

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig**



**Die molekulare Grundlage für die höhere Sensitivität
regulatorischer CD4⁺ T-Zellen
im Vergleich zu konventionellen CD4⁺ T-Zellen
gegenüber der Stimulation mit CD28 Superagonisten**

**The molecular basis for the higher sensitivity of regulatory
CD4⁺ T cells as compared to conventional CD4⁺ T cells
to CD28 superagonistic stimulation**

**Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Tobias Simon Gulde
aus
Tübingen
Würzburg, Juli 2022

Eingereicht am: _____

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende: Prof. Dr. med. Martina Prelog

1. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig

2. Betreuer: PD. Dr. med. Niklas Beyersdorf

3. Betreuer: Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

Tag der mündlichen Prüfung: _____ 25.07.2022 _____

Doktorurkunden ausgehändigt am: _____

Der Promovend ist Arzt.

Für Sara, Salome, Nuria und Ava

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Grundzüge des Immunsystems	1
1.2 Aktivierung von T-Zellen	3
1.3 CD28 Superagonisten.....	8
1.4 Regulatorische T-Zellen.....	11
1.4.1 Im Thymus gebildete regulatorische T-Zellen	15
1.4.2 In der Peripherie induzierte regulatorische T-Zellen.....	15
1.4.3 Mechanismen der Immunsuppression durch regulatorische T-Zellen .	18
1.4.4 Therapeutische Ansätze.....	20
1.5 Zielsetzung.....	23
2. Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Software	27
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.4 Chemikalien	28
2.1.5 Lösungen	28
2.1.6 Puffer.....	28
2.1.7 Nährmedien.....	29
2.1.8 Mäuse	29
2.1.9 Antikörper.....	29
2.1.10 Magnetische Partikel.....	30
2.1.11 Biochemische Reagenzien.....	30
2.1.12 Kits	30
2.2 Methoden.....	30

2.2.1	Gewinnung von Lymphknotenzellen aus der Maus	30
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl.....	31
2.2.3	Zellaufreinigung.....	31
2.2.4	Bestimmung der Zellproliferation mittels CFSE-Färbung	32
2.2.5	Zellkultur.....	34
2.2.6	Extrazelluläre Färbung	34
2.2.7	Intrazelluläre Färbung	36
2.2.8	Tierexperimentelle Methoden.....	37
2.2.9	Durchflusszytometrie (FACS).....	39
2.2.10	Statistische Analysen	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1	Bevorzugte Aktivierung von regulatorischen T-Zellen durch den CD28 Superagonisten D665 in kultivierten Mauslymphozyten	40
3.2	In-vitro Untersuchung von T-Zellaktivierungsmarkern.....	45
3.3	Die Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen hebt die bevorzugte Aktivierung der regulatorischen T-Zellen durch niedrige CD28SA Konzentrationen in-vitro auf.....	47
3.4	MHC-Klasse-II-Blockade in-vivo	53
3.5	In-vivo Versuch der MHC-II-Blockade mittels Y3P-Fab2-Fragmenten.....	58
3.6	Die Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen in-vivo hebt die präferentielle Aktivierung der regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu konventionellen T-Zellen durch low dose CD28SA Therapie auf.....	59
4.	Diskussion	63
5.	Zusammenfassung	71
6.	Summary	72
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	73
8.	Literaturverzeichnis.....	76

9. Abbildungsverzeichnis	99
9.1 Abbildungen	99
9.2 Übersicht über die verwendeten Symbole	101
10. Eidesstattliche Erklärung / Affidavit.....	102
11. Veröffentlichungen.....	103
12. Danksagung.....	104
13. Lebenslauf	106

1. Einleitung

1.1 Grundzüge des Immunsystems

Das Immunsystem bietet einerseits einen effektiven Schutz gegenüber zahlreichen Krankheitserregern und verhindert andererseits fehlgeleitete oder überschießende Immunreaktionen, die schädlich für den eigenen Organismus selbst wären. Es lässt sich vereinfachend in zwei Systeme unterteilen, die jedoch eng miteinander verknüpft und vernetzt sind. Zum einen in das angeborene Immunsystem (*innate immunity*) und zum anderen in das erworbene bzw. adaptive Immunsystem (*adaptive immunity*) (Übersichten in Chaplin 2010; Dempsey et al. 2003; Warrington et al. 2011).

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie gegenüber eindringenden Pathogenen und umfasst physikalische, biochemische und zelluläre Abwehrmechanismen (Übersicht in Turvey and Broide 2010). Die Epithelien der Haut und die Schleimhautepithelien, die die Atemwege, die Mundhöhle, die Speiseröhre, den Magen-Darm-Trakt und den Urogenitaltrakt auskleiden, bilden dabei eine wirkungsvolle physikalische Barriere gegenüber Krankheitserregern (Übersicht in Gallo and Hooper 2012). Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, die Monozyten und Makrophagen, die Mastzellen, die dendritischen Zellen sowie die Natürlichen Killerzellen (NK, *natural killer cells*). Ein weiterer wichtiger Bestandteil sind lösliche Faktoren wie Proteine und kleine, bioaktive Moleküle (Zytokine wie Interleukine, Chemokine, das Komplementsystem, Lysozym und Defensine).

Über Keimbahn-kodierte Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptors*) (Übersicht Takeuchi and Akira 2010) sind die Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lage, hoch konservierte, weitverbreitete molekulare Strukturen von pathogenen Mikroorganismen, sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) (Übersicht in Janeway and Medzhitov 2002) zu erkennen. Zu diesen pathogen-assoziierten molekularen Mustern zählen beispielsweise Bestandteile von bakteriellen Membranen und Zellwänden, bestimmte Proteine oder DNA- und RNA-Bereiche.

Dieses Prinzip wird als Mustererkennung (*Pattern recognition*) bezeichnet (Übersichten in Brubaker et al. 2015 und Parkin and Cohen 2001). Zu den Mustererkennungsrezeptoren gehören beispielsweise die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR, *Toll-like receptor*) (Lemaitre et al. 1996; Lemaitre et al. 1997), die an der Abwehr von Bakterien, Pilzen und Viren beteiligt sind (Übersichten in Kawai and Akira 2010; Kawai and Akira 2011; O'Neill et al. 2013).

Zum adaptiven Immunsystem gehören die T- und B-Lymphozyten (T- und B-Zellen) sowie die von den B-Lymphozyten bzw. den Plasmazellen produzierten Antikörper (Immunglobuline) (Übersicht in Bonilla and Oettgen 2010).

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ist das adaptive Immunsystem in der Lage, Antigene spezifisch zu erkennen und ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Im Falle eines erneuten Antigenkontaktes („Re-Infektion“) kommt es dadurch zu einer schnelleren, stärkeren und effektiveren Immunantwort.

Von zentraler Bedeutung für die Funktion des Immunsystems ist die Eigenschaft zwischen körpereigenen und körperfremd unterscheiden zu können. Die Fähigkeit, körpereigene Zellen und Gewebe nicht zu schädigen oder gar zu zerstören, wird auch als Selbsttoleranz oder Autotoleranz bezeichnet. Autoimmunerkrankungen entstehen als Folge einer Störung beziehungsweise eines Versagens derjenigen Mechanismen, die die Selbsttoleranz des Immunsystems gewährleisten.

Neben häufiger vorkommenden Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, der multiplen Sklerose oder dem Diabetes mellitus Typ I existiert eine Vielzahl von selteneren organspezifischen oder systemischen Autoimmunerkrankungen.

Die Selbsttoleranz wird durch verschiedene Mechanismen gewährleistet und aufrechterhalten. Unterschieden werden dabei Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz. Die zentrale Toleranz umfasst beispielsweise Mechanismen zur Elimination von T-Lymphozyten im Thymus, die Rezeptoren exprimieren, welche spezifisch für Selbstantigene sind (selbstreaktive T-Lymphozyten). Zur peripheren Toleranz zählen Mechanismen zur Inaktivierung von selbstreaktiven Lymphozyten oder deren Suppression sowie die Unterdrückung von unerwünschten Immunreaktionen in der Peripherie

beispielsweise durch sogenannte regulatorische oder Suppressor T-Zellen (Übersicht in Goodnow et al. 2005).

1.2 Aktivierung von T-Zellen

T-Zellen sind wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems und spielen eine Schlüsselrolle bei der zellulären Immunantwort. Sie reifen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark im Thymus heran, sind Schaltstelle der erworbenen Immunität und koordinieren zahlreiche Bereiche wie die Immunantwort gegen Pathogene, Allergene und Tumoren (Übersicht in Kumar et al. 2018). Durch den hochvariablen Antigenrezeptor auf ihrer Zelloberfläche, den T-Zellrezeptor (TZR), sind sie in der Lage, Peptidantigene spezifisch zu erkennen. Der TZR ist ein aus zwei transmembranären Polypeptidketten aufgebautes Heterodimer. Die meisten T-Zellen exprimieren $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptoren, bestehend aus einer α -Kette und einer β -Kette, welche jeweils in der T-Zellmembran verankert und über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Übersichten in Alcover et al. 2018; Starr et al. 2003).

$\alpha\beta$ -T-Zellen können Antigene nicht in ihrem Nativzustand erkennen, sondern nur, wenn diese nach der Antigenprozessierung an MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) gebunden sind. Eine kleine Untergruppe der T-Zellen exprimieren $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptoren, die aus einer über Disulfidbrücken verbundenen γ - und einer δ -Kette aufgebaut sind.

$\gamma\delta$ -T-Zellen sind in der Lage, direkt an pathogene Glykoproteine zu binden oder Antigene zu erkennen, die nicht von klassischen MHC-Molekülen präsentiert werden (Adams et al. 2005); (Übersicht in Chien et al. 1996). Im Folgenden werden die sogenannten $\alpha\beta$ -T-Zellen betrachtet. Sie stellen die überwiegende Mehrheit der im Blut zirkulierenden und in den lymphoiden Organen vorgefundenen T-Zellen dar.

Der TZR ist assoziiert mit weiteren Membranproteinen. Er ist nicht kovalent verbunden mit dem CD3-Komplex (*cluster of differentiation*), der aus jeweils einem CD3 $\gamma\epsilon$ - und einem CD3 $\delta\epsilon$ -Heterodimer besteht, sowie mit einem $\zeta\zeta$ -Homodimer. Diese Membranproteine werden zusammen mit dem TZR als T-Zellrezeptorkomplex bezeichnet. Sie spielen eine wichtige Rolle in der

Signaltransduktion, nachdem der TZR ein Antigen gebunden hat (Übersichten in Brownlie and Zamoyska 2013; Smith-Garvin et al. 2009). Beim Menschen und in Mäusen wird das CD3-Molekül auf allen peripheren T-Zellen exprimiert und stellt dadurch einen wichtigen T-Zellmarker dar.

MHC-Moleküle sind spezialisierte Glykoproteine auf der Zelloberfläche, die der Präsentation von Antigenen dienen (Übersichten in Rossjohn et al. 2015; Rudolph et al. 2006; Vyas et al. 2008). Die Korezeptoren CD4 und CD8 auf der Zelloberfläche von T-Zellen erkennen jeweils unterschiedliche Regionen der MHC-Moleküle. Sie binden deshalb entweder an MHC-Klasse-I-Moleküle oder an MHC-Klasse-II-Moleküle (Übersicht in Germain 2002) und sind somit an der Antigenerkennung mitbeteiligt (Übersicht in Rudolph et al. 2006).

CD8⁺ T-Zellen, sogenannte zytotoxische T-Zellen, erkennen Antigene (Peptid-Fragmente), welche von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. MHC-Klasse-I-Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Körperzellen und auf Thrombozyten vor. Sie präsentieren Antigene aus dem Zytosol der Zellen. Dies können körpereigene Proteine, aber auch Fragmente von Viren, von im Plasma lebenden Bakterien (wie beispielsweise *Listeria monocytogenes*) oder von Tumorantigenen sein.

CD4⁺ T-Zellen erkennen dagegen Antigene, die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. MHC-Klasse-II-Moleküle werden von sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) wie dendritische Zellen (DZ), Makrophagen oder B-Zellen exprimiert (Übersicht in Blum et al. 2013).

Für die vollständige Aktivierung von naiven T-Zellen ist die Antigenerkennung über den T-Zellrezeptor alleine jedoch nicht ausreichend.

In Abwesenheit weiterer Signale führt die alleinige Antigenerkennung durch den T-Zellrezeptor normalerweise nicht zur Aktivierung von T-Zellen, sondern kann sogar die Apoptose (programmierter Zelltod) oder Anergie (ein Zustand der funktionellen Reaktionslosigkeit bzw. Inaktivierung) (Übersichten in Schwartz 1997; Schwartz 2003) der T-Zelle auslösen.

Zur Aktivierung der T-Zellen sind mehrere Signale erforderlich. Das erste Signal erfolgt über die spezifische Antigenerkennung des TZR (Signal 1). Das zweite Signal wird durch die Bindung von weiteren Korezeptoren an ihre Liganden

vermittelt und kann sowohl stimulatorisch (Kostimulation) als auch inhibitorisch (Koinhibition) auf die Funktion der T-Zelle wirken (Signal 2) (Übersicht in Chen 2004). Die Integration der TZR-Signale (Signal 1) und der kostimulatorischen Signale (Signal 2) führt zu einer vollständigen Aktivierung der T-Zellen. Das zweite Signal ist wiederum auch von Signal 1 abhängig, da eine Bindung von kostimulatorischen Rezeptoren in Abwesenheit von Signal 1 alleine in der Regel keine T-Zell-Antwort auslöst. Dieses Modell wird als „two signal model“ der Lymphozytenaktivierung bezeichnet und wurde bereits 1970 von Bretscher und Cohn postuliert (Übersichten in Baxter and Hodgkin 2002; Bretscher and Cohn 1970; Cunningham and Lafferty 1977; Lafferty and Cunningham 1975).

Zudem spielen weitere Mediatoren wie Zytokine insbesondere für die Differenzierung von naiven T-Zellen in T-Effektorzellen eine wichtige Rolle und werden daher von manchen Autoren auch als Signal 3 bezeichnet (Übersicht in Joffre et al. 2009).

Einer der wichtigsten kostimulatorischen Rezeptoren ist das CD28-Molekül auf der Oberfläche von T-Zellen. Es wird konstitutiv von allen T-Zellen in Mäusen exprimiert. Im Menschen exprimieren ca. 80% der CD4⁺ T-Zellen und ungefähr 50% der CD8⁺ T-Zellen CD28 (Übersicht in Esensten et al. 2016). CD28 bindet an die Liganden CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2), welche vor allem auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) exprimiert werden (Übersicht in Sharpe and Freeman 2002). Die Expression der B7-Moleküle, CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), auf den APZ wird beispielsweise im Rahmen von Entzündungsreaktionen durch bakterielle Infektionen über die Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptors*) der APZ z.B. durch Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien (wie den Endotoxinen) in hohem Maße induziert (Übersicht in Joffre et al. 2009). Die B7-Moleküle der APZ stehen dann für die Interaktion mit dem CD28-Molekül der T-Zellen zur Verfügung. CD28 ist ein Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 44 kDa und spielt eine Schlüsselrolle für viele Vorgänge und Abläufe von T-Zellen, wie der Aktivierung von T-Zellen, dem Remodelling des Zytoskeletts, der Zytokinproduktion, dem Überleben und der Differenzierung (Hara et al. 1985; Martin et

al. 1986; Weiss et al. 1986); (Übersichten in Alegre et al. 2001; Bluestone et al. 2006; Bour-Jordan et al. 2011; Esensten et al. 2016).

CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4* = CD152) hingegen ist ein Beispiel für einen negativen Kostimulator (Koinhibition) und wirkt hemmend auf die Aktivierung von T-Zellen (Krummel and Allison 1995). Es wird von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert, gehört wie CD28 zur Immunglobulin-Superfamilie und bindet an die gleichen Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), jedoch mit höherer Affinität als CD28 (Collins et al. 2002); (Übersicht in Schildberg et al. 2016). Durch die Konkurrenz um die gleichen Liganden verhindert die Bindung von CTLA-4 an CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) positive kostimulatorische Signale über CD28. CTLA-4 wirkt sozusagen als ein kompetitiver Antagonist (Übersichten in Thompson and Allison 1997; Walker and Sansom 2011).

Zudem konnte gezeigt werden, dass nach Bindung von CTLA-4 an seine Liganden CD80/CD86 auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen CTLA-4-CD80/CD86-Rezeptor-Liganden-Komplexe von T-Zellen internalisiert und degradiert werden, ein Prozess, der auch als Transendozytose bezeichnet wird. Dadurch wird CD80/CD86 von der Oberfläche der APZ entfernt und weniger CD80/CD86-Liganden stehen zur Bindung von CD28 und somit zur weiteren Aktivierung von T-Zellen zur Verfügung (Qureshi et al. 2011).

Neben der Bindung des T-Zell-Rezeptors an sein spezifisches Antigen auf einem MHC-Molekül und der Bindung der Korezeptoren an ihre Liganden, interagieren weitere Moleküle wie Zelladhäsionsmoleküle, Moleküle zur Signaltransduktion und weitere Zelloberflächenmoleküle miteinander. Insgesamt entsteht so eine hochgradig organisierte Kontaktstelle zwischen der T-Zelle und der Antigen-präsentierenden Zelle beziehungsweise der Zielzelle. Diese Kontaktstelle wird auch als immunologische Synapse oder supramolekularer Aktivierungskomplex (SMAC, *supramolecular activation cluster*) bezeichnet (Grakoui et al. 1999); (Übersichten in Dustin 2014; Fooksman et al. 2010) und ermöglicht eine schnelle und effektive Informationsübertragung zwischen den Zellen.

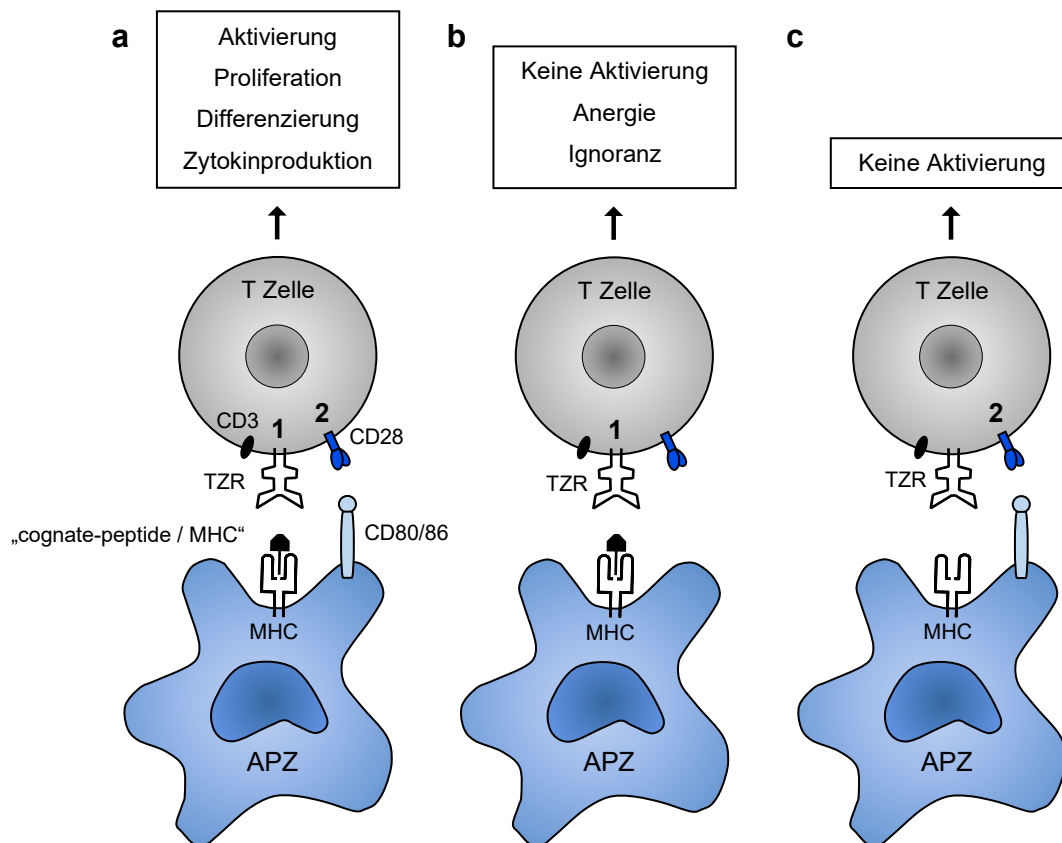


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der T-Zell-Aktivierung

(a) Zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen sind mehrere Signale notwendig. Das erste Signal (1) entsteht durch spezifische Erkennung eines passenden Peptid-Antigens („cognate-peptide“) über den T-Zellrezeptor. Das Antigen wird der T-Zelle über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) angeboten.

Das zweite Signal (2) wird durch Interaktion zwischen kostimulatorischen Rezeptoren (z.B. CD28) und den entsprechenden kostimulatorischen Liganden (z.B. CD80/86) vermittelt. Die Integration dieser Signale innerhalb der T-Zelle führt zu einer optimalen T-Zellaktivierung.

(b) Die Antigen-Erkennung über den T-Zellrezeptor alleine führt ohne kostimulatorische Signale nicht zu einer vollständigen Aktivierung der T-Zelle. Es kann Anergie, Toleranz oder immunologische Ignoranz der T-Zelle induzieren.

(c) Das kostimulatorische Signal ist abhängig von Signal 1, da die Ligandation von kostimulatorischen Rezeptoren alleine ohne TZR-Signale keine T-Zell-Aktivierung hervorruft.

Abkürzungen: APZ = Antigen präsentierende Zelle; TZR = T-Zell Rezeptor; MHC = Major histocompatibility complex.

modifiziert nach Chen, NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY 2004

1.3 CD28 Superagonisten

CD28 Superagonisten (CD28SA) stellen eine besondere Klasse von monoklonalen Antikörpern (mAK) dar, die spezifisch für den kostimulatorischen Rezeptor CD28 auf T-Zellen sind. CD28SA binden bivalent an CD28 und können dort ein starkes aktivierendes Signal induzieren (Bischof et al. 2000; Lühder et al. 2003). Ein weiteres gemeinsames Merkmal von CD28SA, die spezifisch für CD28-Moleküle in Ratten, Mäusen und Menschen sind, ist, dass sie seitlich an die laterale C^αD-Schleife der Ig-ähnlichen Domäne des CD28-Homodimers binden. Diese Eigenschaften der CD28SA ermöglichen ihnen eine umfangreiche Quervernetzung der CD28-Moleküle und tragen wahrscheinlich mit zu den starken agonistischen Fähigkeiten bei (Dennehy et al. 2006; Evans et al. 2005; Lühder et al. 2003).

Konventionelle, monoklonale CD28-spezifische Antikörper (α CD28 mAK) binden (wie die natürlichen Liganden des CD28 Moleküls, CD80 und CD86) nur monovalent an CD28 und benötigen die Besetzung des T-Zellrezeptors, um T-Zellen aktivieren zu können (Dennehy, 2006). Im Gegensatz dazu sind CD28SA in-vitro und in-vivo in der Lage T-Zellen ohne Ligation des T-Zellrezeptors zu aktivieren (Siefken 1996; Tacke 1997).

Dennoch spielt die Signalkaskade des T-Zellrezeptors (TZR) für die CD28SA-Stimulation eine wichtige Rolle, denn die Aktivierung durch die CD28SA-Stimulation ist von TZR-Signalen abhängig (Dennehy et al. 2007; Dennehy et al. 2003; Levin et al. 2008; Lühder et al. 2003). Diese TZR-Signale können jedoch sehr schwach sein und werden als sogenannte tonische Signale (Übersicht in Myers et al. 2017) bezeichnet. Tonische Signale werden über den TZR durch das Absuchen der T-Zellen von auf MHC-Molekülen präsentierten Peptiden generiert, ohne dass dabei ein passendes Antigen erkannt werden muss (Römer et al. 2011; Stefanova et al. 2002), ein Prozess der als MHC-Scanning bezeichnet wird. Dabei dockt der T-Zellrezeptor kurz an MHC-Peptid-Komplexe an und dissoziiert wiederum rasch, falls kein passendes Peptid-Antigen (*cognate peptide antigen*) erkannt wurde (Übersicht in Garcia, 2009). In Abbildung 2 ist das unterschiedliche Bindungsverhalten der konventionellen α CD28 mAK und der CD28SA schematisch dargestellt.

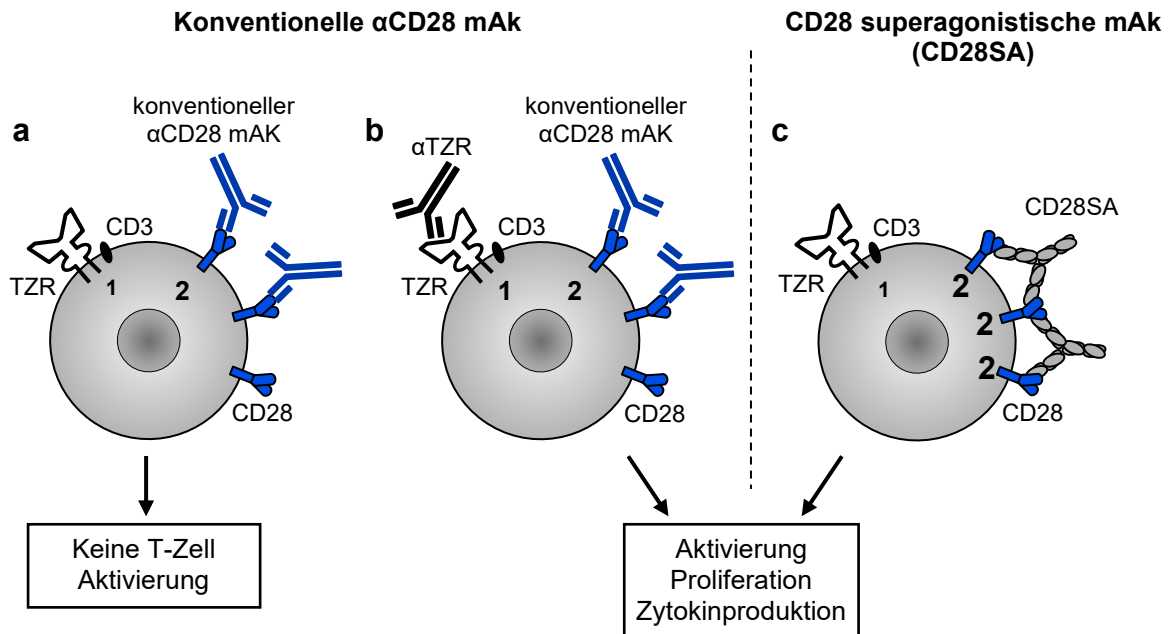


Abb. 2: konventionelle α CD28 mAK Stimulation versus CD28SA-Stimulation

(a) Konventionelle, CD28-spezifische, monoklonale Antikörper (α CD28 mAK) binden nahe der Bindungsstelle der physiologischen Liganden CD80/86 an CD28 und wie diese monovalent. Beide induzieren dadurch ein ähnlich starkes Signal 2 (2) und (b) benötigen zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen die Ligation des T-Zellrezeptors (TZR) beispielsweise in-vitro mittels TZR-spezifischen monoklonalen Antikörpern (α TZR) (Signal 1(1)).

(c) Im Gegensatz dazu binden CD28-spezifische, superagonistische, monoklonale Antikörper (CD28SA) bivalent an CD28. Durch ihren lateralen Bindungsmodus an die CD28-Homodimere wird eine umfangreiche Quervernetzung der CD28-Moleküle ermöglicht und so ein starkes Signal 2 (2) induziert. Dadurch sind die schwachen tonischen TZR-Signale (1) auch ohne Ligation des TZR für die Aktivierung der T-Zelle ausreichend.

Abkürzungen: TZR = T-Zell Rezeptor; α TZR = monoklonaler Antikörper spezifisch für den TZR; α CD28 mAK = CD28-spezifische, monoklonale Antikörper; CD28SA = CD28-spezifische, superagonistische, monoklonale Antikörper.

Modifiziert nach Beyersdorf et al. 2005b; Hünig and Dennehy 2005

Untersuchungen legen nahe, dass die tonischen TZR-Signale auf der Ebene des sogenannten SLP76/VAV1/ITK Signalosoms amplifiziert werden und dass die Beteiligung von Vav1 als Teil dieses Signalosoms entscheidend ist (Dennehy et al. 2007);(Übersichten in Beyersdorf et al. 2015; Hünig 2007).

In den durch CD28SA-Stimulation vollständig aktivierten T-Zellen zeigte sich, dass die proximalen Komponenten der TZR-Signalmaschinerie TCR- ζ und ZAP-70 im Vergleich zum normalen Hintergrundlevel nicht und LAT nur geringfügig stärker phosphoryliert vorliegen (Dennehy et al. 2007; Dennehy et al. 2003; Lühder et al. 2003).

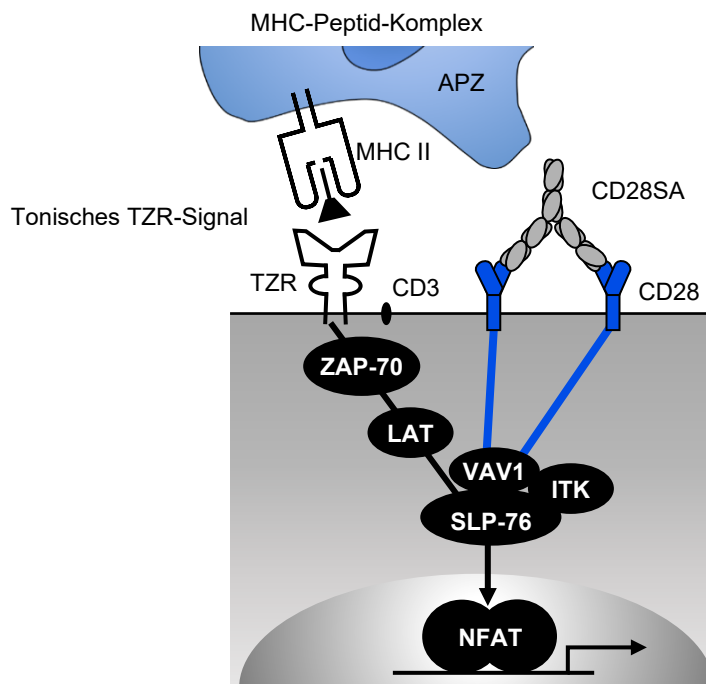


Abb. 3: Vereinfachtes Schema der CD28SA-Stimulation

Die Stimulation durch CD28-Superagonisten (CD28SA) ist abhängig von tonischen TZR-Signalen, welche die T-Zellen durch das MHC-Scanning von Peptid-beladenen MHC-Molekülen über den T-Zellrezeptor (TZR) erhalten, ohne dass dabei ein passendes Antigen erkannt werden muss (wie dargestellt). Die Integration dieser beiden Signalkaskaden, die zum einen über den TZR (schwarz) und zum anderen über den CD28 Signalweg (blau) ablaufen, findet sowohl im Rahmen der Kostimulation durch die natürlichen Liganden von CD28, CD80/CD86 und durch die konventionellen, CD28-spezifischen, monoklonalen Antikörper (α CD28 mAK) als auch bei der Stimulation durch CD28SA auf der Ebene des SLP76/VAV1/ITK Signalosoms statt.

Vereinfachend gesagt stellt die CD28SA Stimulation eine extreme Form der Kostimulation dar, die ausreichend ist, um die schwachen tonischen TZR-Signale so stark zu amplifizieren, dass die T-Zellen ohne TZR-Ligation aktiviert werden. Die Grafik zeigt ein stark vereinfachtes Schema der beteiligten Signalmoleküle.

Abkürzungen: APZ = Antigen-präsentierende Zelle; TZR = T-Zell Rezeptor; ZAP-70 = zeta-associated protein of 70 kDa; SLP76 = SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa; ITK = Interleukin-2-inducible T-cell Kinase; NFAT = nuclear factor of activated T-cells; CD28SA = CD28 Superagonist; LAT = Linker for Activation of T-cells; MHC = Major histocompatibility complex.

Modifiziert nach Beyersdorf et al. 2015; Hünig and Dennehy 2005

1.4 Regulatorische T-Zellen

Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatorische T-Zellen stellen eine besondere Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen dar. Ihr Anteil beträgt ca. 5-10% der CD4⁺ T-Zellen in den lymphoiden Organen und im peripheren Blut im Menschen und in Mäusen (Jonuleit et al. 2001); (Übersichten in Maloy and Powrie 2001; Sharabi et al. 2018). Diese Zellen spielen eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase und der Selbsttoleranz sowie der Verhinderung von Autoimmunität. Regulatorische T-Zellen verfügen über suppressorische Eigenschaften, durch die sie beispielsweise in der Lage sind aberrante und überschießende Immunreaktionen abzuschwächen oder gar zu verhindern (Übersichten in Campbell and Koch 2011; Rudensky 2011; Sakaguchi 2005; Sakaguchi et al. 2008; Wing and Sakaguchi 2011).

