundsätzlich wäre es wünschenswert, die PBMC-Phänotypisierung sowie die Stimulations- und Suppressionsversuche direkt im Anschluss an die Gewinnung der PBMCs durchzuführen. Dies war jedoch aus organisatorischen Gründen, insbesondere aufgrund der Verfügbarkeit der Durchflusszytometer FACSAria III und FACSCanto II sowie aufgrund Dauer der Versuche, nicht zu leisten. So muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass es bei der Produktion von Zytokinen und der Expression von Oberflächenmolekülen sowie bei der Funktion der Lymphozyten durch die Kryokonservierung zu relevanten Abweichungen im Vergleich zu frisch isolierten Zellen kommen könnte [335] [337] [338].

Nach Ansetzen der Prästimulations-Suppression-Assays und der Zellkulturen mit den stimulierten $\text{CD4}+\text{CD25}+\text{CD127}^{\text{low}}/-$ und der $\text{CD4}+\text{CD25}-\text{CD127}-$ Zellen wurden die übrigen für die Poststimulations-Suppression-Assays benötigten $\text{CD4}-$ Effektorzellen erneut für 6 Tage kryokonserviert. Diese zweite Kryokonservierung ist beim Vergleich der Proliferation der $\text{CD4}-$ Effektorzellen zwischen den Prä- und den Poststimulations-Suppression-Assays zu berücksichtigen. Bei Gegenüberstellung der Suppressionsfunktion der $\text{CD4}+\text{CD25}+\text{CD127}^{\text{low}}/-$ bzw. der $\text{CD4}+\text{CD25}-\text{CD127}-$ Zellen in den Prä- und in den Poststimulations-Suppression-Assays wird diese eingeschränkte Vergleichbarkeit jedoch durch den Bezug auf den Kontrollansatz relativiert. Außerdem konnte in einer Studie von Costantini et al. gezeigt werden, dass eine Kryokonservierung die Proliferationskapazität von Lymphozyten in Antwort auf Anti-CD3 nicht relevant beeinträchtigt [335]. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren gingen wir auch beim Vergleich der Prä- mit den Poststimulations-Suppression-Assays von abhängigen Daten aus und verwendeten den Wilcoxon-Rank-Test für die statistische Auswertung.

Ein alternativer Versuchsaufbau zur Umgehung der Effekte der Kryokonservierung wäre, die Isolation der CD4+CD25+CD127low/- Zellen, der CD4+CD25-CD127- Zellen und der CD4- Effektorzellen Zellen aus frischen, nicht kryokonservierten, PBMCs durchzuführen und die CD4- Effektorzellen, die für die Poststimulations-Suppression-Assays benötigt werden, nach ihrer Isolation in einer Zellkultur zu belassen [286]. Jedoch stünde man hier beim Vergleich der Prä- mit den Poststimulations-Suppression-Assays vor der Tatsache, dass frisch isolierte CD4- Effektorzellen mit CD4- Effektorzellen, die sich in einer Zellkultur befanden, verglichen werden müssten und auch der Verbleib in der Zellkultur zu einer abweichenden Proliferation der Zellen führen könnte.

4.3.3 Mikrobielle Kontamination der Proben

Die Isolation der PBMCs und der CD4+ Zellen mittels MACS, die Färbung der CD4+ Zellen mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern PE/Cy7 anti-human CD25 und BV421 anti-human CD127 sowie das Ansetzen der Suppression-Assays und der Zytokin-Stimulationen wurden unter strengen sterilen Bedingungen innerhalb der Sterilbank durchgeführt.

Der verwendete Zell-Sorter FACS Aria III war allerdings ein Durchflusszytometer, welches von verschiedenen Arbeitsgruppen genutzt wurde und nicht unter sterilen Bedingungen arbeitete. Es wurde zwar darauf geachtet, die Öffnung der Tubes, in denen sich die Zellen befanden, möglichst kurz zu halten, allerdings konnte es häufig nicht verhindert werden, dass die Zellen bei diesem Prozess, meist mit Pilzsporen, kontaminiert wurden. Diese Kontaminationen machten dann die sich anschließenden Zellkulturen unbrauchbar. Um sowohl personelle als auch finanzielle Ressourcen zu schonen wäre für weitere Studien ein steril arbeitender Zell-Sorter wünschenswert.

Eine zusätzliche Möglichkeit, um das Risiko der mikrobiellen Kontamination zu minimieren, wäre eine kürzere Zellkulturdauer. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Suppression-Assays auch in drei- bis viertägigen Zellkulturen durchführbar sind [339] [340].

4.3.4 Geringe Zellzahlen

Tregs machen je nach Quelle 1-8 % der CD4+ T-Helferzellen aus [113] [114] [122] [124] [294] [306] [311] [313]. Beim Versuch, Suppression-Assays mit aus PBMCs isolierten Tregs durchzuführen, sind die geringen Zellzahlen häufig der limitierende Faktor [22] [292].

In unserer Studie wäre es nach den Stimulationsversuchen wünschenswert gewesen, den Phänotyp der stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen zu bestimmen. Dies war aufgrund der geringen Zellzahl nicht zu leisten. Durchschnittlich lagen nach der Isolation mittels des Zell-Sorters 286.500 CD4+CD25+CD127low/- Zellen und 144.500 CD4+CD25-CD127- Zellen vor. Ein Ziel unserer Studie war es, eine Methode zu etablieren, nach deren Vorbild größer angelegte Studien durchgeführt werden können, die die Polarisierbarkeit und Funktion von CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen gesunder Probanden mit der Polarisierbarkeit und Funktion von Zellen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen vergleichen. Bedenkt man die bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen zum Teil geringere Anzahl an Tregs im peripheren Blut sowie die unter Umständen geringere Menge an für Studien zur Verfügung stehenden Blutes von Patienten, insbesondere bei Einschluss pädiatrischer Patienten, so verdeutlicht dies die Notwendigkeit einer Methode zur Erhöhung der CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellzahl [198] [205] [341].

4.3.4.1 Einfluss des Isolationsprozesses auf die Zellzahlen

Grundsätzlich gibt es zwei etablierte Methoden zur Isolierung von Tregs für nachfolgende Suppressionsversuche. Die Isolation mittels magnetischer Zell-Separation und die durchflusszytometrische Isolation im Zell-Sorter [286] [293]. In unserer Studie wurden beide Methoden kombiniert.

In den Vorversuchen zu dieser Studie war zunächst versucht worden, die Zellpopulationen durch magnetische Separation mittels des CD4+CD25+CD127low/- Regulatory T Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec zu isolieren. CD4+CD25+CD127low/- Tregs konnten mit dieser Methode erfolgreich isoliert werden, jedoch zeigte sich wiederholt eine unzureichende Reinheit der CD4+CD25-CD127- Fraktion, in der sich noch bis zu 60 % CD4- Zellen befanden. Vorteil der MACS-Isolation ist, verglichen mit dem durchflusszytometrischen Zell-Sorting, dass eine deutlich höhere Zahl an Tregs isoliert werden kann [263] [286]. Jedoch ist die Hauptlimitation der MACS-Isolation die Erzielung der notwendigen Reinheit der Zellpopulationen [22] [56] [306]. Zunächst

wurde in den Vorversuchen angestrebt, durch vorangehende CD4+ Isolierung mittels CD4+ T Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec die CD4+ Reinheit zu verbessern. Dies war erfolgreich, jedoch war nachfolgend die CD4+CD25+CD127low/- Fraktion wiederholt stark mit CD25- Zellen verunreinigt. Für unser Studiendesign mit dem Ziel der Isolierung einer reinen CD4+CD25-CD127- Zellpopulation war die ausschließliche MACS-Isolierung also keine geeignete Methode.

Folglich wurde die Entscheidung getroffen, nach der MACS-Isolierung mittels des CD4+ T Cell Isolation Kits für den zweiten Isolationsschritt den FACS Aria III Zell-Sorter der Firma BD Biosciences zu verwenden. Die bei der MACS-Isolierung verwendeten MicroBeads sind sehr klein und interferieren nicht mit dem nachfolgenden Zell-Sorting [263] [284]. Der Vorteil des durchflusszytometrischen Zell-Sortings ist, verglichen mit der MACS-Isolierung, dass man von einer nahezu 100-prozentigen Reinheit der beiden Zellfraktionen ausgehen kann [22] [293] [306]. Als Nachteil ist die deutlich geringere Zellzahl zu nennen, da bei dem Prozess des Sortens ein erheblicher Anteil der Zellen zugrunde geht [306]. Außerdem kann es durch den Sortingprozess zu einem Verlust der Integrität der Plasmamembran der Zellen oder zur vorzeitigen Zellaktivierung kommen [342] [343] [344]. Aktuelle Studien schätzen jedoch den Einfluss des Sortingprozesses auf die Vitalität und Funktion der Zellen bei der Verwendung moderner Zell-Sorter als sehr gering ein [343] [344].

Eine Kombination der MACS-Isolierung mit dem Zell-Sorting ist eine bewährte und regelmäßig verwendete Strategie zur Isolierung von Tregs [286] [345].

4.3.4.2 Für und Wider einer Treg-Expansion

Um die Zellzahl der Tregs zu erhöhen, wird in vielen Studien zunächst in einer zehn bis 21 Tage dauernden Zellkultur durch die Behandlung der Zellen mit IL-2, Anti-CD3 und Anti-CD28 eine Expansion der Tregs durchgeführt [158] [339]. Unter diesen Bedingungen halten die expandierten Tregs ihre FoxP3-Expression und ihre suppressive Funktion aufrecht [158]. Die Zugabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin zur Zellkultur fördert die Treg-Expansion und führt zu einer besseren Suppressionsfunktion der Tregs, während er die Expansion von Effektorzellen hemmt (mTOR = engl. mechanistic target of rapamycin) [346]. Eine solche Expansion der Tregs stellt jedoch einen unphysiologischen Eingriff dar und es ist möglich, dass Phänotyp und Funktion der expandierten Tregs nicht mit den frisch isolierten Tregs übereinstimmen [22]. Zudem macht eine Expansion einen Wechsel des Zellkultur-Mediums nötig und erhöht damit das Risiko einer Kontamination der Zellkultur mit Pilzen oder Bakterien [347].

Einen interessanten Kompromiss machen Kanjana et al., indem sie eine kurzzeitige Expansion der Tregs über vier Tage durchführen, wodurch sie die zehnfache Anzahl an Tregs erhalten und gleichzeitig das Risiko einer mikrobiellen Kontamination gering halten [286]. Eine solche Kurzzeit-Expansion der Tregs halten wir für eine vielversprechende Methode für weiterführende Studien. Allerdings wäre hier zu prüfen, ob die Funktion der expandierten Tregs mit der Funktion der frisch isolierten Tregs vergleichbar ist und unter welchen Bedingungen eine Expansion von CD4+CD25-CD127- Zellen möglich wäre.

Alternativ zu einer Treg-Expansion könnte man in einer größer angelegten Studie die verschiedenen angestrebten Untersuchungen an den Zellen unterschiedlicher Probanden durchführen. Man könnte z.B. mit den Zellen einer Kohorte die Suppression-Assays vor und nach der Zytokin-Stimulation durchführen und die Zellen einer anderen Probandenkohorte vor und nach der Zytokin-Stimulation durchflusszytometrisch phänotypisieren und dafür auf die Suppression-Assays verzichten. Ein solches Vorgehen würde allerdings die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den beiden Kohorten einschränken.

4.3.4.3 Einfluss des Treg zu Effektorzell-Verhältnisses in der Co-Kultur auf die benötigten Zellzahlen

In vorangehenden Studien hat sich gezeigt, dass die Suppressionsfunktion von Tregs am höchsten ist, wenn in der Co-Kultur ein Verhältnis von Tregs zu Effektorzellen von 1:1 oder 1:2 gewählt wird [321]. Aus diesem Grund entschieden wir uns für die Verwendung der genannten Treg zu Effektorzell-Verhältnisse in unserem Versuchsdesign und konnten damit eine effektive Suppressionsfunktion der Tregs nachweisen. Allerdings spiegeln diese Verhältnisse nicht den in vivo vorliegenden Zustand wider, wo in Relation zu den Effektorzellen eine deutlich geringere Anzahl von Tregs vorliegt [289]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Suppression-Assays auch noch in einem Verhältnis von Effektorzellen zu Tregs von 1:16 bis sogar 1:81 funktionieren [289] [321] [345]. Bei Verwendung dieser Treg zu Effektorzell-Verhältnisse konnten Suppression-Assays noch mit Zellzahlen von 2300 bis 8000 Tregs und damit weit weniger als den von uns veranschlagten 20.000 Tregs pro Ansatz durchgeführt werden [321] [345]. Die Verschiebung des Treg zu Effektorzell-Verhältnisses zugunsten der Effektorzellen und die Reduktion der Tregs auf beispielsweise 5000 Zellen pro Ansatz könnten ein vielversprechendes Versuchsdesigns sein, um die Anzahl der benötigten Tregs zu reduzieren und sollten in weiterführenden Studien untersucht werden.

4.3.5 Messung der Proliferation der CD4- Effektorzellen in CFSE-basierten Proliferations-Assays und Beurteilung der Suppressionsfunktion der Tregs

Für die Messung der Proliferation der Effektorzellen in Suppression-Assays gibt es zwei gängige Methoden [289]. In den ersten durchgeführten Suppression-Assays wurde die ³H-Thymidin-Inkorporations-Methode verwendet [289]. Dabei wird das radioaktive Nukleosid ³H-Thymidin in die bei der Zellteilung neu entstehende DNA eingebaut und kann gemessen werden [348]. Großer Nachteil bei der ³H-Thymidin Inkorporation-Methode ist die fehlende Möglichkeit, zwischen der Proliferation der Effektorzellen und der Proliferation der Tregs zu unterscheiden, was zu einem Unterschätzen der Suppressionsfähigkeit der Tregs führt [293] [345] [349].

Mittlerweile ist die Färbung der Effektorzellen mittels CFSE, wie sie auch in unserer Studie durchgeführt wurde, die etablierteste Methode zur Beurteilung der Proliferation der Effektorzellen [289]. Hierbei werden intrazelluläre Moleküle der Effektorzellen durch den Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert und bei der Zellteilung gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt [287] [288] [289]. Durch die nachfolgende durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenz können bis zu acht Zellteilungen detektiert werden [287] [288]. Die gängige und auch in unserer Studie verwendete Methode zur Auswertung von Suppression-Assays auf der Basis von CFSE-markierten Effektorzellen setzt den Anteil der Effektorzellen, die mindestens einmal proliferiert haben, zu den Zellen, die nicht proliferiert haben, in Relation [289] [291] [292]. Dabei wird jedoch nicht berücksichtigt, dass bei jeder Zellteilung zwei Tochterzellen entstehen und somit die CD4- Effektorzellen, die mehrfache Zellteilungen durchlaufen im Verhältnis zu den Zellen, die nicht proliferieren überrepräsentiert werden [289]. Diese Verzerrung zugunsten der proliferierten Zellen führt zu einer unterschätzten Suppressionsfunktion der Tregs [289]. Um dieses Problem zu umgehen, gibt es Software-Programme (z.B. die „Proliferation“-Funktion für das Programm FlowJo™), die die Anzahl der Zellteilungen mitberücksichtigen, indem sie Teilungs-Indizes berechnen und so der beschriebenen Verzerrung entgegenwirken [289] [350]. Für die Auswertung der Ergebnisse nachfolgender Suppression-Assays wäre es interessant, die Teilungs-Indizes mit einzubeziehen. Dies ist allerdings mit der in unserer Studie verwendeten BD FACS Diva Software nicht möglich, sodass auf ein überlegeneres Auswertungsprogramm, wie z.B. FlowJo™ zurückgegriffen werden müsste [289].

4.3.6 Phänotyp der CD4+CD25+CD127low/- Zellen und der CD4+CD25-CD127- Zellen vor und nach der Zytokin-Stimulation

Es wurde eine ausführliche PBMC-Phänotypisierung durchgeführt, sodass der Phänotyp der CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen vor der Zytokin-Stimulation und den anschließenden Suppression-Assays bekannt war. V.a. die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 sowie die Zytokine IL-10 und IL-17 waren von Interesse. Da der Fokus dieser Studie auf der Plastizität der T-Helferzellen insbesondere zwischen der Treg- und der Th17-Zelllinie lag, wäre ein zusätzlicher Einschluss des Th17-definierenden Transkriptionsfaktors ROR γ t in ein Färbepanel von Interesse gewesen.

Die Stimulation mit dem Th17-Cocktail hatte bei den CD4+CD25+CD127low/- Zellen zu einem Verlust deren Suppressionsfunktion geführt. Durch Stimulation mit dem Treg-Cocktail war es gelungen, aus den CD4+CD25-CD127- Zellen, Zellen mit Suppressionsfunktion zu generieren. Von großem Interesse wäre es, den Phänotyp dieser Zellen nach der Zytokin-Stimulation zu kennen. So ließe sich die Hypothese erhärten, dass aus den CD4+CD25-CD127- Zellen iTregs mit Suppressionsfunktion generiert worden waren. V.a. die Expression von CD25, FoxP3, ROR γ t, IL-10 und IL-17 wären von Interesse.

