

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR IMMUNOLOGIE
PROF. DR. DANIELA N. MÄNNEL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Modulation von T-Zell-Funktionen
durch Aktivierung von TNFR2
mit Fokus auf regulatorische T-Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr. med.)
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Konstantin B. Molitor

September 2015

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR IMMUNOLOGIE
PROF. DR. DANIELA N. MÄNNEL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Modulation von T-Zell-Funktionen
durch Aktivierung von TNFR2
mit Fokus auf regulatorische T-Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr. med.)
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Konstantin B. Molitor

September 2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela N. Männel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger
Tag der mündlichen Prüfung: 04. März 2016

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hamburg, den 27. September 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. September 2011 bis 30. Juli 2013 unter Anleitung von Prof. Dr. Daniela N. Männel am Institut für Immunologie der Universität Regensburg verfasst.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	10
1.1 Das TNF-TNFR-System.....	10
1.1.1 Die TNF-Liganden-Superfamilie	10
1.1.2 Struktur von TNF	10
1.1.3 Funktionen von TNF	11
1.1.4 Die TNF-Rezeptor-Superfamilie	12
1.1.5 Die TNF-Rezeptoren	13
1.1.5.1 TNFR1	14
1.1.5.2 TNFR2	14
1.1.6 Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren	16
1.1.6.1 TNFR1	16
1.1.6.2 TNFR2	17
1.2 Regulatorische T-Zellen.....	18
1.2.1 Historischer Hintergrund	18
1.2.2 Phänotypische Charakterisierung	19
1.2.3 Natürlich vorkommende und induzierte Treg	21
1.2.4 Funktionelle Charakterisierung	23
1.2.5 TNFR2 auf Treg	25
1.3 Ziel der Arbeit.....	26
2 Materialien.....	27
2.1 Zelllinien.....	27
2.2 Mauslinien.....	27
2.3 TNF-Varianten.....	27
2.4 Chemikalien.....	28
2.5 Puffer und Medien.....	28
2.6 Antikörper.....	29
2.7 Kits (Zellisolation & ELISA).....	30
2.8 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.9 Geräte.....	31
2.10 Software.....	32
3 Methoden.....	33
3.1 Zellkulturbedingungen.....	33
3.2 TNF-Varianten.....	33
3.3 TNF-Kill-Assays.....	34

3.3.1 Wirbelzellassay	34
3.3.2 MTT-Assay	35
3.4 Maushaltung.....	36
3.5 Präparation der Milzen.....	36
3.6 Zellisolation.....	37
3.6.1 Aufschluss von Milzzellen für MACS-Zellisolation	37
3.6.2 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Isolation	38
3.6.3 CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ T-Zell-Isolation	39
3.7 Markierung der Milzzellen mit CFSE.....	40
3.8 Proliferations- und Suppressionsassays.....	41
3.9 Prästimulierung der Treg.....	43
3.10 FACS-Färbung.....	43
3.10.1 Oberflächenfärbung	44
3.10.2 Intrazelluläre Foxp3-Färbung	44
3.11 FACS-Analyse und Auswertung.....	46
3.12 Enzyme-linked immunosorbent assay.....	47
3.13 Statistische Analyse.....	48
4 Ergebnisse.....	49
4.1 Spezifität der TNF-Varianten.....	49
4.1.1 Technische Kontrolle des Wirbelzellen-Systems	49
4.1.2 Spezifische Aktivierung von TNFR1 durch Flag-TNF und rhTNF	50
4.1.3 Spezifische Aktivierung von TNFR2 durch TNcscTNF80, nicht aber TNF80	52
4.2 Proliferationsassays.....	53
4.2.1 Verringerte Proliferation von TNFR2-defizienten Effektor-T-Zellen unter anti-CD3ε-Stimulierung	53
4.2.2 Gesteigerte Proliferation von Effektor-T-Zellen aufgrund spezifischer Aktivierung von TNFR2	54
4.2.3 TNFR2-Aktivierung kann CD28-Kostimulus nicht ersetzen	57
4.2.4 „Bystander effects“ in Milzzellkulturen	59
4.3 Suppressionsassays.....	60
4.3.1 T-Zell-Suppression durch Treg abhängig vom Teff:Treg-Verhältnis	60
4.3.2 Aktivierung von TNFR2 verbessert Proliferation von Effektor-T-Zellen trotz Suppression durch Treg	61
4.3.3 Aktivierung von TNFR2 vermindert suppressive Funktion von Treg	63
4.3.4 Aktivierter Phänotyp der Treg nach TNFR2-Stimulierung	65
4.3.5 Erhöhte Oberflächenlevel von CD25 auf Treg nach TNFR2-agonistischer Prästimulierung	66
4.3.6 Aufgehobene Treg-vermittelte Suppression nach TNFR2-Prästimulierung	69