Bereits in den 1970er Jahren wurde unter anderem auf der Basis von Thymektomieexperimenten über die Existenz sogenannter suppressorischer T-Zellen spekuliert (Gershon and Kondo 1970; Gershon and Kondo 1971; Nishizuka and Sakakura 1969). Die anfänglichen Versuche, eine Population suppressorischer T-Zellen zu definieren und deren zelluläre und molekulare Mechanismen zu charakterisieren, gestalteten sich zunächst jedoch schwierig. Es dauerte über 20 Jahre, bis regulatorische T-Zellen von Sakaguchi und Mitarbeitern 1995 erstmals identifiziert werden konnten (Sakaguchi et al. 1995). Diese Forschergruppe konnte experimentell zeigen, dass der Transfer einer CD25-depletierten Suspension aus Milz- und Lymphknotenzellen von BALB/c Mäusen in MHC-kompatible BALB/c Nacktmäuse (immundefiziente, athymische Nacktmäuse ohne eigene T-Zellen) nach einigen Wochen zu schweren Autoimmunerkrankungen führt. Wurden jedoch neben den CD25-depletierten Milz- und Lymphknotenzellen auch CD4⁺CD25⁺ Zellen kotransferiert, entwickelten die Empfängertiere keine Autoimmunerkrankungen.

Die Arbeitsgruppe folgerte daraus, dass in der normalen Lymphozytenpopulation von gesunden Mäusen potenziell autoreaktive, autoimmunitätsinduzierende Zellen vorhanden sind und dass CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) diese potenziell autoreaktiven Zellen effektiv kontrollieren können und die Tregs somit

in der Lage sind, Autoimmunität zu verhindern. Nach einiger Zeit konnten Tregs auch im Menschen nachgewiesen werden (Dieckmann et al. 2001).

CD25 repräsentiert die α -Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors und wird von den meisten Tregs konstitutiv in einem hohen Maße exprimiert. Inzwischen ist allerdings auch die Existenz von CD25-negativen Tregs bekannt. Zudem wird CD25 vorübergehend von verschiedenen Immunzellen wie konventionellen T-Zellen (T_{kon}), B-Zellen, NK Zellen und dendritischen Zellen nach deren Aktivierung exprimiert (Übersicht in Ye et al. 2018).

Die hochaffine Form des IL-2 Rezeptors besteht aus drei Untereinheiten (Heterotrimer): der α -Kette (CD25), der β -Kette (CD122) und der γ_c -Kette (*common gamma chain*, CD132).

Das Heterodimer aus β -Kette und γ_c -Kette bildet hingegen eine Form des IL-2 Rezeptors mit geringerer Affinität zu IL-2 und wird beispielsweise von ruhenden T-Zellen, CD8⁺ T-Gedächtniszellen und NK Zellen exprimiert (Übersicht in Malek 2008). Durch Assoziation des β -/ γ_c -Heterodimers mit CD25 entsteht die hochaffine Form des IL-2 Rezeptors.

IL-2 wird überwiegend von aktivierten CD4⁺ T-Zellen und in geringerem Maße auch von aktivierten CD8⁺ T-Zellen, aktivierten dendritischen Zellen, NK Zellen und B-Zellen produziert ((Harris et al. 2000; Jiang et al. 2005; Setoguchi et al. 2005; Yui et al. 2001; Yui et al. 2004); Übersicht in Zelante et al. 2012).

IL-2 wurde aufgrund der stimulatorischen Effekte auf T-Zellen in-vitro zunächst als T-Zell-Wachstumshormon (*T cell growth factor* (TCGF)) beschrieben (Übersicht in Ross and Cantrell 2018). IL-2 besitzt pleiotrope Effekte und beeinflusst unterschiedliche Lymphozyten-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Differenzierung, der Immunantwort und der Homöostase (Übersicht in Boyman and Sprent 2012). IL-2 ist besonders entscheidend für die Aufrechterhaltung funktionsfähiger regulatorischer T-Zellen (Übersicht in Abbas et al. 2018).

Ein weiterer wichtiger Meilenstein für die Charakterisierung regulatorischer T-Zellen war die Entdeckung des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*forkhead box P3*) (Brunkow et al. 2001), der eine Schlüsselrolle für die Entwicklung, Funktion und Stabilität der meisten Tregs einnimmt (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003; Khattri et al. 2003). Foxp3 interagiert mit verschiedenen weiteren

Transkriptionsfaktoren unter anderem mit NFAT (*nuclear factor of activated T cells*). Die Kooperation zwischen Foxp3 und NFAT ist wesentlich an der Expression relevanter Treg-Bestandteile wie CD25, GITR und CTLA-4 beteiligt und spielt dadurch eine wichtige Rolle für die Funktion der regulatorischen T-Zellen (Wu et al. 2006).

Da Foxp3 jedoch auch von anderen Zellpopulationen exprimiert werden kann, die nicht zwingend eine immunsuppressive Aktivität aufweisen (Miyara et al. 2009), ist Foxp3 strenggenommen kein Linien-definierender Marker für Tregs (Übersichten in Kitz et al. 2018; Ohkura et al. 2013).

Foxp3 wurde erstmals in sog. Scurfy-Mäusen, die durch spontane Mutation im Foxp3-Gen entstanden sind, identifiziert. Scurfy ist eine x-chromosomal-rezessiv vererbte Mutation, die in hemizygoten männlichen Mäusen innerhalb von 16-25 Tagen nach Geburt tödlich verläuft und charakterisiert ist durch eine vermehrte Proliferation und Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen sowie eine verstärkte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Brunkow et al. 2001; Khattri et al. 2003) und somit zu einem autoinflammatorischen Syndrom in mehreren Organen führt. Wie wichtig die Rolle der regulatorischen T-Zellen für die immunologische Toleranzerhaltung ist, zeigt sich besonders eindrücklich bei Patienten, bei denen der Treg-spezifische Transkriptionsfaktor Foxp3 mutiert ist (IPEX-Syndrom, *Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome*) (Powell et al. 1982 ; Übersicht in Bacchetta et al. 2018; Bennett et al. 2001; d'Hennezel et al. 2012). Entsprechende Mutationen wie im Foxp3-Gen der Scurfy-Mäuse konnten 2001 auch im humanen Foxp3-Gen von IPEX-Patienten gefunden werden (Chatila et al. 2000; Wildin et al. 2001). Patienten mit IPEX-Syndrom entwickeln kurz nach der Geburt schwere Autoimmunerkrankungen, die mehrere Organsysteme betreffen. Des Weiteren zeigen sich vermehrt schwere allergische Reaktionen (Übersicht in Barzaghi et al. 2012) und es konnte nachgewiesen werden, dass oft keine oder nur sehr wenige Tregs bei IPEX-Patienten vorhanden sind (Übersicht in Torgerson and Ochs 2007).

Inzwischen sind verschiedene Zellpopulationen, die über immunsuppressorische Eigenschaften verfügen und mit zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz beitragen, bekannt. Weitere Subtypen von CD4⁺ T-Zellen mit

inhibitorischen Eigenschaften sind beispielsweise die IL-10 produzierenden, Foxp3 negativen Tr1-Zellen (*T regulatory type 1*) ((Groux et al. 1997); Übersichten in Battaglia et al. 2006; Roncarolo et al. 2006; Wu et al. 2007) oder die TGF- β produzierenden T_H3-Zellen (Chen et al. 1994; Fukaura et al. 1996; Weiner 2001). Obwohl Tr1-Zellen Foxp3 nicht exprimieren, zeigen sie in-vitro ähnliche suppressorische Eigenschaften wie Foxp3⁺ Tregs (Vieira et al. 2004). Darüber hinaus wurden weitere T-Zell-Subpopulationen, darunter CD8⁺, CD4⁻CD8⁻ und γ/δ T-Zellen, mit immunsuppressiver Wirkung beschrieben (Übersicht in Shevach 2006). Ebenso können auch Th2-Zellen, bestimmte NK-T-Zellen und B-Zellen (Übersicht in Rosser and Mauri 2015) immunregulatorisch wirken.

Die für die Suppression von selbstreaktiven T-Zellen bedeutendsten Zellen sind jedoch Foxp3⁺CD4⁺ Tregs (Übersicht in Sharabi et al. 2018).

In dieser Arbeit wurde mit Foxp3⁺CD4⁺ regulatorischen T-Zellen geforscht, die im Folgenden als Tregs bezeichnet werden.

IL-2 ist entscheidend für die Entwicklung und das Überleben der Tregs (Übersicht in Liston and Gray 2014).

Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen können nach ihrem Ursprung (Thymus oder peripheres Immunsystem) in sogenannte tTregs und pTregs unterteilt werden (Übersichten in Abbas et al. 2013; Bluestone and Abbas 2003; Rodriguez-Perea et al. 2016). Im Unterschied zu den murinen Zellen exprimieren humane naive T-Zellen bereits nach TZR Stimulation Foxp3, obwohl die Expression dabei grundsätzlich viel schwächer als bei tTregs und nur transient vorhanden ist (Gavin et al. 2006; Yagi et al. 2004).

Unter physiologischen Bedingungen zeigen Tregs eine stärkere Proliferation und eine höhere metabolische Aktivität als Nicht-Treg-Zellen (Fisson et al. 2003).

Obwohl eine Depletion regulatorischer T-Zellen Autoimmunität erzeugen kann, kann dies in Ratten zur Tumormunität führen und diese verbessern (Shimizu et al. 1999). Ähnlich wie bei der Tumormunität führt eine Depletion oder eine Reduktion von Tregs zu einer stärkeren Immunantwort gegenüber pathogenen Mikroorganismen (Übersicht in Belkaid and Rouse 2005).

1.4.1 Im Thymus gebildete regulatorische T-Zellen

Der größte Teil der Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen entwickelt sich im Thymus aus unreifen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Sie werden als tTregs (*Thymus-derived-Tregs*) oder auch natürlich vorkommende Tregs (nTreg, *naturally-occurring Tregs*) bezeichnet. Für die Differenzierung der tTregs aus eingewanderten Vorläufer-T-Zellen des Knochenmarks sind eine höhere Affinität des T-Zellrezeptors für Selbst-Peptid/MHC-II-Komplexe der tTregs im Vergleich zu konventionellen T-Zellen sowie IL-2 Rezeptorsignale wichtig. Die Affinität der T-Zellrezeptoren der tTregs liegt jedoch noch unterhalb der Schwelle für die negative Selektion (Hsieh et al. 2006); (Übersichten in Josefowicz et al. 2012; Maloy and Powrie 2001). Dadurch, dass tTregs in der Lage sind Autoantigene zu erkennen, können sie als autoreaktive Zellen (Joffre et al. 2009), die in ihrer Funktion jedoch autoprotektiv und nicht autoaggressiv wirken, angesehen werden (Übersicht in Sakaguchi et al. 2008).

1.4.2 In der Peripherie induzierte regulatorische T-Zellen

Unter bestimmten Umständen können Foxp⁺-Tregs auch außerhalb des Thymus aus naiven konventionellen T-Zellen in der Peripherie entstehen. Diese Zellen werden als pTregs (*peripheral Tregs*) oder iTregs (*induced Tregs*) bezeichnet. Entscheidend dabei ist das Zytokinmilieu der Umgebung und die Art und Stärke der kostimulatorischen Signale. So können iTregs im peripheren lymphatischen Gewebe wie beispielsweise im Bereich der Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes und des Respirationstraktes unter Antigenstimulus durch spezielle Antigen-präsentierende Zellen aus naiven konventionellen T-Zellen induziert werden. Zu diesen speziellen Antigen-präsentierenden Zellen zählen beispielsweise die CD103⁺ dendritische Zellen des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes (Esterhazy et al. 2016) oder die Alveolarmakrophagen der Lunge (Soroosh et al. 2013). Sie produzieren zudem Substanzen wie TGF- β (*transforming growth factor beta*) und Retinsäure, die neben weiteren Faktoren wie dem Zytokin IL-2 (Davidson et al. 2007), wichtig für die Induktion der iTregs sind. In Anwesenheit von TGF- β begünstigt Retinsäure die Differenzierung von

naiven T-Zellen in Foxp3⁺ Tregs (Benson et al. 2007; Coombes et al. 2007; Mucida et al. 2007; Sun et al. 2007).

Auch in-vitro können iTregs aus naiven konventionellen T-Zellen generiert werden. Hierfür wurden verschiedene Protokolle entwickelt. So konnte die Induktion von iTregs beispielsweise unter einem Antigenstimulus in Anwesenheit von TGF- β gezeigt werden (Apostolou and von Boehmer 2004; Chen et al. 2003; Kretschmer et al. 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass IL-2 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Foxp3⁺ Tregs erleichtert und die Differenzierung zu T_H17-Zellen inhibiert (Laurence et al. 2007).

T_H17-Zellen sind beteiligt an der Pathogenese von verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie der Psoriasis, der rheumatoiden Arthritis, von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und der Multiplen Sklerose (Übersichten in Gaffen et al. 2014; Yasuda et al. 2019). Sie sind insbesondere durch das proinflammatorische Zytokin IL-17 charakterisiert (Übersicht in Annunziato et al. 2008) und durch die Expression des spezifischen Transkriptionsfaktors ROR- γ (Maus)/RORC(Mensch) gekennzeichnet (Ivanov et al. 2006). Eine erhöhte Frequenz von T_H17-Zellen und die daraus folgenden erhöhten IL-17-Konzentrationen im Blut und der Synovialflüssigkeit korrelieren beispielsweise mit einer erhöhten Krankheitsaktivität sowie einer gesteigerten systemischen Entzündungsreaktion bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Leipe et al. 2010; Metawi et al. 2011).

Die in-vitro Induktion von Foxp3⁺ regulatorischen Zellen aus naiven T-Zellen ist für therapeutische Zwecke interessant, da aus isolierten Donorzellen eines Patienten nach in-vitro Konvertierung in regulatorische T-Zellen und deren Expansion diese Zellen in großer Zahl und ohne Akzeptanzprobleme in denselben Patienten retransfundiert werden könnten (autologer Zelltransfer/ autologe Transfusion).

Inwieweit die erworbene Foxp3-Expression und die suppressorische Funktion nach Konvertierung jedoch stabil sind, muss noch genauer untersucht werden. Dabei spielen epigenetische Mechanismen eine entscheidende Rolle. Sie regulieren die Stabilität der Tregs und die phenotypischen Eigenschaften (Feng et al. 2014; Li et al. 2014; Liu et al. 2009; Polansky et al. 2008).

In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die regulatorischen Bereiche des Foxp3-Gens in tTregs stärker demethyliert sind als in den durch TGF- β induzierten Tregs. Dies könnte auf eine funktionelle Instabilität der induzierten Tregs hinweisen (Floess et al. 2007).

Aufgrund der unterschiedlichen Entwicklung von tTregs und iTregs überschneiden sich ihre T-Zellrezeptorrepertoires in großen Teilen nicht, sondern unterscheiden sich voneinander (Haribhai et al. 2011); (Übersicht in Sharabi et al. 2018).

Das TZR-Repertoire der iTregs umfasst TZRs, die sich gegen nicht selbst Antigene wie beispielsweise von Viren und kommensalen Mikroorganismen sowie Umweltallergenen richten. Es trägt dadurch entscheidend zur Aufrechterhaltung der Schleimhauttoleranz bei. Im Gegensatz dazu exprimieren die tTregs ein TZR-Repertoire, welches überwiegend auf der Erkennung von Selbstantigenen beruht (Hsieh et al. 2004; Lathrop et al. 2011).

Durch die nur geringe gemeinsame Schnittmenge ergänzen sich die TZR-Repertoires der tTregs und iTregs und ermöglichen so eine breitere Antigen-Abdeckung. Für die Aufrechterhaltung einer optimalen peripheren Toleranz werden deshalb beide Zelltypen benötigt (Haribhai et al. 2011).

Um tTregs von iTregs zu unterscheiden, konnten zwei vielversprechende Marker identifiziert werden, Helios und Neuropilin-1 (Übersicht in Lin et al. 2013).

Helios wird von tTregs in hohem Maße exprimiert, nicht jedoch von iTregs (Kim et al. 2012; Thornton et al. 2010); Übersicht in Thornton and Shevach 2019).

Neuropilin-1 (Nrp-1) wird ebenfalls als tTreg-Marker diskutiert, da Nrp-1 wesentlich stärker von tTregs als von iTregs exprimiert wird (Yadav et al. 2012).

Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass im Rahmen von Entzündungsreaktionen die Expression von Nrp-1 in iTregs hochreguliert wird (Weiss et al. 2012) und die Unterscheidung zwischen tTregs und iTregs dadurch erschwert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Nrp1 in-vivo und in-vitro durch TGF- β induziert werden kann (Weiss et al. 2012).

Ein Marker mit dem sich tTregs von iTregs sicher unterscheiden lassen ist jedoch gegenwärtig noch nicht bekannt.

1.4.3 Mechanismen der Immunsuppression durch regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind auf vielseitige Art und Weise in der Lage, physiologische und pathologische Immunantworten zu hemmen und die Aktivierung, Differenzierung, Expansion sowie (Effektor-)Funktionen von anderen Immunzellen wie (autoreaktiven) CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen aktiv zu unterdrücken und zu modifizieren (McNally et al. 2011; Takahashi et al. 2000; Thornton and Shevach 1998); (Übersichten in Ferreira et al. 2019; Sakaguchi et al. 2009; Shevach 2009).

Um ihre suppressorische Funktion auszuüben, stehen den regulatorischen T-Zellen unterschiedliche Mechanismen zur Verfügung. Dazu gehören unter anderem Zellkontakt-abhängige Mechanismen, die Sekretion verschiedener immunmodulierender Moleküle wie der immunsuppressiven Zytokine IL-10, TGF- β und IL-35, sowie die Granzym-vermittelte Zytolyse von Zielzellen (Gondek et al. 2005; Grossman et al. 2004).

Das von den Tregs produzierte IL-10 trägt beispielsweise entscheidend dazu bei, die Immunreaktionen an Oberflächen zur Außenwelt wie im Bereich der Haut, des Darmes oder der Lunge unter Kontrolle zu halten (Rubtsov et al. 2008); (Übersicht in Josefowicz et al. 2012). Mäuse mit IL-10 defizienten regulatorischen T-Zellen entwickeln spontan eine Kolitis (Rubtsov et al. 2008). Beim Menschen sind Mutationen der Gene, die für IL-10 und den IL-10-Rezeptor codieren, assoziiert mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie der Colitis ulcerosa und dem Morbus Crohn (Übersichten in Glocker et al. 2011; Zhu et al. 2017).

TGF- β wird von den regulatorischen T-Zellen benötigt, um beispielsweise die T_H17-Antwort und damit die IL-17 Produktion effektiv zu unterdrücken (Konkel et al. 2017).

Ein Beispiel für die Zellkontakt-abhängige Treg-vermittelte Suppression ist CTLA-4. Foxp3⁺ Tregs exprimieren CTLA-4 konstitutiv und Foxp3 kontrolliert die Expression von CTLA-4 direkt. Durch die starke Expression von CTLA-4 sind Tregs in der Lage, die Expression der kostimulatorischen B7-Moleküle CD80 und CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen wie den dendritischen Zellen zu

hemmen und durch den Prozess der Transendozytose von der Oberfläche der APZ zu entfernen (Onishi et al. 2008; Qureshi et al. 2011; Wing et al. 2008).

Regulatorische T-Zellen sind zudem in der Lage, durch Beeinflussung des Umgebungsmilieus suppressorische Wirkungen zu erzielen. Durch die konstitutive Expression der hochaffinen IL-2 Rezeptor α -Kette (CD25) besitzen sie einen Vorteil in der Konkurrenz um endogenes IL-2 (Oberle et al. 2007). Das Abgreifen von IL-2 durch regulatorische T-Zellen ist beispielsweise ein wichtiger Mechanismus, um CD8⁺ T-Zellantworten zu kontrollieren (Chinen et al. 2016).

Die von den regulatorischen T-Zellen produzierten Ektoenzyme CD39 und CD73 (Deaglio et al. 2007) können aus den extrazellulären Nukleotiden ATP, ADP und AMP das immunsuppressiv wirkende Nukleosid Adenosin erzeugen (Übersicht in Antonioli et al. 2013). Über den G-Protein gekoppelten Adenosin A2A Rezeptor (A2AR), der auf der Zelloberfläche von T-Zellen exprimiert wird, werden über die Bindung von Adenosin cAMP-vermittelte inhibitorische Signalkaskaden in Gang gesetzt (Ohta and Sitkovsky 2001).

Die suppressive Funktion der regulatorischen T-Zellen ist entscheidend für die Prävention von Autoimmunität und beugt der Zerstörung von gesundem Gewebe und Organen im Rahmen von Immunantworten vor.

Eine wichtige Aufgabe der Foxp3⁺ Tregs ist in entzündetes Gewebe einzuwandern und verschiedene Effektorlymphozyten zu hemmen, insbesondere T-Helfer-Subpopulationen: T_H1, T_H2, T_H17 und folliculäre T-Helferzellen (fT_H). Regulatorische T-Zellen verfügen dabei über eine enorme Anpassungsfähigkeit und sind in der Lage, T-Zellantworten in einer individuellen T_H-Zell-Linien-abhängigen Art und Weise zu regulieren (Chaudhry et al. 2009; Chung et al. 2011; Koch et al. 2009; Levine et al. 2017; Linterman et al. 2011; Wang et al. 2011; Zheng et al. 2009).

1.4.4 Therapeutische Ansätze

Wie bereits erwähnt spielen regulatorische T-Zellen eine Schlüsselrolle, um Autoimmunität und Entzündungsreaktion zu kontrollieren. Eine zu geringe Anzahl von regulatorischen T-Zellen oder eine Störung ihrer Funktion kann ursächlich für verschiedene Autoimmunerkrankungen sein (Übersichten in Dominguez-Villar and Hafler 2018; Noack and Miossec 2014). Aus diesem Grund stellen regulatorische T-Zellen ein geeignetes Ziel dar, um therapeutische Möglichkeiten zu entwickeln, die Zahl der Tregs zu erhöhen oder/und deren Effektorfunktionen zu verstärken, um so beispielsweise Autoimmunerkrankungen zu behandeln und eine immunologische Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen oder Fremd-Antigenen zu induzieren (Übersicht in Sakaguchi 2005).

In Ratten konnte gezeigt werden, dass die Injektion von CD28SA zu einer passageren Aktivierung und numerischen Expansion aller CD4⁺ T-Zellen führt. Die Tregs reagieren dabei jedoch besonders stark auf die CD28SA Stimulation und sind durch ihre suppressorische Eigenschaften in der Lage, die weitere Aktivierung der übrigen CD4⁺ T-Zellen, der sogenannten konventionellen T-Zellen (T_{kon}), zu unterdrücken (Lin and Hünig 2003). Weiterhin zeigte sich, dass es unter Anwendung von niedrigen CD28SA-Dosierungen fast ausschließlich zu einer Aktivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen kommt (Beyersdorf et al. 2005a).

Aufgrund dieser bevorzugten Aktivierung von regulatorischen T-Zellen durch niedrige CD28SA-Dosierung könnten CD28SA potenziell effektive Substanzen zur Behandlung einer Vielzahl von Autoimmun- und entzündlichen Erkrankungen darstellen, bei denen regulatorische T-Zellen quantitativ in ihrer Zahl und/oder funktional beeinträchtigt sind (Übersicht in Miyara et al. 2011), sowie zur Verhinderung von Transplantatabstoßungsreaktionen (GvHD, Graft-versus-Host-Disease) eingesetzt werden.

In verschiedenen Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen hat sich eine Therapie mit CD28SA in niedriger Dosierung bereits als effektiv erwiesen (Quellen siehe Abschnitt 4. Diskussion, Seite 63 ff.).

Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte darin begründet liegen, dass Tregs autoreaktiv sind. Durch ihre Autoreaktivität erhalten sie über den ständigen

Kontakt mit körpereigenen Antigenen starke TZR-Signale (Andersson et al. 2007) und werden folglich kontinuierlich stimuliert. Durch diese stärkere „Vorstimulation“ der Tregs im Vergleich zu den Tkons ist die Amplifikation der stärkeren TZR-Signale der Tregs durch niedrige CD28SA Dosierungen ausreichend für eine vollständige Aktivierung der Tregs. Die Tkons erhalten, sofern sie nicht im Rahmen einer Immunantwort auf ihr passendes Antigen treffen, nur basale, schwache tonische Signale und benötigen deshalb in diesem Zustand eine höhere CD28SA Dosis, damit die Amplifikation dieser schwachen Signale ausreichend ist, um ihre Aktivierungsschwelle zu erreichen (Beyersdorf et al. 2005a; Langenhorst et al. 2018).

Im Gegensatz zu den pathologisch autoreaktiven konventionellen oder Effektor-CD4⁺ T-Zellen (Teff), die beispielsweise eine Rolle in der Pathogenese bei der rheumatoiden Arthritis spielen, sind die Tregs nicht autoaggressiv, sondern wirken im Gegenteil autoprotektiv und der Autoimmunität entgegen.

Durch ihre suppressorischen Eigenschaften sind Tregs in der Lage, Autoimmun- und Entzündungsreaktionen der Teff effektiv zu unterdrücken und exzessive Immunantworten auf pathogene Erreger zu limitieren (Übersichten in Dominguez-Villar and Hafler 2018; Sakaguchi et al. 2006; Wing et al. 2019).

Neben der CD28SA Behandlung existieren weitere Möglichkeiten, um Tregs für therapeutische Ansätze zu expandieren oder ihre Funktion zu verbessern. Manche davon befinden sich bereits in der klinischen Erprobung.

Im Rahmen von mehreren klinischen Studien, in denen bereits zugelassene Medikamente wie IL-2 (Übersichten in Abbas et al. 2018; Klatzmann and Abbas 2015) zur Anwendung kamen, konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen in-vivo erfolgreich vermehrt werden können und dies mit einem bedeutenden klinischen Benefit einhergeht.

Die Therapie mit IL-2 in niedriger Dosierung aktiviert bevorzugt regulatorische T-Zellen aufgrund ihrer konstitutiven CD25 Expression und zeigte eine gute Wirkung in der Behandlung von Transplantatabstoßungsreaktion (GvHD) (Koreth et al. 2011) und der Hepatitis-C-Virus-induzierten Vaskulitis (Saadoun et al. 2011). Auch in der Behandlung von Patienten mit Diabetes mellitus Typ I mit

niedrigdosiertem IL-2 konnte eine deutliche Zunahme der regulatorischen T-Zellen gezeigt werden (Hartemann et al. 2013; Rosenzweig et al. 2015).

Ebenso konnten im Rahmen von klinischen Studien erfolgsversprechende Ergebnisse mit einer low-dose IL-2 Therapie zur Behandlung von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) erzielt werden (Humrich et al. 2015). Weitere Therapieansätze beinhalten unter anderem die Entwicklung von neuen IL-2 Muteinen wie Fusionsproteinen aus IL-2/Antikörper-Komplexen (Peterson et al. 2018; Spangler et al. 2018) oder die Bindung von IL-2 an Trägermoleküle wie Polyethylenglykol (PEG), die bevorzugt regulatorische T-Zellen aktivieren sollen. Im Allgemeinen sind Muteine gezielt veränderte Proteine (Muteins 2005).

Andere Therapiekonzepte verfolgen das Prinzip des adoptiven Treg-Transfers. Dabei werden beispielsweise regulatorische T-Zellen aus dem peripheren Blut isoliert und ex vivo in-vitro vermehrt. Die so expandierten regulatorischen T-Zellen werden anschließend in denselben Patienten transfundiert (adoptiver Zelltransfer) (Übersicht in Trzonkowski et al. 2009b). Dabei konnten im Rahmen von klinischen Studien durch adoptiven Treg-Transfer zur Behandlung von Transplantatabstoßungsreaktionen (GvHD) (Trzonkowski et al. 2009a) und Diabetes mellitus Typ I erfolgsversprechende Resultate erzielt werden (Bluestone et al. 2015; Marek-Trzonkowska et al. 2012).

Andere Ansätze zur Wiederherstellung der immunologischen Toleranz verfolgen das Ziel, regulatorische T-Zellen umzuprogrammieren. Ein Beispiel hierfür stellt die Inhibition der fehlregulierten mTORC2 Aktivität in Foxp3-defizienten regulatorischen T-Zellen, wie sie beispielsweise bei IPEX-Patienten vorkommen, mit Rapamycin (Sirolimus) dar. Rapamycin hat immunsuppressive Eigenschaften. Es bindet an das intrazelluläre Protein FKBP12 (*FK Binding Protein-12*). Der Komplex aus Rapamycin und FKBP12 blockiert wiederum die Kinase mTor (*mammalian Target of rapamycin*) (Barzaghi et al. 2018; Charbonnier et al. 2019).

Weitere aufkommende Konzepte umfassen gentechnische Ansätze wie das Gen-Editing mutierter Foxp3- und Foxp3-verwandter Gene bei monogenetischen Autoimmunerkrankungen wie dem IPEX-Syndrom (Passerini et al. 2013) sowie die Generierung von Antigen-spezifischen regulatorischen T-Zellen bzw. die

Herstellung von genetisch modifizierten regulatorischen T-Zellen (Übersichten in Ferreira et al. 2019; Fritsche et al. 2020; Raffin et al. 2020) zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungsreaktionen (GvHD).

1.5 Zielsetzung

In Ratten (Beyersdorf et al. 2005a), Mäusen (Gogishvili et al. 2009) und für menschliche Zellen (Tabares et al. 2014) konnte gezeigt werden, dass der CD28-spezifische, superagonistische, monoklonale Antikörper, CD28SA, in niedriger Dosierung selektiv regulatorische T-Zellen aktiviert. Im Gegensatz dazu werden durch hohe CD28SA-Konzentrationen sowohl regulatorische T-Zellen als auch konventionelle T-Zellen aktiviert.

Aus klinischer Sicht ist diese Beobachtung interessant, da die Therapie mit niedrigen CD28SA Dosierungen über die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen ein vielversprechender Ansatz in der Behandlung von Autoimmun- und Entzündungserkrankungen sowie von Transplantatabstoßungsreaktionen sein könnte.

Bislang ist die Ursache für dieses Phänomen jedoch mechanistisch noch nicht näher untersucht.

In dieser Arbeit soll der Hypothese nachgegangen werden, dass durch den stärkeren TZR Signalinput der Tregs, bedingt durch ihre Autoreaktivität, im Vergleich zu konventionellen T-Zellen niedrigere CD28SA Dosierungen ausreichen, um Tregs vollständig zu aktivieren.

Dazu soll zunächst in-vitro und in-vivo der Einfluss einer Blockade von MHC-II-Molekülen durch den I-A^b-spezifischen, monoklonalen Antikörper Y3P auf die Antwort der regulatorischen und konventionellen T-Zellen auf unterschiedliche Konzentrationen des CD28-spezifischen, superagonistischen, monoklonalen Antikörpers CD28SA untersucht werden. Hierfür werden sowohl Versuche mit dem kompletten Y3P Antikörper als auch mit F(ab')₂-Fragmenten des Y3P Antikörpers durchgeführt.

In einem weiteren Experiment soll die Treg und die Tkon Antwort gegenüber der CD28SA Stimulation nach Transfer der Zellen in Fcεr1g^{-/-} Mäuse untersucht

werden. Fc ϵ 1g^{-/-} Mäusen fehlt die γ -Kette der Fc γ RI, Fc γ RIII und Fc ϵ RI Rezeptoren, die für die Expression dieser Rezeptoren an der Zelloberfläche essenziell ist. Störende Effekte, die möglicherweise durch den Fc-Teil der kompletten I-A^b-spezifischen monoklonalen Y3P-Antikörper vermittelt werden, können in den Fc ϵ 1g^{-/-} Mäusen dadurch besser kontrolliert werden.

Die konkrete Fragestellung lautet:

Führt die Blockade von MHC-II-Molekülen zu einem Verlust der bevorzugten Aktivierung der regulatorischen T-Zellen durch niedrige CD28SA Konzentrationen?

Die Vorversuche und Experimente dieser Doktorarbeit haben zur Publikation Langenhorst et al. 2018 beigetragen, wobei darauf hingewiesen sei, dass die in dieser Arbeit aufgeführten Experimente selbst nicht in der Publikation Langenhorst et al. 2018 veröffentlicht wurden, sondern vielmehr als Grundlage der Experimente für diese Publikation dienten.