Der Grund dafür, dass keine Phänotypisierung nach der Zytokin-Stimulation erfolgt war, war die geringe Anzahl an zur Verfügung stehenden CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen. Daher bleibt die Frage, inwiefern die Stimulation mit dem Th17- und dem Treg-Cocktail den Phänotyp der Zellen verändert hatte, leider unbeantwortet. Eine Phänotypisierung der CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen nach der Zytokin-Stimulation sollte in einer Folgestudie unbedingt durchgeführt werden.

4.3.7 Vergleich der Ergebnisse der PBMC-Phänotypisierung mit den Ergebnissen des Zell-Sortings bezüglich des Anteils der Tregs an den CD4+ T-Lymphozyten

Für die Suppression-Assays wurden die CD4+ T-Lymphozyten nach vorangegangener MACS-Isolation im Sorter durchflusszytometrisch sortiert. Es wurden dafür dieselben Färbungen wie bei der PBMC-Charakterisierung verwendet: PE/Cy7 anti-human CD25 (Clone C96) und Brilliant Violet 421 anti-human CD127 (IL-7R α) (Clone A019D5). Der Anteil der CD4+CD25-CD127- Zellen an den CD4+ T-Lymphozyten stimmte im

Zell-Sorting (3,3 %) mit dem Anteil in der PBMC-Phänotypisierung (3,2 %) überein. Die CD4+CD25+CD127low/- Zellen machten im Zell-Sorting 6,2 % der CD4+ T-Lymphozyten aus, was verglichen mit der PBMC-Phänotypisierung, in der die CD4+CD25+CD127low/- Zellen einen Anteil von 2,1 % ausmachten, deutlich höher ausfiel. Erwarten würde man übereinstimmende Werte für den Anteil der Tregs an den CD4+ T-Lymphozyten in den beiden in unserer Arbeit durchgeführten Versuchen. Im Folgenden wird die Frage erörtert, wodurch diese unterschiedlichen Werte zustande kamen.

Bei der Auswertung und Interpretation der von uns erhobenen Daten zeigte sich, dass im vor den Suppression-Assays durchgeführten Zell-Sorting der Cut-Off-Wert für CD25 etwas niedriger gewählt wurde als in der PBMC-Phänotypisierung. In der PBMC-Phänotypisierung wurde nur die Treg-Population charakterisiert, welche CD25 sehr hoch exprimieren (sog. CD25high). Die Gating-Strategie orientierte sich an Studien, die zu einem Anteil der Tregs an den CD4+ T-Lymphozyten von 1-3 % kommen [117] [124] [286] [306] [311] [314]. Dagegen wurden beim Zell-Sorting auch einige der Zellen, die CD25 intermediär exprimierten (sog. CD25int), miteingeschlossen (s. Abbildung 17). Diese Gating-Strategie stimmt mit dem Gating in den Studien überein, die einen Treg-Anteil an den CD4+ T-Lymphozyten von 6-8 % beschreiben [113] [114] [122] [294] [312] [313]. Dass sich in der Literatur Studien mit unterschiedlichen Gating-Strategien finden, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, zeigt, welche Herausforderung die Etablierung von Cut-Off-Werten in durchflusszytometrischen Messungen darstellt. Ein Kritikpunkt an unserer Studie ist, dass die Cut-Off-Werte vor dem Durchführen der Versuche hätten etabliert werden sollen und in der Folge in beiden Versuchsarmen konsistent hätten angewendet werden sollen. Für in der Zukunft durchgeführte Studien empfehlen wir, im Zell-Sorting nur die CD25high-Population zu selektionieren, da sich die Tregs hauptsächlich innerhalb dieser Zellpopulation befinden [117] [124] [314]. Es sind zwar auch Tregs beschreiben, die CD25 intermediär exprimieren [123], jedoch ist es möglich, dass es durch die Hinzunahme von CD25int-Zellen zur Kontamination mit aktivierten Effektorzellen kommt, welche ebenfalls CD25 exprimieren, jedoch nur eine geringe FoxP3-Expression zeigen [117]. Bei Anwenden einer restriktiveren Gating-Strategie bezüglich CD25 im Zell-Sorting könnten jedoch die geringen Zellzahlen für die darauffolgenden Suppression-Assays limitierend sein.

Weitere Faktoren, die zu voneinander abweichenden Treg-Anteilen an den CD4+ T-Lymphozyten in den beiden in unserer Arbeit durchgeführten Versuchen geführt haben könnten, werden im Folgenden diskutiert. Die beiden durchflusszytometrischen Messungen fanden innerhalb unterschiedlicher Studiendesigns statt, was die Vergleichbarkeit der Messungen erschwert. Es wurden unterschiedliche Durchflusszytometer für die Messungen verwendet: FACSCanto II für die PBMC-Charakterisierung, FACS Aria III für das Zell-Sorting. Zwar wurden für dieselbe Anzahl an Zellen annähernd dieselbe Konzentration an Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern verwendet ($0,43 \mu\text{l} / 10^6$ Zellen in der PBMC-Phänotypisierung und $0,33 \mu\text{l} / 10^6$ Zellen im Zell-Sorting), jedoch wurden bei der PBMC-Phänotypisierung die gesamten PBMCs gefärbt, beim Zell-Sorting nur die vorher mittels MACS isolierten CD4+ T-Zellen. Bezogen auf die regulatorischen T-Zellen war also beim Zell-Sorting mehr Fluorochrom-gekoppelte Antikörper gegen CD25 und CD127 vorhanden, was zu den höheren Werten beitragen könnte. Beim Zell-Sorting wurden ausschließlich die beiden Oberflächenantigene CD25 und CD127 markiert, intrazelluläre Färbungen kamen nicht zum Einsatz. Im Rahmen der PBMC-Phänotypisierung wurden pro Ansatz acht verschiedene Antigene mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt, u.a. intrazelluläre Antigene, die eine Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Zellmembranen nötig machten. Es ist grundsätzlich vorstellbar, dass die Behandlung der Zellen mit der Fix/Perm Working Solution die zuvor durchgeführte Färbung der Oberflächenantigene beeinflusst haben könnte und der geringere Anteil gemessener Tregs in Teilen daraus resultierte. Außerdem könnten sich die simultan verwendeten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegenseitig beeinflusst haben. Zuletzt könnte auch eine für CD127 leicht abweichende Gating-Strategie zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben.

Die PBMC-Phänotypisierung wurde mit den Zellen aller elf Probanden durchgeführt, mittels Zell-Sorting wurden nur die Zellen der sechs Probanden isoliert, deren Funktion und Polarisierbarkeit nachfolgend in den Suppression-Assays untersucht wurde. Dass der unterschiedliche Anteil der Tregs an den CD4+ T-Lymphozyten durch interindividuelle Unterschiede in den unterschiedlichen Probandenkollektiven zustande gekommen war, wurde widerlegt, indem der Anteil der Tregs der sechs, in den Suppression-Assays weiter untersuchten Probanden, in der PBMC-Phänotypisierung bestimmt wurde und sich auf 2,3 % der CD4+ T-Lymphozyten belief.

4.3.8 Einfluss der Stimulationsmethode auf die Zytokinproduktion von T-Lymphozyten

Bei der Interpretation der intrazellulären Zytokinproduktion muss die Stimulationsmethode berücksichtigt werden [279] [351]. Auch die Stimulationsdauer muss beachtet werden, da das Maximum der Sekretion der unterschiedlichen Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wird [279] [351] [352]. In dieser Arbeit wurden die unspezifischen Stimulatoren PMA und Ionomycin in einer vierstündigen Stimulation verwendet, welche eine T-Zell-Aktivierung unter Umgehung des T-Zell-Rezeptors bewirken [263] [279] [280], zudem erfolgte eine Behandlung der Zellen mit dem Protein-Transport-Inhibitor BFA.

Laut Olsen et al. sind die Stimulatoren PMA und Ionomycin sehr gut geeignet, um die IFN γ - und IL-17-Produktion zu charakterisieren, haben allerdings einen negativen Effekt auf die Detektion von IL-10 [280]. Muris et al. haben gezeigt, dass die Verwendung des Protein-Transport-Inhibitors BFA einen negativen Einfluss auf die IL-10-Detektion, nicht jedoch auf die Detektion von IFN γ - und IL-17 hat [303].

IL-10 wurde in unserer Studie sowohl bei den CD4⁺ T-Zellen als auch bei den CD8⁺ T-Zellen nur in geringem Maß detektiert: 0,3 % der CD4⁺ T-Zellen und 0,6 % der CD8⁺ T-Zellen produzierten IL-10. Auch innerhalb der CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} Zellen und der CD4⁺CD25⁻CD127⁻ Zellen zeigten nur je 0,5 % der Zellen eine IL-10-Produktion.

Wir vermuten, dass die geringe IL-10-Detektion in dieser Arbeit aus der Verwendung der Stimulatoren PMA und Ionomycin in Kombination mit BFA resultierte [33] [280] [303]. Dass keine aussagekräftigen Ergebnisse zur IL-10-Produktion geliefert werden konnten, ist bedauerlich, da es sich bei IL-10 um ein von den im Fokus dieser Studie stehenden regulatorischen T-Zellen produziertes Zytokin handelt [148] [150]. Für die Messung der IL-10-Produktion wäre die Stimulation mit Anti-CD3 und Anti-CD28 eine erfolgversprechende Alternative [280] [353]. Jedoch ist die von uns verwendete Stimulation mit PMA und Ionomycin für die Detektion der Zytokine IFN γ und IL-17 die geeignetere Methode [280]. Bei der Etablierung von Studiendesigns sowie bei der Interpretation der Ergebnisse von Studien, die die Zytokinproduktion von Lymphozyten mittels PBMC-Phänotypisierung durchflusszytometrisch messen, muss also immer die verwendete Stimulationsmethode kritisch hinterfragt werden [280].

Da weder die Stimulation mit PMA und Ionomycin noch die Stimulation mit Anti-CD3 und Anti-CD28 optimal für die durchflusszytometrische Detektion aller drei Zytokine

IFN γ , IL-17 und IL-10 ist, wäre es wünschenswert, die Zytokinproduktion der Lymphozyten-Populationen durch eine weitere Methode zu untersuchen. Hierfür würde sich eine Zytokinmessung aus Kulturüberstand mittels ELISA oder eine mRNA-Messung mittels real-time PCR anbieten (mRNA = engl. messenger ribonucleic acid = Boten-Ribonukleinsäure, real-time PCR = engl. real-time polymerase chain reaction = Echtzeit Polymerase-Ketten-Reaktion) [89] [354] [355] [356] [357]. Nach der Stimulation der CD4+CD25+CD127low/- Zellen und der CD4+CD25-CD127- Zellen wurden die Zellkultur-Überstände eingefroren, sodass sich hier in einer Folgestudie eine Untersuchung der Zytokine IL-17, IL-10 und IFN γ mittels ELISA anbieten würde.

4.3.9 Definition der Effektorzellen

Die Vergleichbarkeit von Suppression-Assays ist durch die uneinheitliche Definition, sowohl der Tregs als auch der Effektorzellen, anhand deren Proliferation die Suppressionsfunktion der Tregs gemessen wird, limitiert [289] [293]. Im Folgenden wird die Definition der Effektorzell-Population diskutiert.

Wir verwendeten CD4- Effektorzellen, anhand deren Proliferation die Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen bestimmt wurde. Häufig werden in Suppression-Assays CD4+CD25- Zellen als autologe Effektorzellen verwendet [286] [292]. Die Isolation und Verwendung dieser CD4+CD25- Zellpopulation als Effektorzellen war in unserer Studie nicht möglich, da diese Zellpopulation weiter genutzt wurde, um die CD4+CD25-CD127 Zellen zu isolieren, deren Suppressionsfunktion und Polarisierbarkeit dann im Weiteren untersucht wurde. Es existieren auch Studien, die autologe CD8+ T-Zellen als Effektorzellen in Suppression-Assays verwenden [340] [358].

Vorteil der Verwendung der heterogenen CD4- Effektorzellen in unserer Studie war, dass in dieser Zellpopulation die APCs mit eingeschlossen waren. Zur Stimulation der Proliferation wurde in unserer Studie ausschließlich Anti-CD3 verwendet, da die Co-Stimulation über die in der CD4- Effektorzell-Population vorhandenen APCs gewährleistet wurde. Die Verwendung von APCs in der Zellkultur führt zu einer physiologischeren Aktivierung der Lymphozyten als die Verwendung von Anti-CD28 [158].

Der Nachteil der Wahl der gesamten CD4- Zellpopulation als Effektorzellen war, dass es sich um eine heterogene Zellpopulation handelte. Neben CD8+ T-Lymphozyten befanden sich in dieser Zellpopulation Monozyten, Granulozyten, B-Zellen, NK-Zellen, DCs und $\gamma\delta$ -T-Zellen [274] [285]. All diese Zellen wurden mit CFSE angefärbt, bevor

deren Proliferation durchflusszytometrisch gemessen wurde. Man konnte also bei der Auswertung nicht differenzieren, die Proliferation welcher Zellen die untersuchten CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen supprimiert hatten. Die unterschiedlichen, in der CD4- Effektorzell-Population vorhandenen Zellen könnten zudem die Funktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen und CD4+CD25-CD127- Zellen auf unbekannte Weise beeinflussen und stellen eine zusätzliche Variable dar, die bei der Interpretation berücksichtigt werden muss [293].

Eine Lösung für dieses Problem wäre, eine definierte, homogene Zellpopulation, wie z.B. autologe CD8+ T-Lymphozyten als Effektorzellen zu verwenden und zudem autologe, nicht proliferationsfähige APCs hinzuzugeben, z.B. in Form von bestrahlten autologen PBMCs [158] [293] [345]. Alternativ könnte man den Versuchsaufbau wie in unserer Studie belassen und zusätzlich zur CFSE-Färbung z.B. das Oberflächenmolekül CD8 färben, um nur die Proliferation der CD8+ Zellen zu beurteilen [358]. Diese Vorgehen würden die in unserer Studie erfolgte Vermischung der Effektorzellen und der APCs in einer Zellpopulation umgehen und sollte in nachfolgenden Studien in Betracht gezogen werden.

4.4 Bedeutung der Ergebnisse für die aktuelle Treg-Forschung und mögliche therapeutische Anwendungen

Bei der kleinen Probandenzahl von $n = 11$ bei der PBMC-Phänotypisierung und $n = 6$ bei den Suppression-Assays hat die Arbeit explorativen Charakter. Ziel war es, eine Methode zu etablieren, mithilfe derer die Polarisierbarkeit und Funktion von peripheren T-Lymphozyten untersucht werden kann. Es ist uns gelungen, den Tregs gesunder Probanden durch Stimulation mit dem Th17-Cocktail die Suppressionsfunktion zu nehmen sowie die CD4+CD25-CD127- Zellen mittels des Treg-Cocktails hin zu T-Zellen mit Suppressionsfunktion zu polarisieren.

Zur sicheren Durchführung von klinischen Studien am Menschen im Bereich der Treg-Forschung ist es essenziell, die Eigenschaften der Tregs in vitro genau zu kennen. Insbesondere die Plastizität der Tregs mit der Möglichkeit der Differenzierung hin zu proinflammatorischen Th17-Zellen muss bei einem Treg-Transfer bedacht werden [192]. Die Ergebnisse unserer Studie leisten einen Beitrag zur in vitro-Grundlagenforschung und liefern aktuelle Daten zu Phänotyp und Funktion von Tregs gesunder Probanden.

Da die Zahl der von Autoimmunerkrankungen betroffenen Menschen immer mehr zunimmt, kommt der Forschung in diesem Bereich eine große Bedeutung zu [359] [360] [361] [362] [363]. Die klassischen Immunsuppressiva gehen mit Nebenwirkungen wie opportunistischen Infektionen und der Suszeptibilität gegenüber Tumorerkrankungen sowie weiteren Medikamenten-spezifischen Nebenwirkungen einher [364]. In Zukunft könnten daher die Stimulation von Tregs in vivo sowie auch der Transfer von ex-vivo expandierten Tregs vielversprechende Therapieoptionen sein.

In den letzten 10 Jahren wurden mehrere präklinische und klinische Phase-I- und Phase-II-Studien zur Treg-Therapie von Autoimmunerkrankungen durchgeführt [22] [346] [363] [365]. Patienten mit T1DM und Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes (SLE) konnten in Phase I-II Studien bereits erfolgreich mit niedrig-dosiertem IL-2 behandelt werden, welches zu einer Erhöhung der Treg-Anzahl führte und so für eine Stärkung der körpereigenen Immuntoleranz sorgte [177] [366] [367] [368] [369]. Die Art und Weise, wie in diesen Studien die Erhöhung der Treg-Anzahl durch IL-2 zustande kam, bleibt jedoch unklar. Denkbar wäre, dass IL-2 zur Proliferation und damit Expansion der bestehenden Tregs geführt hatte. Alternativ wäre unter Berücksichtigung der Ergebnisse unserer Studie auch denkbar, dass sich die

CD4+CD25-CD127- Zellen der Patienten unter dem Einfluss von IL-2 zu iTregs differenziert hatten, deren Phänotyp dann durchflusszytometrisch nicht mehr vom Phänotyp der ursprünglichen Tregs zu unterscheiden war.

In Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Injektion von ex-vivo expandierten, autologen Tregs bei Patienten mit T1DM, Morbus Crohn und SLE sicher durchführbar war [57] [370] [371] [372]. Die Tregs wurden hierfür entweder mittels MACS oder durchflusszytometrisch durch Zell-Sorting isoliert und anschließend mittels Anti-CD3, Anti-CD28 und IL-2 expandiert [57] [370] [371]. Einige Studien verwendeten für die Expansion zusätzlich den mTOR-Inhibitor Rapamycin, das Zytokin TGF β oder das Vitamin-A-Derivat all-trans-Retinsäure [109] [346] [373] [374] [375] [376]. Insbesondere die CD45RA+ naiven Tregs eigneten sich aufgrund ihrer stabilen FoxP3-Expression für die klinische Anwendung zur Treg-Therapie [117] [123]. Alternativ könnte, in Anlehnung an unsere Studie, die Polarisierung von peripheren T-Lymphozyten hin zu Zellen mit Suppressionsfunktion und der anschließende Transfer der so generierten iTregs in den Patienten ein interessanter Ansatz sein. Vorher müssten jedoch der Phänotyp und die Stabilität der so induzierten Tregs untersucht werden.

Ungeklärt bleibt die Frage, wie gewährleistet werden kann, dass die Tregs nach dem Transfer in den Patienten ihre Suppressionsfunktion aufrechterhalten. In unserer Studie hatten die Tregs in einem, durch den Th17-Cocktail dargestellten, proinflammatorischen Milieu ihre Suppressionsfunktion verloren. Eine weitere Herausforderung der Treg-Therapie ist die Gewährleistung der Migration der Tregs nach dem Transfer in die entzündeten Gewebe, in denen sie die Inflammation kontrollieren sollen [22] [375]. Hier wird aktuell an Methoden zur Markierung und Weiterverfolgung der injizierten Tregs geforscht [22] [375]. Eine interessante Methode ist hier die CAR-Technologie, bei der T-Zellen gentechnisch verändert werden, sodass sie chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) exprimieren, die für die Migration in die entzündeten Gewebe sorgen sollen [365].

Die Treg-Therapie wird durch immunsuppressive Medikamente wie Calcineurininhibitoren, Mycophenolat und Methylprednisolon beeinträchtigt, da diese Medikamente die Treg-Vitalität und Proliferation reduzieren [109] [377]. Vielversprechende Kombinationstherapien könnten in Zukunft die Verabreichung von autologen, expandierten oder induzierten Tregs zusammen mit niedrig-dosiertem IL-2 oder mit Rapamycin sein, da IL-2 und Rapamycin die Treg-Expansion in vivo fördern [22] [143] [177] [377].

Bislang wurden jedoch nur Studien mit geringen Probandenzahlen durchgeführt und die Treg-basierte Therapie von Autoimmunkrankheiten findet in der Klinik noch keine breite Anwendung [22]. Unsere Studie leistet einen Beitrag zur aktuellen Forschung, indem sie die Plastizität und Induzierbarkeit von Tregs in vitro durch verschiedene Zytokine untersucht. Der Einfluss der von uns untersuchten Zytokine auf die Tregs und die CD4+CD25-CD127- Zellen in vitro kann herangezogen werden, um die Vorgänge nach dem Transfer von ex-vivo expandierten oder induzierten Tregs in vivo besser zu verstehen.

4.5 Ausblick

Obwohl in den letzten zwei Jahrzehnten etliche Studien zur Erforschung der Funktion regulatorischer T-Zellen durchgeführt wurden, existiert kein einheitliches Protokoll für die Isolierung von Tregs, für deren Polarisierung und für die Durchführung von Suppression-Assays [158]. Die Wahl von Oberflächenmarkern für die Treg-Definition ist in der Literatur nicht einheitlich, es werden unterschiedliche Isolationsmethoden verwendet und es existiert kein Standard für die Zellkulturbedingungen, in denen die Suppression-Assays durchgeführt werden [120] [289] [293] [306].

Die aus der PBMC-Phänotypisierung generierten Ergebnisse sollen als Grundlage für weitere Untersuchungen von Lymphozyten dienen. Hier wäre insbesondere ein Vergleich der Lymphozyten von gesunden Probanden mit den Lymphozyten von an T-Zell-medierte Autoimmunerkrankungen leidenden Patienten von Interesse sowie der Vergleich von Lymphozyten aus dem Blut von Patienten mit Lymphozyten aus entzündeten Geweben.

Mit dieser Arbeit haben wir eine Methode etabliert, um Tregs und CD4+CD25-CD127-Zellen aus PBMCs zu isolieren, diese zu polarisieren und deren Suppressionsfunktion zu untersuchen. Diese Methode soll als Grundlage für weitere Arbeiten mit größeren Probandenkollektiven dienen. Da bei der Ätiologie von T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen und autoinflammatorischen Erkrankungen eine veränderte Anzahl von Tregs bzw. eine gestörte Treg-Funktion vorliegt, wäre es von Interesse, nach dem hier etablierten Protokoll eine vergleichende Studie mit den Zellen von erkrankten Patienten und gesunden Probanden durchzuführen [117] [198] [205]. Optimalerweise sollten therapie-naive Patienten eingeschlossen werden, da Immunsuppressiva die Treg-Anzahl und -Funktion beeinflussen können [109] [377]. Zudem wäre es interessant, periphere Lymphozyten aus dem Blut mit den Lymphozyten aus entzündeten Geweben zu vergleichen, da die Anzahl und die Funktion der Tregs in den verschiedenen Kompartimenten unterschiedlich sein kann [199] [378] [379]. Die Isolation, Phänotypisierung und Funktionsuntersuchung von T-Lymphozyten aus der Mukosa des Darmes von Patienten mit CED wäre ein interessantes Projekt. Hier gilt es allerdings zunächst eine praktikable Methode zu entwickeln, um das Problem der mikrobiellen Kontamination der Zellkulturen zu lösen, da es sich insbesondere bei Kolongewebe um ein massiv mit Mikroorganismen besiedeltes Gewebe handelt [380]. In den Vorversuchen zu dieser Arbeit war begonnen worden, eine Methode für die Isolation von Tregs aus Darmgewebe zu etablieren, auf die in einem Folgeprojekt aufgebaut werden könnte. Weitere sehr interessante Folgeprojekte wären die Untersuchung von T-Lymphozyten aus dem

Blut und aus der Synovialflüssigkeit von an JIA, RA oder Psoriasis-Arthritis leidenden Patienten oder von T-Lymphozyten aus dem Blut und aus dem Liquor von an MS leidenden Patienten. Diese Projekte sollten sich aufgrund der Sterilität der Synovialflüssigkeit bzw. des Liquors methodisch vermutlich wesentlich besser umsetzen lassen.

Diese Arbeit nimmt die Polarisierbarkeit der CD4+CD25-CD127- Zellen hin zu regulatorischen T-Zellen in den Fokus. Ältere Studien untersuchten die Polarisierbarkeit der CD4+CD25- Zellen, ohne den CD127-Status zu berücksichtigen [138] [255] [256] [257] [258]. Wir gehen davon aus, dass es sich bei den CD4+CD25-CD127- Zellen um ruhende, nicht aktivierte T-Lymphozyten handelt, die nicht an der peripheren Homöostase teilnehmen und die durch Stimulation mit den Zytokinen IL-2 und TGF β zu iTregs polarisiert werden können [32] [258]. Diese Hypothese sollte in weiteren Studien u.a. durch eine Phänotypisierung der CD4+CD25-CD127- Zellen nach der Zytokin Stimulation bestätigt werden. Denkbar wäre es, dass die zu Tregs polarisierten CD4+CD25-CD127- Zellen in der Zukunft auch in klinischen Studien zur Treg-Therapie von Autoimmunkrankheiten zur Anwendung kommen könnten.

Von Interesse wäre es, das epigenetische Regulationsmuster der CD4+CD25-CD127- Zellen bezüglich FoxP3 zu kennen. Die Zugänglichkeit bestimmter Gene wird u.a. durch DNA-Methylierung von nicht-kodierenden Regionen modifiziert [140]. Der Aktivierungszustand und damit die Stabilität der FoxP3-Expression kann in Methylierungsanalysen des TSDR-Genlocus untersucht werden [129] [140] [142] [143]. tTregs zeichnen sich durch eine demethylierte TSDR aus und zeigen daher eine stabile FoxP3-Expression [129] [130] [140]. Bei iTregs liegt die TSDR partiell methyliert vor, was zu einer instabileren FoxP3-Expression führt [103] [129] [130] [140]. Von Interesse wäre, ob dies auch für die aus CD4+CD25-CD127- Zellen generierten iTregs gilt. In einem Folgeprojekt sollten Methylierungsanalysen sowohl bei den CD4+CD25+CD127^{low}-Zellen als auch bei den CD4+CD25-CD127- Zellen vor und nach der Zytokin-Stimulation durchgeführt werden. Zu beachten ist, dass die TSDR sich auf dem X-Chromosom befindet und somit bei Methylierungsanalysen berücksichtigt werden muss, dass bei weiblichen Probandinnen die Gene auf einem X-Chromosom durch zufällige X-inaktivierende DNA-Methylierung abgeschaltet sind [289] [129].

Abschließend handelt es sich bei den CD4+CD25-CD127- Zellen um eine interessante Zellpopulation, die es sich lohnt, im Hinblick auf ihre Polarisierbarkeit, ihr Stabilität, ihre Rolle bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen und ihre eventuelle therapeutische Bedeutung weiter zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Eine Dysbalance zwischen regulatorischen und proinflammatorischen T-Helferzellen kann zu Autoimmunerkrankungen führen [176]. In dieser methodischen Arbeit wurde die Polarisierbarkeit von peripheren T-Lymphozyten durch verschiedene Zytokin-Stimuli untersucht. Hauptziel war es, CD4+CD25-CD127- Lymphozyten durch Stimulation mit einem IL-2 und TGF β -beinhaltenden Zytokin-Cocktail zu iTregs zu polarisieren und deren Suppressionsfunktion auf autologe Effektor-Leukozyten zu untersuchen.

Es erfolgte eine Phänotypisierung der PBMCs gesunder Probanden, insbesondere im Hinblick auf die Verteilung der T-Lymphozyten-Subpopulationen, deren Zytokinproduktion und FoxP3-Expression. Zudem wurden aus den PBMCs der Probanden Tregs (CD4+CD25+CD127low/-) sowie CD4+CD25-CD127- Zellen isoliert und deren Funktionsfähigkeit durch die Untersuchung ihrer Suppressionsfunktion auf autologe Effektor-Lymphozyten analysiert. Die Zellen wurden mittels verschiedener Zytokin-Cocktails in Richtung Treg sowie in Richtung Th17-Zellen polarisiert; anschließend wurde die Funktionsfähigkeit der polarisierten Zellen in Suppression-Assays gemessen.

Wir konnten zeigen, dass die CD4+CD25+CD127low/- Zellen Tregs mit der Fähigkeit zur Suppression der Proliferation autologer Effektor-Lymphozyten waren. Bei den CD4+CD25-CD127-Zellen handelte es sich um T-Lymphozyten ohne Suppressionsfunktion. Nach Stimulation der CD4+CD25-CD127-Zellen mit dem Treg-Cocktail zeigten die Zellen eine mit den Tregs vergleichbare Suppressionsfunktion.

Mit dieser Studie haben wir eine aktuelle methodische Quelle für die Untersuchung von Phänotyp und Funktion regulatorischer T-Zellen sowie für die Stimulation peripherer T-Lymphozyten hin zu Tregs geschaffen, die als Basis für Folgeversuche dienen soll, in denen Zellen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen untersucht werden sollen. Da sich die Inflammation bei Autoimmunerkrankungen insbesondere in den betroffenen Geweben abspielt, wäre eine Studie anzustreben, in der aus dem Blut isolierte T-Lymphozyten den Zellen aus den entzündeten Geweben gegenübergestellt werden [199] [378] [379]. Ergänzend sollte eine Phänotypisierung der Tregs und der CD4+CD25-CD127- Zellen nach der Zytokin-Stimulation erfolgen.

Zusammenfassend konnte die Plastizität peripherer T-Lymphozyten in Richtung Treg gezeigt werden. Besonders hervorzuheben ist die bislang wenig untersuchte Zellpopulation der CD4+CD25-CD127- Zellen, die eine vielversprechende Zellpopulation für die in vitro Induktion von Tregs darstellt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*, 9th ed. Philadelphia: Elsevier, 2018.
- [2] B. Broker, C. Schütt, and B. Fleischer, *Grundwissen Immunologie*, 4th ed. Berlin: Springer Spektrum, 2019.
- [3] L. Rink, A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*, 2nd ed. Berlin: Springer Spektrum, 2015.
- [4] Y. Xing and K. A. Hogquist, "T-Cell tolerance: Central and peripheral," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 6: a006957, pp. 1–15, 2012.
- [5] F. A. Bonilla and H. C. Oettgen, "Adaptive immunity," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2, pp. 33–40, 2010.
- [6] A. Waisman, D. Lukas, B. E. Clausen, and N. Yagci, "Dendritic cells as gatekeepers of tolerance," *Semin. Immunopathol.*, vol. 39, no. 2, pp. 153–163, 2017.
- [7] T. Honda and K. Kabashima, "Reconciling innate and acquired immunity in atopic dermatitis," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 145, no. 4, pp. 1136–1137, 2020.
- [8] K. Pieper, B. Grimbacher, and H. Eibel, "B-cell biology and development," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 4, pp. 959–971, 2013.
- [9] S. E. Coupland, M. Hummel, and H. Stein, "Lymphatisches System und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten," *Pathologe*, vol. 21, no. 2, pp. 106–112, 2000.
- [10] B. V. Kumar, T. J. Connors, and D. L. Farber, "Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life," *Immunity*, vol. 48, no. 2, pp. 202–213, 2018.
- [11] A. Trickett and Y. L. Kwan, "T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads," *J. Immunol. Methods*, vol. 275, no. 1–2, pp. 251–255, 2003.
- [12] L. Cosmi, L. Maggi, V. Santarlasci, F. Liotta, and F. Annunziato, "T helper cells plasticity in inflammation," *Cytom. Part A*, vol. 85, no. 1, pp. 36–42, 2014.

- [13] K. Murphy and C. Weaver, *Janeway Immunologie*, 9th ed. Berlin: Springer Spektrum, 2018.
- [14] M. Ciofani and J. C. Zúñiga-Pflücker, "The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 463–493, 2007.
- [15] T. Boehm and J. B. Swann, "Thymus involution and regeneration: Two sides of the same coin?," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 11, pp. 831–838, 2013.
- [16] S. R. Daley, C. Teh, D. Y. Hu, A. Strasser, and D. H. D. Gray, "Cell death and thymic tolerance," *Immunol. Rev.*, vol. 277, no. 1, pp. 9–20, 2017.
- [17] A. C. Carpenter and R. Bosselut, "Decision checkpoints in the thymus," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 8, pp. 666–673, 2010.
- [18] F. Albano *et al.*, "Insights into Thymus Development and Viral Thymic Infections," *Viruses*, vol. 11, no. 9: 836, pp. 1–19, 2019.
- [19] S. Rangarajan and R. A. Mariuzza, "T cell receptor bias for MHC: Co-evolution or co-receptors?," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 71, no. 16, pp. 3059–3068, 2014.
- [20] S. Z. Josefowicz, L. F. Lu, and A. Y. Rudensky, "Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, pp. 531–564, 2012.
- [21] A. Kitz and M. Dominguez-Villar, "Molecular mechanisms underlying Th1-like Treg generation and function," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 74, no. 22, pp. 4059–4075, 2017.
- [22] M. Romano, G. Fanelli, C. J. Albany, G. Giganti, and G. Lombardi, "Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. 43, pp. 1–14, 2019.
- [23] H. Von Boehmer and F. Melchers, "Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 1, pp. 14–20, 2010.
- [24] M. Miyara and S. Sakaguchi, "Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression," *Trends Mol. Med.*, vol. 13, no. 3, pp. 108–116, 2007.
- [25] X. Zhou, S. Bailey-Bucktrout, L. T. Jeker, and J. A. Bluestone, "Plasticity of CD4+ FoxP3+ T cells," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 21, no. 3, pp. 281–285, 2009.