4.3.7 Erniedrigte Oberflächenlevel von CD25 auf TNFR2-prästimulierten Treg nach Suppressionsassay	70
5 Diskussion.....	71
5.1 Spezifität der TNF-Varianten.....	71
5.2 Effekte einer TNFR2-Aktivierung auf Effektor-T-Zellen.....	72
5.3 Effekte einer TNFR2-Aktivierung auf regulatorischen T-Zellen.....	74
5.3.1 Aktivierung von TNFR2 auf Treg verhindert deren suppressive Eigenschaften	74
5.3.2 TNFR2-Stimulierung führt zu erhöhten CD25-Spiegeln, nicht aber zu einer erhöhten Foxp3-Expression	76
5.3.3 Verminderte Suppressionsfähigkeit von Treg nach deren Prästimulierung	77
5.4 Interpretation und Ausblick.....	77
6 Zusammenfassung.....	79
7 Abbildungsverzeichnis.....	81
8 Abkürzungsverzeichnis.....	82
9 Literaturverzeichnis.....	85

1 Einleitung

1.1 Das TNF-TNFR-System

Der Tumornekrosefaktor (TNF, auch TNF- α oder Kachektin) wurde im Jahre 1984 erstmals biochemisch isoliert. Es war damals bekannt, dass Tumorgewebe, das mit Bakterien kontaminiert wurde, teilweise zurückging oder sogar verschwand. Die damalige Hypothese war, die Bakterien würden einen Faktor ausschütten, der eine nekrotische Wirkung auf den Tumor ausübt, er wurde Tumornekrosefaktor genannt (Old et al. 1975). Später entdeckte man, dass Zellen des Patienten selbst als Reaktion auf Antigene der Bakterien, vor allem Lipopolysaccharide (LPS), mit der Ausschüttung dieses Faktors, des Zytokins TNF, reagierten (MacEwan 2002).

In den vergangenen Jahrzehnten wurden das Zytokin TNF und die im Verlauf entdeckten weiteren zahlreichen Mitglieder der TNF-Superfamilie genauer beleuchtet. TNF stellte sich als ein Schlüsselmolekül bei der Regulation der physiologischen wie pathologischen Immunantwort des Körpers dar.

1.1.1 Die TNF-Liganden-Superfamilie

Die TNF-Liganden-Superfamilie hat 19 bekannte Mitglieder, zu ihr gehören neben TNF unter anderem auch Lymphotoxin- α (LT- α), *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), Fas-Ligand (FasL, auch genannt CD95L), *TNF-related weak inducer of apoptosis* (TWEAK) und *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL).

Fast allen Mitgliedern gemein ist ihre Genese als Typ 2 Transmembranprotein, sie sind also Proteine mit intrazellulär gelegenem N-Terminus, exprimiert vor allem von Zellen des Immunsystems. Sie bilden in der Regel in noch membrangebundener Form spontan nicht kovalent verbundene Homotrimere (Peschon et al. 1998).

1.1.2 Struktur von TNF

TNF stellt in vielerlei Hinsicht das vielleicht bedeutendste inflammatorische Molekül dar. Es wird von Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Kardiomyozyten, Fibroblasten und neuronalem Gewebe als 233 Aminosäuren (AS) langes, 26kDa großes Transmembranprotein produziert (*membrane bound TNF*, memTNF). Das 157 AS lange, 17kDa schwere lösliche TNF (*soluble TNF*, sTNF) entsteht nach Abspaltung durch

die Metalloprotease *tumor necrosis factor- α converting enzyme* (TACE) (Gearing et al. 1994). TNF ist sowohl in membranständiger als auch in abgespaltener löslicher Form funktionsfähig, beide Formen können demnach mit den zugehörigen TNF-Rezeptoren (TNFR) 1 und 2 interagieren.