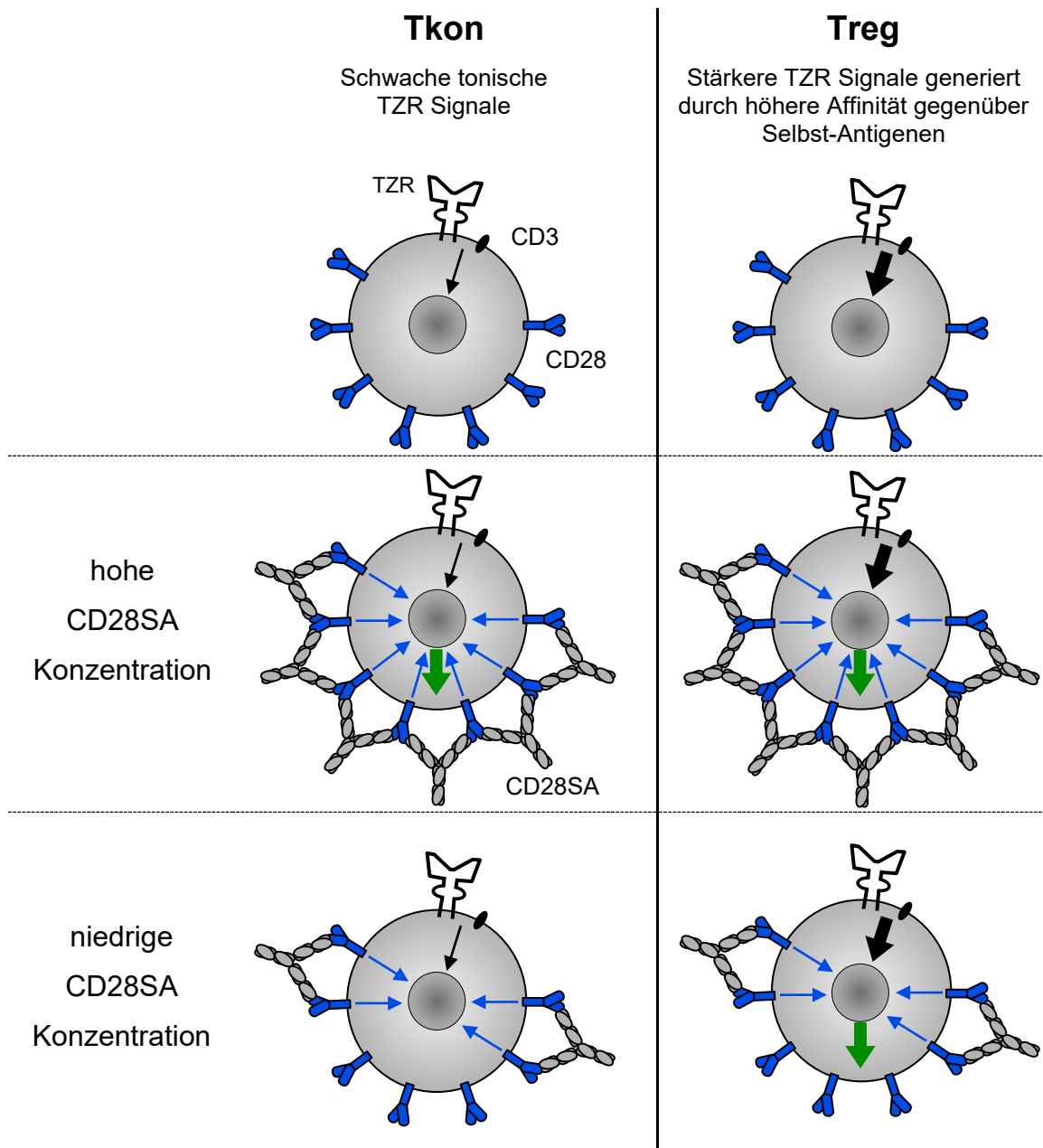


Abb. 4: Arbeitshypothese

Vergleich konventioneller T-Zellen (Tkon) und regulatorischer T-Zellen (Treg) gegenüber der Stimulation mit CD28-spezifischen superagonistischen monoklonalen Antikörpern (CD28SA). Über ihren T-Zellrezeptor erhalten Tkons in Abwesenheit ihres passenden Antigens („cognate-antigen“) nur ein schwaches tonisches Signal (dünner schwarzer Pfeil). Im Vergleich dazu erfahren die Tregs aufgrund ihrer höheren Affinität ihres T-Zellrezeptors (TZR) gegenüber Selbst-Antigenen physiologischerweise ein stärkeres TZR-Signal (dicker schwarzer Pfeil). Hohe Dosierungen des CD28 superagonistischen Antikörpers (CD28SA) sind in der Lage, sowohl die basale Stimulation der Tkons als auch die stärkere Voraktivierung der Tregs so stark zu amplifizieren, um beide T-Zell-Subtypen vollständig aktivieren zu können (dicker grüner Pfeile). Niedrige CD28SA Dosierungen reichen hingegen nur aus, um das stärkere Selbst-Antigen-TZR-Signal der Tregs ausreichend zu amplifizieren und so die Tregs, nicht jedoch die Tkons zu aktivieren. Tkons hingegen können durch niedrige CD28SA Dosierungen nicht vollständig aktiviert werden.

Modifizierte Darstellung nach Zeichnungen von Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Modell / Bezeichnung	Hersteller / Firma
Autoklav		Melag
Computer	Power Mac G5	Apple
Durchflusszytometer	LSR II	BD Biosciences
Eismaschine	AF100	Scotsmann
Gefrierschrank	-20 °C -80 °C	Bosch Forma Scientific
Inkubator		Heraeus
Kühlschrank	4 °C	Bosch
Magnetseparator	MagneSphere®	Promega
Magnetseparator	MidiMACS QuadroMACS	Miltenyi Miltenyi
Mikroskop	Biomed	Leitz
Pipetten		Eppendorf
Pipettierhilfe	accu-jet	Brand
pH-Meter	HI 1280	Hanna Instruments
Mehrfachdispenser	HandyStep® S	Brand
Sterilbank	BSB 4A LaminAir HBB 2448	Gelaire Flow Laboratories Heraeus Instruments
Vortex	Genie 2	Scientific Industries
Waage	SBA51	Scaltec
Wasserbad		Lauda
Wasserbad-Thermostat (digital)	Assistent 3180	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Wasseraufbereitungssystem	BarnsteadGenPure Pro	ThermoScientific
Zählkammer		Neubauer
Zentrifuge	Centrifuge 5810R Centrifuge 5804R	Eppendorf Eppendorf

2.1.2 Software

Software	Anwendung	Hersteller / Firma
EndNote X9	Literaturverwaltung	Thomson Reuters
FACSDiva Software v6.1.3	FACS-Messung und Datenerfassung (LSR II Durchflusszytometer)	BD Biosciences
FlowJo v9.5.2	FACS-Datenanalyse	TreeStar, Inc
Graphpad Prism v4 für Macintosh	Graphiken und statistische Analyse	Graphpad software
Microsoft Word 2013	Textverarbeitung	Microsoft Corporation
Microsoft PowerPoint 2013	Erstellung und Bearbeitung der Abbildungen	Microsoft Corporation
Microsoft Excel 2013	Tabellenkalkulationsprogramm	Microsoft Corporation

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material		Hersteller
Einmalspritzen	1 ml	BD Plastikpak
	2 ml	Braun
Kanülen Sterican	Ø 0,45 x 12 mm 26 G x ½ "	Braun
Eppendorftubes	0,5 ml	Biozym Scientific GmbH
	1,5 ml	Sarstedt
	2,0 ml	Greiner Labortechnik
FACS-Röhrchen		Greiner Labortechnik
		BD Biosciences
LS-Säulen		Miltenyi Biotec
Mikrotiterplatte	96-Napf, U-Boden	Greiner Labortechnik
Zellsieb / Nylonsieb	Maschenweite: 70µm	BD Falcon
Pasteurpipetten (Glas)		
Zentrifugenröhrchen	15 ml	Greiner Labortechnik
	50 ml	Greiner Labortechnik
Pipettenspitzen	10 µl	Roth
Pipettenspitzen	200 µl	Greiner Labortechnik
	1000 µl	
Dispenser-Tips Steril / unsteril	PD Tips	BRAND
Pipettenspitzen (CELLSTAR Serological Pipettes)	5 ml	Greiner Bio-One International
	10 ml	
	25 ml	

2.1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merk
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
Ethanol, vergällt, <99,8%	Roth
Glucose	Roth
HEPES	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Phenolrot	Merck
Rinderserumalbumin (BSA)	biomol
Trypanblau	AppliChem

2.1.5 Lösungen

BSS (Balanced Salt Solution I, II):

BSS I:	BSS II:
50 g Glucose	9,25 g CaCl ₂
3 g KH ₂ PO ₄	20 g KCl
11,9 g Na ₂ HPO ₄	320 g NaCl
0,5 g Phenolrot ad 5 l H ₂ O _{dest}	10 g MgCl ₂
	10 g MgSO ₄ ad 5 l H ₂ O _{dest}

125 ml BSS I mit 125 ml BSS II mischen ad 1 l H₂O_{dest}

BSS/BSA: BSS Lösung mit 0,2% BSA

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

2.1.6 Puffer

PBS (Phosphat-gepufferte Saline)

80,0 g NaCl, 11,6 g Na₂HPO₄, 2,0 g KH₂PO₄, 2,0 g KCl ad 1 l H₂O_{dest}
pH auf 7,0 einstellen

FACS-Puffer

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

2.1.7 Nährmedien

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

2.1.8 Mäuse

C57BL/6 (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) und **Fcer1g^{-/-}** Mäuse (von Prof. Dr. Falk Nimmerjahn aus Erlangen (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt) wurden am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg gehalten. Es wurden Mäuse im Alter zwischen 6 bis 15 Wochen verwendet.

2.1.9 Antikörper

Antikörper	Firma	Format
Ratte Anti-Maus CD4 (Klon: RM4-5)	BD Pharmingen (BD Biosciences)	PerCP
Ratte Anti-Maus CD4 (Klon: RM4-5)	BD Pharmingen (BD Biosciences)	Pacific Blue
Anti-Maus CD8a (Klon: 53-6.7)	BioLegend	Pacific Blue
Ratte Anti-Maus Foxp3 (Klon: FJK-16s)	eBioscience	APC
Anti-Maus CD25 (Klon: PC61)	BioLegend	PE/Cy7
Biotin Ratte Anti-Maus CD25 (Klon: 7D4)	BD Pharmingen (BDBiosciences)	Biotin
Maus Anti-Maus CD28 (D665)	Exbio, Serotec	aufgereinigt
Ratte Anti-Maus CD45R/B220 (RA3-6B2)	BD Pharmingen (BD Biosciences)	PE
Anti-Maus CD69 (Klon: H1.2F3)	BioLegend	FITC
Anti-Maus Y3P (Anti m I-A ^b)	BioXCell	aufgereinigt, FITC
Isotypkontrolle Y3P (Maus IgG2a; C1.18.4)	BioXCell	aufgereinigt
Fixable Viability Dye	eBiosciences	eFluor 780
Ki-67 (Klon: Ki-67)	BioLegend	PE

2.1.10 Magnetische Partikel

Antikörper	Firma
Streptavidin MicroBeads	Miltenyi Biotec

2.1.11 Biochemische Reagenzien

Reagenz	Firma
Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) 5(6)-CFDA, SE	Life technologies
humanes rekombinantes IL-2	Novartis

2.1.12 Kits

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

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

F(ab')₂ Preparation Kit (Thermo Fisher Scientific®)

Die Herstellung der Y3P-Fab₂-Fragmente sowie die Fitylierung des Y3P (Y3P-FITC, *fluorescein isothiocyanate*) Antikörpers wurden freundlicherweise von Frau Susanne Berr durchgeführt. Dafür gilt mein herzlichster Dank.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Lymphknotenzellen aus der Maus

Zur Gewinnung der Lymphknotenzellen wurden die Mäuse mittels CO₂ getötet. Nach Präparation der Lymphknoten (inguinale, mesenteriale, lumbale, axilläre, brachiale und zervikale Lymphknoten) wurden diese in ein 15ml Falcon-Röhrchen in BSS/BSA überführt und auf Eis gelagert. Um eine Zellsuspension zu erhalten, wurden die Lymphknoten anschließend unter der Sterilbank durch ein Nylonsieb mit einer Maschenweite von 70µm auf einem 50ml Falcon-Röhrchen mit dem Kolben einer sterilen 2 ml Spritze zerrieben. Die Zellsuspension wurde dann auf ein Endvolumen von ca. 10-20 ml BSS/BSA in Abhängigkeit von der Anzahl der Lymphknoten eingestellt und zentrifugiert (5 min bei 4 °C und 1500 rpm). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in RPMI-Medium (+10% FCS) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

2.2.2.1 Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension erfolgte mittels Trypanblau-Färbung. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:10, bzw. bei sehr geringer Zellzahl 1:2 mit der Trypanblau-Lösung verdünnt. 10 µl der so hergestellten, gut durchmischten, gefärbten Zellsuspension wurde anschließend mittels Pipette zwischen Deckglas und Zählnetz der Neubauer-Zählkammer gegeben. Trypanblau kann die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen. Unter dem Durchlichtmikroskop (Biomed, Leitz) wurden die lebenden Zellen, die sich ungefärbt und hell leuchtend darstellen, gezählt. Tote Zellen wurden durch das Trypanblau blau angefärbt und entsprechend nicht mitgezählt (Piccinini et al. 2017).

2.2.2.2 Zellzahlbestimmung mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Für die Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) wurden jeweils $3 \cdot 10^3$ beads zu der zu messenden Probe gegeben. Die Proben wurden dann am Durchflusszytometer (LSR II, BD Biosciences) gemessen und anschließend mit der Software FlowJo (TreeStar Inc.) ausgewertet.

2.2.3 Zellaufreinigung

2.2.3.1 Negative Selektion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (Depletion von CD25⁺ Zellen)

Für die CD25-Depletion wurde eine negative Selektion von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus einer Suspension von Lymphknotenzellen über eine Säule durchgeführt. Zu einer Suspension von Lymphknotenzellen in BSS/BSA in einer Konzentration von $1 \cdot 10^8$ Zellen pro 1ml BSS/BSA wurden 20 µl αCD25^{bio} mAKs (Biotin-markierte CD25-spezifische, monoklonale Antikörper) zugegeben und gut vermischt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen einmal mit BSS/BSA gewaschen (5 min bei 4 °C und 1500 rpm). Das Zellpellet wurde anschließend in 1ml BSS/BSA resuspendiert und 50 µl Streptavidin MicroBeads wurden zugegeben. Die Zellsuspension wurde für 20 min bei 4°C im Kühlschrank

inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension wiederholt vorsichtig geschwenkt. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit BSS/BSA (5 min bei 4 °C und 1500 rpm). Danach wurde das Zellpellet in 1 ml BSS/BSA resuspendiert. Nach einmaligem Waschen der LS-Säule mit 3 ml BSS/BSA wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und das Eluat in einem frischen 15ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Anschließend wurde die Säule wiederholt insgesamt dreimal mit je 3ml BSS/BSA gewaschen und das Eluat ebenfalls mit dem Zentrifugenröhrchen aufgefangen (Endvolumen: 10 ml). Da aufgrund der α CD25bio mAK Zugabe nur die CD25 positiven Zellen mit den magnetischen Partikeln (Streptavidin MicroBeads) markiert wurden, wurden diese Zellen im Magnetfeld zurückgehalten und konnten die Säule so nicht durchlaufen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte anschließend mittels Neubauer-Zählkammer.

2.2.4 Bestimmung der Zellproliferation mittels CFSE-Färbung

Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS) und CFSE-Verdünnung (Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester; 5(6)-CFDA, SE; *life technologies, REF V12883*) (Lyons and Parish 1994; Quah et al. 2007). Die Zellen wurden dafür mit CFSE angefärbt. Zunächst wurden die Lymphknotenzellen zweimal mit PBS gewaschen (5 min bei 4 °C und 1500 rpm). Je $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden in 1ml der CFSE-Färbelösung (CFSE 1:25.000 in PBS) resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 10ml RPMI-Medium (+10% FCS) zugegeben und die Zellen zweimal in 10 ml RPMI gewaschen (5 min bei 4 °C und 1500 rpm).

Die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (acd) wurde nach der Formel $\Sigma(\% \text{ der Zellen in Generation } (n) \cdot n)/100$; (n =Nummer der Generation) berechnet.

CFSE verfügt über ähnliche Anregungs- und Emissionseigenschaften wie FITC und kann daher im gleichen Kanal wie FITC am Durchflusszytometer gemessen werden. Allerdings ist es deshalb nicht sinnvoll beide Färbungen (FITC und CFSE) zu kombinieren, da eine Unterscheidung zwischen FITC und CFSE kaum möglich ist. Aus diesem Grund wurde bei den Versuchen mit fitcyliertem Y3P (Y3P-FITC) keine CFSE-Färbung durchgeführt. Abbildung 5 zeigt exemplarisch

die FACS-Analyse zur Bestimmung der Zellproliferation der CFSE-markierten Lymphknotenzellen.

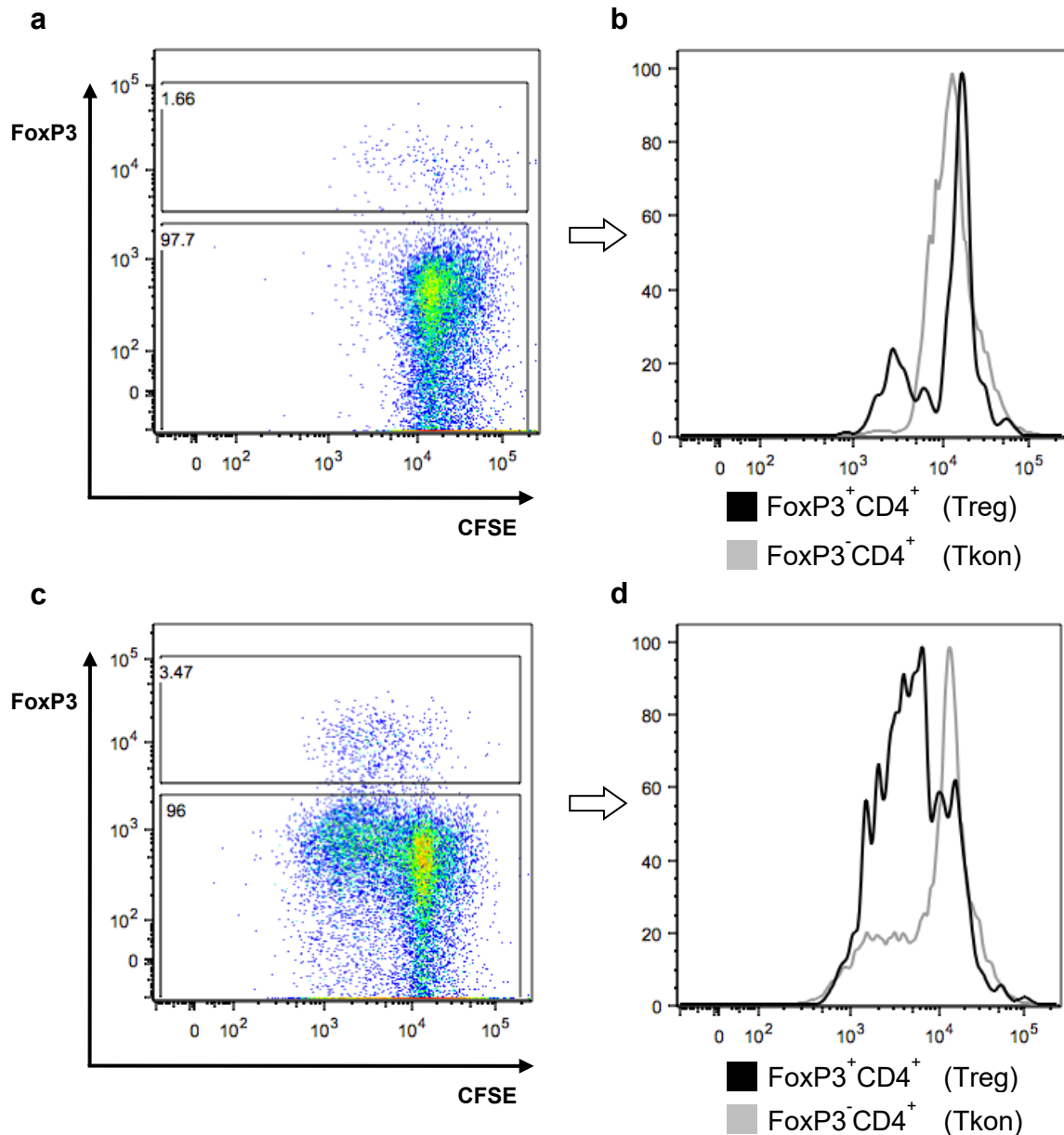


Abb. 5: CFSE-Färbung

In-vitro kultivierte murine Lymphknotenzellen wurden mit dem murinen CD28 spezifischen Superagonisten D665 stimuliert und mit CFSE gefärbt. Die Zellen wurden auf CD4⁺ Zellen gated. Die vertikale Achse zeigt die Foxp3 Färbung und die horizontale Achse die CFSE Färbung. **5 a,b** zeigt unstimulierte Bedingungen ohne Zugabe von D665. **5 c,d** zeigt die Zellproliferation CD4⁺ Zellen, die mit 20µg/ml D665 stimuliert wurden. Neben den Dot Plots (**5 a,c**) sind die Fluoreszenz-Histogramme der Foxp3⁺CD4⁺ Zellen (Treg) und Foxp3⁻CD4⁺ Zellen (Tkon) angegeben (**5 b,d**). Die Fluoreszenz-Histogramme zeigen die zunehmende Minderung der CFSE-Färbung, entsprechend der erfolgten Zellteilungen. (eigene Darstellung, erstellt mit FlowJo und Microsoft PowerPoint).

2.2.5 Zellkultur

Murine Lymphknotenzellen wurden in einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in einer 96-Rundnapf-Mikrotiterplatte (U-Boden, Gesamtvolumen pro Napf: 200 μ l, Zellen pro Napf: 2×10^5 Zellen) in RPMI-Medium mit 10% FCS und SC für insgesamt 4 Tage im Inkubator bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ kultiviert und wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des superagonistischen Maus Anti-Maus CD28 monoklonalen Antikörpers (D665) wie angegeben stimuliert. Teilweise wurde den Kulturen zusätzlich exogenes humanes rekombinantes IL-2 (Novartis) in einer Konzentration von 200 U/ml zugesetzt. Für die Blockade der MHC-Klasse-II-Moleküle wurde entweder der komplette monoklonale Antikörper Y3P oder Fab2-Fragmente des Y3P Antikörpers verwendet. Als Isotypkontrolle der MHC-II-Blockade wurde ein Maus IgG2a Antikörper (C1.18.4, BioXCell) verwendet.

2.2.6 Extrazelluläre Färbung

Für die extrazelluläre Färbung, also die Färbung von Molekülen auf der Zelloberfläche, wurden die Zellen zunächst zweimal in FACS-Puffer gewaschen (5 min bei 4 °C und 1500 rpm). Danach folgte die Färbung mit den jeweiligen Antikörpern bei 4°C im Dunkeln für 30 min in FACS-Puffer. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Antikörper	Format	Firma	Konzentration
Ratte Anti-Maus CD4	PercP	BD Pharmingen (BD Biosciences)	1:300
Ratte Anti Maus CD4	Pacific Blue	BD Pharmingen (BD Biosciences)	1:400
Anti-Maus CD8a	Pacific Blue	BioLegend	1:300
Anti-Maus CD25	PE/Cy7	BioLegend	1:200
Anti-Maus CD69	FITC	BioLegend	1:300
Ratte Anti-Maus CD45R/B220	PE	BD Pharmingen (BD Biosciences)	1:300
Y3P	FITC	BioXCell	1:100

Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen.

Abbildung 6 zeigt schematisch die Färbung der MHC-Klasse-II-Moleküle mit dem monoklonalen Antikörper Y3P-FITC.

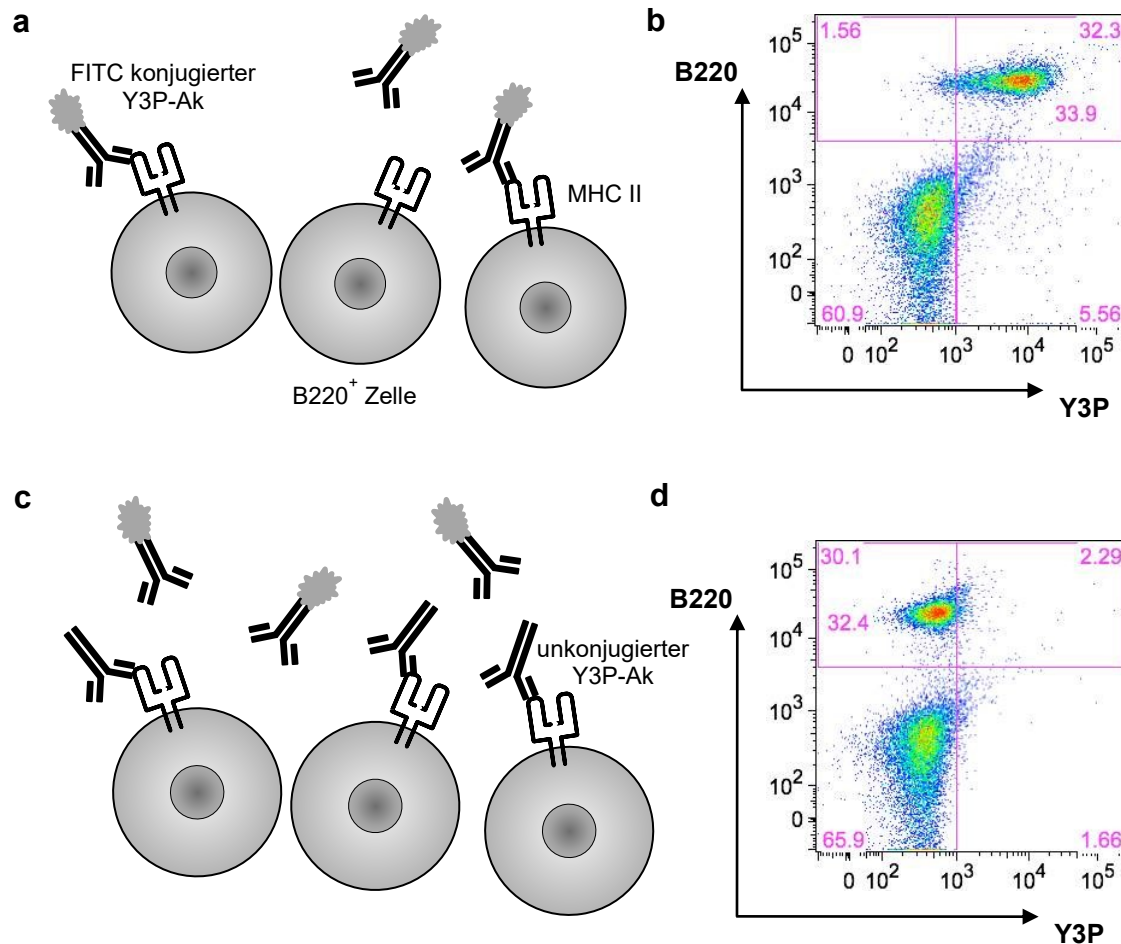


Abb. 6: Schematische Darstellung der Y3P-FITC-Färbung

a Die FITC-konjugierten monoklonalen, I-A^b spezifischen Y3P Antikörper binden an MHC-Klasse-II-Moleküle, hier auf der Zelloberfläche von B220⁺ Zellen. B220 ist ein gebräuchlicher Marker für B-Zellen in Mäusen, wird in Mäusen von allen B-Zellen exprimiert und ist somit ein Pan-B-Zellmarker in Mäusen (Bleesing and Fleisher 2003; Rodig et al. 2005b).

b Die Dot Plot Darstellung zeigt die entsprechende Anfärbung der Y3P⁺B220⁺ Zellen im rechten oberen Quadranten.

c Wurden die Zellen zuvor mit unkonjugierten, monoklonalen Y3P Antikörpern zur MHC-Klasse-II-Blockade vorbehandelt, können die FITC-konjugierten Y3P Antikörper nicht mehr an die MHC-II-Moleküle binden, da deren Epitope durch die unkonjugierten Y3P Antikörper besetzt sind.

d Der Dot Plot zeigt, dass sich die B220⁺ Zellen so nicht mehr mit den Y3P-FITC Antikörpern anfärben lassen. Die Fraktion der B220⁺ Zellen bleibt durch die MHC-II-Blockade in-vitro in ihrer Frequenz (um 30%) jedoch weitestgehend unbeeinträchtigt.

(eigene Darstellung, erstellt mit FlowJo und Microsoft PowerPoint).

Die B220-Färbung wurde als Kontrolle einer relevanten Fraktion MHC-II-tragender Zellen verwendet. B220 (CD45R) wird hauptsächlich von B-Zellen exprimiert (Coffman and Weissman 1981; Hardy et al. 1991; Hathcock et al. 1992; Rodig et al. 2005a). Aus diesem Grund ist B220 ein gebräuchlicher B-Zell-Marker im Mausmodell. B220 wird allerdings auch von bestimmten T-Zell- und NK-Zelluntergruppen exprimiert (Übersicht in Trowbridge and Thomas 1994).

2.2.7 Intrazelluläre Färbung

Bei der intrazellulären Färbung werden Zellbestandteile innerhalb der Zelle, die sich im Zellplasma oder im Zellkern befinden, mit Antikörpern angefärbt. Dafür müssen die Antikörper durch die Zellmembran in die Zelle eindringen können.

Nach der extrazellulären Färbung wurden die Zellen deshalb zunächst mittels Fixation/Permeabilization-Puffer (eBioscience) für mindestens 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden danach einmal in FACS-Puffer gewaschen (5 min bei 4 °C und 1500 rpm) und anschließend ein weiteres Mal mit Perm Wash (eBioscience) gewaschen. Es folgte die intrazelluläre Färbung mit den jeweiligen Antikörpern für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln in Perm Wash. Die eingesetzten Konzentrationen der Antikörper sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Antikörper	Format	Firma	Konzentration
Ratte Anti-Maus Foxp3	APC	eBioscience	1:100
Ki67	PE	BioLegend	1:50

Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (5 min bei 4 °C und 1500 rpm) und anschließend für die FACS-Messung in FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.8 Tierexperimentelle Methoden

2.2.8.1 In-vivo MHC-II-Blockade mit kompletten Y3P monoklonalen Antikörpern

Zur Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen in-vivo wurden C57BL/6 Mäuse 24 Stunden vor Injektion mit dem superagonistischen, monoklonalen CD28-spezifischen Antikörper (CD28SA) mit jeweils 2 mg Y3P durch intraperitoneale Injektion vorbehandelt. Die Applikation von CD28SA erfolgte ebenfalls intraperitoneal in zwei verschiedenen Dosen, in einer niedrigen CD28SA Dosis von 50 µg D665 und in einer hohen CD28SA Dosis von 150 µg D665. An Tag 4 nach der Y3P- und CD28SA-Injektion wurden die Mäuse mit CO₂ getötet und die Lymphknoten entnommen.

2.2.8.2 In-vivo MHC-II-Blockade mit Y3P-Fab₂ Fragmenten

Für die MHC-II-Blockade durch Y3P-Fab₂ Fragmente wurden C57BL/6 Mäuse zweimal in einem Abstand von 24 Stunden mit je 1 mg Y3P-Fab₂ intraperitoneal vorbehandelt. Die Y3P-Fab₂ Fragmente wurden mithilfe des F(ab')₂ Preparation Kits (Thermo Fisher Scientific®) entsprechend der Anleitung aus kompletten Y3P Antikörpern hergestellt. 24 Stunden nach der zweiten Y3P-Injektion erfolgte die Stimulation mit CD28SA durch intraperitoneale Applikation von 150 µg D665.

An Tag 6, also an Tag 4 nach CD28SA Behandlung, wurden die Mäuse mit CO₂ getötet und die Lymphknoten entnommen.

Fab-Fragmente entstehen durch proteolytische Spaltung von Immunglobulinen durch die Protease Papain und verfügen jeweils über eine Antigenbindungsstelle (Fab, *fragment antigen binding*). Neben zwei Fab-Fragmenten entsteht durch die Spaltung mit Papain ein drittes Fragment ohne antigenbindende Aktivität. Da dieses Fragment leicht zu kristallisieren ist, wird es als Fc-Fragment (Fc, *fragment crystallizable*) bezeichnet (Porter 1959).

Im Rahmen der proteolytischen Spaltung von Immunglobulin-Molekülen durch die Protease Pepsin bleiben die beiden antigenbindenden Fab-Fragmente über Disulfidbindungen miteinander verbunden und bilden so das F(ab')₂-Fragment (Parham 1983). Das F(ab')₂-Fragment besitzt dieselben Bindungseigenschaften für das jeweilige Antigen wie der ursprüngliche komplette Antikörper, es kann

jedoch nicht mit Effektormolekülen wie beispielsweise den Fc-Rezeptoren interagieren. Der Vorteil davon ist, dass mithilfe der $F(ab')_2$ -Fragmenten die Effekte der Antigenbindung unabhängig von den Effektorfunktionen, die durch den Fc-Teil des Antikörpers vermittelt werden, untersucht werden können. Der Fc-Teil wird durch Pepsin in mehrere, unterschiedlich große Stücke gespalten. Das größte Fragment wird als pFc' -Fragment bezeichnet. In Abbildung 7 ist die proteolytische Spaltung eines Immunglobulin-Moleküls durch die Proteasen Papain und Pepsin schematisch dargestellt.