- [26] K. M. Murphy and B. Stockinger, "Effector T cell plasticity: Flexibility in the face of changing circumstances," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 8, pp. 674–680, 2010.
- [27] A. Larbi and T. Fulop, "From 'truly naïve' to 'exhausted senescent' T cells: When markers predict functionality," *Cytom. Part A*, vol. 85, no. 1, pp. 25–35, 2014.
- [28] V. Appay, R. A. W. Van Lier, F. Sallusto, and M. Roederer, "Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues," *Cytom. Part A*, vol. 73, no. 11, pp. 975–983, 2008.
- [29] C. D. Surh and J. Sprent, "Homeostasis of Naive and Memory T Cells," *Immunity*, vol. 29, no. 6, pp. 848–862, 2008.
- [30] I. den Braber *et al.*, "Maintenance of Peripheral Naive T Cells Is Sustained by Thymus Output in Mice but Not Humans," *Immunity*, vol. 36, no. 2, pp. 288–297, 2012.
- [31] M. A. Moro-García, R. Alonso-Arias, and C. López-Larrea, "When aging reaches CD4+ T-cells: Phenotypic and functional changes," *Front. Immunol.*, vol. 4, no. 107, pp. 1–12, 2013.
- [32] C. M. Capitini, A. A. Chisti, and C. L. MacKall, "Modulating T-cell homeostasis with IL-7: Preclinical and clinical studies," *J. Intern. Med.*, vol. 266, no. 2, pp. 141–153, 2009.
- [33] T. Sathaliyawala *et al.*, "Distribution and Compartmentalization of Human Circulating and Tissue-Resident Memory T Cell Subsets," *Immunity*, vol. 38, no. 1, pp. 187–197, 2013.
- [34] F. Sallusto, C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia, "The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses," *Annu. Rev. Immunol.*, no. 18, pp. 593–620, 2000.
- [35] T. C. Wirth, V. P. Badovinac, L. Zhao, M. O. Dailey, and J. T. Harty, "Differentiation of Central Memory CD8 T Cells Is Independent of CD62L-Mediated Trafficking to Lymph Nodes," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 10, pp. 6195–6206, 2009.
- [36] F. Sallusto, J. Geginat, and A. Lanzavecchia, "Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance," *Annu. Rev.*

- Immunol.*, vol. 22, pp. 745–763, 2004.
- [37] P. Romero *et al.*, “Four Functionally Distinct Populations of Human,” *J. Immunol.*, vol. 178, no. 7, pp. 4112–4119, 2007.
- [38] K. K. McKinstry, T. M. Strutt, and S. L. Swain, “The potential of CD4 T-cell memory,” *Immunology*, vol. 130, no. 1, pp. 1–9, 2010.
- [39] G. Almanzar *et al.*, “Long-Term Cytomegalovirus Infection Leads to Significant Changes in the Composition of the CD8 + T-Cell Repertoire, Which May Be the Basis for an Imbalance in the Cytokine Production Profile in Elderly Persons,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 6, pp. 3675–3683, 2005.
- [40] P. Saule, J. Trauet, V. Dutriez, V. Lekeux, J. P. Dessaint, and M. Labalette, “Accumulation of memory T cells from childhood to old age: Central and effector memory cells in CD4+ versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8+ compartment,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 127, no. 3, pp. 274–281, 2006.
- [41] M. Prelog, “Aging of the immune system: A risk factor for autoimmunity?,” *Autoimmun. Rev.*, vol. 5, no. 2, pp. 136–139, 2006.
- [42] Y. D. Mahnke, T. M. Brodie, F. Sallusto, M. Roederer, and E. Lugli, “The who’s who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, no. 11, pp. 2797–2809, 2013.
- [43] F. Sallusto, D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia, “Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions,” *Nature*, vol. 401, no. 6754, pp. 708–712, 1999.
- [44] T. Willinger, T. Freeman, H. Hasegawa, A. J. McMichael, and M. F. C. Callan, “Molecular Signatures Distinguish Human Central Memory from Effector Memory CD8 T Cell Subsets,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 9, pp. 5895–5903, 2005.
- [45] C. Stemmerger, M. Neuenhahn, F. E. Gebhardt, M. Schiemann, V. R. Buchholz, and D. H. Busch, “Stem cell-like plasticity of naïve and distinct memory CD8+ T cell subsets,” *Semin. Immunol.*, vol. 21, no. 2, pp. 62–68, 2009.
- [46] K. Verma *et al.*, “Human CD8+ CD57- TEMRA cells: Too young to be called ‘old,’” *PLoS One*, vol. 12, no. 5: e0177405, pp. 1–14, 2017.

- [47] Y. Tai, Q. Wang, H. Korner, L. Zhang, and W. Wei, "Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases," *Front. Pharmacol.*, vol. 9, no. 642, pp. 1–10, 2018.
- [48] P. V. Jeurink, Y. M. Vissers, B. Rappard, and H. F. J. Savelkoul, "T cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: Kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production," *Cryobiology*, vol. 57, no. 2, pp. 91–103, 2008.
- [49] F. Benvenuti, "The dendritic cell synapse: A life dedicated to T cell activation," *Front. Immunol.*, vol. 7, no. 70, pp. 1–6, 2016.
- [50] M. Merad, P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha, "The dendritic cell lineage: Ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 31, pp. 563–604, 2013.
- [51] R. Wang, K. Natarajan, and D. H. Margulies, "Structural Basis of the CD8 $\alpha\beta$ /MHC Class I Interaction: Focused Recognition Orients CD8 β to a T Cell Proximal Position," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 4, pp. 2554–2564, 2009.
- [52] M. Embgenbroich and S. Burgdorf, "Current concepts of antigen cross-presentation," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. 1643, pp. 1–10, 2018.
- [53] G. R. Lee, "The balance of th17 versus treg cells in autoimmunity," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 3: 730, pp. 1–14, 2018.
- [54] T. Kono, Y. Minami, and T. Taniguchi, "The interleukin-2 receptor complex and signal transduction: Role of the β -chain," *Seminars in Immunology*, vol. 5, no. 5, pp. 299–307, 1993.
- [55] S. H. Ross and D. A. Cantrell, "Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 36, pp. 411–433, 2018.
- [56] E. M. Shevach, "Mechanisms of Foxp3⁺ T Regulatory Cell-Mediated Suppression," *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 636–645, 2009.
- [57] M. Dall'Era *et al.*, "Adoptive Treg Cell Therapy in a Patient With Systemic Lupus Erythematosus," *Arthritis Rheumatol.*, vol. 71, no. 3, pp. 431–440, 2019.
- [58] J. M. Curtsinger and M. F. Mescher, "Inflammatory cytokines as a third signal for

- T cell activation,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 22, no. 3, pp. 333–340, 2010.
- [59] N. Zhang and M. J. Bevan, “CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System,” *Immunity*, vol. 35, no. 2, pp. 161–168, 2011.
- [60] C. Kurts, “Cross-presentation: Inducing CD8 T cell immunity and tolerance,” *J. Mol. Med.*, vol. 78, no. 6, pp. 326–332, 2000.
- [61] M. J. Bevan, “Helping the CD8+ T-cell response,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 8, pp. 595–602, 2004.
- [62] M. Kleinewietfeld and D. A. Hafler, “The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity,” *Semin. Immunol.*, vol. 25, no. 4, pp. 305–312, 2013.
- [63] J. J. O’Shea and W. E. Paul, “Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells,” *Science.*, vol. 327, no. 5969, pp. 1098–1102, 2010.
- [64] S. Romagnani, “Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more,” *Immunol. Today*, vol. 12, no. 8, pp. 256–257, 1991.
- [65] I. Raphael, S. Nalawade, T. N. Eagar, and T. G. Forsthuber, “T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases,” *Cytokine*, vol. 74, no. 1, pp. 5–17, 2015.
- [66] S. G. Tangye, C. S. Ma, R. Brink, and E. K. Deenick, “The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 6, pp. 412–426, 2013.
- [67] J. Zhu, “T helper cell differentiation, heterogeneity, and plasticity,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 10, no. 10: a030338, pp. 1–18, 2018.
- [68] R. Manetti *et al.*, “Interleukin 12 Induces Stable Priming for Interferon γ (IFN- γ) Production During Differentiation of Human T Helper (Th) Cells and Transient IFN- γ Production in Established Th2 Cell Clones,” *J. Exp. Med.*, vol. 179, no. 4, pp. 1273–1283, 1994.
- [69] P. Licona-Limón, L. K. Kim, N. W. Palm, and R. A. Flavell, “TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 6, pp. 536–542, 2013.

- [70] A. Mazzoni, L. Maggi, F. Liotta, L. Cosmi, and F. Annunziato, "Biological and clinical significance of Th17 cell plasticity," *Immunology*, vol. 158, no. 4, pp. 287–295, 2019.
- [71] Z. Chen, C. M. Tato, L. Muul, A. Laurence, and J. J. O'Shea, "Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes," *Arthritis Rheum.*, vol. 56, no. 9, pp. 2936–2946, 2007.
- [72] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, "IL-17 and Th17 Cells," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, no. 1, pp. 485–517, 2009.
- [73] S. K. Bromley, T. R. Mempel, and A. D. Luster, "Orchestrating the orchestrators: Chemokines in control of T cell traffic," *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 9, pp. 970–980, 2008.
- [74] I. Raphael and T. G. Forsthuber, "Stability of T-cell lineages in autoimmune diseases," *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 8, no. 4, pp. 299–301, 2012.
- [75] F. Castellino, A. Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker, and R. N. Germain, "Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction," *Nature*, vol. 440, no. 7086, pp. 890–895, 2006.
- [76] G. G. Xu, J. Guo, and Y. Wu, "Chemokine Receptor CCR5 Antagonist Maraviroc: Medicinal Chemistry and Clinical Applications," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 14, no. 13, pp. 1504–1514, 2019.
- [77] J. R. Groom and A. D. Luster, "CXCR3 in T cell function," *Exp. Cell Res.*, vol. 317, no. 5, pp. 620–631, 2011.
- [78] J. Yang, M. S. Sundrud, J. Skepner, and T. Yamagata, "Targeting Th17 cells in autoimmune diseases," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 35, no. 10, pp. 493–500, 2014.
- [79] N. J. Wilson *et al.*, "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 9, pp. 950–957, 2007.
- [80] M. Laan *et al.*, "Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways," *J. Immunol.*, vol. 162, no. 4, pp. 2347–52, 1999.

- [81] D. J. Cua and C. M. Tato, "Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 7, pp. 479–489, 2010.
- [82] C. Gu, L. Wu, and X. Li, "IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling," *Cytokine*, vol. 64, no. 2, pp. 477–485, 2013.
- [83] T. Duhon, R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, "Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 8, pp. 857–863, 2009.
- [84] T. Tian, S. Yu, and D. Ma, "Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 17, no. 2, pp. 113–125, 2013.
- [85] K. Wolk *et al.*, "IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: A potential role in psoriasis," *Eur. J. Immunol.*, vol. 36, no. 5, pp. 1309–1323, 2006.
- [86] S. P. Singh, H. H. Zhang, J. F. Foley, M. N. Hedrick, and J. M. Farber, "Human T Cells That Are Able to Produce IL-17 Express the Chemokine Receptor CCR6," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 1, pp. 214–221, 2008.
- [87] K. Hirota *et al.*, "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 12, pp. 2803–2812, 2007.
- [88] L. Maggi *et al.*, "CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC," *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, no. 8, pp. 2174–2181, 2010.
- [89] K. S. Voo *et al.*, "Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 12, pp. 4793–8, 2009.
- [90] E. Billerbeck *et al.*, "Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 7, pp. 3006–3011, 2010.
- [91] J. R. Fergusson, V. M. Fleming, and P. Klenerman, "CD161-expressing human T cells," *Front. Immunol.*, vol. 2, no. 36, pp. 1–7, 2011.
- [92] Y. Zheng and A. Y. Rudensky, "Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage,"

- Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 5, pp. 457–462, 2007.
- [93] T. H. S. Ng, G. J. Britton, E. V. Hill, J. Verhagen, B. R. Burton, and D. C. Wraith, “Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10,” *Front. Immunol.*, vol. 4, no. 129, pp. 1–14, 2013.
- [94] M. A. Curotto de Lafaille and J. J. Lafaille, “Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor?,” *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 626–635, 2009.
- [95] E. Zorn *et al.*, “IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo,” *Blood*, vol. 108, no. 5, pp. 1571–1579, 2006.
- [96] C. Micossé *et al.*, “Human ‘Th9’ cells are a subpopulation of PPAR γ + Th2 cells,” *Sci. Immunol.*, vol. 4, no. 31: eaat5943, pp. 1–14, 2019.
- [97] J. Chen *et al.*, “T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases,” *DNA Cell Biol.*, vol. 38, no. 10, pp. 1040–1047, 2019.
- [98] H. Ueno, J. Banchereau, and C. G. Vinuesa, “Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice,” *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 2, pp. 142–152, 2015.
- [99] N. Chevalier *et al.*, “CXCR5 Expressing Human Central Memory CD4 T Cells and Their Relevance for Humoral Immune Responses,” *J. Immunol.*, vol. 186, no. 10, pp. 5556–5568, 2011.
- [100] J. L. Cannons, K. T. Lu, and P. L. Schwartzberg, “T follicular helper cell diversity and plasticity,” *Trends Immunol.*, vol. 34, no. 5, pp. 200–207, 2013.
- [101] M. Ruterbusch, K. B. Pruner, L. Shehata, and M. Pepper, “In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 38, pp. 705–725, 2020.
- [102] Y. S. Choi *et al.*, “ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6,” *Immunity*, vol. 34, no. 6, pp. 932–946, 2011.
- [103] A. Rajendran and K. Tenbrock, “Regulatory T cell function in autoimmune

- disease,” *J. Transl. Autoimmun.*, vol. 4, no. 100130, pp. 1–6, 2021.
- [104] S. Sakaguchi, “Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 22, no. 1, pp. 531–562, 2004.
- [105] M. A. ElTanbouly and R. J. Noelle, “Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell’s journey,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 21, no. 4, pp. 257–267, 2021.
- [106] M. K. Levings, S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini, and M. G. Roncarolo, “Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells,” *Blood*, vol. 105, no. 3, pp. 1162–1169, 2005.
- [107] S. Sakaguchi, M. Miyara, C. M. Costantino, and D. A. Hafler, “FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 7, pp. 490–500, 2010.
- [108] D. V. Sawant and D. A. A. Vignali, “Once a Treg, always a Treg?,” *Immunol. Rev.*, vol. 259, no. 1, pp. 173–191, 2014.
- [109] C. Scottà *et al.*, “Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells,” *Haematologica*, vol. 101, no. 1, pp. 91–100, 2016.
- [110] Y. R. Mohseni, S. L. Tung, C. Dudreuilh, R. I. Lechler, G. O. Fruhwirth, and G. Lombardi, “The Future of Regulatory T Cell Therapy: Promises and Challenges of Implementing CAR Technology,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. 1608, pp. 1–13, 2020.
- [111] E. G. Schmitt and C. B. Williams, “Generation and function of induced regulatory T cells,” *Front. Immunol.*, vol. 4, no. 152, pp. 1–13, 2013.
- [112] L. S. Shen *et al.*, “CD4+CD25+CD127low/- regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression,” *Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 1, pp. 109–118, 2009.
- [113] N. Seddiki *et al.*, “Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells,” *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 7, pp. 1693–1700, 2006.

- [114] W. Liu *et al.*, “CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells,” *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 7, pp. 1701–1711, 2006.
- [115] L. S. K. Walker and D. M. Sansom, “The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 12, pp. 852–863, 2011.
- [116] D. M. Sansom and L. S. K. Walker, “The role of CD28 and cytotoxic regulatory T-cell biology,” *Immunol. Rev.*, vol. 212, pp. 131–148, 2006.
- [117] P. Hoffmann *et al.*, “Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25 high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion,” *Blood*, vol. 108, no. 13, pp. 4260–4267, 2006.
- [118] Z. Li, D. Li, A. Tsun, and B. Li, “FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 12, no. 5, pp. 558–565, 2015.
- [119] M. Battaglia and M. G. Roncarolo, “The Fate of Human Treg Cells,” *Immunity*, vol. 30, no. 6, pp. 763–765, 2009.
- [120] S. J. A. M. Santegoets *et al.*, “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 Immunol. Immunother.*, vol. 64, no. 10, pp. 1271–1286, 2015.
- [121] N. J. Booth *et al.*, “Different Proliferative Potential and Migratory Characteristics of Human CD4 + Regulatory T Cells That Express either CD45RA or CD45RO,” *J. Immunol.*, vol. 184, no. 8, pp. 4317–4326, 2010.
- [122] B. Santner-Nanan *et al.*, “Accelerated age-dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype,” *Int. Immunol.*, vol. 20, no. 3, pp. 375–383, 2008.
- [123] R. A. Hornero, G. J. Betts, B. Sawitzki, K. Vogt, P. N. Harden, and K. J. Wood, “CD45RA Distinguishes CD4+CD25+CD127-/low TSDR Demethylated Regulatory T Cell Subpopulations with Differential Stability and Susceptibility to Tacrolimus-Mediated Inhibition of Suppression,” *Transplantation*, vol. 101, no. 2, pp. 302–309, 2017.