1.1.3 Funktionen von TNF

Als inflammatorisches Molekül steht TNF in erster Linie für die Vermittlung von nekrotischem und apoptotischem Zelltod, dient aber auch der Protektion eines lokalen Gebietes vor immunologischer Invasion und Gewebeschaden (Faustman and Davis 2010). Weiterhin greift TNF im Rahmen bakterieller Infektionen und der Virusreplikation in die Regulation der zellulären Proliferation und Differenzierung bei entzündlichen Geschehen ein und ermöglicht die klonale Expansion von Immunzellen, vor allem T-Zellen, die nötig ist, um eine solche Infektion zu bekämpfen (Pfeffer 2003).

Eine konstitutionelle oder funktionelle Dysregulation des TNF führt zum septischen Schock und Autoimmunerkrankungen, was die essentielle Bedeutung des Zytokins im Rahmen der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase unterstreicht. Eine pathologische Produktion des TNF spielt eine herausragende Rolle bei Sepsis, Tumorwachstum, Transplantatreaktionen, viraler Replikation und Autoimmunerkrankungen wie Diabetes, rheumatoider Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Amyotropher Lateralsklerose (ALS) und Multipler Sklerose (MS).

Anti-TNF-Therapien stellten einen großen Fortschritt für die Therapie von Autoimmunerkrankungen dar. Erstmals konnte TNF *in vivo* blockiert werden, um eine pathologische, sich selbst positiv verstärkende Immunreaktion des Körpers aufgrund einer überschießenden TNF-Produktion zu vermindern. Monoklonale TNF-spezifische Antikörper (AK) wie Infliximab und Adalimumab sind hierbei in struktureller und funktioneller Hinsicht von dem löslichen Fusionsprotein Etanercept zu unterscheiden. Letzteres wurde aus der ligandenbindenden Domäne des humanen TNFR2 und der F_c-Untereinheit des IgG1-AK synthetisiert, es stellt gewissermaßen eine Variante des löslichen TNFR2 dar. Diese Immunsuppressiva werden zur Therapie von Rheumatoider Arthritis, Psoriasis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt. Nichtsdestotrotz bleiben diese

Behandlungsmöglichkeiten selbstredend nicht ohne Nebenwirkungen, insbesondere besteht unter einer Therapie mit anti-TNF-Antikörpern ein hohes Risiko opportunistischer Infektionen aufgrund der allgemeinen Immunsuppression sowie die Gefahr allergischer Reaktionen auf die Antikörper. Dies ist unter anderem auf die Tatsache zurückzuführen, dass diese ihre Wirkung stets über beide TNF-Rezeptoren ausüben.

1.1.4 Die TNF-Rezeptor-Superfamilie

Die TNFR-Superfamilie besteht aus 29 bekannten Rezeptoren, diese werden von den verschiedenen Liganden der TNF-Familie aktiviert. Viele Liganden sind in der Lage, mehrere Rezeptoren zu aktivieren. Interessanterweise scheinen die Wirkungen der vielfältigen Ligand-Rezeptor-Interaktionen nicht redundant zu sein, was für jeweils spezifische und einzigartige Effekte der verschiedenen Kombinationen spricht.

Die Mitglieder der TNFR-Superfamilie werden als Typ 1 Transmembranproteine exprimiert, die sich durch das Charakteristikum wiederholter Cystein-reicher extrazellulärer Sequenzhomologien (*cystein-rich domains*, CRD) auszeichnen. Diese 40 AS langen CRD werden durch Cysteinbrücken stabilisiert und bilden die Kontaktstellen für Liganden.

Gewissermaßen den „Prototyp“ eines Mitglieds der TNFR-Superfamilie stellt Fas, auch *cluster of differentiation* (CD) 95 oder *apoptosis antigen-1* (Apo-1) genannt, dar. Es wird, soweit bekannt, ausschließlich durch den Fas-Liganden (FasL) aktiviert (Peter and Krammer 2003). Der Fas-Rezeptor wird von den meisten kernhaltigen Zellen exprimiert, seine Aktivierung führt im Regelfall zur Apoptose der Zielzelle, dem programmierten Zelltod. Dieser kann sowohl durch intrazelluläre Signalwege als auch durch externe Stimuli herbeigeführt werden. Defekte des Fas-Signalweges resultieren in einem gestörten Abbau von aktivierte Lymphozyten nach einer erfolgreichen Immunantwort und führen somit zu Symptomen wie Lymphadenopathie, Splenomegalie und erhöhten Spiegeln von Autoantikörpern (Eissner, Kolch, and Scheurich 2004). Weitere Rezeptoren, die der Gruppe der sogenannten Todesrezeptoren angehören, sind unter anderem die TRAIL-Rezeptoren und TNFR1 (siehe 1.1.5.1). Ihnen allen ist das Adaptermolekül *Fas associated death domain* (FADD) gemein, über das eine Kaskade von *cysteinyl-aspartate specific proteases* (Caspasen), initiiert durch Caspase 8, aktiviert wird, die zur Apoptose der Zielzelle führt (MacEwan 2002).