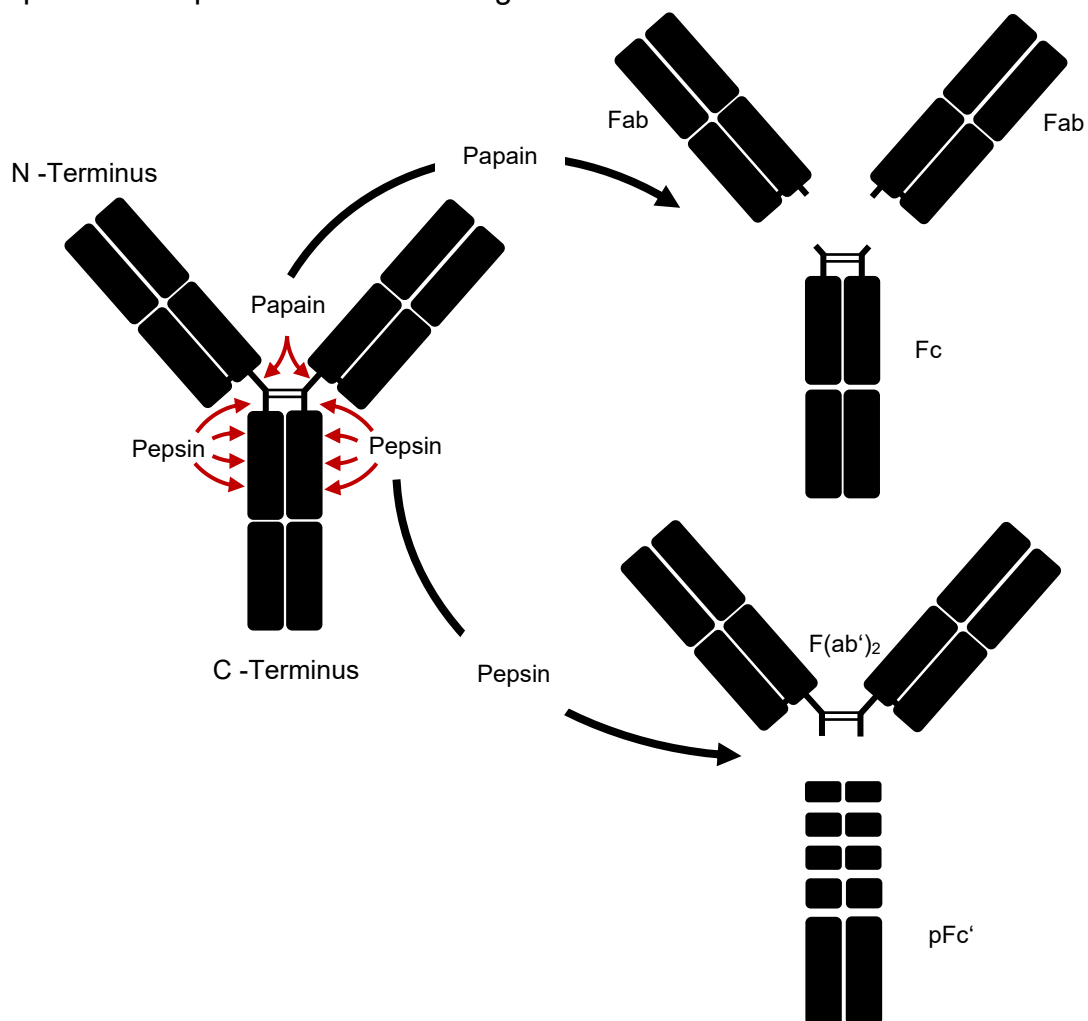


Abb. 7: Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung eines Immunglobulin-Moleküls durch die Proteasen Papain und Pepsin

Papain spaltet das Immunglobulin-Molekül in zwei monovalente Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Pepsin hingegen spaltet das Immunglobulin-Molekül in ein bivalentes $F(ab')_2$ -Fragment und verdaut den Fc-Teil in mehrere unterschiedlich große Fragmente. Das größte Fragment davon wird als pFc' -Fragment bezeichnet.

Eigene Skizze in Anlehnung an Murphy, K., Weaver, C. (2018). Janeway Immunologie, 9. Auflage. Springer Spektrum.

2.2.8.3 Adoptiver Zelltransfer und in-vivo MHC-II-Blockade

Aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen aus unbehandelten C57BL/6 Mäusen wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit CFSE (10 µM) markiert. Anschließend erfolgte der adoptive Zelltransfer von jeweils 1x10⁷ CD4⁺ CFSE-markierter T-Zellen in PBS intravenös (i.v.) in die Kaudalvene von Fcγr1g^{-/-} Mäusen. Zur Blockade der MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgte 6 Stunden vor dem adoptiven Zelltransfer die intraperitoneale (i.p.) Injektion von jeweils 2mg komplettem Y3P Antikörper in die Fcγr1g^{-/-} Mäuse. 24 Stunden nach der Y3P-Ak Applikation erfolgte am Folgetag die i.p. Injektion einer niedrigen CD28SA Dosierung von 25 µg CD28SA. An Tag 4, 3 Tage nach der CD28SA Stimulation, wurden die Fcγr1g^{-/-} Mäuse mittels CO₂ getötet. Anschließend wurden die Lymphknoten entnommen und die Lymphknotenzellen analysiert. Anhand der CFSE Verdünnung der transferierten Zellen wurde die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (acd) bestimmt (siehe Abschnitt: 2.2.4 Bestimmung der Zellproliferation mittels CFSE-Färbung; Seite 32 f.).

2.2.9 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Zellen wurden mit den angegebenen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*; Gerät: LSR II, BD Biosciences) (Übersicht in Adan et al. 2017) charakterisiert und untersucht. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo (TreeStar Inc.).

2.2.10 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit der Software Graphpad Prism v4 durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD, *standard deviation*) der erhobenen Daten dargestellt. Die statistische Signifikanz zwischen zwei Gruppen jeweils unterschiedlicher Versuchsbedingungen wurde mittels ungepaartem t-Test (*unpaired t-test*) überprüft. Die statistische Analyse mehrerer Gruppen erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (Two-way ANOVA, *Analysis of Variance*). Werte mit p<0.05 wurden dabei als signifikant betrachtet (*p<0.05, **p≤0.01; ***p≤0.001; und ****p< 0.0001).

3. Ergebnisse

3.1 Bevorzugte Aktivierung von regulatorischen T-Zellen durch den CD28 Superagonisten D665 in kultivierten Mauslymphozyten

Um die Wirkung des CD28 spezifischen Superagonisten D665 auf regulatorische T-Zellen (Treg, Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen) und konventionelle T-Zellen (Tkon, Foxp3⁻CD4⁺ T-Zellen) zu untersuchen, wurden zunächst unseparierte CFSE-markierte Lymphknotenzellen aus C57BL/6-Mäusen für insgesamt vier Tage mit ansteigenden Konzentrationen des Maus-Anti-Maus CD28 spezifischen Superagonisten D665 (Dennehy et al. 2006) kultiviert (Versuchsübersicht Abb. 8). Dabei zeigt sich, dass die Anzahl der Gesamtlymphknotenzellen mit steigender CD28SA-Konzentration zunimmt (Abb. 9 a,b) und dass sowohl die Tkons als auch die Tregs in einer dosisabhängigen Weise proliferieren (Abb. 9 c,d,e).

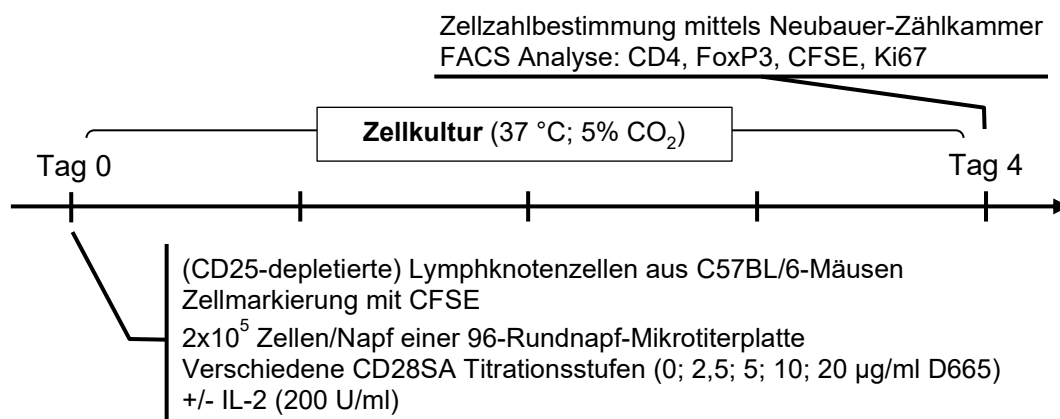


Abb. 8: Versuchsübersicht der Induktion der T-Zellproliferation durch CD28-superagonistische Stimulation (D665) in-vitro

CFSE-markierte unseparierte und CD25-depletierte gepoolte Lymphknotenzellen aus C57BL/6-Mäusen wurden in einer Konzentration von 2x10⁵ Zellen pro Napf in eine 96-Rundnapf-Mikrotiterplatte ausgesät und für 4 Tage bei 37 °C und 5 Vol% CO₂ im Inkubator in Kultur gehalten. Die Zellen wurden dabei mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen, CD28-spezifischen Superagonisten D665 (0; 2,5; 5; 10; 20 µg/ml) mit und ohne Zugabe von exogenem IL-2 stimuliert. An Tag 4 erfolgten die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer, die Färbung der Zellen und die anschließende FACS-Analyse.

Diese Beobachtung gilt für die absoluten Zellzahlen (Abb. 9 a-e), für den Faktor, um den die Zellzahl im Vergleich zu der unstimulierten Bedingung angestiegen ist (Expansionsfaktor, *fold increase*) (Abb. 9 f und Abb. 11 a,b), für den

Proliferationsverlauf anhand der durchschnittlichen Zellteilungen (*acd*, *average cell divisions*) (Abb.11 c,d) und für die Expression des nukleären Proliferationsmarkers Ki-67 (Übersicht in Scholzen and Gerdes 2000) (Abb. 11 e,f).

Auffällig dabei ist, dass der Anstieg der Zellzahl bei den Tregs in allen getesteten CD28SA-Konzentrationen im Vergleich zu der unstimulierten Bedingung ohne CD28SA-Zugabe (*fold increase*) höher ist als bei den konventionellen T-Zellen (Abb. 9 f und Abb. 11 a,b). Die stärkere Proliferation der Tregs gegenüber den Tkons zeigte sich auch in der höheren Anzahl der durchschnittlichen Zellteilungen (*acd*), die anhand der CFSE-Markierung ermittelt wurde (Abb. 10 und Abb. 11 c,d).

Insbesondere in der niedrigsten CD28SA-Konzentration von 2,5 µg/ml D665 zeigte sich eine nahezu ausschließliche Aktivierung der Tregs (Abb. 9 f und Abb. 11 a-f).

Um zu untersuchen, ob dieser Effekt sekundär in Folge einer Suppression der konventionellen T-Zellen durch die CD28SA-aktivierten regulatorischen T-Zellen hervorgerufen wird, wurden ebenfalls Zellkulturen mit Treg depletierten Lymphozyten untersucht (CD25-depletierte Lymphknotenzellen). Obwohl dies zu einer geringfügigen Verbesserung der Antwort der Tkons gegenüber der superagonistischen CD28 Stimulation führt, ist die Expansion der Tregs in den unseparierten Kulturen im Vergleich dazu dennoch deutlich höher (Abb 9 c - f).

Die meisten Tregs exprimieren die α -Kette des hochaffinen IL-2-Rezeptors (CD25) konstitutiv. Die Tkons exprimieren CD25 vor allem nach ihrer Aktivierung, jedoch nicht in ruhendem Zustand. Aus diesem Grund könnte IL-2 durch die Tregs mit ihrem hochaffinen IL-2-Rezeptor in den Zellkulturen abgegriffen werden und die Proliferation der Tkons dadurch beeinträchtigt werden.

Um diesem möglicherweise auftretenden suppressorischen Effekt durch die Tregs entgegenzuwirken, wurden die Experimente ebenfalls unter Zugabe von exogenem IL-2 durchgeführt. Obwohl die Zugabe von IL-2 die Proliferation der Tkons etwas verbessert, war der Effekt der bevorzugten Aktivierung der Tregs durch die CD28SA-Stimulation auch unter exogener IL-2 Zugabe weiterhin deutlich zu beobachten (Abb. 11 b, d, f).

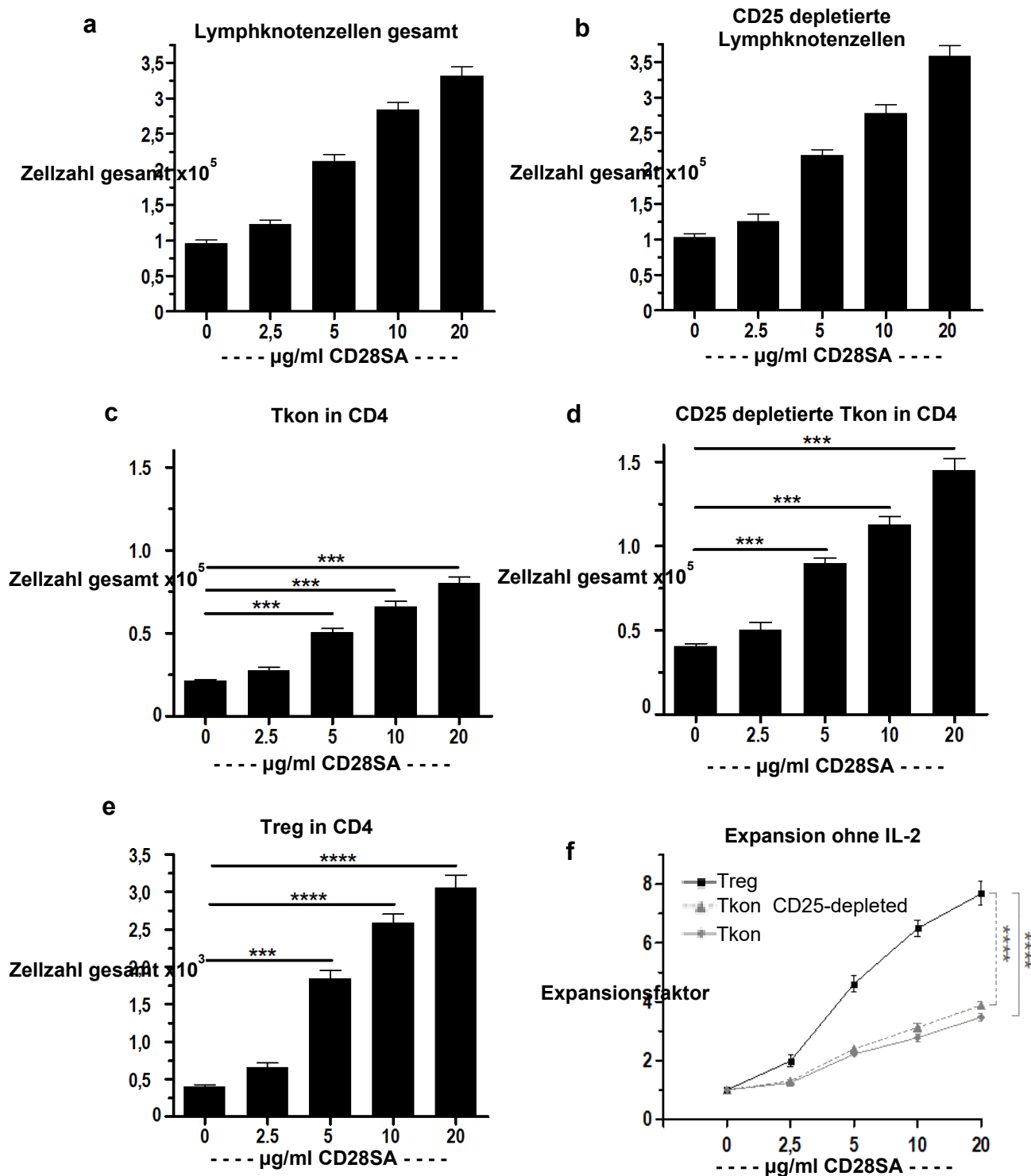


Abb. 9: Induktion der T-Zellproliferation durch den CD28 Superagonisten (CD28SA) D665 in-vitro

(a) Gesamtzellzahlen gepoolter CFSE-markierter unseparierter und (b) CD25-depletierter Lymphknotenzellen aus C57BL/6-Mäusen nach 4-tägiger in-vitro Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des monoklonalen, CD28-spezifischen Superagonisten D665 (0; 2,5; 5; 10; 20 µg/ml) ohne Zugabe von exogenem IL-2.

(c)+(d) Jeweilige Gesamtzellzahlen der Foxp3⁺CD4⁺ Tkon und (e) der Foxp3⁺CD4⁺ Treg innerhalb der CD4⁺ Lymphknotenzellen.

(f) Faktor, um den die Zellzahl der Foxp3⁺CD4⁺ Tkon und der Foxp3⁺CD4⁺ Treg im Vergleich zur unstimulierten Bedingung angestiegen ist (Expansionsfaktor, *fold increase*).

Two-way ANOVA: *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001 und ****P < 0,0001

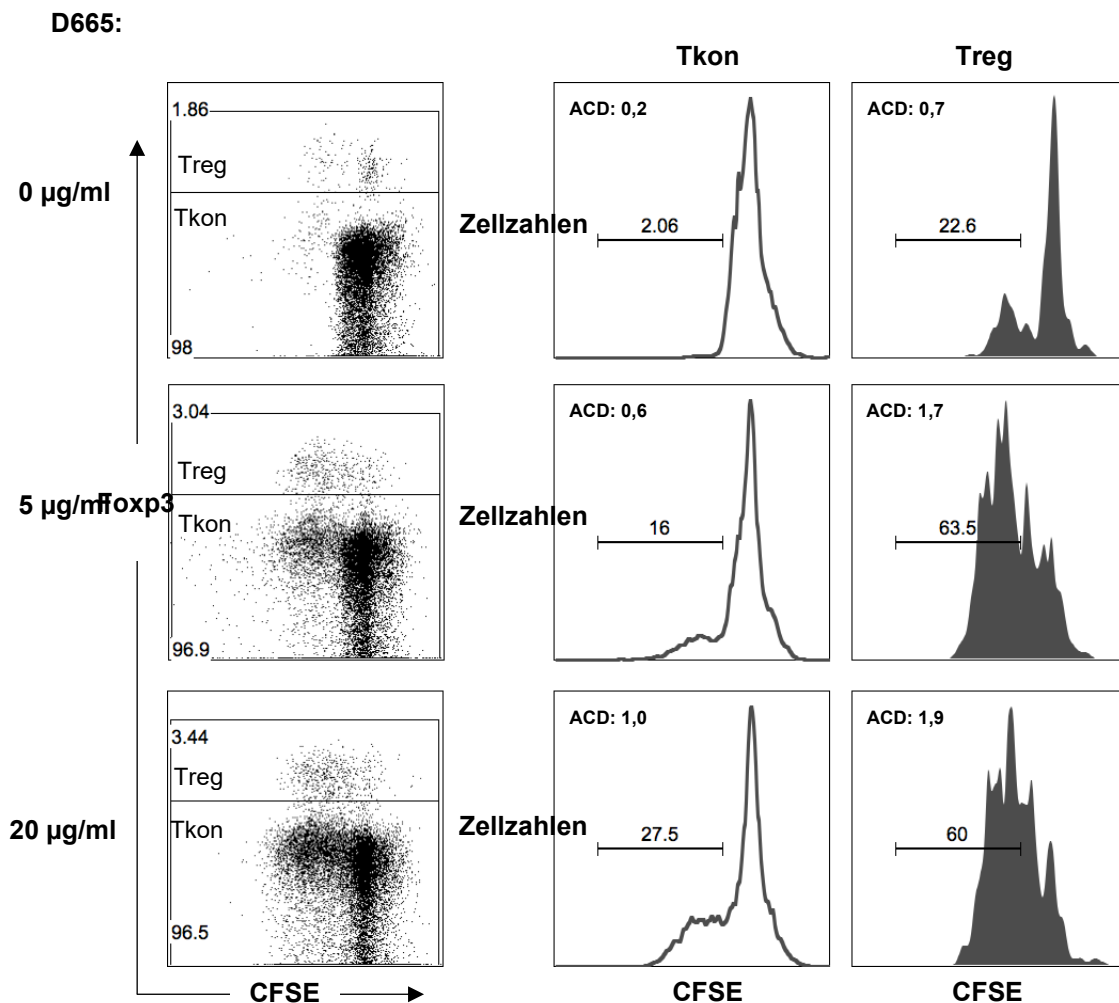


Abb. 10: Dosisabhängige Unterschiede der Proliferation von Tkon und Treg durch CD28-superagonistische Stimulation (CD28SA) in-vitro

CFSE-markierte gepoolte Lymphknotenzellen aus C57BL/6-Mäusen wurden CFSE markiert und in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro well in eine 96-well Suspensionsplatte ausgesät und für 4 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen des monoklonalen, CD28-spezifischen Superagonisten D665 (0; 2,5; 5; 10; 20 µg/ml) behandelt. Abgebildet sind exemplarisch die Dosierungen 0 µg/ml D665 (unstimuliert), 5 µg/ml D665 (niedrige Dosis) und 20 µg/ml D665 (hohe Dosis).

Die Dot Plots (linke Spalte) zeigen die prozentualen Anteile der regulatorischen T-Zellen (Foxp3⁺CD4⁺ Treg) und der konventionellen T-Zellen (Foxp3⁻CD4⁺ Tkon) innerhalb der CD4⁺ Lymphknotenzellen (auf CD4⁺ Zellen gated).

Die Histogramme (rechte Spalte) zeigen die Verteilung der Zellen hinsichtlich der Zahl ihrer Zellteilungen innerhalb einer Population. Angegeben ist jeweils der Prozentsatz an Zellen (Zahl über dem Balken) der konventionellen und regulatorischen CD4⁺ T-Zellen, die sich (ein oder mehrfach) geteilt haben.

In der oberen linken Ecke der Histogramme sowie in der nachstehenden Tabelle sind die durchschnittlichen Zahlen der Zellteilungen (ACD) angegeben:

	0 µg/ml D665	5 µg/ml D665	20 µg/ml D665
ACD Treg	0,7	1,7	1,9
ACD Tkon	0,2	0,6	1,0

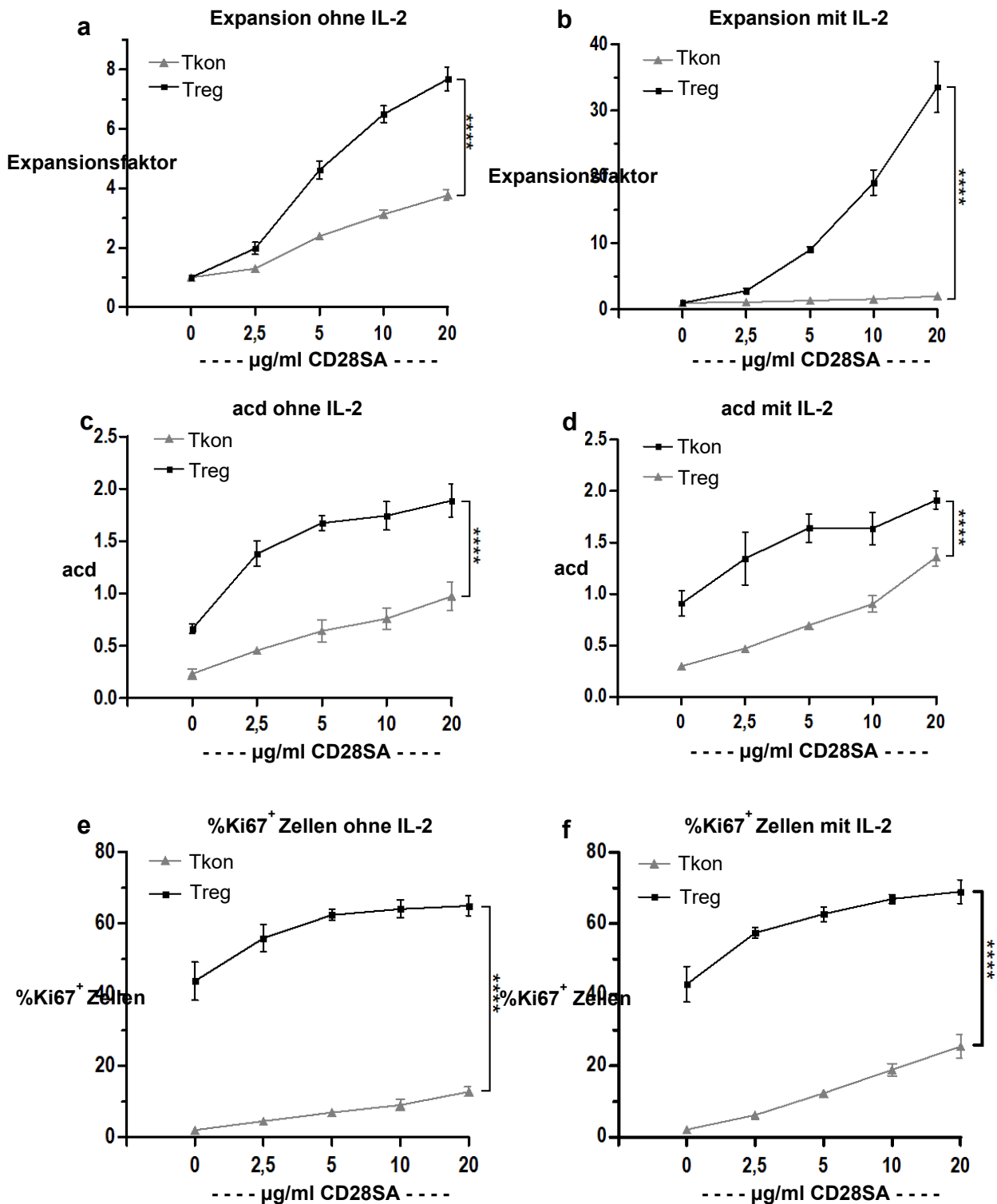


Abb. 11: Proliferationsverhalten konventioneller (Tkon) und regulatorischer T-Zellen (Treg) gegenüber unterschiedlichen CD28SA-Dosierungen

CFSE-markierte gepoolte Lymphknotenzellen aus C57BL/6-Mäusen wurden CFSE markiert und in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro well in eine 96-well Suspensionsplatte ausgesät und für 4 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen des monoklonalen, CD28-spezifischen Superagonisten D665 (0; 2,5; 5; 10; 20 µg/ml) behandelt. Die Grafiken zeigen die Proliferation der regulatorischen (Treg) und konventionellen T-Zellen (Tkon) anhand **(a)+(b)** des Faktors, um den die Zellzahl im Vergleich zur unstimulierten Bedingung angestiegen ist (Expansionsfaktor, *fold increase*), **(c)+(d)** der durchschnittlichen Zellteilungen (acd, *average cell divisions*) und **(e)+(f)** der Expression des nukleären Proliferationsmarkers Ki-67.

Two-way ANOVA: *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001 und ****P < 0,0001

3.2 In-vitro Untersuchung von T-Zellaktivierungsmarkern

Um Unterschiede im Aktivierungszustand der Tregs und Tkons durch die CD28SA-Stimulation zu untersuchen, wurde die Expression der T-Zellaktivierungsmarker CD25 und CD69 mittels Durchflusszytometrie analysiert (Versuchsübersicht Abb. 12).

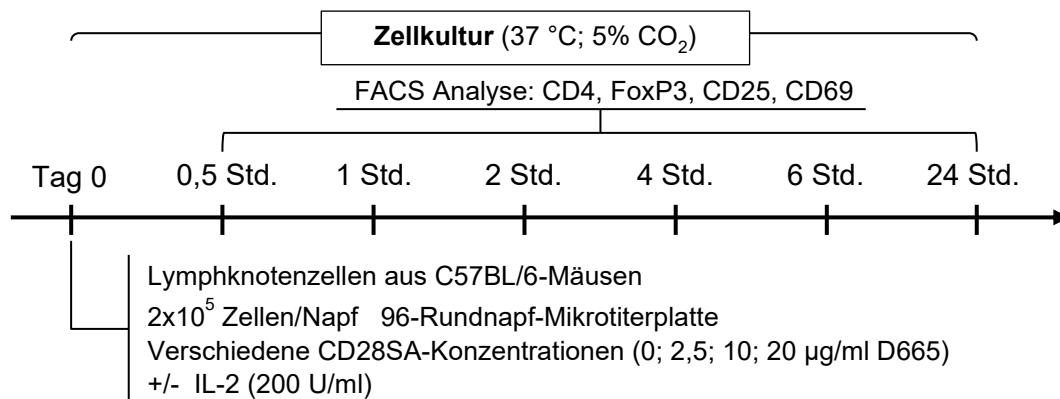


Abb. 12: In-vitro Untersuchung von T-Zellaktivierungsmarkern

Gepoolte Lymphknotenzellen aus C57BL/6-Mäusen wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro Napf in eine 96-Rundnapf-Mikrotiterplatte ausgesät und für 4 Tage bei 37 °C und 5 Vol% CO₂ im Inkubator in Kultur gehalten. Die Zellen wurden dabei mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen, CD28-spezifischen Superagonisten D665 (0; 2,5; 10; 20 µg/ml) mit und ohne Zugabe von exogenem IL-2 stimuliert. Nach entsprechender Färbung der Lymphknotenzellen (CD4, FoxpP3, CD25 und CD69) erfolgte die FACS-Analyse nach 30 Min, 1 Std, 2 Std, 4 Std, 6 Std und 24 Std.

Bereits nach 30 Minuten ist eine erhöhte Expression von CD69 bei den regulatorischen T-Zellen auch in der niedrigsten CD28SA-Dosierung (2,5 µg/ml) messbar. Dies zeigt sich sowohl mit und ohne Zugabe von exogenem IL-2 (Abb. 13 a,b). Im Vergleich dazu wurde die Expression von CD69 bei den Tkons erst später zwischen 4 und 6 Stunden und nur in den hohen CD28SA-Dosierungen (10 und 20 µg/ml) hochreguliert (Abb. 13 a,b).

CD25 wird von den Tregs konstitutiv exprimiert (Abb. 13 c,d). Nach 6 Stunden lässt sich dennoch ein Anstieg der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von CD25 (MFI, *mean fluorescence intensity*) durch die CD28SA-Stimulation für alle CD28SA Dosierungen bei den Tregs zeigen. Dies spricht für eine Hochregulation der CD25 Expression der Tregs durch die CD28SA-Stimulation (Abb. 13 c,d). IL-2 alleine führt bei den regulatorischen T-Zellen auch ohne CD28SA-

Stimulation zu einem Anstieg der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von CD25 zwischen 6 und 24 Stunden (Abb. 13 d).

Die Tkons exprimieren CD25 in einem weitaus geringeren Maße als die Tregs (Abb. 13 c,d). Ein Anstieg der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von CD25 bei den Tkons lässt sich ebenfalls zwischen 6 und 24 Stunden verzeichnen. Dieser ist im Vergleich zu den Tregs jedoch wesentlich geringer. Selbst die Zugabe von exogenem IL-2 beeinflusst diesen deutlichen Unterschied der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von CD25 zwischen Tregs und Tkons nicht wesentlich.

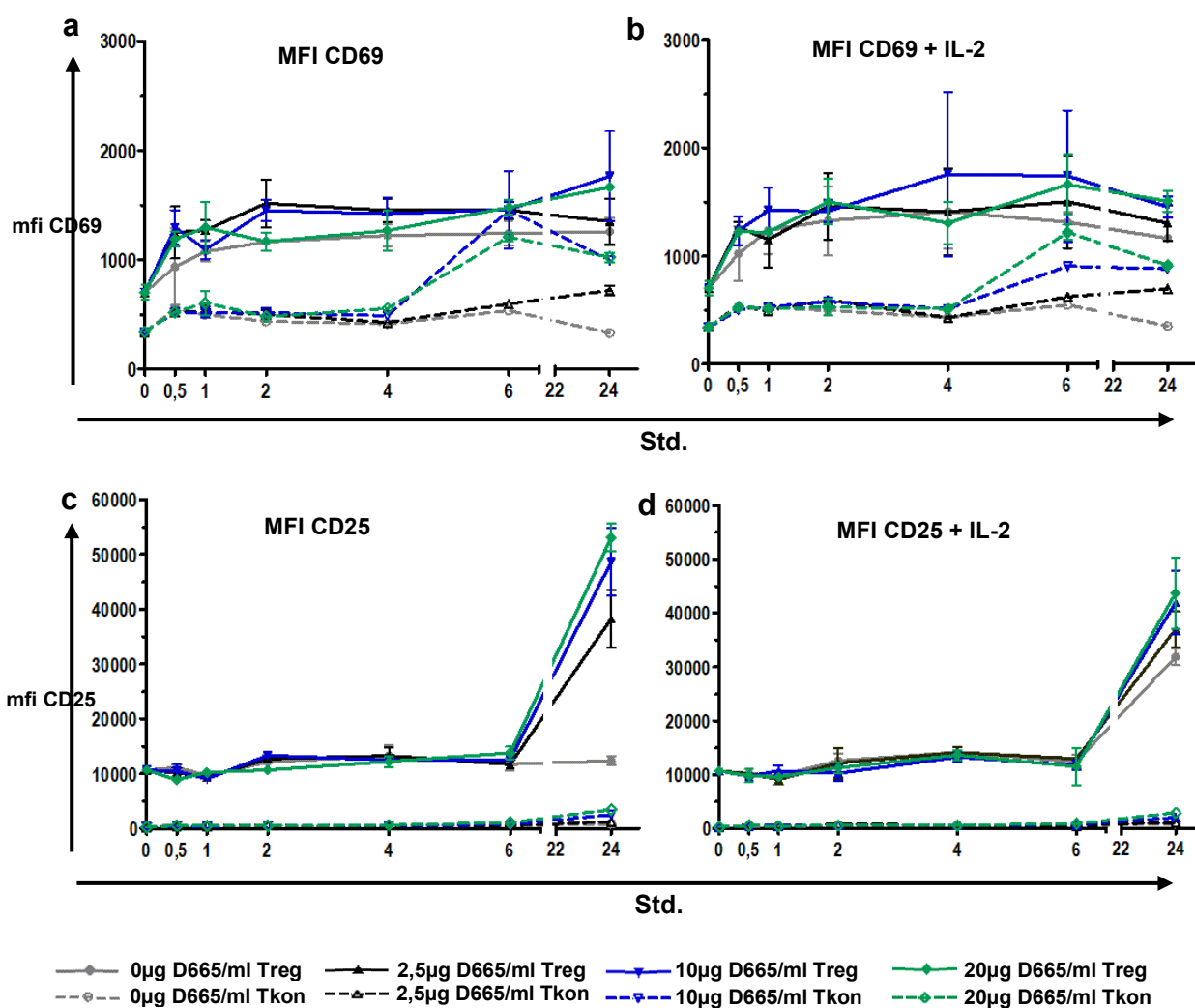


Abb. 13: T-Zellaktivierungsmarker CD69 und CD25

Vergleich der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten (MFI, *mean fluorescence intensity*) der T-Zellaktivierungsmarker CD69 und CD25 zwischen regulatorischen (Treg) und konventionellen T-Zellen (Tkon) mit und ohne Zugabe von exogenem IL-2 nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen, CD28-spezifischen Superagonisten D665 (0; 2,5; 10; 20 µg/ml).