- [124] N. Seddiki *et al.*, “Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life,” *Blood*, vol. 107, no. 7, pp. 2830–2838, 2006.
- [125] S. F. Ziegler, “FOXP3: Of mice and men,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 24, pp. 209–226, 2006.
- [126] C. Cozzo, J. Larkin, and A. J. Caton, “Cutting Edge: Self-Peptides Drive the Peripheral Expansion of CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 11, pp. 5678–5682, 2003.
- [127] T. Alissafi, A. Hatzioannou, A. I. Legaki, A. Varveri, and P. Verginis, “Balancing cancer immunotherapy and immune-related adverse events: The emerging role of regulatory T cells,” *J. Autoimmun.*, vol. 104, no. 102310, pp. 1–11, 2019.
- [128] A. M. Thornton, P. E. Korty, D. Q. Tran, E. A. Wohlfert, P. E. Murray, and E. M. Shevach, “Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3⁺ T Regulatory Cells,” *J. Immunol.*, vol. 184, no. 7, pp. 3433–3441, 2010.
- [129] U. Baron *et al.*, “DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3⁺ conventional T cells,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 9, pp. 2378–2389, 2007.
- [130] G. Lal and J. S. Bromberg, “Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression,” *Blood*, vol. 114, no. 18, pp. 3727–3735, 2009.
- [131] K. Hirahara, A. Poholek, G. Vahedi, A. Laurence, and Y. Kanno, “Mechanisms Underlying Helper T cell Plasticity: Implications for Immune-mediated Disease,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 5, pp. 1276–1287, 2013.
- [132] A. Oettel, M. Lorenz, V. Stangl, S. D. Costa, A. C. Zenclussen, and A. Schumacher, “Human Umbilical Vein Endothelial Cells foster conversion of CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ T cells into CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells via Transforming Growth Factor- β ,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 23278, pp. 1–8, 2016.
- [133] S. K. Lathrop *et al.*, “Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota,” *Nature*, vol. 478, no. 7368, pp. 250–254, 2011.
- [134] M. Kanamori, H. Nakatsukasa, M. Okada, Q. Lu, and A. Yoshimura, “Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications,” *Trends*

Immunol., vol. 37, no. 11, pp. 803–811, 2016.

- [135] A. M. Bilate and J. J. Lafaille, “Induced CD4 + Foxp3 + Regulatory T Cells in Immune Tolerance,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, no. 1, pp. 733–758, 2012.
- [136] E. V. Russler-Germain, S. Rengarajan, and C. S. Hsieh, “Antigen-specific regulatory T-cell responses to intestinal microbiota,” *Mucosal Immunol.*, vol. 10, no. 6, pp. 1375–1386, 2017.
- [137] A. K. Abbas *et al.*, “Regulatory T cells: Recommendations to simplify the nomenclature,” *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 4, pp. 307–308, 2013.
- [138] A. Schmidt, S. Éliás, R. N. Joshi, and J. Tegnér, “In vitro differentiation of human CD4+FOXP3+ induced regulatory T cells (iTregs) from naïve CD4+ T cells using a TGF- β -containing protocol,” *J. Vis. Exp.*, vol. 118, no. 55015, pp. 1–10, 2016.
- [139] J. Wang, A. Ioan-Facsinay, E. I. H. van der Voort, T. W. J. Huizinga, and R. E. M. Toes, “Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 1, pp. 129–138, 2007.
- [140] J. Huehn, J. K. Polansky, and A. Hamann, “Epigenetic control of FOXP3 expression: The key to a stable regulatory T-cell lineage?,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 2, pp. 83–89, 2009.
- [141] K. Hirahara *et al.*, “Helper T-cell differentiation and plasticity: Insights from epigenetics,” *Immunology*, vol. 134, no. 3, pp. 235–245, 2011.
- [142] P. C. J. Janson, M. E. Winerdal, P. Marits, M. Thörn, R. Ohlsson, and O. Winqvist, “FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans,” *PLoS One*, vol. 3, no. 2: e1612, pp. 1–13, 2008.
- [143] A. Hatzioannou *et al.*, “Regulatory T Cells in Autoimmunity and Cancer: A Duplicitous Lifestyle,” *Front. Immunol.*, vol. 12, no. 731947, pp. 1–19, 2021.
- [144] H. W. Lim, P. Hillsamer, A. H. Banham, and C. H. Kim, “Cutting Edge: Direct Suppression of B Cells by CD4 + CD25 + Regulatory T Cells,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 7, pp. 4180–4183, 2005.
- [145] F. Ghiringhelli *et al.*, “CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner,” *J. Exp. Med.*,

- vol. 202, no. 8, pp. 1075–1085, 2005.
- [146] N. Misra, J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri, “Cutting Edge: Human CD4⁺ CD25⁺ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells,” *J. Immunol.*, vol. 172, no. 8, pp. 4676–4680, 2004.
- [147] M. O. Li, Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A.-K. L. Robertson, and R. A. Flavell, “Transforming Growth Factor- β Regulation of Immune Responses,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 24, no. 1, pp. 99–146, 2006.
- [148] C. J. Workman, A. L. Szymczak-Workman, L. W. Collison, M. R. Pillai, and D. A. A. Vignali, “The development and function of regulatory T cells,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 16, pp. 2603–2622, 2009.
- [149] W. Ouyang, S. Rutz, N. K. Crellin, P. A. Valdez, and S. G. Hymowitz, “Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, pp. 71–109, 2011.
- [150] D. A. A. Vignali, L. W. Collison, and C. J. Workman, “How regulatory T cells work,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 7, pp. 523–532, 2008.
- [151] L. Strauss, C. Bergmann, M. Szczepanski, W. Gooding, J. T. Johnson, and T. L. Whiteside, “A unique subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor- β 1 mediates suppression in the tumor microenvironment,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 15, pp. 4345–4354, 2007.
- [152] K. L. Dennis, N. R. Blatner, F. Gounari, and K. Khazaie, “Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer,” *Curr. Opin. Oncol.*, vol. 25, no. 6, pp. 637–645, 2013.
- [153] R. de Waal Malefyt *et al.*, “Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression,” *J. Exp. Med.*, vol. 174, no. Oct, pp. 915–924, 1991.
- [154] L. Ding, P. S. Linsley, L. Y. Huang, R. N. Germain, and E. M. Shevach, “IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-

- regulation of B7 expression,” *J. Immunol.*, vol. 151, no. 3, pp. 1224–1234, 1993.
- [155] K. W. Moore, R. D. W. Malefyt, L. Robert, and A. O. Garra, “Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, pp. 683–765, 2001.
- [156] K. Speiran *et al.*, “Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 85, no. 5, pp. 826–836, 2009.
- [157] R. Du, H. Zhao, F. Yan, and H. Li, “IL-17+ Foxp3+ T cells: an intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 96, no. 1, pp. 39–48, 2014.
- [158] L. W. Collison and D. A. A. Vignali, “In Vitro Treg Suppression Assays,” in *Regulatory T Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 707, G. Kassiotis and A. Liston, Eds. Springer Science+Business Media, LLC, 2011, pp. 21–37.
- [159] D. Dieckmann, H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler, “Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood,” *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 11, pp. 1303–1310, 2001.
- [160] H. Jonuleit, E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk, “Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood,” *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 11, pp. 1285–1294, 2001.
- [161] L. S. Taams, J. Smith, M. H. Rustin, M. Salmon, L. W. Poulter, and A. N. Akbar, “Human anergic/suppressive CD4+CD25+ T cells: A highly differentiated and apoptosis-prone population,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 31, no. 4, pp. 1122–1131, 2001.
- [162] C. Baecher-Allan, J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler, “CD4 + CD25 high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood,” *J. Immunol.*, vol. 167, no. 3, pp. 1245–1253, 2001.
- [163] M. L. Dustin and D. Depoil, “New insights into the T cell synapse from single molecule techniques,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 10, pp. 672–684, 2011.
- [164] J. Bayry, F. Triebel, S. V. Kaveri, and D. F. Tough, “Human Dendritic Cells Acquire a Semimature Phenotype and Lymph Node Homing Potential through

- Interaction with CD4+ CD25+ Regulatory T Cells,” *J. Immunol.*, vol. 178, no. 7, pp. 4184–4193, 2007.
- [165] T. Maruhashi, D. Sugiura, I. M. Okazaki, and T. Okazaki, “LAG-3: from molecular functions to clinical applications,” *J. Immunother. cancer*, vol. 8, no. 2: e001014, pp. 1–9, 2020.
- [166] X. Li *et al.*, “Dysfunctions, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Strategies of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis,” *Front. Pharmacol.*, vol. 12, no. 716081, pp. 1–16, 2021.
- [167] M. de la Rosa, S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold, “Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 34, no. 9, pp. 2480–2488, 2004.
- [168] A. Ohta and M. Sitkovsky, “Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells,” *Front. Immunol.*, vol. 5, no. 304, pp. 1–9, 2014.
- [169] G. Borsellino *et al.*, “Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellularATP and immune suppression,” *Blood*, vol. 110, no. 4, pp. 1225–1233, 2007.
- [170] W. J. Grossman, J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, and T. J. Ley, “Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death,” *Immunity*, vol. 21, no. 4, pp. 589–601, 2004.
- [171] W. J. Grossman, J. W. Verbsky, B. L. Tollefsen, C. Kemper, J. P. Atkinson, and T. J. Ley, “Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells,” *Blood*, vol. 104, no. 9, pp. 2840–2848, 2004.
- [172] B. R. Powell, N. R. M. Buist, and P. Stenzel, “An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy,” *J. Pediatr.*, vol. 100, no. 5, pp. 731–737, 1982.
- [173] C. L. Bennett and H. D. Ochs, “IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena,” *Curr. Opin. Pediatr.*, vol. 13, no. 6, pp. 533–538, 2001.

- [174] E. Gambineri, T. R. Torgerson, and H. D. Ochs, "Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis," *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 15, no. 4, pp. 430–435, 2003.
- [175] F. Barzaghi, L. Passerini, and R. Bacchetta, "Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome: A paradigm of immunodeficiency with autoimmunity," *Front. Immunol.*, vol. 3, no. 211, pp. 1–26, 2012.
- [176] S. L. Bailey-Bucktrout and J. A. Bluestone, "Regulatory T cells: Stability revisited," *Trends Immunol.*, vol. 32, no. 7, pp. 301–306, 2011.
- [177] A. Hartemann *et al.*, "Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: A phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial," *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 1, no. 4, pp. 295–305, 2013.
- [178] T. R. Mosmann and R. L. Coffman, "TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 7, pp. 145–173, 1989.
- [179] M. Messi, I. Giacchetto, K. Nagata, A. Lanzavecchia, G. Natoli, and F. Sallusto, "Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human TH1 and TH2 lymphocytes," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 78–86, 2003.
- [180] S. Romagnani, "T-cell subsets (Th1 versus Th2)," *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, vol. 85, no. 1, pp. 9–18, 2000.
- [181] P. Parronchi, M. De Carli, R. Manetti, C. Simonelli, S. Sampognaro, and M. P. Piccinni, "IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones," *J. Immunol.*, vol. 149, no. 9, pp. 2977–2983, 1992.
- [182] M. A. Cooper, T. A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna, and M. A. Caligiuri, "NK cell and DC interactions," *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 1, pp. 47–52, 2004.
- [183] C. B. Wilson, E. Rowell, and M. Sekimata, "Epigenetic control of T-helper-cell differentiation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 2, pp. 91–105, 2009.

- [184] F. Annunziato *et al.*, “Phenotypic and functional features of human Th17 cells,” *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 8, pp. 1849–1861, 2007.
- [185] K. Nistala *et al.*, “Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 33, pp. 14751–14756, 2010.
- [186] L. Cosmi *et al.*, “Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis,” *Arthritis Rheum.*, vol. 63, no. 8, pp. 2504–2515, 2011.
- [187] L. Cosmi *et al.*, “Identification of a novel subset of human circulating memory CD4+ T cells that produce both IL-17A and IL-4,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 1, pp. 222–230, 2010.
- [188] C. Irvin *et al.*, “Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 134, no. 5, pp. 1175–1186, 2014.
- [189] L. Li and V. A. Boussiotis, “The role of IL-17-producing Foxp3+ CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and colon cancer,” *Clin. Immunol.*, vol. 148, no. 2, pp. 246–253, 2013.
- [190] L. Zhou *et al.*, “TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function,” *Nature*, vol. 453, no. 7192, pp. 236–240, 2008.
- [191] C. Ogawa, Y. Tone, M. Tsuda, C. Peter, H. Waldmann, and M. Tone, “TGF- β -Mediated Foxp3 Gene Expression Is Cooperatively Regulated by Stat5, Creb, and AP-1 through CNS2,” *J. Immunol.*, vol. 192, no. 1, pp. 475–483, 2014.
- [192] M. O. Li and R. A. Flavell, “TGF- β : A Master of All T Cell Trades,” *Cell*, vol. 134, no. 3, pp. 392–404, 2008.
- [193] W. Liao, J. X. Lin, and W. J. Leonard, “Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy,” *Immunity*, vol. 38, no. 1, pp. 13–25, 2013.
- [194] W. Liao, J. X. Lin, L. Wang, P. Li, and W. J. Leonard, “Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages,” *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 6, pp. 551–559, 2011.

- [195] N. Manel, D. Unutmaz, and D. R. Littman, "The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t," *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 6, pp. 641–649, 2008.
- [196] T. Korn and M. Hiltensperger, "Role of IL-6 in the commitment of T cell subsets," *Cytokine*, vol. 146, no. 155654, pp. 1–8, 2021.
- [197] E. Lamprianidou *et al.*, "Modulation of IL-6/STAT3 signaling axis in CD41FOXP32 T cells represents a potential antitumor mechanism of azacitidine," *Blood Adv.*, vol. 5, no. 1, pp. 129–142, 2021.
- [198] C. Dejaco, C. Duftner, B. Grubeck-Loebenstien, and M. Schirmer, "Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases," *Immunology*, vol. 117, no. 3, pp. 289–300, 2006.
- [199] S. A. McClymont *et al.*, "Plasticity of Human Regulatory T Cells in Healthy Subjects and Patients with Type 1 Diabetes," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 7, pp. 3918–3926, 2011.
- [200] A. Kitz, M. Marcken, A. Gautron, M. Mitrovic, D. A. Hafler, and M. Dominguez-Villar, "AKT isoforms modulate Th1-like Treg generation and function in human autoimmune disease," *EMBO Rep.*, vol. 17, no. 8, pp. 1169–1183, 2016.
- [201] H. J. Bovenschen, P. C. Van De Kerkhof, P. E. Van Erp, R. Woestenenk, I. Joosten, and H. J. P. M. Koenen, "Foxp3 regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 131, no. 9, pp. 1853–1860, 2011.
- [202] K. G. MacDonald, N. A. J. Dawson, Q. Huang, J. V. Dunne, M. K. Levings, and R. Broady, "Regulatory T cells produce profibrotic cytokines in the skin of patients with systemic sclerosis," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 135, no. 4, pp. 946-955.e9, 2015.
- [203] I. Kryczek *et al.*, "IL-17 + Regulatory T Cells in the Microenvironments of Chronic Inflammation and Cancer," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 7, pp. 4388–4395, 2011.
- [204] H. J. P. M. Koenen, R. L. Smeets, P. M. Vink, E. Van Rijssen, A. M. H. Boots, and I. Joosten, "Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17 producing cells," *Blood*, vol. 112, no. 6, pp. 2340–2352, 2008.

- [205] S. A. Long and J. H. Buckner, "CD4+FOXP3+ Treg in human autoimmunity: more than a numbers game," *J. Immunol.*, vol. 187, no. 5, pp. 2061–2066, 2011.
- [206] G. Bossi and G. M. Griffiths, "CTL secretory lysosomes: Biogenesis and secretion of a harmful organelle," *Semin. Immunol.*, vol. 17, no. 1, pp. 87–94, 2005.
- [207] D. Kaiserman, C. H. Bird, J. Sun, A. Matthews, K. Ung, and J. C. Whisstock, "The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent," *J. Cell Biol.*, vol. 175, no. 4, pp. 619–630, 2006.
- [208] H. Neumann, I. M. Medana, J. Bauer, and H. Lassmann, "Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases," *Trends Neurosci.*, vol. 25, no. 6, pp. 313–319, 2002.
- [209] R. S. Liblau, F. S. Wong, L. T. Mars, and P. Santamaria, "Autoreactive CD8 T cells in organ-specific autoimmunity: Emerging targets for therapeutic intervention," *Immunity*, vol. 17, no. 1, pp. 1–6, 2002.
- [210] I. Voskoboinik, J. C. Whisstock, and J. A. Trapani, "Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 6, pp. 388–400, 2015.
- [211] J. A. Lopez *et al.*, "Rapid and Unidirectional Perforin Pore Delivery at the Cytotoxic Immune Synapse," *J. Immunol.*, vol. 191, no. 5, pp. 2328–2334, 2013.
- [212] D. Liu, Y. T. Bryceson, T. Meckel, G. Vasiliver-Shamis, M. L. Dustin, and E. O. Long, "Integrin-Dependent Organization and Bidirectional Vesicular Traffic at Cytotoxic Immune Synapses," *Immunity*, vol. 31, no. 1, pp. 99–109, 2009.
- [213] M. L. Dustin and E. O. Long, "Cytotoxic immunological synapses," *Immunol. Rev.*, vol. 235, no. 1, pp. 24–34, 2010.
- [214] J. F. De Vries *et al.*, "Differential activation of the death receptor pathway in human target cells induced by cytotoxic T lymphocytes showing different kinetics of killing," *Haematologica*, vol. 92, no. 12, pp. 1671–1678, 2007.
- [215] E. Volpe, M. Sambucci, L. Battistini, and G. Borsellino, "Fas-fas ligand: Checkpoint of t cell functions in multiple sclerosis," *Front. Immunol.*, vol. 7, no. 383, pp. 1–9, 2016.