Andere Rezeptoren, die weniger Apoptose-Signale vermitteln, sondern vielmehr durch eine Modulation der Genexpression Signale zur Proliferation und Differenzierung der Zellen senden, werden der zweiten Gruppe der Nicht-Todesrezeptoren zugeordnet. So reguliert beispielsweise eine Aktivierung von CD40 durch CD40-Ligand (CD154) direkt die Genexpression der CD40-tragenden B-Zellen und Makrophagen, was eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen B- und T-Zellen spielt (Eissner, Kolch, and Scheurich 2004).

Eines der zentralen Moleküle, das durch Mitglieder der Nicht-Todesrezeptoren moduliert wird, ist der Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B). Eine Aktivierung des *receptor activator of NF- κ B* (RANK) kann so zum Beispiel direkt über eine Expressionsmodulation von NF- κ B die Funktion von Dendritischen Zellen (DC) und Osteoklasten regulieren (Srivastava 2003).

1.1.5 Die TNF-Rezeptoren

TNF übt all seine Funktionen ausschließlich durch die Aktivierung der beiden für die Superfamilie namensgebenden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 aus. Die beiden Rezeptoren besitzen eine Sequenzhomologie von 28%, die sich fast ausschließlich auf den extrazellulären Teil beschränkt. Unter anderem lassen sich hier vier der für die Superfamilie typischen Cystein-reichen Domänen finden (MacEwan 2002). Außerdem besitzen sowohl TNFR1 als auch TNFR2 eine *extracellular pre-ligand-binding assembly domain* (PLAD), die nicht in der den Liganden bindenden Region liegt. Diese erleichtert die Komplexbildung der TNFR-Moleküle und deren Trimerisierung unter Aktivierung durch TNF (Chan 2000). Im intrazellulären Abschnitt der beiden Rezeptoren lassen sich fast keine Sequenzhomologien identifizieren, dennoch ähneln sich die Tertiärstrukturen der beiden Rezeptoren stark (Grell et al. 1994).

Neben TNF aktiviert auch LT- α beide TNF-Rezeptoren, wenn auch mit geringerer biologischer Aktivität.

Von Bedeutung in den experimentellen Setups ist die Kreuzreaktivität des humanen TNF (hTNF) und Maus TNF (mTNF) an den TNFR. Während endogenes wie auch rekombinant hergestelltes Maus TNF (rmTNF) in der Lage sind, sowohl Maus TNFR1 als auch Maus TNFR2 zu aktivieren, kann hTNF generell nur an Maus TNFR1 binden, nicht jedoch an Maus TNFR2 (Tartaglia et al. 1991).

1.1.5.1 TNFR1

TNFR1 (auch p55 oder CD120a genannt) ist der bekanntere und besser untersuchte der beiden TNF-Rezeptoren. Er kommt auf fast allen Zellen des Körpers (außer Erythrozyten) vor und vermittelt vor allem apoptotische und anti-inflammatorische Effekte. Er wird auf den Zellen konstitutionell exprimiert, die Oberflächenlevel von TNFR1 steigen bei einer Aktivierung der Zellen kaum.

Lösliches TNF (sTNF) kann vergleichsweise leicht und schnell an TNFR1 binden, die Bindung ist dann sehr stabil und weist eine recht langsame Dissoziationsrate ($t_{1/2} = 33\text{min}$) auf (Grell et al. 1998). Dies ermöglicht eine sichere TNF-abhängige Aktivierung des Rezeptors, der unter Stimulierung internalisiert wird (Higuchi and Aggarwal 1994; Schneider-Brachert et al. 2004). In diesen Punkten unterscheidet sich TNFR1 wesentlich von TNFR2.