3.3 Die Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen hebt die bevorzugte Aktivierung der regulatorischen T-Zellen durch niedrige CD28SA Konzentrationen in-vitro auf

Um zu untersuchen, ob eine Blockade der MHC-Klasse-II-Moleküle in der Zellkultur die bevorzugte Expansion der regulatorischen T-Zellen durch die CD28SA-Stimulation beeinflusst, wurde ein weiteres Experiment mit unseparierten Lymphknotenzellen aus C57BL/6-Mäusen und gleichzeitiger MHC-II-Blockade durchgeführt. Für die MHC-II-Blockade in-vitro wurde der komplette, I-A^b-spezifische monoklonale Antikörper Y3P (Janeway et al. 1984) eingesetzt, der die I-A^b-spezifische Erkennung des T-Zell-Rezeptors blockiert. Um möglichen Effekten einer reduzierten parakrinen IL-2 Sekretion in den mit Y3P behandelten Zellkulturen Rechnung zu tragen, wodurch insbesondere die Proliferation der Tregs beeinträchtigt werden könnte, wurden die Experimente wiederum einmal ohne und einmal mit Zugabe von exogenem IL-2 durchgeführt (Versuchsübersicht Abb. 14).

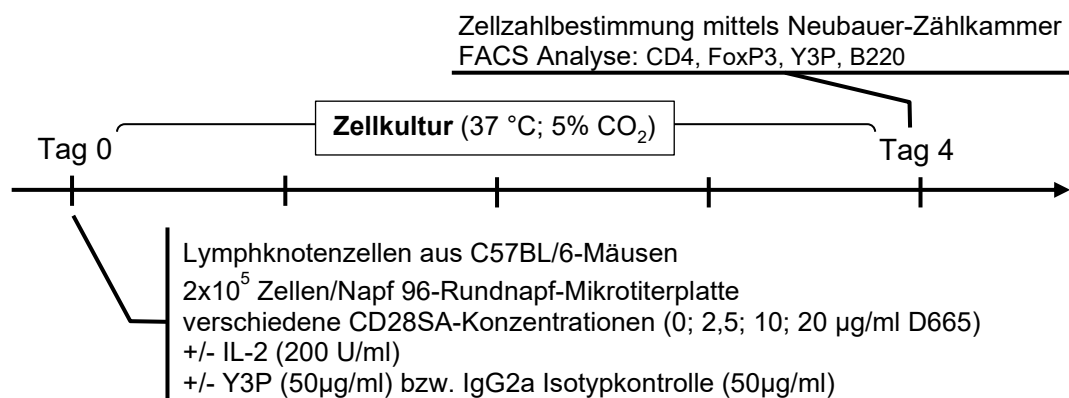


Abb. 14: Versuchsübersicht der MHC-II-Blockade in-vitro

Gepoolte Lymphknotenzellen aus C57BL/6-Mäusen wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro Napf in eine 96-Rundnapf-Mikrotiterplatte ausgesät und für 4 Tage bei 37 °C und 5 Vol% CO₂ im Inkubator in Kultur gehalten. Die Zellen wurden dabei mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen, CD28-spezifischen Superagonisten D665 (0; 2,5; 10; 20 µg/ml) mit und ohne Zugabe von exogenem IL-2 stimuliert. Die MHC-II-Blockade erfolgte durch Zugabe des kompletten, I-A^b-spezifischen, monoklonalen Antikörpers Y3P. Zudem wurde parallel jeweils eine Versuchsreihe ohne Zugabe von Y3P und als Kontrolle eine Versuchsreihe mit Zugabe einer IgG2a Isotypkontrolle des Y3P-Antikörpers angesetzt.

An Tag 4 erfolgten die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer, die Färbung der Zellen und die anschließende FACS-Analyse.

IL-2 spielt eine wichtige Rolle für das Überleben und die Proliferation der regulatorischen T-Zellen. FOXP3 unterdrückt die IL-2 Expression, weshalb regulatorische T-Zellen auf die parakrine Sekretion von IL-2, welches beispielsweise von aktivierten konventionellen T-Zellen im Rahmen von Immunreaktionen freigesetzt wird, angewiesen sind (Übersicht in Sharabi et al. 2018).

Tatsächlich wird der Effekt der bevorzugten CD28SA-Aktivierung der Tregs im Vergleich zu den Tkons durch die MHC-II-Blockade unabhängig davon, ob exogenes IL-2 zugegeben wurde oder nicht, aufgehoben (Abb. 15 a,b; Abb. 16 a,b; Abb. 17 a,b).

Wichtig dabei ist, dass die Behandlung mit Y3P die Zahl der I-A^b exprimierenden Zellen in-vitro nicht reduziert, die I-A^b Moleküle aber vollständig blockiert sind. Dies zeigt sich darin, dass sich die B220⁺ Zellen (B-Zellen) am Ende der Zellkultur nicht mit direkt FITC-konjugierten Y3P Antikörpern anfärben ließen, also alle MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche der B220⁺ Zellen bereits durch den Y3P Antikörper in der Zellkultur besetzt waren. Der Anteil der B220⁺ Zellen blieb stabil (Abb. 18 a,b) (Vergleiche auch Abbildung 6, Seite 35, Material und Methoden). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass der voraktivierte Zustand der Tregs, der durch die Erkennung von Selbst-Peptiden auf MHC-II-Molekülen entsteht, die Tregs sensitiver gegenüber der CD28SA-Stimulation macht im Vergleich zu den Tkons, die nur die schwächeren tonische Signale erhalten.

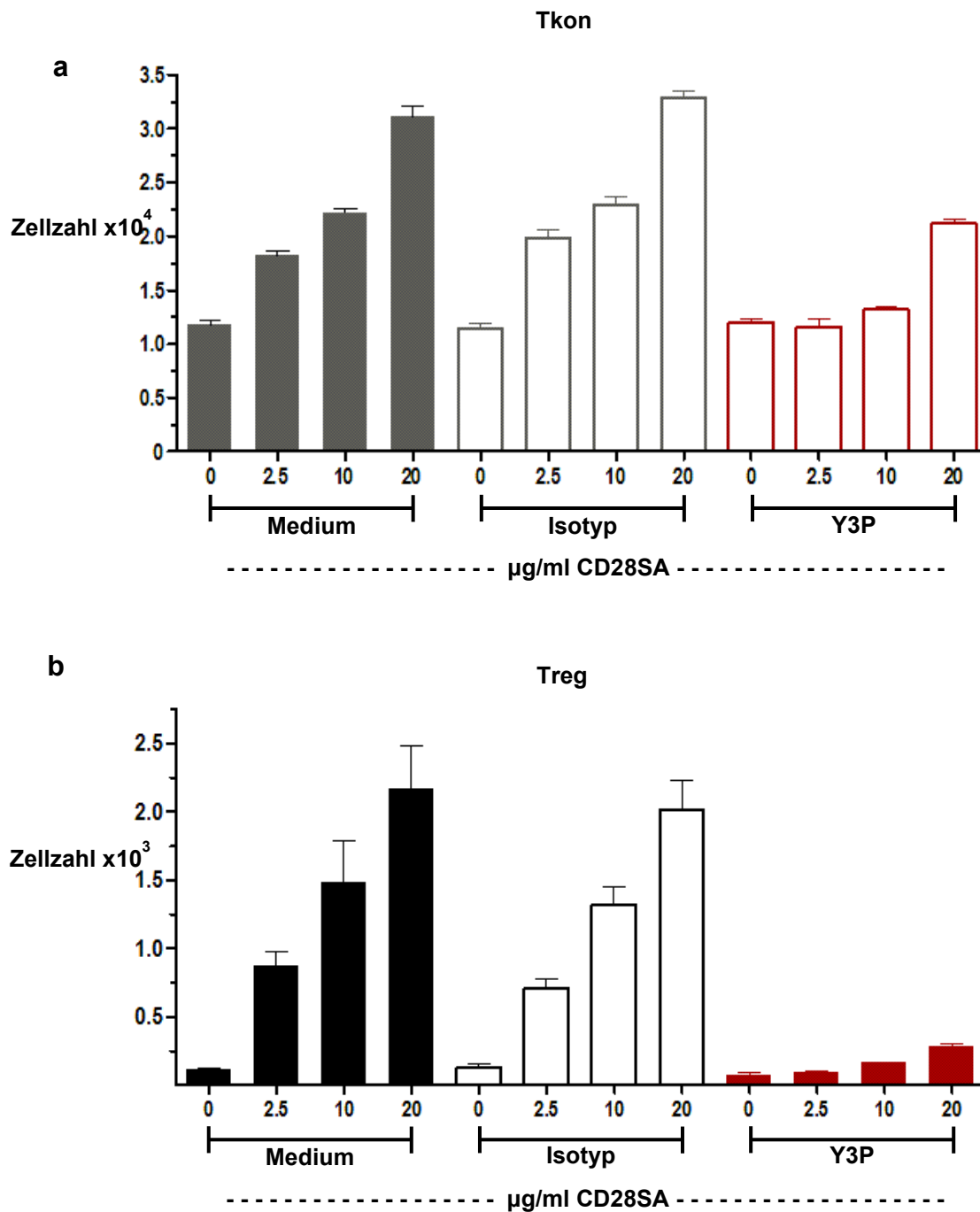


Abb. 15: MHC-II-Blockade in-vitro ohne exogene IL-2 Zugabe

(a) Gesamtzellzahlen der konventionellen und (b) regulatorischen T-Zellen gepoolter Lymphknotenzellen aus C57BL/6-Mäusen nach 4-tägiger in-vitro Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen, CD28-spezifischen Superagonisten D665 (0; 2,5; 10; 20 µg/ml) ohne Zugabe von exogenem IL-2. Die MHC-II-Blockade erfolgte durch Zugabe des kompletten, I-A^b-spezifischen, monoklonalen Antikörpers Y3P. Zudem wurde parallel jeweils eine Versuchsreihe ohne Zugabe von Y3P (Medium) und als Kontrolle eine Versuchsreihe mit Zugabe einer IgG2a Isotypkontrolle des Y3P-Antikörpers angesetzt (Isotyp).

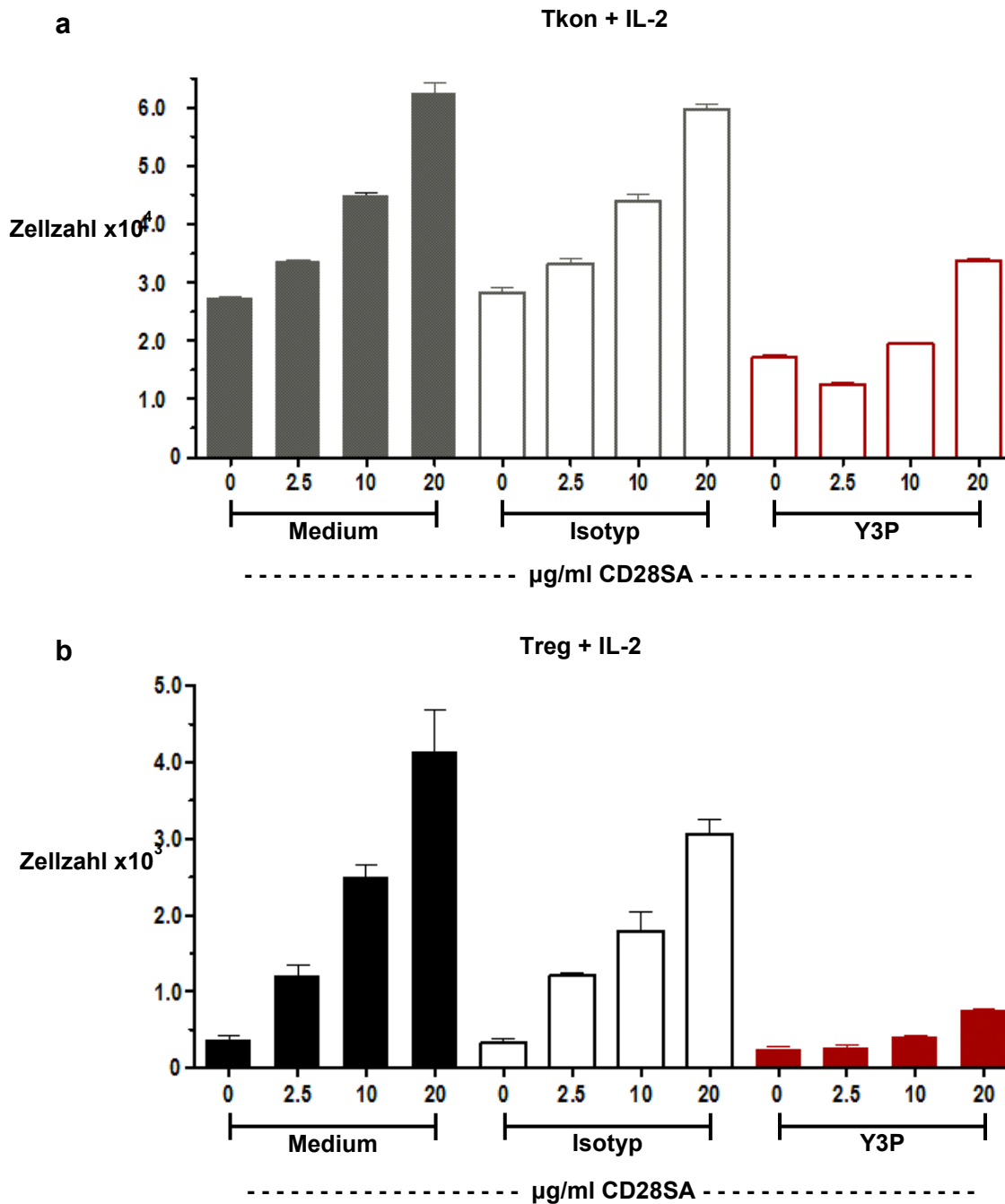


Abb. 16: MHC-II-Blockade in-vitro mit exogener IL-2 Zugabe

(a) Gesamtzellzahlen der konventionellen und (b) regulatorischen T-Zellen gepoolter Lymphknotenzellen aus C57BL/6-Mäusen nach 4-tägiger in-vitro Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen, CD28-spezifischen Superagonisten D665 (0; 2,5; 10; 20 µg/ml) unter Zugabe von exogenem IL-2. Die MHC-II-Blockade erfolge durch Zugabe des kompletten, I-A^b-spezifischen, monoklonalen Antikörpers Y3P. Zudem wurde parallel jeweils eine Versuchsreihe ohne Zugabe von Y3P (Medium) und als Kontrolle eine Versuchsreihe mit Zugabe einer IgG2a Isotypkontrolle des Y3P-Antikörpers angesetzt (Isotyp).

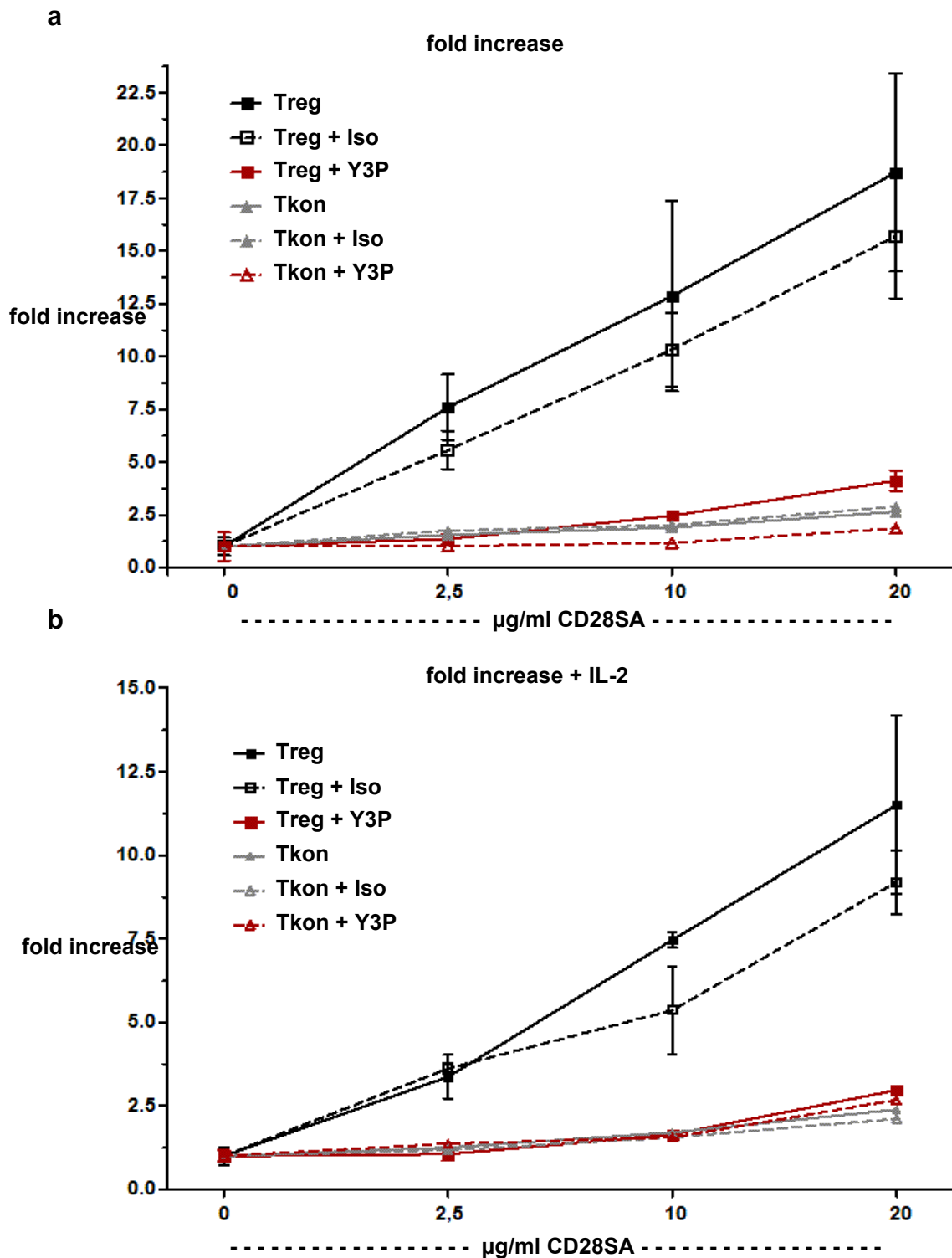


Abb. 17: MHC-II-Blockade in-vitro

Proliferation der regulatorischen (Treg) und konventionellen T-Zellen (Tkon) anhand des Faktors, um den die Zellzahl im Vergleich zur unstimulierten Bedingung angestiegen ist (Expansionsfaktor, *fold increase*), (a) oben ohne exogene IL-2 Zugabe und (b) unten mit exogener IL-2 Zugabe.

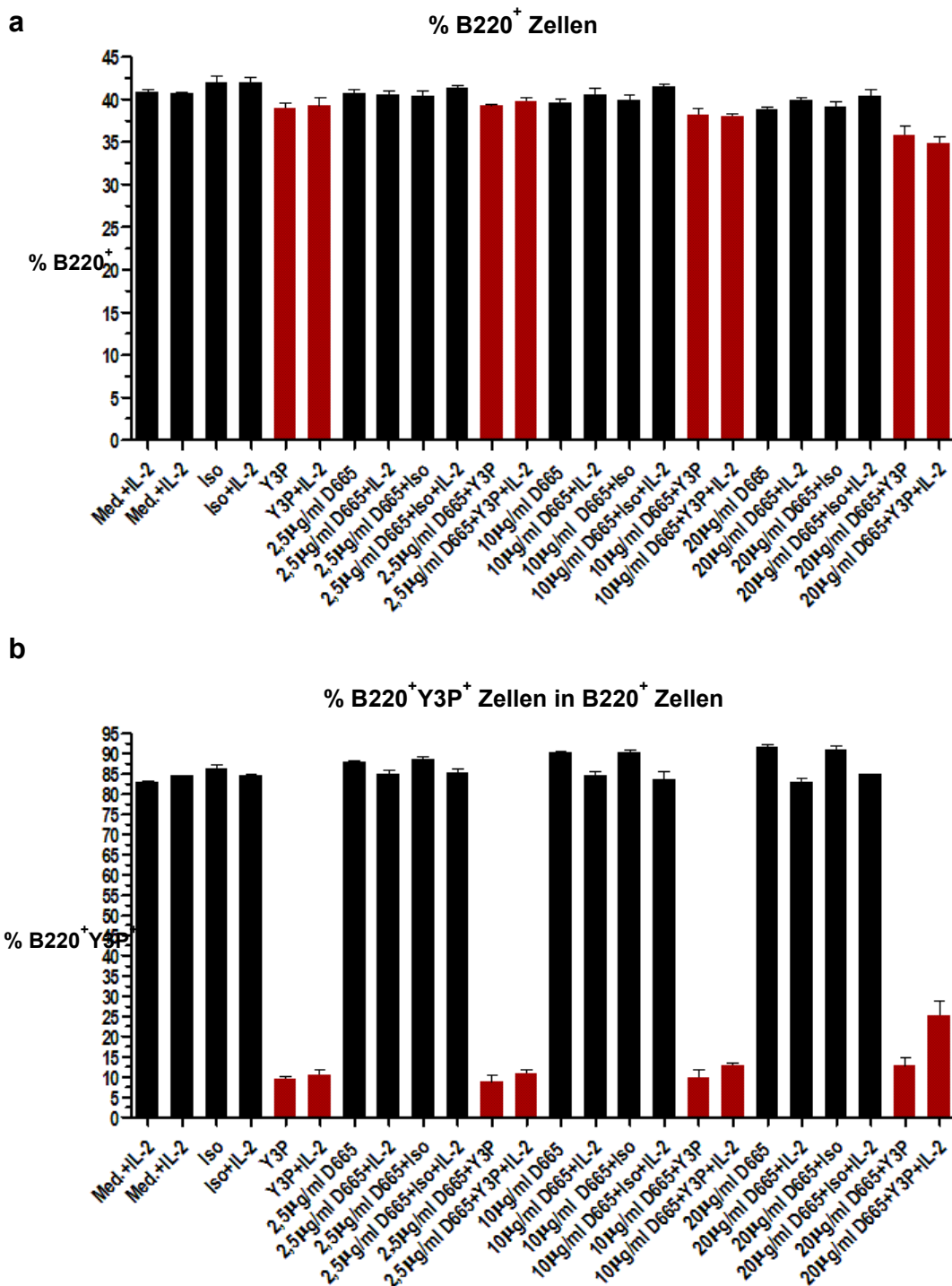


Abb. 18: Auswirkung der MHC-II-Blockade in-vitro auf B220⁺ Zellen

Die Histogramme zeigen zum einen (a) die Frequenz der B220⁺ Zellen und zum anderen (b) den prozentualen Anteil der mit Y3P-FITC-gefärbten B220⁺ Zellen (Y3P⁺B220⁺). Die Zellen, deren MHC-II-Moleküle bereits durch die MHC-II-Blockade durch den unkonjugierten Y3P Antikörper belegt sind, werden nicht mehr mit dem fitcyliertem Y3P Antikörper gefärbt.

3.4 MHC-Klasse-II-Blockade in-vivo

Um die bisher gewonnenen Ergebnisse auch in-vivo überprüfen zu können wurden zunächst wildtypische C57BL/6-Mäuse mit dem kompletten monoklonalen blockierenden Antikörper Y3P behandelt. Zur Ermittlung der Dosis für eine effektive Blockade der MHC-II-Moleküle in-vivo wurde eine Y3P-Titration durchgeführt (Versuchsübersicht Abb. 19). Dabei zeigt sich bei einer einmaligen intraperitonealen Injektion von 2mg Y3P i.p. eine fast vollständige Blockade der MHC-II-Moleküle nach 4 Tagen (Abb. 20d).

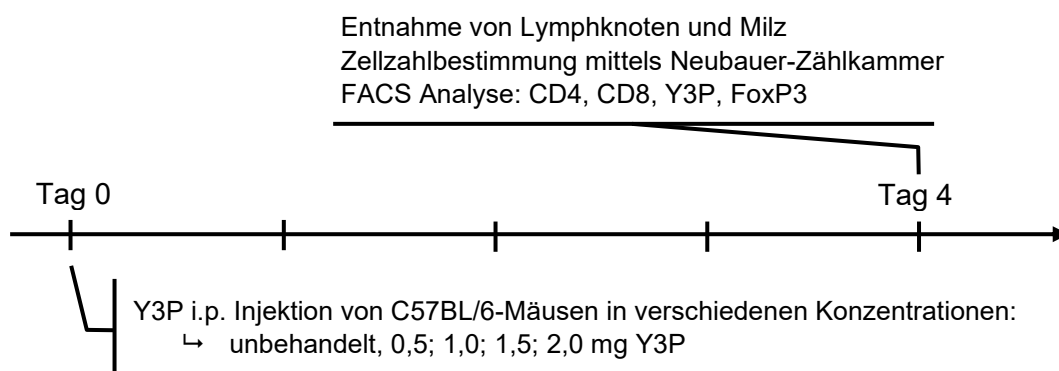


Abb. 19: Versuchsübersicht der Titration des kompletten Y3P Antikörpers in-vivo

Zur Ermittlung der Y3P Dosis bei der in-vivo eine suffiziente Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen erreicht wird, wurden C57BL/6-Mäuse mit unterschiedlichen Y3P Dosierungen i.p. behandelt (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg Y3P), wobei in diesem Fall jeweils nur eine C57BL/6-Maus mit einer Y3P Konzentration behandelt wurde und keine Triplets pro Y3P Konzentration vorliegen. An Tag 4 wurden die Mäuse mit CO₂ getötet und jeweils die Lymphknoten und die Milz entnommen. Anschließend erfolgten die Bestimmung der Gesamtzellzahlen und nach der entsprechenden Färbung die FACS-Analyse.

Die Abbildungen 20a und 20b zeigen die Gesamtzellzahlen der Lymphknotenzellen und Milzzellen, sowie jeweils die Gesamtzellzahlen der CD4⁺, CD8⁺ und der CD4⁻CD8⁻ Zellen. Es zeigt sich, dass sowohl in der Milz als auch in den Lymphknoten vor allem die Zahl der CD4⁻CD8⁻ Zellen, die die MHC-II-tragenden Zellen beinhalten, durch die Y3P Behandlung abnimmt. Dieser Effekt tritt bereits bei der niedrigsten Y3P Konzentration mit 0,5 mg Y3P auf. Im Vergleich der verschiedenen Y3P Konzentrationen miteinander bleibt die Zahl der CD4⁻CD8⁻ Zellen jedoch relativ konstant.

Ebenso zeigen sich die Tregs (Foxp3⁺CD4⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellen) im Vergleich zu den Tkons (Foxp3⁻CD4⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellen) durch die Y3P Behandlung stärker beeinträchtigt (Abb. 20c).

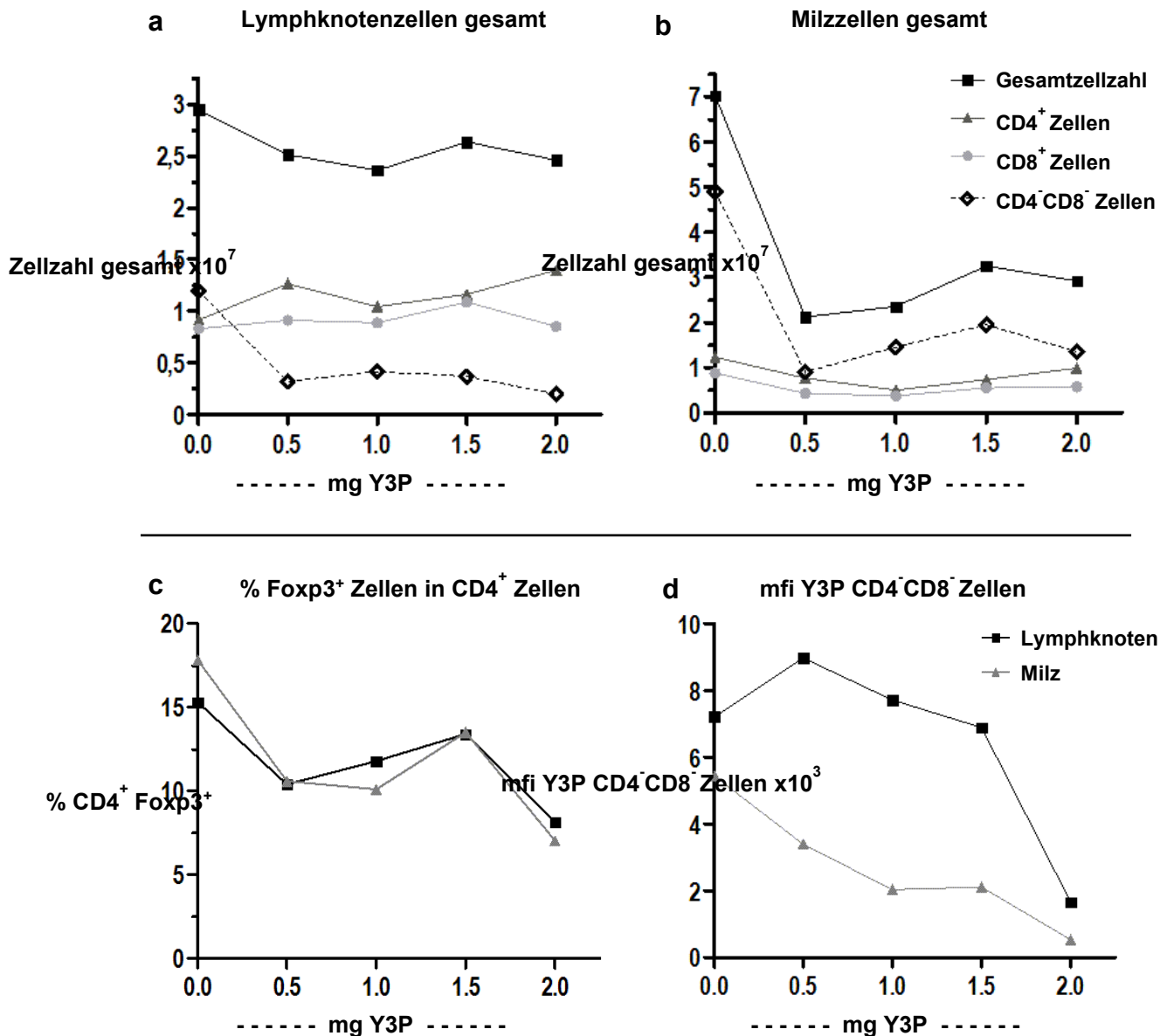


Abb. 20: Titration des kompletten Y3P Antikörpers in-vivo

Dargestellt sind die Gesamtzellzahlen der untersuchten Lymphknoten (a) und der Milz (b) an Tag 4 nach i.p. Behandlung von C57BL/6-Mäusen mit ansteigenden Y3P Konzentrationen, sowie jeweils die Gesamtzellzahlen der CD4⁺, CD8⁺ und der CD4⁻CD8⁻ Zellen.

Die Grafik unten links (c) zeigt den prozentualen Anteil der Foxp3⁺CD4⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellen und repräsentiert die regulatorischen T-Zellen (Treg). Der verbliebene Anteil der CD4⁺ Zellen (Foxp3⁻CD4⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellen) entspricht dem Anteil der konventionellen T-Zellen (Tkon). Die Grafik unten rechts (d) bildet die mittlere Fluoreszenzintensität (mfi, *mean fluorescence intensity*) der Y3P FITC angefärbten CD4⁻CD8⁻ Zellen ab.