- [216] U. Srenathan, K. Steel, and L. S. Taams, "IL-17+ CD8+ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease," *Immunol. Lett.*, vol. 178, pp. 20–26, 2016.
- [217] N. Parameswaran and S. Patial, "Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages," *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, vol. 20, no. 2, pp. 87–103, 2010.
- [218] P. Wong and E. G. Pamer, "CD8 T Cell Responses to Infectious Pathogens," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 21, no. 1, pp. 29–70, 2003.
- [219] E. MacHura, B. Mazur, M. Rusek-Zychma, and M. Barć-Czarnecka, "Cytokine production by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in atopic childhood asthma," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2010, no. 60613, pp. 1–11, 2010.
- [220] D. Hijnen *et al.*, "CD8+ T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- γ , IL-13, IL-17 and IL-22," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 4, pp. 973–979, 2013.
- [221] C. Ortega *et al.*, "IL-17-producing CD8 + T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 86, no. 2, pp. 435–443, 2009.
- [222] B. Menon *et al.*, "Interleukin-17+CD8+ T cells are enriched in the joints of patients with psoriatic arthritis and correlate with disease activity and joint damage progression," *Arthritis Rheumatol.*, vol. 66, no. 5, pp. 1272–1281, 2014.
- [223] M. B. M. Teunissen *et al.*, "The IL-17A-producing CD8 + T-cell population in psoriatic lesional skin comprises mucosa-associated invariant t cells and conventional t cells," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no. 12, pp. 2898–2907, 2014.
- [224] Z. Shi, Y. Okuno, M. Rifa'i, A. T. Endharti, and K. Akane, "Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg," *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 8, pp. 2106–2119, 2009.
- [225] Z. Xu *et al.*, "Molecular and cellular characterization of human CD8 T suppressor cells," *Front. Immunol.*, vol. 7, no. 549, pp. 1–9, 2016.
- [226] K. Fukada, Y. Sobao, H. Tomiyama, S. Oka, and M. Takiguchi, "Functional Expression of the Chemokine Receptor CCR5 on Virus Epitope-Specific Memory

- and Effector CD8 + T Cells,” *J. Immunol.*, vol. 168, no. 5, pp. 2225–2232, 2002.
- [227] I. H. Seo *et al.*, “IL-15 enhances CCR5-mediated migration of memory CD8+ T cells by upregulating CCR5 expression in the absence of TCR stimulation,” *Cell Rep.*, vol. 36, no. 4, 109438, pp. 1–10, 2021.
- [228] Y. F. Yang *et al.*, “IL-12 as well as IL-2 upregulates CCR5 expression on T cell receptor-triggered human CD4+ and CD8+ T cells,” *J. Clin. Immunol.*, vol. 21, no. 2, pp. 116–125, 2001.
- [229] R. K. Dinesh, B. J. Skaggs, A. La Cava, B. H. Hahn, and R. P. Singh, “CD8+ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond,” *Autoimmun. Rev.*, vol. 9, no. 8, pp. 560–568, 2010.
- [230] L. B. Jarvis, M. K. Matyszak, R. C. Duggleby, J. C. Goodall, F. C. Hall, and J. S. H. Gaston, “Autoreactive human peripheral blood CD8+ T cells with a regulatory phenotype and function,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, no. 10, pp. 2896–2908, 2005.
- [231] G. Churlaud *et al.*, “Human and mouse CD8+CD25+FOXP3+ regulatory T cells at steady state and during interleukin-2 therapy,” *Front. Immunol.*, vol. 6, no. 171, pp. 1–10, 2015.
- [232] L. Lu and H. Cantor, “Generation and regulation of CD8+ regulatory T cells,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 5, no. 6, pp. 401–406, 2008.
- [233] T. R. F. Smith and V. Kumar, “Revival of CD8+ Treg-mediated suppression,” *Trends Immunol.*, vol. 29, no. 7, pp. 337–342, 2008.
- [234] Y. Yu, X. Ma, R. Gong, J. Zhu, L. Wei, and J. Yao, “Recent advances in CD8+ regulatory t cell research (Review),” *Oncol. Lett.*, vol. 15, no. 6, pp. 8187–8194, 2018.
- [235] M. Bonneville, R. L. O’Brien, and W. K. Born, “ $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 7, pp. 467–478, 2010.
- [236] M. Lawand, J. Déchanet-Merville, and M. C. Dieu-Nosjean, “Key features of gamma-delta T-cell subsets in human diseases and their immunotherapeutic implications,” *Front. Immunol.*, vol. 8, no. 761, pp. 1–9, 2017.

- [237] C. T. Morita, C. Jin, G. Sarikonda, and H. Wang, "Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V γ 2V δ 2 T cells: Discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens," *Immunol. Rev.*, vol. 215, no. 1, pp. 59–76, 2007.
- [238] S. R. Carding and P. J. Egan, " $\gamma\delta$ T cells: Functional plasticity and heterogeneity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 5, pp. 336–345, 2002.
- [239] A. Toulon *et al.*, "A role for human skin-resident T cells in wound healing," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 4, pp. 743–750, 2009.
- [240] C. T. Morita, R. A. Mariuzza, and M. B. Brenner, "Antigen recognition by human $\gamma\delta$ T cells: Pattern recognition by the adaptive immune system," *Springer Semin. Immunopathol.*, vol. 22, no. 3, pp. 191–217, 2000.
- [241] Z. W. Chen and N. L. Letvin, "V γ 2V δ 2+ T cells and anti-microbial immune responses," *Microbes Infect.*, vol. 5, no. 6, pp. 491–498, 2003.
- [242] M. Brandes, K. Willmann, and B. Moser, "Professional Antigen-Presentation Function by Human $\gamma\delta$ T Cells," *Science.*, vol. 309, no. 5732, pp. 264–268, 2005.
- [243] A. C. Hayday, " $\gamma\delta$ T Cells and the Lymphoid Stress-Surveillance Response," *Immunity*, vol. 31, no. 2, pp. 184–196, 2009.
- [244] M. C. D'Ombrian, D. S. Hansen, K. M. Simpson, and L. Schofield, " $\gamma\delta$ -T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN- γ response to *Plasmodium falciparum* malaria," *Eur. J. Immunol.*, vol. 37, no. 7, pp. 1864–1873, 2007.
- [245] G. Chitadze, H. H. Oberg, D. Wesch, and D. Kabelitz, "The Ambiguous Role of $\gamma\delta$ T Lymphocytes in Antitumor Immunity," *Trends Immunol.*, vol. 38, no. 9, pp. 668–678, 2017.
- [246] N. Caccamo *et al.*, "Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human v γ 9v δ 2 T cells," *Blood*, vol. 118, no. 1, pp. 129–138, 2011.
- [247] K. J. Ness-Schwickerath, C. Jin, and C. T. Morita, "Cytokine Requirements for the Differentiation and Expansion of IL-17A- and IL-22-Producing Human V γ 2V δ 2 T Cells," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 12, pp. 7268–7280, 2010.

- [248] U. Laggner *et al.*, “Identification of a Novel Proinflammatory Human Skin-Homing V γ 9V δ 2 T Cell Subset with a Potential Role in Psoriasis,” *J. Immunol.*, vol. 187, no. 5, pp. 2783–2793, 2011.
- [249] V. Lafont, J. Liautard, J. P. Liautard, and J. Favero, “Production of TNF- α by Human V γ 9V δ 2 T Cells Via Engagement of Fc γ RIIIA, the Low Affinity Type 3 Receptor for the Fc Portion of IgG, Expressed upon TCR Activation by Nonpeptidic Antigen,” *J. Immunol.*, vol. 166, no. 12, pp. 7190–7199, 2001.
- [250] L. Wang, H. Das, A. Kamath, and J. F. Bukowski, “Human V γ 2V δ 2 T Cells Produce IFN- γ and TNF- α with an On/Off/On Cycling Pattern in Response to Live Bacterial Products,” *J. Immunol.*, vol. 167, no. 11, pp. 6195–6201, 2001.
- [251] M. Todaro *et al.*, “Efficient Killing of Human Colon Cancer Stem Cells by $\gamma\delta$ T Lymphocytes,” *J. Immunol.*, vol. 182, no. 11, pp. 7287–7296, 2009.
- [252] T. Hoeres, M. Smetak, D. Pretscher, and M. Wilhelm, “Improving the efficiency of V γ 9V δ 2 T-cell immunotherapy in cancer,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. 800, pp. 1–18, 2018.
- [253] K. Comeau, P. Paradis, and E. L. Schiffrin, “Human and murine memory $\gamma\delta$ T cells: Evidence for acquired immune memory in bacterial and viral infections and autoimmunity,” *Cell. Immunol.*, vol. 357, no. 104217, pp. 1–10, 2020.
- [254] X. Li *et al.*, “Generation of Human Regulatory $\gamma\delta$ T Cells by TCR $\gamma\delta$ Stimulation in the Presence of TGF- β and Their Involvement in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus,” *J. Immunol.*, vol. 186, no. 12, pp. 6693–6700, 2011.
- [255] S. Yamagiwa, J. D. Gray, S. Hashimoto, and D. A. Horwitz, “A Role for TGF- β in the Generation and Expansion of CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells from Human Peripheral Blood,” *J. Immunol.*, vol. 166, no. 12, pp. 7282–7289, 2001.
- [256] A. Schmidt, M. Eriksson, M. M. Shang, H. Weyd, and J. Tegnér, “Comparative analysis of protocols to induce human CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by combinations of IL-2, TGF-beta, retinoic acid, rapamycin and butyrate,” *PLoS One*, vol. 11, no. 2, e0148474, pp. 1–31, 2016.
- [257] A. Zanin-Zhorov *et al.*, “Human in vitro-induced regulatory T cells display Dlg1dependent and PKC- θ restrained suppressive activity,” *Sci. Rep.*, vol. 7,

- no. 4258, pp. 1–8, 2017.
- [258] S. G. Zheng, J. D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagiwa, and D. A. Horwitz, “Generation Ex Vivo of TGF- β -Producing Regulatory T Cells from CD4⁺ CD25⁻ Precursors,” *J. Immunol.*, vol. 169, no. 8, pp. 4183–4189, 2002.
- [259] R. M. Dunham *et al.*, “CD127 and CD25 Expression Defines CD4⁺ T Cell Subsets That Are Differentially Depleted during HIV Infection,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 8, pp. 5582–5592, 2008.
- [260] W. M. Association, “World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects,” *JAMA*, vol. 310, no. 20, pp. 2191–2194, 2013.
- [261] F. Qiu *et al.*, “Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down?,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 1, pp. 268–284, 2017.
- [262] W. S. Low and W. A. B. Wan Abas, “Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, no. 239362, pp. 1–22, 2015.
- [263] A. Cossarizza *et al.*, “Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 47, no. 10, pp. 1584–1797, 2017.
- [264] “Produktinformationsblatt Ficoll 400, Sigma-Aldrich.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/492/232/f4375pis.pdf>. [Accessed: 23-Sep-2022].
- [265] A. Bøyum, “Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 21, no. 97, pp. 77–89, 1968.
- [266] Z. Lin *et al.*, “In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells,” *Nat. Protoc.*, vol. 9, no. 7, pp. 1563–1577, 2014.
- [267] W. Strober, “Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability,” *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. Appendix 3, no. 111, p. A3.B.1-A3.B.3, 2015.
- [268] R. E. Owen *et al.*, “Loss of T cell responses following long-term cryopreservation,” *J. Immunol. Methods*, vol. 326, no. 1–2, pp. 93–115, 2007.

- [269] C. T. Wohnhaas *et al.*, “DMSO cryopreservation is the method of choice to preserve cells for droplet-based single-cell RNA sequencing,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1:10699, pp. 1–14, 2019.
- [270] A. Smagur *et al.*, “Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells,” *Vox Sang.*, vol. 104, no. 3, pp. 240–247, 2013.
- [271] W. M. Yokoyama, M. L. Thompson, and R. O. Ehrhardt, “Cryopreservation and thawing of cells,” *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. Appendix 3, no. 99, p. A.3G.1-A.3G.5, 2012.
- [272] J. P. Robinson, “Overview of Flow Cytometry and Microbiology,” *Curr. Protoc. Cytom.*, vol. 84, no. e37, pp. 1–8, 2018.
- [273] Firma BD Biosciences, “Introduction to Flow Cytometry - A Learning Guide, Manual Part Number: 11-11032-01,” 2000. [Online]. Available: <https://de.scribd.com/doc/184733295/Introduction-to-Flow-Cytometry-A-Learning-Guide>. [Accessed: 24-Sep-2019].
- [274] K. M. McKinnon, “Flow cytometry: An overview,” *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 120, pp. 5.1.1-5.1.11, 2018.
- [275] F. F. Mandy, M. Bergeron, and T. Minkus, “Principles of flow cytometry,” *Transfus. Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 303–314, 1995.
- [276] Z. Maciorowski, P. K. Chattopadhyay, and P. Jain, “Basic multicolor flow cytometry,” *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 117, pp. 5.4.1-5.4.38, 2017.
- [277] BD Biosciences, “BD FACSCanto II Brochure,” 2009. [Online]. Available: http://www.https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCanto_II_brochure.pdf. [Accessed: 30-Dec-2019].
- [278] BD Biosciences, “BD FACSAria III Brochure,” 2010. [Online]. Available: https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSAria_III_brochure.pdf. [Accessed: 05-Jan-2020].
- [279] W. Ai, H. Li, N. Song, L. Li, and H. Chen, “Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment,” *Int. J. Environ. Res.*

Public Health, vol. 10, no. 9, pp. 3834–3842, 2013.

- [280] I. Olsen and L. M. Sollid, “Pitfalls in determining the cytokine profile of human T cells,” *J. Immunol. Methods*, vol. 390, no. 1–2, pp. 106–112, 2013.
- [281] Y. Zhang, Y. Wang, E. Read, M. Fu, Y. Pei, and L. Wu, “Golgi stress response, H₂S metabolism, and intracellular calcium homeostasis,” *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 32, no. 9, pp. 583–601, 2020.
- [282] Firma BD Biosciences, “Regulatory T Cells (Tregs): Frequently Asked Questions,” *Technical Resources*, 2010. [Online]. Available: https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/Treg_FAQ.pdf. [Accessed: 09-Dec-2019].
- [283] A. Laghmouchi, C. Hoogstraten, J. H. F. Falkenburg, and I. Jedema, “Long-term in vitro persistence of magnetic properties after magnetic bead-based cell separation of T cells,” *Scand. J. Immunol.*, vol. 92, no. 3: e12924, pp. 1–9, 2020.
- [284] Firma Miltenyi Biotec GmbH, “MACS® Cell Separation Select the best,” 2017. [Online]. Available: https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/b5349effdd595b72195e588aff033be3e24706bd/IM0020021.pdf. [Accessed: 01-Jan-2020].
- [285] Firma Miltenyi Biotec GmbH, “CD4 + T Cell Isolation Kit human,” 2018. [Online]. Available: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/macscell-separation/cell-separation-reagents/microbeads-and-isolation-kits/t-cells/cd4-t-cell-isolation-kit-human.html>. [Accessed: 24-Sep-2019].
- [286] K. Kanjana, K. Paisooksantivatana, P. Matangkasombut, P. Chevairakul, and P. Lumjiaktase, “Efficient short-term expansion of human peripheral blood regulatory T cells for co-culture suppression assay,” *J. Immunoass. Immunochem.*, vol. 40, no. 6, pp. 573–589, 2019.
- [287] B. J. C. Quah, H. S. Warren, and C. R. Parish, “Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester,” *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 9, pp. 2049–2056, 2007.
- [288] A. B. Lyons, S. J. Blake, and K. V. Doherty, “Flow cytometric analysis of cell

- division by dilution of CFSE related dyes,” *J. Immunol. Methods*, no. 64, pp. 9.11.1-9.11.12, 2013.
- [289] A. N. McMurchy and M. K. Levings, “Suppression assays with human T regulatory cells: A technical guide,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 42, no. 1, pp. 27–34, 2012.
- [290] Firma BioLegend, “CFSE Cell Division Assay Kit,” 2020. [Online]. Available: <https://d1spbj2x7qk4bg.cloudfront.net/fr-lu/products/cfse-cell-division-tracker-kit-9396?pdf=true&displayInline=true&leftRightMargin=15&topBottomMargin=15&filename=CFSE Cell Division Tracker Kit.pdf&v=20220726123020>. [Accessed: 10-Oct-2022].
- [291] M. T. Holzer, G. Almanzar, R. Woidich, B. Hügler, J. P. Haas, and M. Prelog, “Mitigated suppressive function of regulatory T cells (Treg) upon Th17-inducing cytokines in oligo- and polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) patients,” *Pediatr. Rheumatol.*, vol. 20, no. 26, pp. 1–7, 2022.
- [292] A. E. Long, M. Tatum, C. Mikacenic, and J. H. Buckner, “A novel and rapid method to quantify Treg mediated suppression of CD4 T cells,” *J. Immunol. Methods*, vol. 25, no. 3, pp. 289–313, 2017.
- [293] T. M. Brusko, M. A. Hulme, C. B. Myhr, M. J. Haller, and M. A. Atkinson, “Assessing the in vitro suppressive capacity of regulatory T cells,” *Immunol. Invest.*, vol. 36, no. 5–6, pp. 607–628, 2007.
- [294] J. S. Yi *et al.*, “Establishment of normative ranges of the healthy human immune system with comprehensive polychromatic flow cytometry profiling,” *PLoS One*, vol. 14, no. 12: e0225512, pp. 1–18, 2019.
- [295] P. Zarin, E. L. Y. Chen, T. S. H. In, M. K. Anderson, and J. C. Zúñiga-Pflücker, “Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much?,” *Cell. Immunol.*, vol. 296, no. 1, pp. 70–75, 2015.
- [296] H. T. Maecker, J. P. McCoy, and R. Nussenblatt, “Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 3, pp. 191–200, 2012.