1.1.5.2 TNFR2

Die Struktur von TNFR2 (auch genannt p75 oder CD120b) wurde erst im Jahre 2010 von Mukai et al. aufgeklärt.

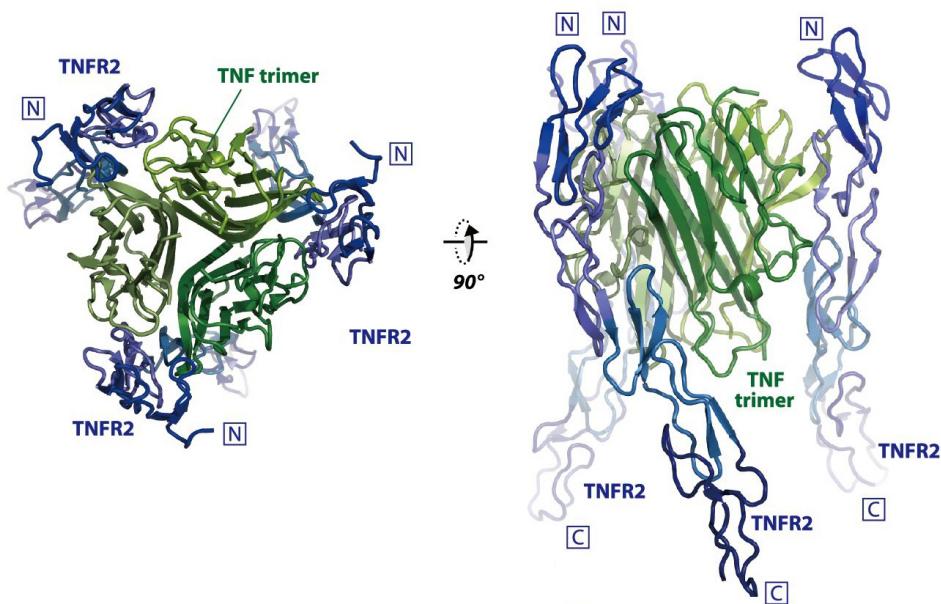


Abb. 1: Struktur von TNF und TNFR2

Struktur des nicht-kovalent zusammengelagerten TNF-Trimers und des ebenfalls in trimerisierter Form aktiven TNFR2 (modifiziert nach Mukai et al. 2010).

Über die Funktion von TNFR2 ist vergleichsweise wenig bekannt. In den letzten Jahren wird der Untersuchung von TNFR2 aber immer mehr Bedeutung beigemessen. TNFR2 kommt hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems vor, vor allem auf T-Lymphozyten und hier insbesondere auf regulatorischen T-Zellen (Treg, siehe 1.2), zudem auf Endothelzellen, Oligodendrozyten, Mikroglia, Kardiomyozyten und mesenchymalen Stammzellen. TNFR2 stellt einen der wichtigsten Aktivierungsmarker von T-Zellen dar, da diese ihn unter Stimulierung verstärkt exprimieren. Alle Zellen, die TNFR2 exprimieren, tragen auch TNFR1 auf ihrer Oberfläche, was in technischer Hinsicht die funktionelle Differenzierung wie auch eine getrennte Untersuchung der intrazellulären Signalwege der beiden Rezeptoren erschwert. Eine TNFR2-Aktivierung stößt hauptsächlich intrazelluläre Signalwege an, die die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen fördern, und ist somit essentiell bei der Vermittlung zellulärer Immunität gegenüber Antigenen sowie bei der Erkennung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ im Rahmen autoimmuner Prozesse.

Viele Stimuli durch Selbst- oder Fremdantigene gehen mit einer verstärkten Expression von TNFR2 auf T-Zellen im Rahmen der immunologischen Antwort auf diese Reize einher. So ist bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Chron und Colitis ulcerosa eine Hochregulation des TNFR2 zu beobachten, wie auch bei einer Organabstoßung bei Nierentransplantationen (Holtmann et al. 2002; Hoffmann et al. 2009). Auch nach cerebralen und kardialen Ischämien lassen sich höhere Level von TNFR2 messen (Semenza 1998).