Nachdem die Y3P Dosis für eine suffiziente MHC-II-Blockade in-vivo ermittelt wurde, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, um den Effekt einer in-vivo MHC-II-Blockade mit kompletten Y3P Antikörpern (2 mg i.p.) auf die Stimulation der Tkons und der Tregs durch die Behandlung mit einer niedrigen (50 µg D665) und einer hohen CD28SA-Dosis (150 µg D665) zu untersuchen (Versuchsübersicht in Abb. 21a).

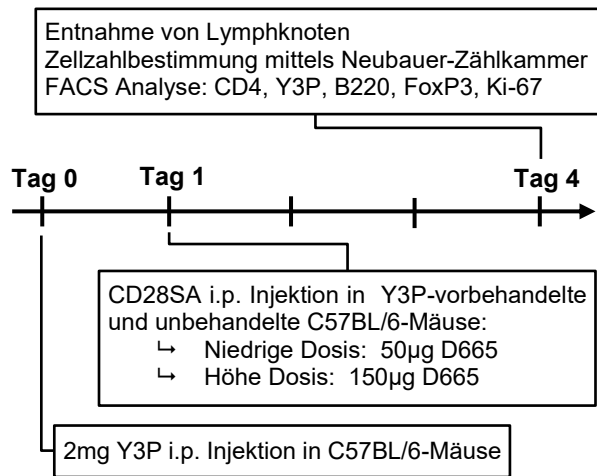
Wie in Abbildung 22 gezeigt, beeinträchtigt die Y3P Behandlung die Proliferation sowohl der konventionellen als auch der regulatorischen CD4⁺ T-Zellen.

Es zeigt sich jedoch ein wesentlich deutlicherer Effekt auf die Expansion der regulatorischen T-Zellen. Die bevorzugte Aktivierung der Tregs im Vergleich zu den Tkons durch niedrige CD28SA Dosen ist wie bereits in den in-vitro Experimenten durch die Blockade der MHC-Klasse-II-Moleküle aufgehoben (Abb. 22).

Allerdings führte die in-vivo Behandlung mit kompletten Y3P Antikörpern zu einer Depletion der Mehrzahl der I-A^b-exprimierenden Zellen (= Antigen-präsentierenden Zellen) (Abbildung 21b). Dieser Effekt wurde ebenfalls von Andersson und Kollegen beobachtet (Andersson et al. 2007). Grund dafür könnte die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) sein. Als ADCC wird ein Prozess bezeichnet, durch den Zellen, die auf ihrer Oberfläche mit Antikörpern besetzt sind durch andere Zellen mit Fc-Rezeptoren, die die konstante Region dieser auf der Oberfläche gebundenen Antikörper erkennen, abgetötet werden. Beispielsweise tragen NK-Zellen auf ihrer Oberfläche FcγRIII (CD16), einen Rezeptor für IgG, der die ADCC auslösen kann. Durch Bindung von IgG an CD16 werden die NK-Zellen aktiviert, die daraufhin ihre zytotoxischen Granula, die unter anderem Perforin und Granzyme enthalten, freisetzen. ADCC kann jedoch auch durch andere Zellen, wie Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten, vermittelt werden (Übersicht in Teillaud 2012).

CD16 kommt auch auf Makrophagen und neutrophilen Zellen vor und bewirkt dort die Aufnahme und Zerstörung von Pathogenen, an die Antikörper gebunden haben. Ein Prozess, der als Phagozytose bezeichnet wird.

a



b

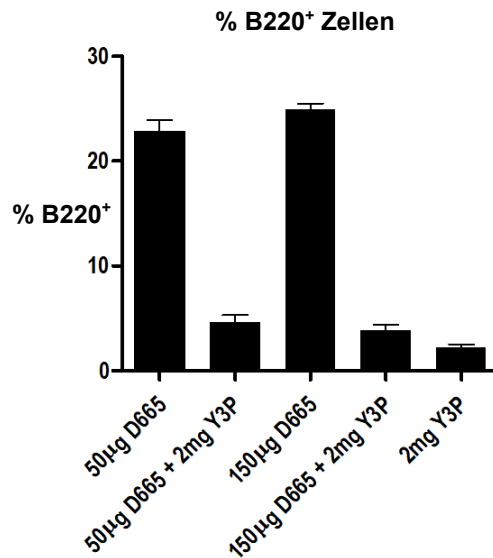


Abb. 21: Depletion von B220⁺ Zellen durch die in-vivo Behandlung mit dem kompletten Y3P Antikörper in C57BL/6-Mäusen

(a) Es wurden zunächst je 2mg Y3P intraperitoneal (i.p.) in C57BL/6-Mäusen injiziert. Am Folgetag wurden die Y3P vorbehandelten Mäuse und die unbehandelten C57BL/6 Mäuse entweder mit einer niedrigen (50µg D665) oder einer hohen CD28SA Dosis (150µg D665) behandelt. An Tag 4 wurden die Mäuse mit CO₂ getötet und die Lymphknoten entnommen. Es folgten die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer und nach entsprechender Färbung die FACS Analyse. (b) Das Histogramm zeigt die Häufigkeit der B220⁺ Zellen.

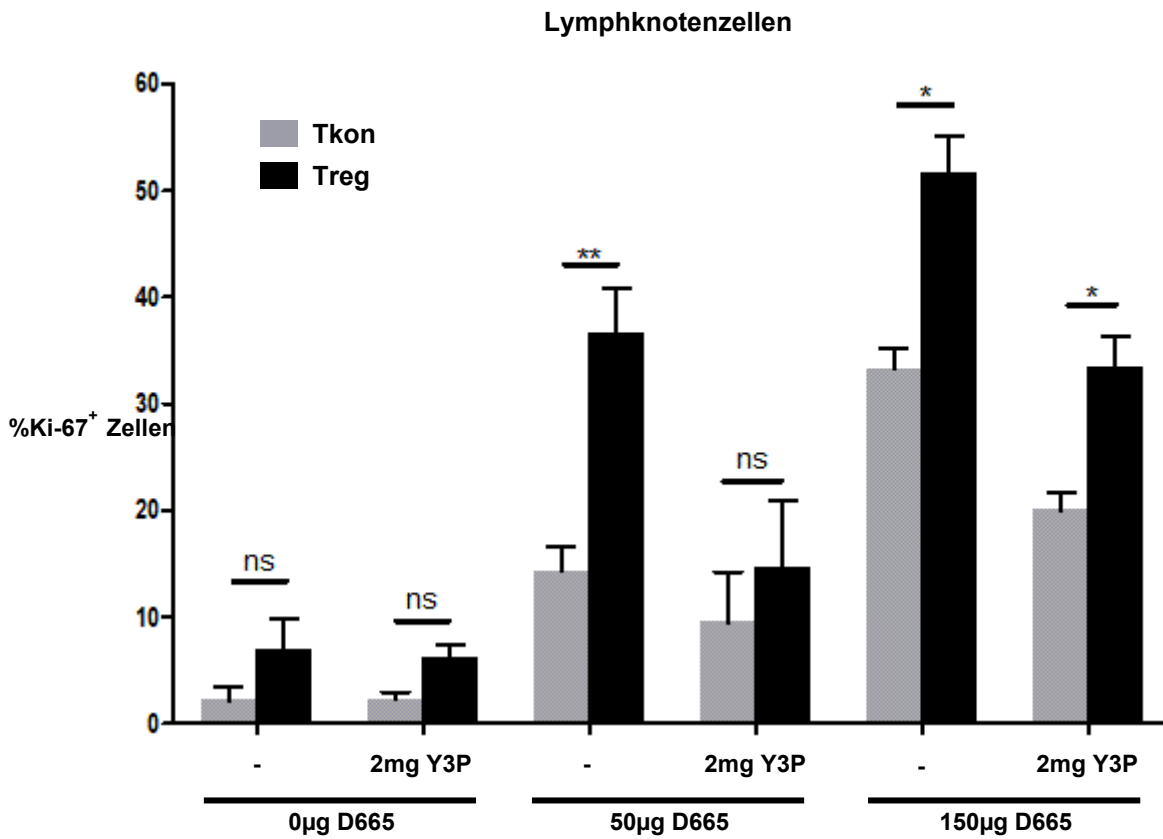


Abb. 22: Die in-vivo Behandlung mit dem kompletten Y3P Antikörper in C57BL/6-Mäusen reduziert die durch niedrige CD28SA Dosierungen induzierte Proliferation der regulatorischen T-Zellen

Proliferation der regulatorischen (Treg) und konventionellen T-Zellen (Tkon) anhand der Expression des nukleären Proliferationsmarkers Ki-67 im Vergleich zu unstimulierten Bedingungen (0 µg D665), niedrigen (50 µg D665) und hohen CD28SA Dosierungen (150 µg D665).

Two-way ANOVA: *P ≤ 0,05 und **P ≤ 0,01

3.5 In-vivo Versuch der MHC-II-Blockade mittels Y3P-Fab2-Fragmenten

Um einen durch den Fc-Teil der Y3P Antikörper vermittelten, depletierenden Effekt der I-A^b- exprimierenden Zellen zu vermeiden, wurden Experimente mit Y3P-Fab2 Fragmenten durchgeführt.

Um eine ausreichende Dosierung der Y3P-Fab2 Fragmente mit blockierender Wirkung der MHC-II-Moleküle zu erreichen, wurden wildtypische C57BL/6-Mäuse an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 1mg Y3P-Fab2 Fragmenten intraperitoneal behandelt (Versuchsübersicht Abb. 23). Durch die Behandlung mit Y3P-Fab2 Fragmenten konnte jedoch keine ausreichende Blockade der MHC-II-Moleküle erreicht werden (Abb. 24 b+c).

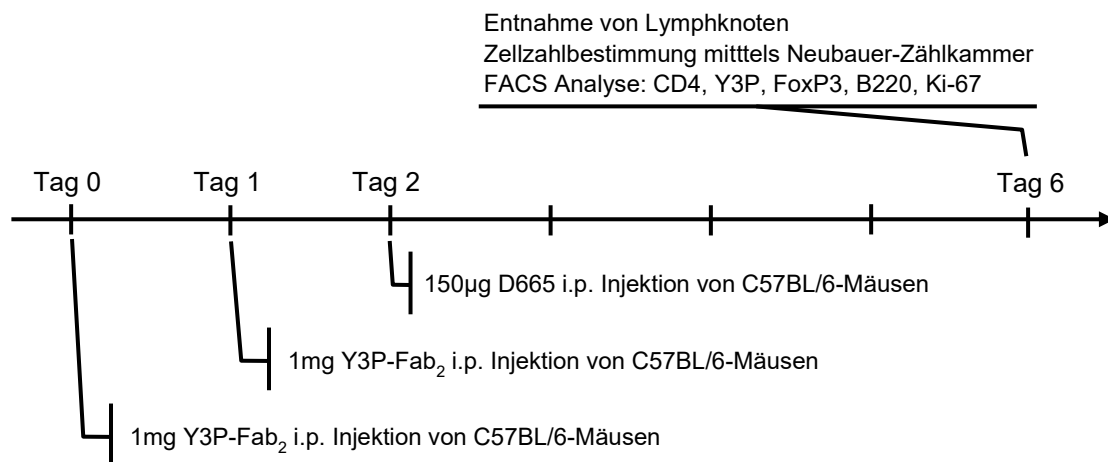


Abb. 23: Versuchsübersicht der MHC-II-Blockade in-vivo mittels Y3P-Fab2-Fragmenten in C57BL/6-Mäusen

Um auf eine ausreichende Dosierung Y3P-Fab2 Fragmente für eine blockierende Wirkung der MHC-II-Moleküle zu kommen, wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 + Tag 1) intraperitoneal in C57BL/6-Mäuse injiziert. Einem Teil der mit Y3P-Fab2 Fragmenten vorbehandelten C57BL/6-Mäusen wurde an Tag 2 eine hohe CD28SA-Dosis (150 µg D665) intraperitoneal injiziert. An Tag 6 erfolgten die Entnahme der Lymphknoten, die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer und nach entsprechender Färbung die FACS Analyse.

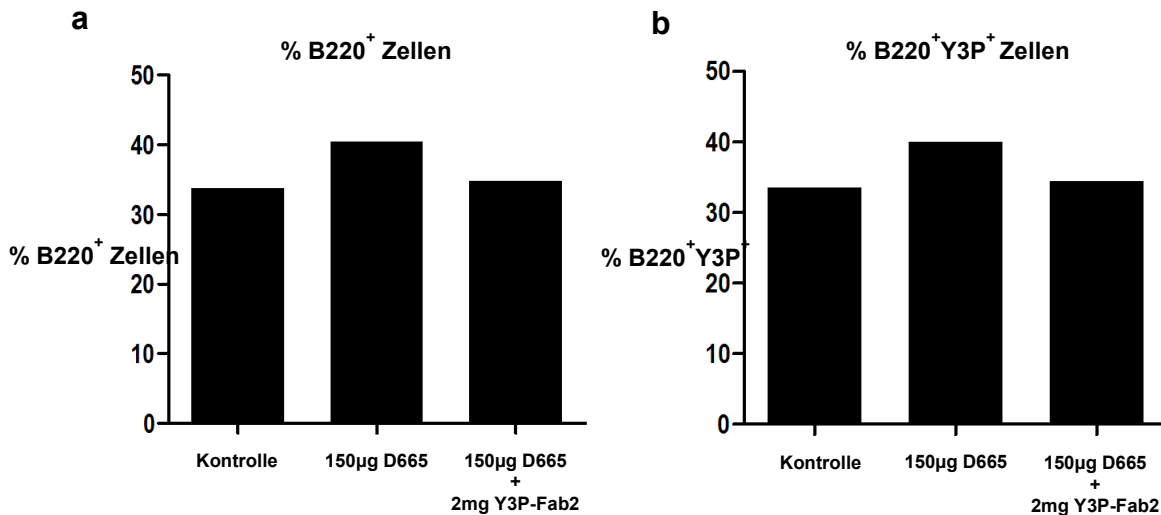


Abb. 24: Die in-vivo Behandlung von C57BL/6-Mäusen mit Y3P-Fab2-Fragmenten führte nicht zur Reduktion Y3P-bindender B-Zellen

(a) Das Histogramm zeigt den Anteil der B220⁺ Zellen.

(b) Abgebildet ist der Anteil der B220⁺Y3P⁺ Zellen. Dieser Anteil entspricht den B220⁺ Zellen, deren MHC-II-Moleküle nicht durch Y3P-Fab2-Fragmente gebunden sind und dadurch mit Y3P-FITC Antikörpern angefärbt werden können.

3.6 Die Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen in-vivo hebt die präferentielle Aktivierung der regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu konventionellen T-Zellen durch low dose CD28SA Therapie auf

Da eine weitere Steigerung der Dosis von Y3P-Fab2-Fragmenten technisch nicht möglich war, wurde stattdessen versucht, den depletierenden Effekt des kompletten Y3P Antikörpers durch Einsatz von Fc γ 1g-defizienten Mäusen (Fc γ 1g^{-/-}) zu umgehen. Dass der depletierende Effekt des kompletten Y3P Antikörpers auf Antigen-präsentierende Zellen in Fc γ 1g-defizienten Mäusen nicht auftritt, konnte bereits durch Andersson et. al gezeigt werden (Andersson et al. 2007).

Fc-Rezeptoren bilden eine Familie von Oberflächenmolekülen, die an den Fc-Teil von Immunglobulinen binden können. Für die verschiedenen Immunglobulin-Isotypen existieren unterschiedliche Fc-Rezeptoren. So binden beispielsweise Fc γ -Rezeptoren an IgG und Fc ϵ -Rezeptoren an IgE. Fc-Rezeptoren ermöglichen unter anderem die Phagozytose von Pathogenen, deren Oberfläche mit Antikörpern besetzt ist (Opsonisierung), durch Makrophagen, dendritische Zellen

und neutrophile Granulozyten. Des Weiteren vermitteln sie die Freisetzung von Mediatoren aus NK-Zellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Mastzellen, wenn deren Fc-Rezeptoren an auf Pathogenen gebundene Antikörper binden. Die Freisetzung von zytotoxischen Mediatoren kann dann zur Zerstörung der pathogenen Mikroorganismen führen (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) (Übersicht in Nimmerjahn and Ravetch 2007; Rosales and Uribe-Querol 2013).

Fcer1g^{-/-} Mäusen fehlt die γ -Kette der Fc γ RI, Fc γ RIII und Fc ϵ RI Rezeptoren. Die fehlende γ -Kette ist für die Expression dieser Rezeptoren an der Zelloberfläche essentiell (Takai et al. 1994).

Um den Effekt der MHC-Klasse-II-Blockade auf die T-Zellantwort mit niedrigen CD28SA-Dosen zu untersuchen, wurden 10 Millionen CFSE-markierte CD4⁺ T-Zellen von Wildtyp C57BL/6 Mäusen 6 Stunden nach i.p. Injektion von 2 mg komplettem Y3P Antikörper in Fcer1g^{-/-} Mäuse transferiert (adoptiver Zelltransfer). An Tag 1 nach der Y3P Behandlung erfolgte die i.p. Injektion von 25 μ g CD28SA, einer niedrigen CD28SA-Dosis, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie zu einer nachweisbaren Stimulation der T-Zellen führt und präferenziell die regulatorischen T-Zellen aktiviert (Gogishvili et al. 2009) (Versuchsübersicht Abb. 25).

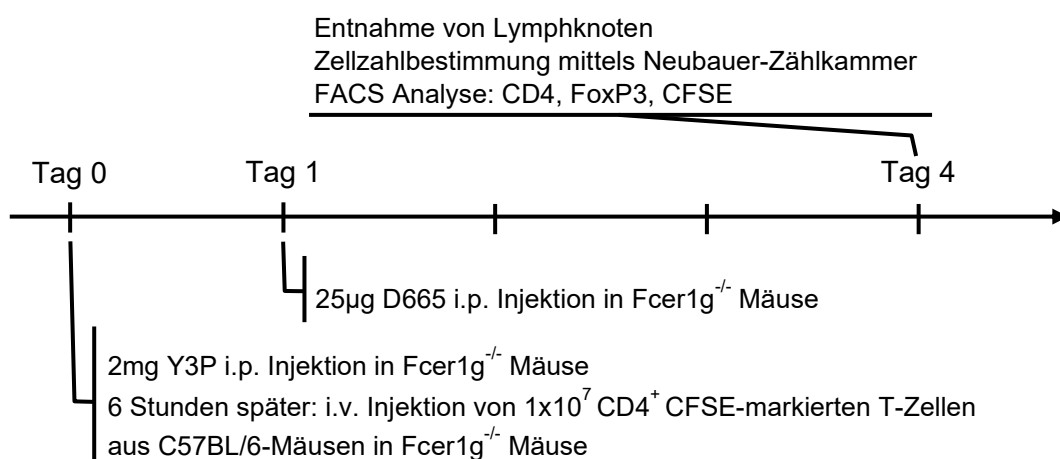


Abb. 25: Versuchsübersicht der MHC-II-Blockade in-vivo mittels kompletten Y3P Antikörpern in Fcer1g^{-/-} Mäusen

Zur MHC-II-Blockade wurden 2mg Y3P intraperitoneal in Fcer1g^{-/-} Mäuse injiziert. 6 Stunden danach wurde jeweils 1x10⁷ CD4⁺ CFSE-markierte T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen in Fcer1g^{-/-} Mäuse transferiert (Adoptiver Zelltransfer). An Tag 4 erfolgten die Entnahme der Lymphknoten, die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer und nach entsprechender Färbung die FACS Analyse. Mittels der CFSE-Verdünnung der transferierten Zellen wurde die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen (acd) bestimmt.

Bereits ohne Zugabe von CD28SA zeigten die Tregs eine signifikant höhere spontane Teilungsaktivität als die Tkon (Abb. 26, Abb. 27), ein Effekt, der in der Autoreaktivität der Tregs begründet liegt und durch die kostimulierende Wirkung der Erkennung von Selbstantigen/MHC-Komplexen entsteht (*costimulated self recognition*). Der monoklonale CD28 spezifische Superagonist verstärkt diese Aktivität um fast das 2-fache (Abb. 27). Durch die Y3P Behandlung wird dieser Effekt jedoch beinahe vollständig aufgehoben (Abb. 27). Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit niedrig dosiertem CD28SA unabhängig von der MHC-II-Blockade nur einen geringen Effekt auf die Proliferation der Tkon (Abb. 27).

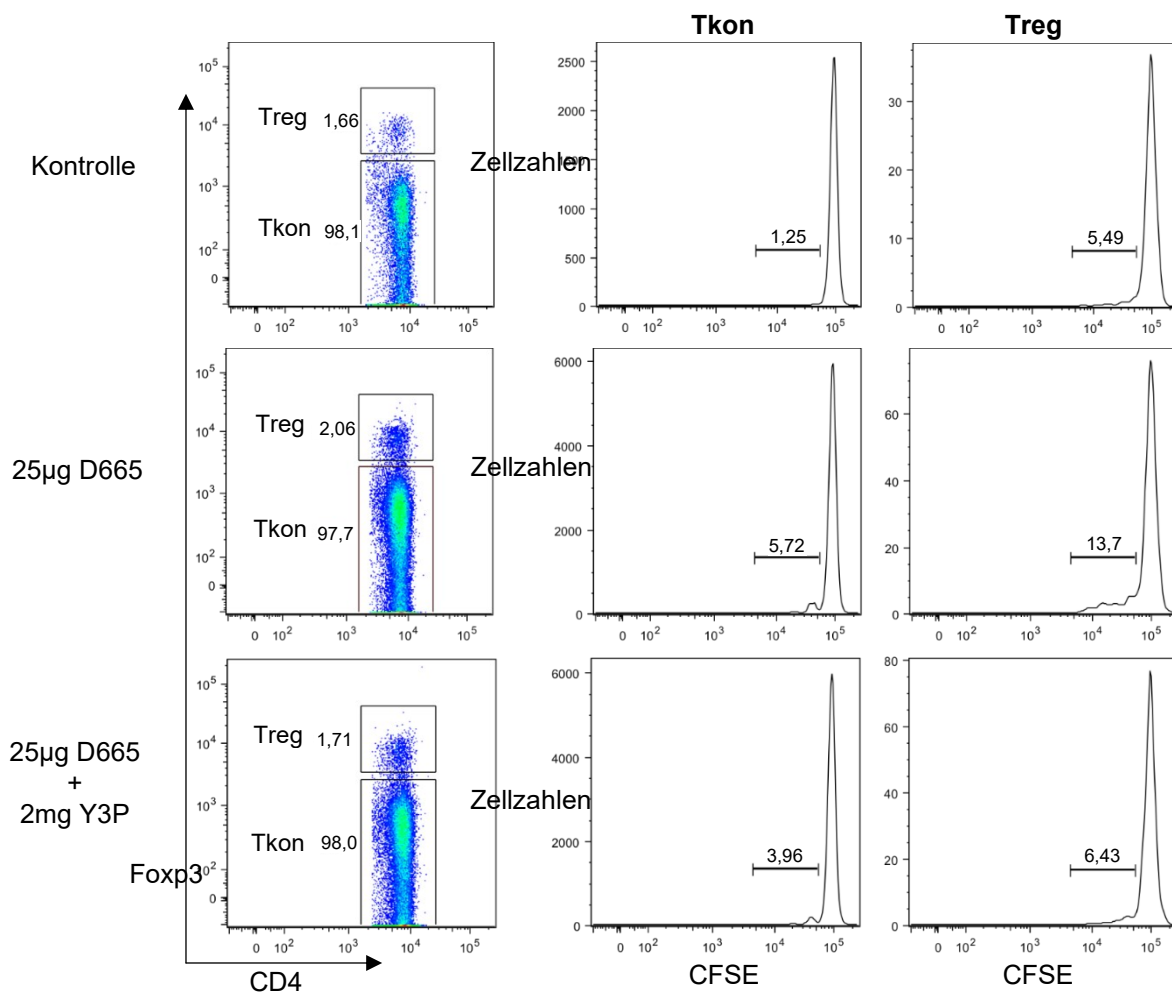


Abb. 26: MHC-II-Blockade mittels kompletten Y3P Antikörpern in-vivo in *Fcrl1g*^{-/-} Mäusen
 Durchflusszytometrische Analyse der Häufigkeit der regulatorischen (Foxp3⁺CD4⁺) und konventionellen (Foxp3⁻CD4⁺) T-Zellen (linke Spalte) aus C57BL/6-Mäusen nach adoptivem Zelltransfer in *Fcrl1g*^{-/-} Mäuse im Vergleich zwischen der unstimulierten Bedingung (Kontrolle, ohne Zugabe von D665), einer niedrigen (25µg D665) CD28SA Dosierung und der MHC-II-Blockade mittels kompletten Y3P Antikörpern und Stimulation mit einer niedrigen CD28SA Dosierung (25µg D665 + 2mg Y3P).
 Die Histogramme zeigen die Proliferation der regulatorischen (Foxp3⁺CD4⁺) und konventionellen (Foxp3⁻CD4⁺) T-Zellen (mittlere und rechte Spalte).

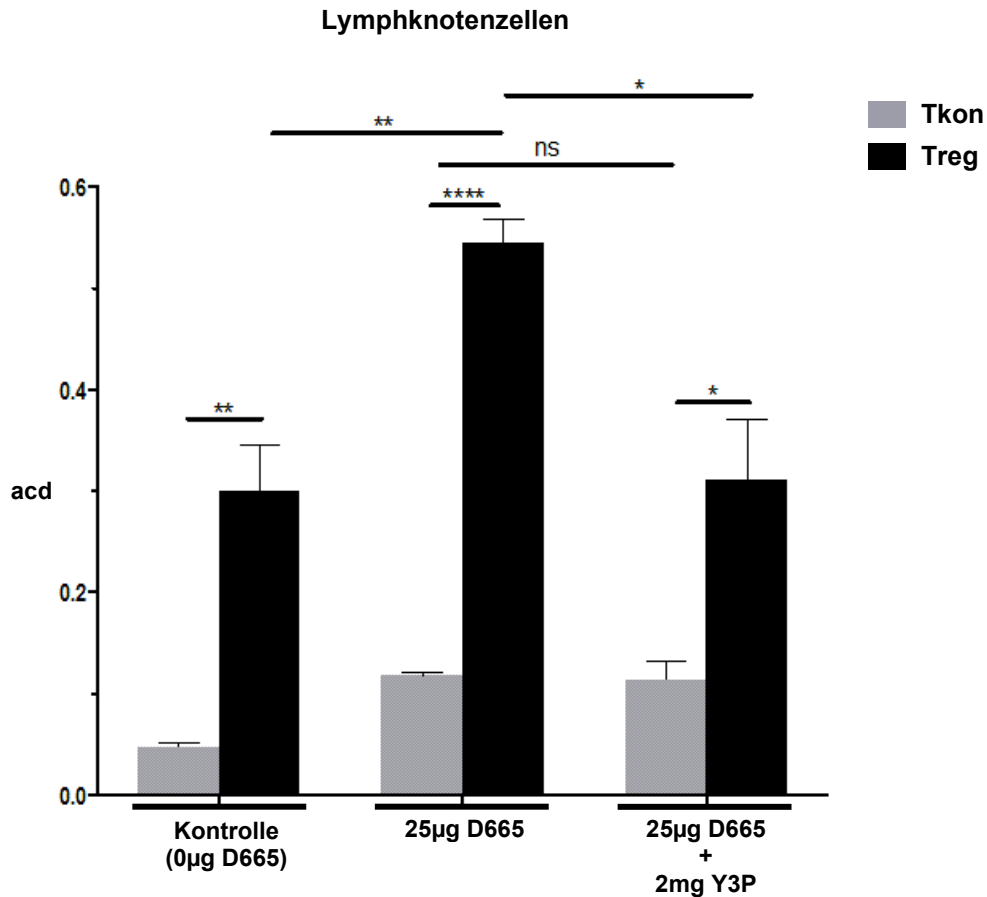


Abb. 27: Die MHC-II-Blockade in-vivo beeinträchtigt die durch niedrige CD28SA-Dosierungen induzierte Proliferation der regulatorischen T-Zellen

Proliferation der regulatorischen (Treg) und konventionellen T-Zellen (Tkon) aus C57BL/6-Mäusen nach adoptivem Zelltransfer in Fcεr1g^{-/-} Mäusen anhand der durchschnittlichen Anzahl der Zellteilungen (acd) im Vergleich zwischen unstimulierten Bedingungen (Kontrolle, ohne Zugabe von D665 (= 0µg D665)), einer niedrigen (25µg D665) CD28SA Dosierung und der MHC-II-Blockade mittels kompletten Y3P Antikörpern und Stimulation mit einer niedrigen CD28SA Dosierung (25µg D665 + 2mg Y3P).

Two-way ANOVA: *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01 und ***P ≤ 0,001

4. Diskussion

Obwohl die präferenzielle Aktivierung regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu konventionellen T-Zellen durch Stimulation mit superagonistischen CD28 spezifischen monoklonalen Antikörpern, insbesondere durch niedrige CD28SA-Dosierungen, bereits schon längere Zeit bekannt ist und inzwischen in Ratten (Lin and Hünig 2003), in Mäusen (Gogishvili et al. 2009) und für menschliche Zellen (Tabares et al. 2014) nachgewiesen werden konnte, wurde die Frage nach der mechanistischen Grundlage für diesen Effekt bislang noch nicht näher adressiert und untersucht.

Die Ursache hierfür könnte in der Autoreaktivität der regulatorischen T-Zellen liegen, wodurch diese Zellen aufgrund ihrer höheren Affinität gegenüber Selbstantigen/MHC-Komplexen (*self recognition*) stärkere Signale über ihren T-Zellrezeptor erhalten als konventionelle T-Zellen, die im Rahmen des MHC-Scannings nur schwache tonische Signale erhalten, solange sie nicht auf ihr passendes Antigen treffen.

Passend dazu weisen die Tregs im Vergleich zu den Tkons eine stärkere, konstitutive Phosphorylierung der TZR ζ -Kette auf (Andersson et al. 2007), eine Tatsache, die gut durch ihre höhere Reaktivität gegenüber Selbstantigenen erklärt werden kann. Die Blockade von MHC-II-Molekülen führt hingegen zu einer Reduktion der TZR ζ -Phosphorylierung der Tregs und der Tkons (Andersson et al. 2007).

Die daraus abgeleitete Hypothese lautet, dass durch den stärkeren TZR-Signalinput der Tregs, bedingt durch ihre Autoreaktivität, im Vergleich zu konventionellen T-Zellen, niedrigere CD28SA Dosierungen ausreichen, um die Tregs über ihre Aktivierungsschwelle zu heben und vollständig zu aktivieren.

Hohe CD28SA Konzentrationen führen zu einer ausgeprägten Quervernetzung von CD28-Molekülen, wodurch auch die schwachen tonischen Signale der Tkons so stark amplifiziert werden, dass auch diese Zellen aktiviert werden können.

Ein wichtiger Aspekt dabei ist, dass die CD28SA-Stimulation, nicht wie ursprünglich angenommen, unabhängig von TZR-Signalen ist, sondern im Gegenteil auf die Signalmaschinerie des T-Zellrezeptors absolut angewiesen ist

und die TZR-Signale durch die CD28SA-Stimulation auf Höhe des SLP76/VAV1/ITK Signalosoms amplifiziert werden (Dennehy et al. 2007; Levin et al. 2008).

Welche Bedeutung die CD28-vermittelte Kostimulation neben der höheren Reaktivität gegenüber Selbstantigenen für das Überleben und die Funktion der Tregs hat, zeigt sich auch darin, dass der kontinuierliche Turnover, den regulatorische T-Zellen in-vivo sowohl in Mäusen (Fisson et al. 2003; Walker et al. 2003) als auch im Menschen (Vukmanovic-Stejic et al. 2006) aufweisen, durch die Deletion von CD28 drastisch reduziert wird (Gogishvili et al. 2013).

Um die aufgestellte Hypothese zu überprüfen, wurden Experimente mit Lymphknotenzellen aus Mäusen durchgeführt, bei denen durch die Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen in-vitro und in-vivo der stärkere TZR-Signalinput, den die Tregs durch ihre höhere Affinität zu Selbstantigen/MHC-Komplexen erhalten, unterbunden wurde. Unter diesen Bedingungen wurde die Antwort der Tregs und der Tkons auf unterschiedliche CD28SA-Konzentrationen untersucht und mit der Situation ohne MHC-II-Blockade verglichen. In der Tat beeinträchtigt die Blockade der MHC-II-Erkennung durch den I-A^b-spezifischen monoklonalen Antikörper Y3P die Treg Antwort in-vitro (Abb. 15, Abb. 16, Abb. 17) und in-vivo (Abb. 26, Abb. 27). Dies zeigt sich insbesondere bei niedrigen CD28SA Dosierungen, für die die präferenzielle Aktivierung der Tregs im Vergleich zu den Tkons ohne MHC-II-Blockade am stärksten ausgeprägt ist.