- [297] R. M. De Castro Cunha, E. G. Kallas, D. S. Rodrigues, M. Nascimento Burattini, and R. Salomao, "Interferon- γ and tumour necrosis factor- α production by CD4+ T and CD8+ T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 140, no. 3, pp. 491–497, 2005.
- [298] M. Kadivar, J. Petersson, L. Svensson, and J. Marsal, "CD8 $\alpha\beta$ + $\gamma\delta$ T Cells: A Novel T Cell Subset with a Potential Role in Inflammatory Bowel Disease," *J. Immunol.*, vol. 197, no. 12, pp. 4584–4592, 2016.
- [299] A. K. Singh *et al.*, "High interferon- γ uniquely in V δ 1 T cells correlates with markers of inflammation and axonal damage in early multiple sclerosis," *Front. Immunol.*, vol. 8, no. 260, pp. 1–13, 2017.
- [300] T. Kondo, H. Takata, F. Matsuki, and M. Takiguchi, "Cutting Edge: Phenotypic Characterization and Differentiation of Human CD8+ T Cells Producing IL-17," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 4, pp. 1794–1798, 2009.
- [301] A. Lenarczyk, J. Helsloot, K. Farmer, L. Peters, A. Sturgess, and B. Kirkham, "Antigen-induced IL-17 response in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy controls," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 122, no. 1, pp. 41–48, 2000.
- [302] N. Muls, Z. Nasr, H. A. Dang, C. Sindic, and V. Van Pesch, "IL-22, GM-CSF and IL-17 in peripheral CD4+ T cell subpopulations during multiple sclerosis relapses and remission. Impact of corticosteroid therapy," *PLoS One*, vol. 12, no. 3: e0173780, pp. 1–16, 2017.
- [303] A. H. Muris, J. Damoiseaux, J. Smolders, J. W. Cohen Tervaert, R. Hupperts, and M. Thewissen, "Intracellular IL-10 detection in T cells by flowcytometry: The use of protein transport inhibitors revisited," *J. Immunol. Methods*, vol. 381, no. 1–2, pp. 59–65, 2012.
- [304] G. Mazza, C. A. Sabatos-Peyton, R. E. Protheroe, A. Herman, J. D. Campbell, and D. C. Wraith, "Isolation and characterization of human interleukin-10-secreting T cells from peripheral blood," *Hum. Immunol.*, vol. 71, no. 3, pp. 225–234, 2010.
- [305] S. C. De Rosa, L. A. Herzenberg, L. A. Herzenberg, and M. Roederer, "11-color, 13-parameter flow cytometry: Identification of human naive T cells by phenotype,

- function, and T-cell receptor diversity,” *Nat. Med.*, vol. 7, no. 2, pp. 245–248, 2001.
- [306] C. Baecher-Allan, E. Wolf, and D. A. Hafler, “Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells,” *Clin. Immunol.*, vol. 115, no. 1, pp. 10–18, 2005.
- [307] C. S. Lages *et al.*, “Functional Regulatory T Cells Accumulate in Aged Hosts and Promote Chronic Infectious Disease Reactivation,” *J. Immunol.*, vol. 181, no. 3, pp. 1835–1848, 2008.
- [308] F. Simonetta *et al.*, “Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, no. 9, pp. 2528–2538, 2010.
- [309] S. Y. Kawashiri *et al.*, “CD4+CD25 highCD127 low/- Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis,” *J. Rheumatol.*, vol. 38, no. 12, pp. 2517–2521, 2011.
- [310] A. K. Marwaha *et al.*, “Cutting Edge: Increased IL-17–Secreting T Cells in Children with New-Onset Type 1 Diabetes,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 7, pp. 3814–3818, 2010.
- [311] M. Beyer *et al.*, “Comparative approach to define increased regulatory T cells in different cancer subtypes by combined assessment of CD127 and FOXP3,” *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2011, no. 734036, pp. 1–12, 2011.
- [312] M. F. Chevalier *et al.*, “Phenotype alterations in regulatory T-cell subsets in primary HIV infection and identification of Tr1-like cells as the main interleukin 10-producing CD4+ T cells,” *J. Infect. Dis.*, vol. 211, no. 5, pp. 769–779, 2015.
- [313] B. Y. Guevoghlanian-Silva, C. Hernandez, R. P. Correia, and S. Podgaec, “Deep Infiltrating Endometriosis and Activation and Memory Surface Markers and Cytokine Expression in Isolated Treg Cells,” *Reprod. Sci.*, vol. 27, no. 2, pp. 599–610, 2020.
- [314] D. Valmori, A. Merlo, N. E. Souleimanian, C. S. Hesdorffer, and M. Ayyoub, “A peripheral circulating compartment of natural naive CD4+ Tregs,” *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 7, pp. 1953–1962, 2005.
- [315] M. C. A. Melnick L. Sheng, “Characteristics of Regulatory T-Cell Populations

- Before and After Ty21a Typhoid Vaccination in Children and Adults,” *Clin. Immunol.*, vol. 203, no. 1, pp. 14–22, 2019.
- [316] R. Gregg *et al.*, “The number of human peripheral blood CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells increases with age,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 140, no. 3, pp. 540–546, 2005.
- [317] L. M. Ebert and S. R. McColl, “Up-Regulation of CCR5 and CCR6 on Distinct Subpopulations of Antigen-Activated CD4⁺ T Lymphocytes,” *J. Immunol.*, vol. 168, no. 1, pp. 65–72, 2002.
- [318] S. Henze, “Analyse der Expression von Chemokinrezeptoren auf T-Lymphozyten im peripheren Blut von Patienten mit verschiedenen Manifestationen des kutanen Lupus erythematoses,” Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Hohen Medizinischen Fakultät der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2007.
- [319] E. Roffe *et al.*, “Increased frequencies of circulating CCR5⁺ memory T cells are correlated to chronic chagasic cardiomyopathy progression,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 106, no. 3, pp. 641–652, 2019.
- [320] L. M. Jakob, “Polarisierbarkeit von peripheren T-Zellen nach Stimulation mit diabetesspezifischen Antigenen bei Patienten mit T1DM und gesunden Kontrollpersonen,” Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2020.
- [321] N. K. Crellin, R. V. Garcia, O. Hadisfar, S. E. Allan, T. S. Steiner, and M. K. Levings, “Human CD4⁺ T Cells Express TLR5 and Its Ligand Flagellin Enhances the Suppressive Capacity and Expression of FOXP3 in CD4⁺ CD25⁺ T Regulatory Cells,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 12, pp. 8051–8059, 2005.
- [322] J. Yamanouchi *et al.*, “Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity,” *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 3, pp. 329–337, 2007.
- [323] Q. Tang *et al.*, “Central Role of Defective Interleukin-2 Production in the Triggering of Islet Autoimmune Destruction,” *Immunity*, vol. 28, no. 5, pp. 687–697, 2008.

- [324] S. Sakaguchi, D. A. A. Vignali, A. Y. Rudensky, R. E. Niec, and H. Waldmann, "The plasticity and stability of regulatory T cells," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 6, pp. 461–467, 2013.
- [325] E. M. Shevach and A. M. Thornton, "tTregs, pTregs, and iTregs," *Immunol. Rev.*, vol. 259, no. 1, pp. 88–102, 2014.
- [326] J. Ye *et al.*, "Human tumor-infiltrating Th17 cells have the capacity to differentiate into IFN- γ + and FOXP3+ T cells with potent suppressive function," *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 4, pp. 936–951, 2011.
- [327] M. C. Fantini, C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle, and M. F. Neurath, "Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4+ CD25- T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 9, pp. 5149–5153, 2004.
- [328] P. Pandiyan, L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M. J. Lenardo, "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells," *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 12, pp. 1353–1362, 2007.
- [329] M. Panzer, S. Sitte, S. Wirth, I. Drexler, T. Sparwasser, and D. Voehringer, "Rapid In Vivo Conversion of Effector T Cells into Th2 Cells during Helminth Infection," *J. Immunol.*, vol. 188, no. 2, pp. 615–623, 2012.
- [330] M. Feuerer, J. A. Hill, K. Kretschmer, H. Von Boehmer, D. Mathis, and C. Benoist, "Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 13, pp. 5919–5924, 2010.
- [331] Y. Y. Wan and R. A. Flavell, "'Yin-Yang' functions of transforming growth factor- β and T regulatory cells in immune regulation," *Immunol. Rev.*, vol. 220, no. 1, pp. 199–213, 2007.
- [332] K. R. Fowke, J. Behnke, C. Hanson, K. Shea, and L. M. Cosentino, "Apoptosis: A method for evaluating the cryopreservation of whole blood and peripheral blood mononuclear cells," *J. Immunol. Methods*, vol. 244, no. 1–2, pp. 139–144, 2000.

- [333] M. Kvarnström, M. C. Jenmalm, and C. Ekerfelt, "Effect of cryopreservation on expression of Th1 and Th2 cytokines in blood mononuclear cells from patients with different cytokine profiles, analysed with three common assays: An overall decrease of interleukin-4," *Cryobiology*, vol. 49, no. 2, pp. 157–168, 2004.
- [334] M. Venkataraman, "Effects of Cryopreservation on Immune Responses: IX. Stimulus-Mediated Dichotomy in IL-10 Production by Frozen Human Peripheral Blood Mononuclear Cells," *J. Hematother.*, vol. 5, no. 3, pp. 301–308, 1996.
- [335] A. Costantini *et al.*, "Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function," *J. Immunol. Methods*, vol. 278, no. 1–2, pp. 145–155, 2003.
- [336] C. R. Kreher, M. T. Dittrich, R. Guerkov, B. O. Boehm, and M. Tary-Lehmann, "CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays," *J. Immunol. Methods*, vol. 278, no. 1–2, pp. 79–93, 2003.
- [337] Y. Luo, P. Wang, H. Liu, Z. Zhu, C. Li, and Y. Gao, "The state of T cells before cryopreservation: Effects on post-thaw proliferation and function," *Cryobiology*, vol. 79, pp. 65–70, 2017.
- [338] A. Sadeghi, G. Ullenhag, G. Wagenius, T. H. Tötterman, and F. Eriksson, "Rapid expansion of T cells: Effects of culture and cryopreservation and importance of short-term cell recovery," *Acta Oncol.*, vol. 52, no. 5, pp. 978–986, 2013.
- [339] J. J. Ruitenber, C. Boyce, R. Hingorani, A. Putnam, and S. A. Ghanekar, "Rapid assessment of in vitro expanded human regulatory T cell function," *J. Immunol. Methods*, vol. 372, no. 1–2, pp. 95–106, 2011.
- [340] A. L. Putnam *et al.*, "Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes," *Diabetes*, vol. 58, no. 3, pp. 652–662, 2009.
- [341] A. Kukreja *et al.*, "Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes," *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 1, pp. 131–140, 2002.
- [342] J. Seidl, R. Knuechel, and L. A. Kunz-Schughart, "Evaluation of membrane physiology following fluorescence activated or magnetic cell separation," *Cytometry*, vol. 36, no. 2, pp. 102–111, 1999.

- [343] I. Andrä *et al.*, “An Evaluation of T-Cell Functionality After Flow Cytometry Sorting Revealed p38 MAPK Activation,” *Cytom. Part A*, vol. 97, no. 2, pp. 171–183, 2020.
- [344] G. Pfister, S. M. Toor, V. Sasidharan Nair, and E. Elkord, “An evaluation of sorter induced cell stress (SICS) on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after different sort conditions - Are your sorted cells getting SICS?,” *J. Immunol. Methods*, vol. 487, no. 112902, pp. 1–7, 2020.
- [345] A. Schneider and J. H. Buckner, “Assessment of Suppressive Capacity by Human Regulatory T Cells Using a Reproducible, Bi-Directional CFSE-Based In Vitro Assay,” in *Regulatory T Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 707, G. Kassiotis and A. Liston, Eds. Springer Science+Business Media, LLC, 2011, pp. 233–241.
- [346] H. Fraser *et al.*, “A Rapamycin-Based GMP-Compatible Process for the Isolation and Expansion of Regulatory T Cells for Clinical Trials,” *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 8, no. Mar, pp. 198–209, 2018.
- [347] A. Mirjalili, E. Parmoor, S. Moradi Bidhendi, and B. Sarkari, “Microbial contamination of cell cultures: A 2 years study,” *Biologicals*, vol. 33, no. 2, pp. 81–85, 2005.
- [348] V. W. Hu, G. E. Black, A. Torres-Duarte, and F. P. Abramson, “³H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis.,” *FASEB J.*, vol. 16, no. 11, pp. 1456–1457, 2002.
- [349] K. Venken *et al.*, “A CFSE based assay for measuring CD4+CD25+ regulatory T cell mediated suppression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses,” *J. Immunol. Methods*, vol. 322, no. 1–2, pp. 1–11, 2007.
- [350] A. M. Schmidt *et al.*, “Regulatory T Cells Require TCR Signaling for Their Suppressive Function,” *J. Immunol.*, vol. 194, no. 9, pp. 4362–4370, 2015.
- [351] L. Janský, P. Reymanová, and J. Kopecký, “Dynamics of Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated by LPS or Infected by *Borrelia*,” *Physiol. Res.*, vol. 52, no. 5, pp. 593–598, 2003.
- [352] E. Kumolosasi, E. Salim, I. Jantan, and W. Ahmad, “Kinetics of intracellular,

- extracellular and production of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells," *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 13, no. 4, pp. 536–543, 2014.
- [353] M. K. Levings, R. Sangregorio, and M. G. Roncarolo, "Human CD25+CD4+ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function," *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 11, pp. 1295–1301, 2001.
- [354] J. Nemunaitis, T. Fong, P. Shabe, D. Martineau, and D. Ando, "Comparison of serum interleukin-10 (il-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma," *Cancer Invest.*, vol. 19, no. 3, pp. 239–247, 2001.
- [355] S. X. Leng, J. E. McElhaney, J. D. Walston, D. Xie, N. S. Fedarko, and G. A. Kuchel, "ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research," *J. Gerontol.*, vol. 63, no. 8, pp. 879–884, 2008.
- [356] A. A. Ellington, I. J. Kullo, K. R. Bailey, and G. G. Klee, "Antibody-based protein multiplex platforms: Technical and operational challenges," *Clin. Chem.*, vol. 56, no. 2, pp. 186–193, 2010.
- [357] W. De Jager, H. Te Velthuis, B. J. Prakken, W. Kuis, and G. T. Rijkers, "Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells," *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 10, no. 1, pp. 133–139, 2003.
- [358] A. Y. Wang, S. Q. Crome, K. M. Jenkins, J. A. Medin, J. L. Bramson, and M. K. Levings, "Adenoviral-transduced dendritic cells are susceptible to suppression by T regulatory cells and promote interleukin 17 production," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 60, no. 3, pp. 381–388, 2011.
- [359] S. Kivity, N. Agmon-Levin, M. Blank, and Y. Shoenfeld, "Infections and autoimmunity - friends or foes?," *Trends Immunol.*, vol. 30, no. 8, pp. 409–414, 2009.
- [360] G. S. Cooper, M. L. K. Bynum, and E. C. Somers, "Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: Improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases," *J. Autoimmun.*, vol. 33, no. 3–4, pp.

197–207, 2009.