Die Kinetik der TNF-TNFR2-Interaktion unterscheidet sich wesentlich von der TNF-TNFR1-Interaktion: sTNF hat eine ungleich geringere Affinität zu TNFR2 im Vergleich zu TNFR1, die Dissoziation von sTNF und TNFR2 ist um ca. 20 bis 30 Mal schneller. sTNF ist *in vivo* somit kaum in der Lage TNFR2 zu aktivieren, was zur Folge hat, dass sTNF vor allem TNFR1-vermittelte apoptotische Signalwege anstößt. memTNF hingegen kann eine stabile Bindung zu TNFR2 herstellen und aktiviert somit sowohl TNFR1 als auch TNFR2. Der Einfluss von TNFR2 kann folglich in *in vitro* Experimenten leicht unterschätzt werden, da hier meist sTNF verwendet wird (Grell et al. 1998; MacEwan 2002).

Membrangebundener TNFR2 kann von verschiedenen Zelltypen proteolytisch abgespalten werden. Der dann lösliche TNFR2 (*soluble TNFR2, sTNFR2*) behält seine Bindungsfähigkeiten in vollem Umfang bei, er kann freies wie auch membranständiges TNF binden (Higuchi and

Aggarwal 1994). Außerdem kann sTNFR2 auch direkt durch alternatives *splicing* freigesetzt werden (Lainez 2004). sTNFR2 hat so die wichtige Funktion, freies endogenes TNF abzufangen und dadurch eine überschießende Aktivierung der TNF-Rezeptoren zu verhindern (van Mierlo et al. 2008).

1.1.6 Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren

1.1.6.1 TNFR1

Eine Stimulierung von TNFR1 führt in erster Linie zur Aktivierung des Apoptose-vermittelnden Fas-Signalweges. Eine Bindung des Liganden ermöglicht es dem Adapterprotein *TNF receptor-associated death domain* (TRADD), mittels seiner eigenen Todesdomäne an TNFR1 zu binden (Hsu, Xiong, and Goeddel 1995). TRADD kann nun die weiteren Adaptermoleküle FADD und die Serin/Threoninkinase *receptor interacting protein* (RIP) rekrutieren. FADD besitzt eine *death effector domain* (DED) (Chinnaiyan et al. 1995), mit der es mit der DED der Caspase 8 (auch genannt *FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme* (FLICE)) und weiteren DED-besitzenden Molekülen wie Caspase 10 interagieren kann (Muzio et al. 1996). Diese Interaktionen führen zur autoproteolytischen Aktivierung der Caspase und über die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7, Proteasen, Lipasen und DNAsen zur Apoptose der Zelle. Abhängig von Aktivierungsgrad und Zustand der Zelle scheinen FADD und RIP auch nekrotische Effekte erzielen zu können, zum Beispiel über die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, genauere Mechanismen sind hier aber noch nicht bekannt (Erickson et al. 1994; Wajant 2002).

Eine TNFR1-Stimulierung kann neben der Vermittlung des Zelltods auch Signale für Proliferation und Differenzierung der Zielzelle initiieren. So kann *TNF receptor-associating factor 2* (TRAF2) unter Vermittlung durch RIP an TRADD binden und auf diese Weise zum Beispiel mit *NF- κ B-inducing kinase* (NIK) interagieren, was zu einer Bahnung des NF- κ B-Signalweges führt (siehe 1.1.6.2). Dieser spielt auf transkriptionaler Ebene bei der Vermittlung von anti-apoptotischen Effekten und bei der zellulären Reaktion auf Stress eine wesentliche Rolle (Ling, Tornos, and Perez-Soler 1998).

1.1.6.2 TNFR2

Eine Aktivierung von TNFR2 sendet im Gegensatz zu TNFR1 vor allem Überlebenssignale an die Zellen.

TRAF2 kann ohne ein weiteres Adapterprotein direkt an die zytoplasmatische Domäne von TNFR2 binden (Rothe et al. 1994). Dies ermöglicht dann eine weitere Bindung von TRAF1 und TRAF3 an TRAF2. Die Aktivierung der TRAFs ermöglicht nun beispielsweise die schon oben erwähnte Aktivierung von NIK. Diese phosphoryliert das Protein *inhibitor of κB* (IκB) kinase (IKK), so dass die regulatorische Hemmung des NF-κB-Signalweges vermindert wird. IKK und insbesondere die Untereinheit IKKa ist Voraussetzung für eine maximale Aktivierung von T-Lymphozyten nach Stimulierung des TCR (X. Chen et al. 2015). Auch der *NF-κB essential modulator* (NEMO) kann eine Induktion von NF-κB nach Interaktion mit RIP und TRAF2 bewirken.