Durch Experimente, bei denen eine Suspension aus CTV-markierten, wildtypischen Tkons und Tregs aus C57BL/6 Mäusen in H-2M Knockout Mäuse transferiert wurde, konnte die Hypothese, dass die Erkennung von Selbstpeptiden eine zentrale Rolle für die höhere Sensitivität der regulatorischen T-Zellen gegenüber der CD28SA-Stimulation spielt, weiter untermauert werden (Langenhorst et al. 2018). H-2M mutierte Mäuse exprimieren MHC-II-Moleküle, die durch einen Defekt in der Peptid-Beladung der MHC-Moleküle ausschließlich mit dem CLIP-Peptid beladen sind (Fung-Leung et al. 1996; Miyazaki et al. 1996). Dadurch wird den transferierten T-Zellen weiterhin ermöglicht tonische TZR-Signale zu erhalten, allerdings ist eine spezifische Antigenerkennung eines passenden Antigens (*cognate recognition*) sowohl für die Tkons als auch für die

Tregs nicht möglich. Der Vorteil davon ist, dass in diesem Modell keine monoklonalen Antikörper zur MHC-II-Blockade eingesetzt werden müssen und somit mögliche störende Effekte, die durch die monoklonalen Antikörper selbst vermittelt werden könnten, eliminiert werden.

Die Fähigkeit der regulatorischen T-Zellen durch niedrige CD28SA-Dosierungen aktiviert zu werden, die hingegen nicht ausreichen, um Tkons umfangreich zu aktivieren, ist bei den in die H-2M transferierten Tregs komplett aufgehoben. Hohe CD28SA-Dosierungen, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie die Proliferation sowohl der Tkons als auch der Tregs triggern, führten jedoch weiterhin zu einer vergleichbaren Aktivierung und Proliferation dieser beiden T-Zell-Subpopulationen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass sowohl die transferierten Tkons als auch die Tregs in H2-M Knockout Mäuse nur basale tonische TZR-Signale erhalten und dass deshalb beide Gruppen ein starkes CD28 Signal benötigen, um aktiviert werden zu können.

Darüber hinaus weisen die Versuche darauf hin, dass es die Erkennung von Selbst-Peptiden ist, die die regulatorischen T-Zellen hochsensitiv für die CD28SA-Stimulation macht.

Die Ergebnisse aus den Mausexperimenten konnten auch in in-vitro Versuchen mit menschlichen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC, *zirkulierende Lymphozyten und Monozyten*) in einem speziellen Zellkultursystem (RESTORE = *resetting T-cells to original reactivity*, siehe auch Seite 68) reproduziert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Unterbindung der MHC-II-Erkennung in-vitro das Ansprechen der Tregs und Tkons gegenüber der CD28SA-Stimulation beeinträchtigt. Dieser Effekt war auch in den Versuchen mit menschlichen PMBCs für niedrige CD28SA-Dosierungen, für die die bevorzugte Aktivierung der Tregs im Vergleich zu den Tkons besonders deutlich ist, am stärksten ausgeprägt (Langenhorst et al. 2018).

Die selektive Aktivierung von regulatorischen T-Zellen durch niedrige CD28SA-Dosierungen könnte als Therapiekonzept zur Behandlung einer Vielzahl von Autoimmun- und Entzündungserkrankungen ebenso wie von Transplantat-abstoßungsreaktionen interessant sein.

Die polyklonale CD28SA-Aktivierung der regulatorischen T-Zellen führt nicht nur zu einer numerischen Expansion, sondern auch zur Induktion der Effektorfunktionen der regulatorischen T-Zellen, wie der Produktion des immunsupprimierend und antiinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 (Langenhorst et al. 2012).

In verschiedenen Tiermodellen konnte bereits eine erfolgreiche Anwendung der CD28SA-vermittelten, polyklonalen Treg-Aktivierung gezeigt werden (Übersicht in Tabares et al. 2014), unter anderem in Modellen für Typ-1-Diabetes (van den Brandt et al. 2010), rheumatoide Arthritis (Rodríguez-Palmero et al. 2006), Multiple Sklerose (Beyersdorf et al. 2005a), Graft-versus-Host-Disease nach Knochenmarktransplantation (Beyersdorf et al. 2009; Kitazawa et al. 2010) sowie Transplantatabstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen (Azuma et al. 2008 (Nierentransplantation); Kitazawa et al. 2008 (Herztransplantation); Urakami et al. 2006 (Lebertransplantation)) und für infektionsassoziierte Entzündungsreaktionen (Guilliams et al. 2008).

Darüber hinaus konnte eine verbesserte Gewebeheilung im Mausmodell nach Herzinfarkt (Weirather et al. 2014) und Schlaganfall (Na et al. 2015) durch eine Behandlung mit CD28SA gezeigt werden.

Weiterhin wächst die Zahl von Erkrankungen, die mit einer auf regulatorischen T-Zellen basierenden Therapie effektiv behandelt werden könnten, stetig an. Beispiele hierfür sind Skelettmuskelverletzungen (Burzyn et al. 2013) und chronische Entzündungsreaktionen im Fettgewebe (Cipolletta et al. 2012).

Da wie bereits erwähnt die Autoreaktivität der regulatorischen T-Zellen eine wichtige Grundlage für ihre bevorzugte Aktivierung durch niedrige CD28SA Konzentrationen darstellt, könnten im Hinblick auf eine therapeutische CD28SA-Anwendung jedoch neben den Tregs auch autoreaktive, potenziell schädliche konventionelle T-Zellen durch niedrige CD28SA-Konzentrationen aktiviert werden und expandieren. Der protektive Effekt einer CD28SA-Therapie von Autoimmunerkrankungen könnte dadurch aufgehoben oder zumindest deutlich beeinträchtigt werden.

In den bisher untersuchten Tiermodellen konnte durch eine CD28SA-Therapie jedoch jeweils eine verminderte und keine verstärkte Autoimmunitätsreaktion beobachtet werden (Beyersdorf et al. 2015).

Zudem konnte in Versuchen mit CD4⁺ (OT-II) und CD8⁺ (OT-I) T-Zell-Rezeptor-transgenen konventionellen T-Zellen spezifisch für Ovalbumin nach Transfer in Mäuse, die Ovalbumin auf dendritischen Zellen exprimieren (CD11c-DOG Mäuse), gezeigt werden, dass diese wie zu erwarten ohne CD28SA-Behandlung stark proliferieren. Die CD28SA-Therapie führte zu einer starken Proliferation der regulatorischen T-Zellen, wohingegen die Anzahl der OT-I und OT-II-Zellen nicht vermehrt wurde, sondern vielmehr verringert. Die durch die CD28SA-Therapie aktivierten Tregs scheinen demzufolge in der Lage zu sein die Antwort der autoreaktiven T-Zellen (OT-I und OT-II-Zellen) effektiv unterdrücken und kontrollieren zu können (Langenhorst et al. 2018).

Im Rahmen einer Phase-1-Studie, des humanen CD28SA TGN1412 am Northwick-Hospital in London (Großbritannien) kam es 2006 (First-in-human, FIH) bedauerlicherweise bei allen sechs gesunden, freiwilligen Testpersonen durch eine massive Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IFN- λ IFN- γ und IL-6, zu einer lebensbedrohlichen akuten systemischen Entzündungsreaktion, die jeweils eine intensivmedizinische Behandlung notwendig machte (Suntharalingam et al. 2006).

In der Zwischenzeit konnten die Ursachen identifiziert werden, warum es durch die Behandlung mit dem voll humanisierten CD28SA TGN1412 bei den 6 gesunden Probanden zu diesem dramatischen Zytokinsturm kommen konnte.

In den durchgeführten Versuchen in Nagermodellen wurden jeweils keine unerwünschten Reaktionen beobachtet. In einer Toxizitätsstudie von TGN1412 in Cynomolgus-Makaken wurde eine bis zu 500-mal höhere TGN1412-Dosis appliziert als die verwendete TGN1412 Dosierung in den gesunden Testpersonen, ohne einen Zytokinsturm auszulösen. Eastwood und Mitarbeiter fanden heraus, dass die massive Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen beim Menschen aus CD4⁺-T-Effektor-Gedächtniszellen (*Effector Memory CD4⁺ T Cells, T_{EM}*) erfolgt (Eastwood et al. 2010).

Diese spezialisierten Zellen sind überwiegend in nicht-lymphatischen Geweben lokalisiert und sind in der Lage, nach Antigen-Wiedererkennung in kurzer Zeit inflammatorische Zytokine wie Interferon-gamma (IFN- λ) freizusetzen (Reinhardt et al. 2001);(Übersicht in Pepper and Jenkins 2011).

CD4⁺-T-Effektor-Gedächtniszellen exprimieren beim Menschen, nicht jedoch beim Cynomolgus-Makakken, CD28, das Zielmolekül von TGN1412. Aufgrund dieser Tatsache kam es im Rahmen der Toxizitätsstudie in den Cynomolgus-Makakken nicht zu einem Zytokinsturm.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass es in den Nagermodellen deshalb nicht zu einem Zytokinsturm kommt, weil die verwendeten Labortiere in sauberen Unterbringungen und Bedingungen gehalten werden und vergleichsweise sehr jung sind. Insgesamt existiert in diesen Tieren dadurch nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl von CD4⁺-T-Effektor-Gedächtniszellen, die deshalb wiederum effektiv durch die Tregs kontrolliert werden können (Gogishvili et al. 2009).

In Zellkulturversuchen mit menschlichen PBMCs konnte vor der FIH-Studie ebenfalls keine Freisetzung von toxischen Zytokinen durch Zugabe von CD28 Superagonisten beobachtet werden. Mittlerweile konnte als Ursache hierfür gezeigt werden, dass in den zu Anfang verwendeten Kulturbedingungen die T-Zellen kein tonisches Signal mehr erhalten (siehe Abschnitt 1.3 CD28 Superagonisten, Seite 8 ff.). In-vivo werden die tonischen Signale der T-Zellen durch das Abtasten von anderen Zellen im Gewebe erzeugt. Beim Übertritt in die Blutzirkulation gehen diese tonischen Signale verloren, da den T-Zellen dann ihre Interaktionspartner fehlen (Stefanova et al. 2002).

Durch kurzzeitige Kultivierung der PBMC in hoher Zelldichte können die tonischen Signale jedoch wieder generiert werden (Römer et al. 2011). Durch dieses Zellkultursystem (RESTORE) ist es dann wiederum möglich, die Effekte von CD28 Superagonisten (TAB08, früher TGN1412) auf konventionelle und regulatorische T-Zellen genauer untersuchen zu können.

Im RESTORE-Zellkultursystem konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von TAB08 zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und zu einer starken Aktivierung und Vermehrung der regulatorischen T-Zellen führt.

Die Reduktion der CD28SA-Dosierung auf eine Konzentration, die zu niedrig ist, um CD4⁺-T-Effektor-Gedächtniszellen zu aktivieren, ist jedoch noch ausreichend, um weiterhin eine effektive Stimulation der Tregs zu erzielen (Tabares et al. 2014).

Durch die Gabe von Methylprednisolon in therapeutischen Dosierungen konnte zwischenzeitlich gezeigt werden, dass die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine vollständig gehemmt werden kann. Die präferenzielle CD28SA Aktivierung der regulatorischen T-Zellen ist dadurch zwar vermindert, besteht jedoch weiterhin und ist deutlich stärker als die der konventionellen T-Zellen (Tabares et al. 2014).

In einer auf diesen Erkenntnissen basierenden, erneut durchgeführten Phase-I-Studie, in der deutlich niedrigere CD28SA Dosierungen verwendet, die Antikörper jeweils langsamer über einen längeren Zeitraum infundiert und nicht als Bolusgabe wie in London 2006 appliziert wurden, konnten bei den Probanden in keiner der getesteten TAB08-Dosierungen zirkulierende proinflammatorische Zytokine nachgewiesen werden. Schwerwiegende Zwischenfälle und unerwünschte Arzneimittelwirkungen traten nicht auf. Im verwendeten oberen TAB08-Dosierungsbereich konnte jedoch eine signifikante Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, welches zelltypisch für regulatorische T-Zellen ist, gemessen werden. Die maximal getestete TAB08-Dosierung betrug 7µg/kg KG und entsprach damit ungefähr einem Vierzehntel der in London 2006 verwendeten CD28SA-Dosierung (Tabares et al. 2014).

In einer nachfolgend durchgeführten Phase-IB-Studie an 18 Rheumapatienten zeigte sich ein positives Ansprechen (Clinical trials identifier: NCT01990157) (Tyrsin et al. 2016).

Neben dem Konzept der CD28SA-vermittelten polyklonalen Aktivierung und Proliferation regulatorischer T-Zellen werden weitere Ansätze verfolgt, regulatorische T-Zellen zu vermehren und die Treg-Aktivierung zu fördern. Beispiele sind IL-2/anti-IL-2 Komplexe im Mausmodell, die selektiv an den hochaffinen IL-2-Rezeptor binden (Übersicht in Boyman et al. 2006), oder Tregalizumab (BT-061), ein humanisierter CD4-spezifischer monoklonaler Antikörper (Helling et al. 2015);(Übersicht in König et al. 2016).

Die bereits gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung der Erkennung von Selbstpeptiden der Tregs über MHC-II-Moleküle als wichtige Grundlage für ihre höhere Sensitivität gegenüber der Stimulation mit niedrigen CD28 Dosierungen. Wahrscheinlich tragen jedoch noch weitere Effekte wie Zell-intrinsische Unterschiede der Signalkaskaden der Tregs und Tcons (Übersicht in Mikami and Sakaguchi 2014) sowie die Fähigkeit der Tregs, IL-2 sehr effektiv über ihre hochaffinen IL-2 Rezeptoren abzugreifen (Übersicht in Scheffold et al. 2005), zu der überlegenen Expansion und Aktivierung der Tregs durch niedrige CD28SA Dosierungen bei. Hier sind sicherlich auch weitere Untersuchungen notwendig, um die genauen Wirkmechanismen noch weiter zu beleuchten.

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse könnten zur weiteren Entwicklung einer CD28SA-basierten Therapie zur selektiven Aktivierung von regulatorischen T-Zellen beitragen, die übereinstimmend mit den bereits nachgewiesenen Behandlungserfolgen in den korrespondierenden Nagermodellen zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen Anwendung finden könnte und diese Erkrankungen effektiv kontrollieren oder sogar heilen könnte.

Darüber hinaus sind weitere Nachforschungen notwendig, um die mechanistischen Hintergründe der bevorzugten Treg-Aktivierung durch niedrige CD28SA Dosierungen auf molekularer Ebene noch besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

In Ratten und Mäusen aktiviert der superagonistische anti-CD28 monoklonale Antikörper (CD28SA) vorzugsweise regulatorische T-Zellen. In niedriger Dosierung führt CD28SA zu einer fast ausschließlichen Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs). Diese Beobachtung konnte inzwischen auch für menschliche Zellen in Zellkultur bestätigt werden.

In gesunden und freiwilligen Testpersonen deutet die Zytokin-Antwort nach Applikationen von niedrigen CD28SA-Dosen darauf hin, dass sich diese Beobachtung auch in-vivo bewahrheitet. Eine Gabe von CD28SA in niedriger Dosierung, die zu einer exklusiven Aktivierung von regulatorischen T-Zellen führt, könnte somit in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder von entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden.

Eine mechanistische Erklärung für dieses Phänomen blieb lange Zeit unklar. Die CD28SA-vermittelte T-Zell-Aktivierung ist abhängig von der Verstärkung von basalen tonischen Signalen, die T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor erhalten. Diese Tatsache führte zu der Hypothese, dass die schwachen, tonischen Signale, die konventionelle CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit ihrer spezifischen Antigene über den T-Zell-Rezeptor erhalten, ein stärkeres CD28 Signal für ihre Aktivierung benötigen als die selbstreaktiven regulatorischen T-Zellen, die ein stärkeres Selbstpeptid-TCR Signal erhalten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Blockade von MHC-Klasse-II-Molekülen in Mäusen, in-vitro und in-vivo, den Vorteil der regulatorischen T-Zellen gegenüber den konventionellen T-Zellen bezüglich der Antwort auf niedrige CD28SA Dosierungen, aufhebt.

6. Summary

In rats and mice, CD28 superagonistic mAb (CD28SA) preferentially activate regulatory T-cells, resulting in near exclusive Treg activation at low CD28SA doses. This observation has recently also been extended to cell culture studies in humans, and the cytokine response of healthy volunteers to low-dose CD28SA application suggests that it also holds true *in vivo*, and thus can be utilized for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. A mechanistic explanation for this phenomenon, however, remained uncertain for a long time. Given that CD28SA-mediated T-cell activation depends on the amplification of basal tonic TCR signals, the hypothesis was tested that the weak tonic TCR signals received by conventional CD4 T-cells in absence of their cognate antigen require more CD28 signalling input than the stronger TCR signals perceived by self-reactive regulatory T-cells.

The experiments of this thesis provide strong evidence that in mice, blockade of MHC class II *in vitro* or *in vivo* abrogates the advantage of Treg over Tconv in the response to low CD28SA doses.

7. Abkürzungsverzeichnis

acd	average cell divisions
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin / bovine serum albumin
BSS	Balanced salt solution
CD	Cluster of differentiation
CD3	assoziiert mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen (TZR)
CD4	Corezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle
CD8	Corezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle
CD25	α -Kette des IL-2-Rezeptors
CD28	Rezeptor für costimulierendes Signal (Signal 2), bindet CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2)
α CD28 mAK	konventionelle, CD28-spezifische monoklonale Antikörper
CD28SA	CD28-spezifische, superagonistische, monoklonale Antikörper
CD39	Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1 (ENTPD1) ATPDase; NTPDase1
CD73	Ekto-5'-Nucleotidase (E5NT)
CD122	β -Kette des IL-2-Rezeptors
CD132	γ -Kette des IL-2-Rezeptors
CD152	CTLA-4 (<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>)
CFSE	Carboxy-Fluoreszeindiacetat-Succinimidyl-Ester
CTL	zytotoxische T-Zellen (<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>)
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (=CD152)
CTV	Cell Trace Violet
DZ	Dendritische Zelle

FACS	fluorescence-activated cell sorting/sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKBP12	FK Binding Protein-12
Foxp3	Forkhead box P3
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPEX-Syndrom	immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
ITK	Interleukin-2-inducible T-cell Kinase
KG	Körpergewicht
LAT	Linker for Activation of T-cells
mAk	monoklonale Antikörper
MFI	mittlere fluorescence intensity, Durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
mTor	mammalian Target of rapamycin
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphat buffered saline
PRR	Pattern recognition receptor
RESTORE	resetting T-cells to original reactivity
SC	Synthetic Complete (SC) Medium
SLAP76	SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SMAC	Supramolecular activation cluster
TCGF	T cell growth factor (= IL-2)
Th17	T-Helferzelle Typ 17
Tkonv	Konventionelle T-Zellen

TLR	Toll-like receptor
Tr1	Treg type 1
Treg	Regulatorische T-Zelle
α TZR	monoklonale Antikörper spezifisch für den T-Zellrezeptor
TZR	T-Zellrezeptor
U	Units

8. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Benoist, C., Bluestone, J. A., Campbell, D. J., Ghosh, S., Hori, S., Jiang, S., Kuchroo, V. K., Mathis, D., Roncarolo, M. G., Rudensky, A., Sakaguchi, S., Shevach, E. M., Vignali, D. A. and Ziegler, S. F. (2013) Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 14 (4), 307-8.
- Abbas, A. K., Trotta, E., R Simeonov, D., Marson, A. and Bluestone, J. A. (2018) Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Science immunology* 3 (25), eaat1482.
- Adams, E. J., Chien, Y. H. and Garcia, K. C. (2005) Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science* 308 (5719), 227-31.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. and Nalbant, A. (2017) Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 37 (2), 163-176.
- Alcover, A., Alarcon, B. and Di Bartolo, V. (2018) Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annu Rev Immunol* 36, 103-125.
- Alegre, M. L., Frauwirth, K. A. and Thompson, C. B. (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 1 (3), 220-8.
- Andersson, J., Stefanova, I., Stephens, G. L. and Shevach, E. M. (2007) CD4+CD25+ regulatory T cells are activated in vivo by recognition of self. *Int Immunol* 19 (4), 557-66.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E. and Romagnani, S. (2008) The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 20 (11), 1361-8.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S. and Haskó, G. (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine* 19 (6), 355-367.
- Apostolou, I. and von Boehmer, H. (2004) In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199 (10), 1401-8.
- Azuma, H., Isaka, Y., Li, X., Hünig, T., Sakamoto, T., Nohmi, H., Takabatake, Y., Mizui, M., Kitazawa, Y., Ichimaru, N., Ibuki, N., Ubai, T., Inamoto, T., Katsuoka, Y. and Takahara, S. (2008) Superagonistic CD28 antibody induces donor-specific tolerance in rat renal allografts. *Am J Transplant* 8 (10), 2004-14.
- Bacchetta, R., Barzaghi, F. and Roncarolo, M. G. (2018) From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. *Ann N Y Acad Sci* 1417 (1), 5-22.

- Barzaghi, F., Amaya Hernandez, L. C. and Neven, B. (2018) Long-term follow-up of IPEX syndrome patients after different therapeutic strategies: An international multicenter retrospective study. *The Journal of allergy and clinical immunology* 141 (3), 1036-1049.e5.
- Barzaghi, F., Passerini, L. and Bacchetta, R. (2012) Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity. *Front Immunol* 3, 211.
- Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R. and Roncarolo, M.-G. (2006) Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Seminars in immunology* 18 (2), 120-127.
- Baxter, A. G. and Hodgkin, P. D. (2002) Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat Rev Immunol* 2 (6), 439-46.
- Belkaid, Y. and Rouse, B. T. (2005) Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 6 (4), 353-60.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F. and Ochs, H. D. (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27 (1), 20-1.
- Benson, M. J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M. and Noelle, R. J. (2007) All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 204 (8), 1765-74.
- Beyersdorf, N., Ding, X., Hünig, T. and Kerkau, T. (2009) Superagonistic CD28 stimulation of allogeneic T cells protects from acute graft-versus-host disease. *Blood* 114 (20), 4575-82.
- Beyersdorf, N., Gaupp, S., Balbach, K., Schmidt, J., Toyka, K. V., Lin, C. H., Hanke, T., Hünig, T., Kerkau, T. and Gold, R. (2005a) Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 202 (3), 445-55.
- Beyersdorf, N., Hanke, T., Kerkau, T. and Hünig, T. (2005b) Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 4, iv91-5.
- Beyersdorf, N., Kerkau, T. and Hünig, T. (2015) CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther* 4, 111-22.
- Bischof, A., Hara, T., Lin, C. H., Beyers, A. D. and Hünig, T. (2000) Autonomous induction of proliferation, JNK and NF-alphaB activation in primary resting T cells by mobilized CD28. *Eur J Immunol* 30 (3), 876-82.

- Bleesing, J. J. and Fleisher, T. A. (2003) Human B cells express a CD45 isoform that is similar to murine B220 and is downregulated with acquisition of the memory B-cell marker CD27. *Cytometry B Clin Cytom* 51 (1), 1-8.
- Bluestone, J. A. and Abbas, A. K. (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology* 3, 253.
- Bluestone, J. A., Buckner, J. H., Fitch, M., Gitelman, S. E., Gupta, S., Hellerstein, M. K., Herold, K. C., Lares, A., Lee, M. R., Li, K., Liu, W., Long, S. A., Masiello, L. M., Nguyen, V., Putnam, A. L., Rieck, M., Sayre, P. H. and Tang, Q. (2015) Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science translational medicine* 7 (315), 315ra189-315ra189.
- Bluestone, J. A., St Clair, E. W. and Turka, L. A. (2006) CTLA4Ig: bridging the basic immunology with clinical application. *Immunity* 24 (3), 233-8.
- Blum, J. S., Wearsch, P. A. and Cresswell, P. (2013) Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 31, 443-73.
- Bonilla, F. A. and Oettgen, H. C. (2010) Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2), S33-40.
- Bour-Jordan, H., Esensten, J. H., Martinez-Llordella, M., Penaranda, C., Stumpf, M. and Bluestone, J. A. (2011) Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunol Rev* 241 (1), 180-205.
- Boyman, O. and Sprent, J. (2012) The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12 (3), 180-90.
- Boyman, O., Surh, C. D. and Sprent, J. (2006) Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. *Expert Opin Biol Ther* 6 (12), 1323-31.
- Bretscher, P. and Cohn, M. (1970) A theory of self-nonself discrimination. *Science* 169 (3950), 1042-9.
- Brownlie, R. J. and Zamoyska, R. (2013) T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* 13 (4), 257-69.
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I. and Kagan, J. C. (2015) Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol* 33, 257-90.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F. and Ramsdell, F. (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27 (1), 68-73.

- Burzyn, D., Kuswanto, W., Kolodin, D., Shadrach, J. L., Cerletti, M., Jang, Y., Sefik, E., Tan, T. G., Wagers, A. J., Benoist, C. and Mathis, D. (2013) A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* 155 (6), 1282-95.
- Campbell, D. J. and Koch, M. A. (2011) Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 11 (2), 119-30.
- Chaplin, D. D. (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2), S3-23.
- Charbonnier, L.-M., Cui, Y., Stephen-Victor, E., Harb, H., Lopez, D., Bleesing, J. J., Garcia-Lloret, M. I., Chen, K., Ozen, A., Carmeliet, P., Li, M. O., Pellegrini, M. and Chatila, T. A. (2019) Functional reprogramming of regulatory T cells in the absence of Foxp3. *Nature immunology* 20 (9), 1208-1219.
- Chatila, T. A., Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H. M., Voulgaropoulos, C., Helms, C. and Bowcock, A. M. (2000) JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 106 (12), R75-81.
- Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R. M., Liang, Y., Kas, A. and Rudensky, A. Y. (2009) CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326 (5955), 986-91.
- Chen, L. (2004) Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4 (5), 336-47.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. and Wahl, S. M. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198 (12), 1875-86.
- Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A. and Weiner, H. L. (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265 (5176), 1237-40.
- Chien, Y. H., Jores, R. and Crowley, M. P. (1996) Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol* 14, 511-32.
- Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D. and Rudensky, A. Y. (2016) An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol* 17 (11), 1322-1333.
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R. I., Martinez, G. J., Rawal, S., Wang, Y. H., Lim, H., Reynolds, J. M., Zhou, X. H., Fan, H. M., Liu, Z. M., Neelapu, S. S. and Dong, C. (2011) Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med* 17 (8), 983-8.

- Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S. E., Benoist, C. and Mathis, D. (2012) PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486 (7404), 549-53.
- Coffman, R. L. and Weissman, I. L. (1981) B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* 289, 681.
- Collins, A. V., Brodie, D. W., Gilbert, R. J., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D. I., van der Merwe, P. A. and Davis, S. J. (2002) The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17 (2), 201-10.
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y. and Powrie, F. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204 (8), 1757-64.
- Cunningham, A. J. and Lafferty, K. J. (1977) A simple conservative explanation of the H-2 restriction of interactions between lymphocytes. *Scand J Immunol* 6 (1-2), 1-6.
- d'Hennezel, E., Bin Dhuban, K., Torgerson, T. and Piccirillo, C. A. (2012) The immunogenetics of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 49 (5), 291-302.
- Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J. and Shevach, E. M. (2007) Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 178 (7), 4022-6.
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B. and Robson, S. C. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204 (6), 1257-65.
- Dempsey, P. W., Vaidya, S. A. and Cheng, G. (2003) The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci* 60 (12), 2604-21.
- Dennehy, K. M., Elias, F., Na, S. Y., Fischer, K. D., Hünig, T. and Lühder, F. (2007) Mitogenic CD28 signals require the exchange factor Vav1 to enhance TCR signaling at the SLP-76-Vav-Itk signalosome. *J Immunol* 178 (3), 1363-71.
- Dennehy, K. M., Elias, F., Zeder-Lutz, G., Ding, X., Altschuh, D., Lühder, F. and Hünig, T. (2006) Cutting edge: monovalency of CD28 maintains the antigen dependence of T cell costimulatory responses. *J Immunol* 176 (10), 5725-9.
- Dennehy, K. M., Kerstan, A., Bischof, A., Park, J. H., Na, S. Y. and Hünig, T. (2003) Mitogenic signals through CD28 activate the protein kinase Ctheta-

- NF-kappaB pathway in primary peripheral T cells. *Int Immunol* 15 (5), 655-63.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T. and Schuler, G. (2001) Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193 (11), 1303-10.
- Dominguez-Villar, M. and Hafler, D. A. (2018) Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol* 19 (7), 665-673.
- Dustin, M. L. (2014) What counts in the immunological synapse? *Mol Cell* 54 (2), 255-62.
- Eastwood, D., Findlay, L., Poole, S., Bird, C., Wadhwa, M., Moore, M., Burns, C., Thorpe, R. and Stebbings, R. (2010) Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. *Br J Pharmacol* 161 (3), 512-26.
- Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A. and Bluestone, J. A. (2016) CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* 44 (5), 973-88.
- Esterhazy, D., Loschko, J., London, M., Jove, V., Oliveira, T. Y. and Mucida, D. (2016) Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T(reg) cells and tolerance. *Nat Immunol* 17 (5), 545-55.
- Evans, E. J., Esnouf, R. M., Manso-Sancho, R., Gilbert, R. J., James, J. R., Yu, C., Fennelly, J. A., Vowles, C., Hanke, T., Walse, B., Hünig, T., Sorensen, P., Stuart, D. I. and Davis, S. J. (2005) Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex. *Nat Immunol* 6 (3), 271-9.
- Feng, Y., Arvey, A., Chinen, T., van der Veecken, J., Gasteiger, G. and Rudensky, A. Y. (2014) Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus. *Cell* 158 (4), 749-763.
- Ferreira, L. M. R., Muller, Y. D., Bluestone, J. A. and Tang, Q. (2019) Next-generation regulatory T cell therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 18 (10), 749-769.
- Fisson, S., Darrasse-Jeze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R. and Salomon, B. L. (2003) Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198 (5), 737-46.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H. D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A. and Huehn, J. (2007) Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5 (2), e38.

- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4 (4), 330-6.
- Fooksman, D. R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D. A., Waite, J., Sacristan, C., Victora, G. D., Zanin-Zhorov, A. and Dustin, M. L. (2010) Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol* 28, 79-105.
- Fritsche, E., Volk, H.-D., Reinke, P. and Abou-El-Enein, M. (2020) Toward an Optimized Process for Clinical Manufacturing of CAR-Treg Cell Therapy. *Trends in Biotechnology* 38 (10), 1099-1112.
- Fukaura, H., Kent, S. C., Pietrusewicz, M. J., Khoury, S. J., Weiner, H. L. and Hafler, D. A. (1996) Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 98 (1), 70-7.
- Fung-Leung, W. P., Surh, C. D., Liljedahl, M., Pang, J., Leturcq, D., Peterson, P. A., Webb, S. R. and Karlsson, L. (1996) Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice. *Science* 271 (5253), 1278-81.
- Gaffen, S. L., Jain, R., Garg, A. V. and Cua, D. J. (2014) The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature Reviews Immunology* 14 (9), 585-600.
- Gallo, R. L. and Hooper, L. V. (2012) Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 12 (7), 503-16.
- Gavin, M. A., Torgerson, T. R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W. Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E. L., Greenberg, P. D., Ochs, H. D. and Rudensky, A. Y. (2006) Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (17), 6659-64.
- Germain, R. N. (2002) T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology* 2, 309.
- Gershon, R. K. and Kondo, K. (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18 (5), 723-37.
- Gershon, R. K. and Kondo, K. (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21 (6), 903-14.
- Glocker, E.-O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N. and Grimbacher, B. (2011) IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1246, 102-107.