- [361] E. Gale, “The Rise of Childhood Type 1 Diabetes in the 20th Century,” *Diabetes*, vol. 51, no. 12, pp. 3353–3361, 2002.
- [362] C. Walton *et al.*, “Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition,” *Mult. Scler. J.*, vol. 26, no. 14, pp. 1816–1821, 2020.
- [363] P. J. Eggenhuizen, B. H. Ng, and J. D. Ooi, “Treg enhancing therapies to treat autoimmune diseases,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 19, pp. 1–18, 2020.
- [364] J. Bamoulid *et al.*, “The need for minimization strategies: Current problems of immunosuppression,” *Transpl. Int.*, vol. 28, no. 8, pp. 891–900, 2015.
- [365] C. R. Maldini, G. I. Ellis, and J. L. Riley, “CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 18, no. 10, pp. 605–616, 2018.
- [366] H. Graßhoff *et al.*, “Low-Dose IL-2 Therapy in Autoimmune and Rheumatic Diseases,” *Front. Immunol.*, vol. 12, no. 648408, pp. 1–13, 2021.
- [367] J. A. Todd *et al.*, “Regulatory T Cell Responses in Participants with Type 1 Diabetes after a Single Dose of Interleukin-2: A Non-Randomised, Open Label, Adaptive Dose-Finding Trial,” *PLoS Med.*, vol. 13, no. 10: e1002139, pp. 1–33, 2016.
- [368] J. Y. Humrich and G. Riemekasten, “Low-dose interleukin-2 therapy for the treatment of systemic lupus erythematosus,” *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 31, no. 2, pp. 208–212, 2019.
- [369] J. He *et al.*, “Efficacy and safety of low-dose IL-2 in the treatment of systemic lupus erythematosus: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 79, no. 1, pp. 141–149, 2020.
- [370] J. A. Bluestone *et al.*, “Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, no. 315, pp. 1–14, 2015.
- [371] N. Marek-Trzonkowska *et al.*, “Therapy of type 1 diabetes with CD4+CD25highCD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - Results of one year follow-up,” *Clin. Immunol.*, vol. 153, no. 1, pp. 23–30, 2014.

- [372] P. Desreumaux *et al.*, "Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease," *Gastroenterology*, vol. 143, no. 5, pp. 1207-1217.e2, 2012.
- [373] J. M. Mathew *et al.*, "A Phase I Clinical Trial with Ex Vivo Expanded Recipient Regulatory T cells in Living Donor Kidney Transplants," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1: 7428, pp. 1–12, 2018.
- [374] J. L. D. S. Schiavinato *et al.*, "TGF-beta/atRA-induced Tregs express a selected set of microRNAs involved in the repression of transcripts related to Th17 differentiation," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1: 3627, pp. 1–17, 2017.
- [375] M. Romano, S. L. Tung, L. A. Smyth, and G. Lombardi, "Treg therapy in transplantation: a general overview," *Transpl. Int.*, vol. 30, no. 8, pp. 745–753, 2017.
- [376] C. Scottà *et al.*, "Differential effects of rapamycin and retinoic acid on expansion, stability and suppressive qualities of human CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cell subpopulations," *Haematologica*, vol. 98, no. 8, pp. 1291–1299, 2013.
- [377] D. S. Segundo *et al.*, "Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients," *Transplantation*, vol. 82, no. 4, pp. 550–557, 2006.
- [378] D. Cao, R. van Vollenhoven, L. Klareskog, C. Trollmo, and V. Malmström, "CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 6, no. 4, pp. 335–346, 2004.
- [379] U. Feger, C. Luther, S. Poeschel, A. Melms, and E. Tolosa, "Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 147, no. 3, pp. 412–418, 2007.
- [380] D. P. Chopra, A. A. Dombkowski, P. M. Stemmer, and G. C. Parker, "Intestinal epithelial cells in vitro," *Stem Cells Dev.*, vol. 19, no. 1, pp. 131–141, 2010.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

-	negativ(e)
+	positiv(e)
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AHR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
APC	Allophycocyanin
APCs	engl. antigen-presenting cells = Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest.	lateinisch Aqua destillata = destilliertes Wasser
aTregs	aktivierte Tregs
Bcl	engl. B cell lymphoma
BFA	Brefeldin A
BID	engl. BH3 interacting domain death agonist
BSA	engl. bovine serum albumin = Albumin aus Rinderserum
BV	engl. Brilliant Violet
bzw.	beziehungsweise
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
Cat.	Katalognummer
CCL	CC-Chemokinligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	engl. cluster of differentiation
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen

CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidylester
Ch.-B.	Chargen-Bezeichnung
CM	engl. central memory cells = zentrale Gedächtniszellen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTLA-4	engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTLs	engl. cytotoxic T lymphocytes = zytotoxische T-Lymphozyten
CXCL	CXC-Chemokinligand
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
Cut-Off (-Wert)	engl. Grenzwert
Cy	Cyanin
DCs	engl. dendritic cells = dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dot Plot(s)	engl. Streudiagramm(e)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eff	Effektorzellen
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
EM	engl. effector memory cells = Effektor-Gedächtniszellen
engl.	englisch
evtl.	eventuell
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting
FBS	engl. fetal bovine serum = fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	engl. forkhead box protein 3

FSC	engl. forward-scattered light = Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
Gate	engl. gate = Gatter
G-CSF	engl. granulocyte-colony stimulating factor
high	engl. hoch
IFN	Interferon
IL	Interleukin
int	intermediär
IPEX-Syndrom	X-chromosomales Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-Syndrom
IRF4	engl. interferon regulatory factor 4
iTregs	in vitro induzierte Tregs
JIA	juvenile idiopathische Arthritis
LAG-3	Lymphozyten-Aktivierungsgen 3
low	engl. niedrig
m	männlich
MACS	engl. magnetic activated cell sorting = magnetische Zellseparation
Max	maximaler Wert
Mean	engl. Mittelwert
MHC	engl. major histocompatibility complex
Min	minimaler Wert
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	millimolar
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid = Boten-Ribonukeinsäure
MS	Multiple Sklerose
mTOR	engl. mechanistic target of rapamycin
N	naive Zellen
n	engl. number = Anzahl
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
nTregs	natürliche Tregs
o.g.	oben genannte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Peak	engl. Zacke
PBMCs	engl. peripheral blood mononuclear cells = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	engl. phosphate-buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PostStim	Poststimulations-Suppression-Assay
PreStim	Prästimulations-Suppression-Assay
pTregs	periphere regulatorische T-Zellen

RA	Rheumatoide Arthritis
real-time PCR	engl. real-time polymerase chain reaction = Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion
ROR γ t	engl. retinoic acid orphan receptor gamma t
rpm	engl. revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
rTregs	ruhende Tregs
s.	siehe
SD	engl. standard deviation = Standardabweichung
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SSC	engl. side-scattered light = Seitwärtsstreulicht
STAT	engl. signal transducer and activator of transcription
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T-bet	engl. T-box expressed in T cells
TCR	engl. T cell receptor = T-Zell-Rezeptor
TEMRA	engl. terminally differentiated effector memory cells re-expressing CD45RA
Tfh	follikuläre T-Helferzellen
TGF	engl. transforming growth factor
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg(s)	regulatorische T-Zelle(n)
TSDR	Treg-spezifische demethylierte Region
TSLP	engl. thymic stromal lymphoprotein
tTregs	thymische regulatorische T-Zellen

Tube(s)	engl. Zentrifugenröhrchen
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
w	weiblich
well	engl. Schacht = Vertiefung einer Zellkulturplatte
z.B.	zum Beispiel

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierungsweg der CD4+ Thymozyten (modifiziert nach [20]).	3
Abbildung 2: Entstehung von FoxP3+ Tregs im Thymus und in der Peripherie (modifiziert nach [94]).	16
Abbildung 3: Rolle der Tregs bei der Immunhomöostase (modifiziert nach [161]).	19
Abbildung 4: Plastizität der T-Helferzellen (modifiziert nach [62]).	21
Abbildung 5: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der durchgeführten Versuche.	39
Abbildung 6: Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMCs (modifiziert nach [266]).	42
Abbildung 7: Technischer Ablauf der Durchflusszytometrie (modifiziert nach [267]).	45
Abbildung 8 Unterscheidung der Subpopulationen der PBMCs anhand ihrer Größe und inneren Komplexität (modifiziert nach [277]).	47
Abbildung 9: Gating Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenmoleküle CD4 und CD8.	48
Abbildung 10: Gating und damit Selektion der Lymphozytenpopulation innerhalb der PBMCs.	54
Abbildung 11: Dot-Plot des ungefärbten Kontrollansatzes.	54
Abbildung 12: Gating und damit Eliminierung der toten Zellen.	55
Abbildung 13: Gating der CD4+ und der CD8+ Lymphozyten.	55
Abbildung 14: Isolation von CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs) und CD4+CD25-CD127- Zellen.	57
Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf der Suppression-Assays und Stimulationen.	58
Abbildung 16: Magnetische Zellseparation (MACS) (modifiziert nach [284]).	60
Abbildung 17: Gating-Strategie zur Isolierung von CD4+CD25+CD127low/- und CD4+CD25-CD127- Zellen durch Zell-Sorting.	62
Abbildung 18: Zusammensetzung der Ansätze des Prästimulations-Suppression-Assays.	65
Abbildung 19: Zusammensetzung der Ansätze der Poststimulations-Suppression-Assays.	69
Abbildung 20: Gating der Lymphozytenpopulation bei der Auswertung der Suppression-Assays.	70
Abbildung 21: Darstellung der Proliferation der CD4- Effektorzellen durch Gegenüberstellung der CFSE-Konzentration zum Vorwärtsstreulicht.	71
Abbildung 22: Histogrammdarstellung der CFSE-Konzentration zur Messung der Proliferation der CD4- Effektorzellen.	72
Abbildung 23: Schema zur Analyse der Lymphozyten-Subpopulationen.	76

Abbildung 24: Gating-Strategie der Lymphozyten-Populationen und der Messung der Zytokine IFN γ und IL-17 innerhalb der Lymphozyten-Populationen.	80
Abbildung 25: Schema zur Analyse der Subpopulationen der T-Zell-Differenzierung..	80
Abbildung 26: Gating-Strategie der Subpopulationen der T-Zell-Differenzierung. Schritt 1: Gating anhand der Oberflächenantigene CD45RA und CD27.....	82
Abbildung 27: Gating-Strategie der Subpopulationen der T-Zell-Differenzierung innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten. Schritt 2: Einbeziehung des Oberflächenantigens CCR7 zusätzlich zu CD45RA und CD27.....	83
Abbildung 28: Schema zur Analyse der Subpopulationen anhand der Antigene CD4, CD25 und CD127.	85
Abbildung 29: Gating-Strategie für die Oberflächenantigene CD25 und CD127 innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten.	87
Abbildung 30: Gating-Strategie der CD4+ Lymphozyten und deren Subpopulationen für die CD45RA- und FoxP3-Expression.....	89
Abbildung 31: Gating-Strategie der CD4+ Lymphozyten und deren Subpopulationen für die FoxP3-Expression und die IL-10-Produktion.	92
Abbildung 32: Vergleich der FoxP3-Expression innerhalb der jeweiligen Subpopulationen.....	94
Abbildung 33: Gating-Strategie der CD4+ Lymphozyten und deren Subpopulationen für IFN γ und IL-17.....	96
Abbildung 34: Vergleich der intrazellulären IFN γ -Produktion innerhalb der Treg-Subpopulationen.....	98
Abbildung 35: Vergleich der intrazellulären IL-17-Produktion innerhalb der Treg-Subpopulationen.....	99
Abbildung 36: Vergleich der intrazellulären IL-10-Produktion innerhalb der Treg-Subpopulationen.....	100
Abbildung 37: Gating-Strategie der Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR6 und CCR5 in Verbindung mit den Zytokinen IFN γ und IL-17 innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten.	104
Abbildung 38: Gating-Strategie des Oberflächenmoleküls CD161 innerhalb der CD4+ T-Lymphozyten und der Zytokinproduktion von IFN γ und IL-17 innerhalb der CD4+CD161+ Zellen.....	105
Abbildung 39: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Kontrollansätzen.	111

Abbildung 40: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Kontrollansätzen.	112
Abbildung 41: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen...	115
Abbildung 42: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit stimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen.....	116
Abbildung 43: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Ansätzen mit CD4+CD25+CD127low/- Zellen mit der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den korrespondierenden Ansätzen mit CD4+CD25-CD127- Zellen.....	119
Abbildung 44: Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen in Prozent der supprimierten CD4- Effektorzellen.	122
Abbildung 45: Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen in Prozent der supprimierten CD4- Effektorzellen.	123
Abbildung 46: Vergleich der Suppressionsfunktion der stimulierten mit der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- Zellen.	126
Abbildung 47: Vergleich der Suppressionsfunktion der stimulierten mit der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25-CD127- Zellen.....	127
Abbildung 48: Vergleich der Suppressionsfunktion der CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen in den korrespondierenden Versuchsansätzen.	130

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phänotyp-definierende Marker der T-Zell-Subpopulationen (modifiziert nach [1]).	4
Tabelle 2: T-Helferzell-Subpopulationen und ihre Eigenschaften (modifiziert nach [1], [2] und [66]).	9
Tabelle 3: Geräte.	29
Tabelle 4: Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial.	30
Tabelle 5: Chemikalien, Lösungen, Puffer und Medien.	33
Tabelle 6: Gebrauchsfertige Lösungen.	34
Tabelle 7: Gebrauchsfertige Kits.	34
Tabelle 8: Antikörper.	35
Tabelle 9: Zytokine.	37
Tabelle 10: Stimuli.	37
Tabelle 11: Software.	37
Tabelle 12: Charakterisierung der Studienpopulation.	40
Tabelle 13: Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie.	41
Tabelle 14: Färbepanel zur Phänotypisierung der PBMCs.	50
Tabelle 15: Zusammensetzung der Stimulationscocktails.	66
Tabelle 16: Charakterisierung der in der PBMC-Phänotypisierung untersuchten Probanden hinsichtlich ihres Alters und Geschlechts.	75
Tabelle 17: Verteilung der gemessenen Ereignisse anhand der Vitalitätsfärbung.	76
Tabelle 18: Proportionale Verteilung der Lymphozyten.	76
Tabelle 19: Zytokinproduktion innerhalb der Lymphozyten-Populationen.	77
Tabelle 20: Proportionale Verteilung der Subpopulationen der T-Zell-Differenzierung.	81
Tabelle 21: Zytokinproduktion der Subpopulationen der T-Zell-Differenzierung.	84
Tabelle 22: Anteil der Treg-Subpopulationen an den CD4+ Lymphozyten.	86
Tabelle 23: CD45RA-Status innerhalb der CD4+CD25+CD127low/- Zellen (Tregs).	87
Tabelle 24: Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 innerhalb der Treg-Subpopulationen.	90
Tabelle 25: Vergleich der FoxP3-Expression innerhalb der Treg-Subpopulationen.	93
Tabelle 26: Zytokinproduktion innerhalb der Treg-Subpopulationen.	95
Tabelle 27: Vergleich der Zytokinproduktion innerhalb der Treg-Subpopulationen.	97
Tabelle 28: Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR6 und CCR5 sowie des Oberflächenmoleküls CD161.	101

Tabelle 29: Zytokinproduktion innerhalb der Chemokinrezeptor-tragenden und CD161-exprimierenden Zellen.	102
Tabelle 30: Charakterisierung der in Suppression-Assays untersuchten Probanden hinsichtlich ihres Alters und Geschlechts.	106
Tabelle 31: Zellzahlen nach den verschiedenen Isolationsprozessen.	107
Tabelle 32: Deskriptive Darstellung der Ergebnisse der Prä- und Poststimulations-Suppression-Assays.	108
Tabelle 33: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen zwischen den Co-Kulturen und den Kontrollansätzen.	110
Tabelle 34: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den Co-Kulturen mit unstimulierten oder stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen.....	114
Tabelle 35: Vergleich der Proliferation der CD4- Effektorzellen in den korrespondierenden Ansätzen	118
Tabelle 36: Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- und der CD4+CD25-CD127- Zellen.....	121
Tabelle 37: Vergleich der Suppressionsfunktion der unstimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen mit der Suppressionsfunktion der stimulierten CD4+CD25+CD127low/- bzw. CD4+CD25-CD127- Zellen.....	125
Tabelle 38: Vergleich der Suppressionsfunktion der CD4+CD25+CD127low/- Zellen und der CD4+CD25-CD127- Zellen in den korrespondierenden Versuchsansätzen.	129

IV. Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Martina Prelog für die Unterstützung und Betreuung meiner Dissertation und ihre sorgfältigen Korrekturen, die meine Arbeit enorm bereichert haben. Mit ihrer Begeisterung für die Forschung und ihrer wissenschaftlichen Karriere in der Pädiatrie war sie für mich persönlich ein Vorbild.

Bei Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Giovanni Almanzar bedanke ich mich herzlich für die praktische Anleitung bei der Durchführung der Versuche im Labor, für die Unterstützung bei der Auswertung und Interpretation der Daten und für die stets geduldigen Erklärungen.

Für die ausführliche statistische Beratung bedanke ich mich bei Frau Dr. Rebecca Roth.

Beim gesamten Team des Labors für Pädiatrische Rheumatologie und Spezielle Immunologie der Universitäts-Kinderklinik bedanke ich mich für die freundschaftliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre und die anregenden Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt allen Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihr großes Verständnis und ihren unermüdlichen Zuspruch.