- Gogishvili, T., Langenhorst, D., Lühder, F., Elias, F., Elflein, K., Dennehy, K. M., Gold, R. and Hünig, T. (2009) Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28 superagonist treated mice. *PLoS One* 4 (2), e4643.
- Gogishvili, T., Lühder, F., Goebbels, S., Beer-Hammer, S., Pfeffer, K. and Hünig, T. (2013) Cell-intrinsic and -extrinsic control of Treg-cell homeostasis and function revealed by induced CD28 deletion. *Eur J Immunol* 43 (1), 188-93.
- Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. and Noelle, R. J. (2005) Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174 (4), 1783-6.
- Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. and Vinuesa, C. G. (2005) Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435 (7042), 590-7.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M. and Dustin, M. L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285 (5425), 221-7.
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P. and Ley, T. J. (2004) Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21 (4), 589-601.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E. and Roncarolo, M. G. (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389 (6652), 737-42.
- Guilliams, M., Bosschaerts, T., Herin, M., Hünig, T., Loi, P., Flamand, V., De Baetselier, P. and Beschin, A. (2008) Experimental expansion of the regulatory T cell population increases resistance to African trypanosomiasis. *J Infect Dis* 198 (5), 781-91.
- Hara, T., Fu, S. M. and Hansen, J. A. (1985) Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J Exp Med* 161 (6), 1513-24.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D. and Hayakawa, K. (1991) Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 173 (5), 1213-25.
- Haribhai, D., Williams, J. B., Jia, S., Nickerson, D., Schmitt, E. G., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Yassai, M., Li, S. H., Relland, L. M., Wise, P. M., Chen, A., Zheng, Y. Q., Simpson, P. M., Gorski, J., Salzman, N. H., Hessner, M. J., Chatila, T. A. and Williams, C. B. (2011) A requisite role for induced

- regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 35 (1), 109-22.
- Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Johnson, L. L., Swain, S. L. and Lund, F. E. (2000) Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 1 (6), 475-82.
- Hartemann, A., Bensimon, G., Payan, C. A., Jacqueminet, S., Bourron, O., Nicolas, N., Fonfrede, M., Rosenzweig, M., Bernard, C. and Klatzmann, D. (2013) Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Diabetes & endocrinology* 1 (4), 295-305.
- Hathcock, K. S., Hirano, H., Murakami, S. and Hodes, R. J. (1992) CD45 expression by B cells. Expression of different CD45 isoforms by subpopulations of activated B cells. *The Journal of Immunology* 149 (7), 2286.
- Helling, B., König, M., Dälken, B., Engling, A., Krömer, W., Heim, K., Wallmeier, H., Haas, J., Wildemann, B., Fritz, B., Jonuleit, H., Kubach, J., Dingermann, T., Radeke, H. H., Osterroth, F., Uherek, C., Czeloth, N. and Schüttrumpf, J. (2015) A specific CD4 epitope bound by tregalizumab mediates activation of regulatory T cells by a unique signaling pathway. *Immunology & Cell Biology* 93 (4), 396-405.
- Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299 (5609), 1057-61.
- Hsieh, C. S., Liang, Y., Tyznik, A. J., Self, S. G., Liggitt, D. and Rudensky, A. Y. (2004) Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 21 (2), 267-77.
- Hsieh, C. S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J. D. and Rudensky, A. Y. (2006) An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* 7 (4), 401-10.
- Humrich, J. Y., von Spee-Mayer, C., Siegert, E., Alexander, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Burmester, G.-R. and Riemekasten, G. (2015) Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE. *Annals of the rheumatic diseases* 74 (4), 791-792.
- Hünig, T. (2007) Manipulation of Regulatory T-Cell Number and Function with CD28-Specific Monoclonal Antibodies. *Advances in Immunology*. 111-148.
- Hünig, T. and Dennehy, K. (2005) CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential. *Immunol Lett* 100 (1), 21-8.

- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J. and Littman, D. R. (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126 (6), 1121-1133.
- Janeway, C. A., Jr., Conrad, P. J., Lerner, E. A., Babich, J., Wettstein, P. and Murphy, D. B. (1984) Monoclonal antibodies specific for Ia glycoproteins raised by immunization with activated T cells: possible role of T cellbound Ia antigens as targets of immunoregulatory T cells. *J Immunol* 132 (2), 662-7.
- Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Jiang, S., Game, D. S., Davies, D., Lombardi, G. and Lechler, R. I. (2005) Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells? *Eur J Immunol* 35 (4), 1193-200.
- Joffre, O., Nolte, M. A., Spörri, R. and Reis e Sousa, C. (2009) Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227 (1), 234-47.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J. and Enk, A. H. (2001) Identification and functional characterization of human CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193 (11), 1285-94.
- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F. and Rudensky, A. Y. (2012) Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 30, 531-64.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11 (5), 373-84.
- Kawai, T. and Akira, S. (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34 (5), 637-50.
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S. A. and Ramsdell, F. (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4 (4), 337-42.
- Kim, Y. C., Bhairavabhotla, R., Yoon, J., Golding, A., Thornton, A. M., Tran, D. Q. and Shevach, E. M. (2012) Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion. *Blood* 119 (12), 2810-2818.
- Kitazawa, Y., Fujino, M., Sakai, T., Azuma, H., Kimura, H., Isaka, Y., Takahara, S., Hünig, T., Abe, R. and Li, X. K. (2008) Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody can prevent rat cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 27 (4), 362-71.

- Kitazawa, Y., Li, X. K., Liu, Z., Kimura, H., Isaka, Y., Hünig, T. and Takahara, S. (2010) Prevention of graft-versus-host diseases by in vivo supCD28mAb-expanded antigen-specific nTreg cells. *Cell Transplant* 19 (6), 765-74.
- Kitz, A., Singer, E. and Hafler, D. (2018) Regulatory T Cells: From Discovery to Autoimmunity. *Cold Spring Harb Perspect Med*.
- Klatzmann, D. and Abbas, A. K. (2015) The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology* 15 (5), 283-294.
- Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B. and Campbell, D. J. (2009) The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10 (6), 595-602.
- König, M., Rharbaoui, F., Aigner, S., Dälken, B. and Schüttrumpf, J. (2016) Tregalizumab - A Monoclonal Antibody to Target Regulatory T Cells. *Frontiers in immunology* 7, 11-11.
- Konkel, J. E., Zhang, D., Zanvit, P., Chia, C., Zangarle-Murray, T., Jin, W., Wang, S. and Chen, W. (2017) Transforming Growth Factor- β Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. *Immunity* 46 (4), 660-674.
- Koreth, J., Matsuoka, K.-i., Kim, H. T., McDonough, S. M., Bindra, B., Alyea, E. P., 3rd, Armand, P., Cutler, C., Ho, V. T., Treister, N. S., Bienfang, D. C., Prasad, S., Tzachanis, D., Joyce, R. M., Avigan, D. E., Antin, J. H., Ritz, J. and Soiffer, R. J. (2011) Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine* 365 (22), 2055-2066.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C. and von Boehmer, H. (2005) Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6 (12), 1219-27.
- Krummel, M. F. and Allison, J. P. (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182 (2), 459-65.
- Kumar, B. V., Connors, T. J. and Farber, D. L. (2018) Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* 48 (2), 202-213.
- Lafferty, K. J. and Cunningham, A. J. (1975) A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 53 (1), 27-42.
- Langenhorst, D., Gogishvili, T., Ribechini, E., Kneitz, S., McPherson, K., Lutz, M. B. and Hünig, T. (2012) Sequential induction of effector function, tissue migration and cell death during polyclonal activation of mouse regulatory T-cells. *PLoS One* 7 (11), e50080.

- Langenhorst, D., Tabares, P., Gulde, T., Becklund, B. R., Berr, S., Surh, C. D., Beyersdorf, N. and Hünig, T. (2018) Self-Recognition Sensitizes Mouse and Human Regulatory T Cells to Low-Dose CD28 Superagonist Stimulation. *Frontiers in Immunology* 8 (1985).
- Lathrop, S. K., Bloom, S. M., Rao, S. M., Nutsch, K., Lio, C. W., Santacruz, N., Peterson, D. A., Stappenbeck, T. S. and Hsieh, C. S. (2011) Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 478 (7368), 250-4.
- Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R. B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E. M. and O'Shea J, J. (2007) Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26 (3), 371-81.
- Leipe, J., Grunke, M., Dechant, C., Reindl, C., Kerzendorf, U., Schulze-Koops, H. and Skapenko, A. (2010) Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 62 (10), 2876-85.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86 (6), 973-83.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (26), 14614-9.
- Levin, S. E., Zhang, C., Kadlecsek, T. A., Shokat, K. M. and Weiss, A. (2008) Inhibition of ZAP-70 kinase activity via an analog-sensitive allele blocks T cell receptor and CD28 superagonist signaling. *J Biol Chem* 283 (22), 15419-30.
- Levine, A. G., Mendoza, A., Hemmers, S., Moltedo, B., Niec, R. E., Schizas, M., Hoyos, B. E., Putintseva, E. V., Chaudhry, A., Dikiy, S., Fujisawa, S., Chudakov, D. M., Treuting, P. M. and Rudensky, A. Y. (2017) Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature* 546 (7658), 421-425.
- Li, X., Liang, Y., LeBlanc, M., Benner, C. and Zheng, Y. (2014) Function of a Foxp3 cis-element in protecting regulatory T cell identity. *Cell* 158 (4), 734-748.
- Lin, C. H. and Hünig, T. (2003) Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur J Immunol* 33 (3), 626-38.
- Lin, X., Chen, M., Liu, Y., Guo, Z., He, X., Brand, D. and Zheng, S. G. (2013) Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T

- cells. *International journal of clinical and experimental pathology* 6 (2), 116-123.
- Linterman, M. A., Pierson, W., Lee, S. K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T. F., Srivastava, M., Divekar, D. P., Beaton, L., Hogan, J. J., Fagarasan, S., Liston, A., Smith, K. G. and Vinuesa, C. G. (2011) Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 17 (8), 975-82.
- Liston, A. and Gray, D. H. (2014) Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat Rev Immunol* 14 (3), 154-65.
- Liu, X., Nguyen, P., Liu, W., Cheng, C., Steeves, M., Obenauer, J. C., Ma, J. and Geiger, T. L. (2009) T cell receptor CDR3 sequence but not recognition characteristics distinguish autoreactive effector and Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunity* 31 (6), 909-20.
- Lühder, F., Huang, Y., Dennehy, K. M., Guntermann, C., Muller, I., Winkler, E., Kerkau, T., Ikemizu, S., Davis, S. J., Hanke, T. and Hünig, T. (2003) Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med* 197 (8), 955-66.
- Lyons, A. B. and Parish, C. R. (1994) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171 (1), 131-7.
- Malek, T. R. (2008) The Biology of Interleukin-2. *Annual Review of Immunology* 26 (1), 453-479.
- Maloy, K. J. and Powrie, F. (2001) Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2 (9), 816-22.
- Marek-Trzonkowska, N., Mysliwiec, M., Dobyszek, A., Grabowska, M., Techmanska, I., Juscinska, J., Wujtewicz, M. A., Witkowski, P., Mlynarski, W., Balcerska, A., Mysliwska, J. and Trzonkowski, P. (2012) Administration of CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ regulatory T cells preserves β -cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes care* 35 (9), 1817-1820.
- Martin, P. J., Ledbetter, J. A., Morishita, Y., June, C. H., Beatty, P. G. and Hansen, J. A. (1986) A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J Immunol* 136 (9), 3282-7.
- McNally, A., Hill, G. R., Sparwasser, T., Thomas, R. and Steptoe, R. J. (2011) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control CD8⁺ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (18), 7529-34.

- Metawi, S. A., Abbas, D., Kamal, M. M. and Ibrahim, M. K. (2011) Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. *Clin Rheumatol* 30 (9), 1201-7.
- Mikami, N. and Sakaguchi, S. (2014) CD28 signals the differential control of regulatory T cells and effector T cells. *Eur J Immunol* 44 (4), 955-7.
- Miyara, M., Gorochov, G., Ehrenstein, M., Musset, L., Sakaguchi, S. and Amoura, Z. (2011) Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 10 (12), 744-55.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochov, G. and Sakaguchi, S. (2009) Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30 (6), 899-911.
- Miyazaki, T., Wolf, P., Tourne, S., Waltzinger, C., Dierich, A., Barois, N., Ploegh, H., Benoist, C. and Mathis, D. (1996) Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 84 (4), 531-41.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M. and Cheroutre, H. (2007) Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317 (5835), 256-60.
- Muteins. (2005) In Vohr, H.-W. (editor) *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 468-468.
- Myers, D. R., Zikherman, J. and Roose, J. P. (2017) Tonic Signals: Why Do Lymphocytes Bother? *Trends Immunol* 38 (11), 844-857.
- Na, S.-Y., Mracsko, E., Liesz, A., Hünig, T. and Veltkamp, R. (2015) Amplification of Regulatory T Cells Using a CD28 Superagonist Reduces Brain Damage After Ischemic Stroke in Mice. *Stroke* 46 (1), 212-220.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2007) Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96, 179-204.
- Nishizuka, Y. and Sakakura, T. (1969) Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166 (3906), 753-5.
- Noack, M. and Miossec, P. (2014) Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity Reviews* 13 (6), 668-677.

- O'Neill, L. A., Golenbock, D. and Bowie, A. G. (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13 (6), 453-60.
- Oberle, N., Eberhardt, N., Falk, C. S., Krammer, P. H. and Suri-Payer, E. (2007) Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* 179 (6), 3578-87.
- Ohkura, N., Kitagawa, Y. and Sakaguchi, S. (2013) Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 38 (3), 414-23.
- Ohta, A. and Sitkovsky, M. (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414 (6866), 916-20.
- Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. and Sakaguchi, S. (2008) Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (29), 10113-8.
- Parham, P. (1983) On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from BALB/c mice. *J Immunol* 131 (6), 2895-902.
- Parkin, J. and Cohen, B. (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357 (9270), 1777-89.
- Passerini, L., Mel, E. R., Sartirana, C., Fousteri, G., Bondanza, A., Naldini, L., Roncarolo, M. G. and Bacchetta, R. (2013) CD4+T Cells from IPEX Patients Convert into Functional and Stable Regulatory T Cells by FOXP3 Gene Transfer. *Science Translational Medicine* 5 (215), 215ra174.
- Pepper, M. and Jenkins, M. K. (2011) Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat Immunol* 12 (6), 467-71.
- Peterson, L. B., Bell, C. J. M., Howlett, S. K., Pekalski, M. L., Brady, K., Hinton, H., Sauter, D., Todd, J. A., Umana, P., Ast, O., Waldhauer, I., Freimoser-Grundschober, A., Moessner, E., Klein, C., Hosse, R. J. and Wicker, L. S. (2018) A long-lived IL-2 mutein that selectively activates and expands regulatory T cells as a therapy for autoimmune disease. *Journal of autoimmunity* 95, 1-14.
- Piccinini, F., Tesei, A., Arienti, C. and Bevilacqua, A. (2017) Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biological procedures online* 19, 8-8.
- Polansky, J. K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H. and Huehn, J. (2008) DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* 38 (6), 1654-63.

- Porter, R. R. (1959) The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* 73, 119-26.
- Powell, B. R., Buist, N. R. and Stenzel, P. (1982) An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr* 100 (5), 731-7.
- Quah, B. J. C., Warren, H. S. and Parish, C. R. (2007) Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols* 2, 2049.
- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T. Z., Futter, C. E., Anderson, G., Walker, L. S. and Sansom, D. M. (2011) Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332 (6029), 600-3.
- Raffin, C., Vo, L. T. and Bluestone, J. A. (2020) Treg cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nature Reviews Immunology* 20 (3), 158-172.
- Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. and Jenkins, M. K. (2001) Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410 (6824), 101-5.
- Rodig, S. J., Shahsafaei, A., Li, B. and Dorfman, D. M. (2005a) The CD45 isoform B220 identifies select subsets of human B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol* 36 (1), 51-7.
- Rodig, S. J., Shahsafaei, A., Li, B. and Dorfman, D. M. (2005b) The CD45 isoform B220 identifies select subsets of human B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Human Pathology* 36 (1), 51-57.
- Rodríguez-Palmero, M., Franch, A., Castell, M., Pelegrí, C., Pérez-Cano, F. J., Kleinschnitz, C., Stoll, G., Hünig, T. and Castellote, C. (2006) Effective treatment of adjuvant arthritis with a stimulatory CD28-specific monoclonal antibody. *The Journal of Rheumatology* 33 (1), 110-118.
- Rodriguez-Perea, A. L., Arcia, E. D., Rueda, C. M. and Velilla, P. A. (2016) Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clin Exp Immunol* 185 (3), 281-91.
- Römer, P. S., Berr, S., Avota, E., Na, S. Y., Battaglia, M., ten Berge, I., Einsele, H. and Hünig, T. (2011) Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood* 118 (26), 6772-82.
- Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K. and Levings, M. K. (2006) Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212, 28-50.

- Rosales, C. and Uribe-Querol, E. (2013) Fc receptors: Cell activators of antibody functions. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 04 (04), 21-33.
- Rosenzwajg, M., Churlaud, G., Mallone, R., Six, A., Dérian, N., Chaara, W., Lorenzon, R., Long, S. A., Buckner, J. H., Afonso, G., Pham, H.-P., Hartemann, A., Yu, A., Pugliese, A., Malek, T. R. and Klatzmann, D. (2015) Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *Journal of autoimmunity* 58, 48-58.
- Ross, S. H. and Cantrell, D. A. (2018) Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 36, 411-433.
- Rosser, E. C. and Mauri, C. (2015) Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 42 (4), 607-12.
- Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J. J., Turner, S. J., Godfrey, D. I. and McCluskey, J. (2015) T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu Rev Immunol* 33, 169-200.
- Rubtsov, Y. P., Rasmussen, J. P., Chi, E. Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W. R., Jr., Muller, W. and Rudensky, A. Y. (2008) Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28 (4), 546-558.
- Rudensky, A. Y. (2011) Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev* 241 (1), 260-8.
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L. and Wilson, I. A. (2006) How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24, 419-66.
- Saadoun, D., Rosenzwajg, M., Joly, F., Six, A., Carrat, F., Thibault, V., Sene, D., Cacoub, P. and Klatzmann, D. (2011) Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *The New England journal of medicine* 365 (22), 2067-2077.
- Sakaguchi, S. (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6 (4), 345-52.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T. and Nomura, T. (2006) Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212, 8-27.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155 (3), 1151-64.

- Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P. and Yamaguchi, T. (2009) Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21 (10), 1105-11.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. and Ono, M. (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133 (5), 775-87.
- Scheffold, A., Hühn, J. and Höfer, T. (2005) Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *European Journal of Immunology* 35 (5), 1336-1341.
- Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. (2016) Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* 44 (5), 955-72.
- Scholzen, T. and Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182 (3), 311-22.
- Schwartz, R. H. (1997) T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol* 9 (3), 351-7.
- Schwartz, R. H. (2003) T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-34.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. and Sakaguchi, S. (2005) Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201 (5), 723-35.
- Sharabi, A., Tsokos, M. G., Ding, Y., Malek, T. R., Klatzmann, D. and Tsokos, G. C. (2018) Regulatory T cells in the treatment of disease. *Nat Rev Drug Discov*.
- Sharpe, A. H. and Freeman, G. J. (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2 (2), 116-26.
- Shevach, E. M. (2006) From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25 (2), 195-201.
- Shevach, E. M. (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30 (5), 636-45.
- Shimizu, J., Yamazaki, S. and Sakaguchi, S. (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163 (10), 5211-8.
- Siefken (1996) CD28-Mediated Activation of Resting Human T Cells without Costimulation of the CD3/TCR Complex. *CELLULAR IMMUNOLOGY*.
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. and Jordan, M. S. (2009) T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27, 591-619.

- Soroosh, P., Doherty, T. A., Duan, W., Mehta, A. K., Choi, H., Adams, Y. F., Mikulski, Z., Khorram, N., Rosenthal, P., Broide, D. H. and Croft, M. (2013) Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J Exp Med* 210 (4), 775-88.
- Spangler, J. B., Trotta, E., Tomala, J., Peck, A., Young, T. A., Savvides, C. S., Silveria, S., Votavova, P., Salafsky, J., Pande, V. S., Kovar, M., Bluestone, J. A. and Garcia, K. C. (2018) Engineering a Single-Agent Cytokine/Antibody Fusion That Selectively Expands Regulatory T Cells for Autoimmune Disease Therapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 201 (7), 2094-2106.
- Starr, T. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A. (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-76.
- Stefanova, I., Dorfman, J. R. and Germain, R. N. (2002) Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420 (6914), 429-34.
- Sun, C. M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R. and Belkaid, Y. (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204 (8), 1775-85.
- Suntharalingam, G., Perry, M. R., Ward, S., Brett, S. J., Castello-Cortes, A., Brunner, M. D. and Panoskaltsis, N. (2006) Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 355 (10), 1018-28.
- Tabares, P., Berr, S., Römer, P. S., Chuvpilo, S., Matskevich, A. A., Tyrsin, D., Fedotov, Y., Einsele, H., Tony, H. P. and Hünig, T. (2014) Human regulatory T cells are selectively activated by low-dose application of the CD28 superagonist TGN1412/TAB08. *Eur J Immunol* 44 (4), 1225-36.
- Tacke (1997) CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur. J. Immunol.*
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W. and Sakaguchi, S. (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192 (2), 303-10.
- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R. and Ravetch, J. V. (1994) FcR γ chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76 (3), 519-529.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140 (6), 805-820.
- Teillaud, J.-L. (2012) Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC).

- Thompson, C. B. and Allison, J. P. (1997) The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7 (4), 445-50.
- Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y. and Shevach, E. M. (2010) Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 184 (7), 3433-41.
- Thornton, A. M. and Shevach, E. M. (1998) CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188 (2), 287-96.
- Thornton, A. M. and Shevach, E. M. (2019) Helios: still behind the clouds. *Immunology* 158 (3), 161-170.
- Torgerson, T. R. and Ochs, H. D. (2007) Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 120 (4), 744-50; quiz 751-2.
- Trowbridge, I. S. and Thomas, M. L. (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12, 85-116.
- Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juścińska, J., Dobyszuk, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Myśliwska, J. and Hellmann, A. (2009a) First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T regulatory cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 133 (1), 22-26.
- Trzonkowski, P., Szaryńska, M., Myśliwska, J. and Myśliwski, A. (2009b) Ex vivo expansion of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T regulatory cells for immunosuppressive therapy. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 75 (3), 175-188.
- Turvey, S. E. and Broide, D. H. (2010) Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2), S24-32.
- Tyrsin, D., Chuvpilo, S., Matskevich, A., Nemenov, D., Römer, P. S., Tabares, P. and Hünig, T. (2016) From TGN1412 to TAB08: the return of CD28 superagonist therapy to clinical development for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 34 (4 Suppl 98), 45-8.
- Urakami, H., Ostanin, D. V., Hünig, T. and Grisham, M. B. (2006) Combination of donor-specific blood transfusion with anti-CD28 antibody synergizes to prolong graft survival in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 38 (10), 3244-6.
- van den Brandt, J., Fischer, H. J., Walter, L., Hünig, T., Klötting, I. and Reichardt, H. M. (2010) Type 1 diabetes in BioBreeding rats is critically linked to an

- imbalance between Th17 and regulatory T cells and an altered TCR repertoire. *J Immunol* 185 (4), 2285-94.
- Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D. C. and O'Garra, A. (2004) IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 172 (10), 5986-93.
- Vukmanovic-Stejic, M., Zhang, Y., Cook, J. E., Fletcher, J. M., McQuaid, A., Masters, J. E., Rustin, M. H., Taams, L. S., Beverley, P. C., Macallan, D. C. and Akbar, A. N. (2006) Human CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* 116 (9), 2423-33.
- Vyas, J. M., Van der Veen, A. G. and Ploegh, H. L. (2008) The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 8 (8), 607-18.
- Walker, L. S., Chodos, A., Eggena, M., Dooms, H. and Abbas, A. K. (2003) Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med* 198 (2), 249-58.
- Walker, L. S. and Sansom, D. M. (2011) The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol* 11 (12), 852-63.
- Wang, Y., Su, M. A. and Wan, Y. Y. (2011) An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. *Immunity* 35 (3), 337-348.
- Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L. and Antonetti, F. R. (2011) An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 7 Suppl 1, S1.
- Weiner, H. L. (2001) The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat Immunol* 2 (8), 671-2.
- Weirather, J., Hofmann, U. D., Beyersdorf, N., Ramos, G. C., Vogel, B., Frey, A., Ertl, G., Kerkau, T. and Frantz, S. (2014) Foxp3⁺ CD4⁺ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res* 115 (1), 55-67.
- Weiss, A., Manger, B. and Imboden, J. (1986) Synergy between the T3/antigen receptor complex and Tp44 in the activation of human T cells. *J Immunol* 137 (3), 819-25.
- Weiss, J. M., Bilate, A. M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M. A., Parkhurst, C. N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A. B., Ruocco, M. G., Yang, Y., Floess, S., Huehn, J., Oh, S., Li, M. O., Niec, R. E., Rudensky, A. Y., Dustin, M. L., Littman, D. R. and Lafaille, J. J. (2012) Neuropilin 1 is

- expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells. *J Exp Med* 209 (10), 1723-42, s1.
- Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J. L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli, F. D., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M. and Brunkow, M. E. (2001) X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27 (1), 18-20.
- Wing, J. B. and Sakaguchi, S. (2011) TCR diversity and Treg cells, sometimes more is more. *Eur J Immunol* 41 (11), 3097-100.
- Wing, J. B., Tanaka, A. and Sakaguchi, S. (2019) Human FOXP3(+) Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* 50 (2), 302-316.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2008) CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* 322 (5899), 271-5.
- Wu, K., Bi, Y., Sun, K. and Wang, C. (2007) IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 4 (4), 269-75.
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S. F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L. and Rao, A. (2006) FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126 (2), 375-387.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J. M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B. A., Sverdrup, F. M., Head, R., Kuster, D. J., Ruminski, P., Weiss, D., Von Schack, D. and Bluestone, J. A. (2012) Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* 209 (10), 1713-22, s1-19.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S. and Sakaguchi, S. (2004) Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* 16 (11), 1643-56.
- Yasuda, K., Takeuchi, Y. and Hirota, K. (2019) The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Seminars in immunopathology* 41 (3), 283-297.
- Ye, C., Brand, D. and Zheng, S. G. (2018) Targeting IL-2: an unexpected effect in treating immunological diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 3 (1), 2.
- Yui, M. A., Hernández-Hoyos, G. and Rothenberg, E. V. (2001) A New Regulatory Region of the IL-2 Locus That Confers Position-Independent Transgene Expression. *The Journal of Immunology* 166 (3), 1730.

- Yui, M. A., Sharp, L. L., Havran, W. L. and Rothenberg, E. V. (2004) Preferential activation of an IL-2 regulatory sequence transgene in TCR gamma delta and NKT cells: subset-specific differences in IL-2 regulation. *J Immunol* 172 (8), 4691-9.
- Zelante, T., Fric, J., Wong, A. Y. W. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2012) Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. *Frontiers in immunology* 3, 161-161.
- Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J. M., Chu, T.-T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U. and Rudensky, A. Y. (2009) Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458 (7236), 351-356.
- Zhu, L., Shi, T., Zhong, C., Wang, Y., Chang, M. and Liu, X. (2017) IL-10 and IL-10 Receptor Mutations in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology research* 10 (2), 65-69.

Weitere Quellen und Lehrbücher:

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). Cellular and molecular immunology, ninth edition. *Elsevier*
- Murphy, K., Weaver, C. (2018). Janeway Immunologie, 9. Auflage. *Springer Spektrum*.







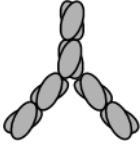

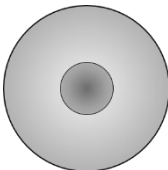
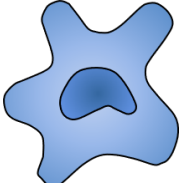
9. Abbildungsverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abbildung 1.:	Vereinfachtes Schema der T-Zell-Aktivierung	7
Abbildung 2.:	konventionelle α CD28 mAK Stimulation versus CD28SA-Stimulation	9
Abbildung 3.:	Vereinfachtes Schema der CD28SA-Stimulation	10
Abbildung 4.:	Arbeitshypothese	25
Abbildung 5.:	CFSE-Färbung	33
Abbildung 6.:	Schematische Darstellung der Y3P-FITC-Färbung	35
Abbildung 7.:	Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung eines Immunglobulin-Moleküls durch die Proteasen Papain und Pepsin	38
Abbildung 8.:	Versuchsübersicht der Induktion der T-Zellproliferation durch CD28-superagonistische Stimulation (D665) in-vitro _	40
Abbildung 9.:	Induktion der T-Zellproliferation durch den CD28 Superagonisten (CD28SA) D665 in-vitro	42
Abbildung 10.:	Dosisabhängige Unterschiede der Proliferation von Tkon und Treg durch CD28-superagonistische Stimulation (CD28SA) in-vitro	43
Abbildung 11.:	Proliferationsverhalten konventioneller (Tkon) und regulatorischer T-Zellen (Treg) gegenüber unterschiedlichen CD28SA-Dosierungen	44
Abbildung 12.:	In-vitro Untersuchung von T-Zellaktivierungsmarker	45
Abbildung 13.:	T-Zellaktivierungsmarker CD69 und CD25	46
Abbildung 14.:	Versuchsübersicht der MHC-II-Blockade in-vitro	47
Abbildung 15.:	MHC-II-Blockade in-vitro ohne exogene IL-2 Zugabe	49

Abbildung 16.: MHC-II-Blockade in-vitro mit exogener IL-2 Zugabe	50
Abbildung 17.: MHC-II-Blockade in-vitro	51
Abbildung 18.: Auswirkung der MHC-II-Blockade in-vitro auf B220 ⁺ Zellen	52
Abbildung 19.: Versuchsübersicht der Titration des kompletten Y3P Antikörpers in-vivo	53
Abbildung 20.: Titration des kompletten Y3P Antikörpers in-vivo	54
Abbildung 21.: Depletion von B220 ⁺ Zellen durch die in-vivo Behandlung mit dem kompletten Y3P Antikörper in C57BL/6-Mäusen	56
Abbildung 22.: Die in-vivo Behandlung mit dem kompletten Y3P Antikörper in C57BL/6-Mäusen reduziert die durch niedrige CD28SA Dosierungen induzierte Proliferation der regulatorischen T-Zellen	57
Abbildung 23.: Versuchsübersicht der MHC-II-Blockade in-vivo mittels Y3P-Fab2-Fragmenten in C57BL/6-Mäusen	58
Abbildung 24.: Die in-vivo Behandlung von C57BL/6-Mäusen mit Y3P-Fab2-Fragmenten führte nicht zur Reduktion Y3P-bindender B-Zellen	59
Abbildung 25.: Versuchsübersicht der MHC-II-Blockade in-vivo mittels kompletten Y3P Antikörpern in Fcer1g ^{-/-} Mäusen	60
Abbildung 26.: MHC-II-Blockade mittels kompletten Y3P Antikörpern in-vivo in Fcer1g ^{-/-} Mäusen	61
Abbildung 27.: Die MHC-II-Blockade in-vivo beeinträchtigt die durch niedrige CD28SA-Dosierungen induzierte Proliferation der regulatorischen T-Zellen	62

9.2 Übersicht über die verwendeten Symbole

	CD3
	T-Zellrezeptor (TZR)
	MHC-II-Molekül
	Antigenfragment / Peptidfragment von MHC-II-Molekülen
	CD28
	CD80/86
	CD28 Superagonist (CD28SA)
	Konventioneller Antikörper
	Zelle
	Antigen-präsentierende Zelle (APZ)

Die verwendeten Symbole wurden selbständig mit Microsoft PowerPoint 2013 erstellt. Teilweise dienten hierzu Zeichnungen von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig sowie aus den angegebenen Publikationen als Vorlage und wurden modifiziert.

10. Eidesstattliche Erklärung / Affidavit

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die molekulare Grundlage für die höhere Sensitivität regulatorischer CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu konventionellen CD4⁺ T-Zellen gegenüber der Stimulation mit CD28 Superagonisten“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „The molecular basis for the higher sensitivity of regulatory CD4⁺ T cells as compared to conventional CD4⁺ T cells to CD28 superagonistic stimulation“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

11. Veröffentlichungen

Langenhorst D, Tabares P, Gulde T, et al. Self-Recognition Sensitizes Mouse and Human Regulatory T Cells to Low-Dose CD28 Superagonist Stimulation. *Front Immunol.* 2018;8:1985. Published 2018 Jan 30.
doi:10.3389/fimmu.2017.01985

12. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof Dr. rer. nat. Thomas Hünig, Leiter des Lehrstuhls für Immunbiologie des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, für die Auswahl des Themas, seine hervorragende Betreuung, die große Unterstützung, seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für die Begleitung bis zur Finalisierung dieser Arbeit bedanken. Für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken.

Für die konstruktiven Beiträge und die fruchtbaren Gespräche möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. med. Niklas Beyersdorf und Herrn Prof. Dr. med. Matthias Eyrich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe Hünig für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die vielen wertvollen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. Shin-Young Na und Frau Dr. Daniela Langenhorst gilt mein herzlichster Dank für die Einarbeitung, Hilfe und die vielen praktischen Tipps im Labor.

Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. Daniela Langenhorst für die Hilfe und Supervision der Zellkulturarbeiten, der in-vivo Experimente, der FACS-Analysen und der Datenauswertung von Herzen bedanken. Bei Frau Dr. Monika Fröhlich möchte ich mich insbesondere für die Unterstützung bei den in-vivo Experimenten bedanken.

Frau Susanne Beer gilt mein herzlichster Dank für die Herstellung der Y3P-Fab2-Fragmente, der Fitylierung des Y3P (Y3P-FITC, fluorescein isothiocyanate) Antikörpers sowie für die ständige Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Paula Tabares gilt mein Dank für viele konstruktive Diskussionen und die Betreuung im Rahmen des Graduiertenprogramms „Immunomodulation“.

Weiterer Dank gilt Frau Dr. Julia Wegner, Frau Dr. Paula Römer, Frau Dr. Tea Gogishvili und Frau Bettina Stein für eine freundliche Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Besonders danken möchte ich auch dem gesamten Team der Tierhaltung unter der Leitung von Frau Dr. Sabine Kranz. Herrn Prof. Dr. Falk Nimmerjahn möchte ich für die Bereitstellung der Fcer1g^{-/-} Mäuse danken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner wundervollen Frau Sara und meinen Töchtern Salome und Nuria bedanken, die mich über die ganze Zeit begleitet und großartig unterstützt haben. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Auch möchte ich meiner Familie danken, allen voran meinen Eltern und Schwiegereltern sowie meinen Geschwistern für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung. Ein besonderer Dank für das akribische Gegenlesen dieser Arbeit ist an Ann-Marie Mecklenburg gerichtet.

13. Lebenslauf