Eines der Gene, das unter der Kontrolle von NF-κB steht, ist das *cellular inhibitor of apoptosis protein 2* (c-IAP2), welches an TRAF2 bindet und die Aktivierung von Caspase 8 und somit die Apoptoseeinleitung blockieren kann (MacEwan 2002; Karl et al. 2014). Es stellt so einen Feedback-Loop her, der eine stärkere Aktivierung der anti-apoptotischen Signalwege ermöglicht. Dies ist von besonderer Bedeutung, da TNFR2 seine typischen Signalwege nur relativ schwach zu aktivieren vermag.

TNFR2 trägt am intrazellulären carboxyterminalen Ende eine TRAF2-Bindungsstelle, die ungewöhnlicherweise den ersten Schritt des Signalweges, die Assoziation von TNFR2 und TRAF2, negativ reguliert (Grech 2005). Dies hat zur Folge, dass eine schwache TNF-TNFR2-Interaktion paradoxe Weise eher zu einer Inhibition von NF-κB führen kann. Diese Tatsache wird einerseits als mögliche Art der Modulation der TNF-Rezeptor-Aktivierung und des Rezeptor-crosstalks gesehen, anderseits verdeutlicht sie den erheblichen physiologischen Einfluss von membranständigem TNF, welches TNFR2 deutlich stärker und besser aktivieren kann als sTNF.

Weitere Signalwege über *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) oder die Familie der *Jun N-terminal kinases* (JNK) und *activator protein 1* (AP-1) fördern ebenso die Proliferation und Aktivierung der Zielzellen.

Umgekehrt scheint TNFR2 unter bestimmten Bedingungen über TRAF2 auch RIP und FADD zu aktivieren und somit den apoptotischen Weg anstoßen zu können (Pimentel-Muinos and Seed 1999).

Es zeigt sich, dass sich die Funktionen der beiden TNF-Rezeptoren nicht klar trennen lassen. Der Rezeptor-crosstalk und die Tatsache, dass die Effekte der Stimulierung der beiden Rezeptoren von Aktivierungszustand der Zellen, weiteren kostimulatorischen Signalen und der Form des Liganden (sTNF, memTNF) abhängig sind, zeigen die Komplexität der TNF-TNFR-Interaktionen und ihrer Effekte.

1.2 Regulatorische T-Zellen

1.2.1 Historischer Hintergrund

Schon in den 1970er Jahren beschäftigten sich mehrere Forschungsgruppen mit einer Gruppe von T-Lymphozyten, die die Immunantwort des Körpers nicht verstärkt, sondern eher dämpft. Es wurde beobachtet, dass diese anderen T-Zellen in ihrer Funktion hemmen und somit immunologische Toleranz und eine Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ vermitteln (Sakaguchi et al. 1995), daher bezeichnete man sie damals als Suppressorzellen (Gershon and Kondo 1970; Gery, Gershon, and Waksman 1972). Über viele Jahre wurde kontrovers diskutiert, ob es sich bei diesen Zellen um eine getrennte Zelllinie, mit dezidierten Funktionen und charakteristischem Phänotyp, handelt oder ob sie vielmehr einen Teil der T-Zellpopulation ausmachen, der funktionell wie phänotypisch nicht klar von den übrigen konventionellen T-Zellen zu trennen ist. Tatsächlich wurde das Konzept einer klar differenzierbaren suppressiven Zellpopulation in den 1980er Jahren mehr oder weniger aufgegeben, wohl vor allem aufgrund fehlender für diese Zellgruppe spezifischer Marker (Möller 1988; Sakaguchi, Wing, and Miyara 2007).

Erst in den 1990er Jahren wurde das Konzept einer eigenen Zellpopulation, die regulatorischen Einfluss auf die übrigen T-Zellen hat, wieder aufgegriffen. Dieses Modell teilt CD4⁺ T-Zellen in zwei Gruppen auf: Die Gruppe der konventionellen T-Helfer- (Th-) Zellen, die mittels Stimulierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen eine Aktivierung des Immunsystems fördern, sowie die Gruppe der regulatorischen T-Zellen (Treg), die einen eher hemmenden Einfluss auf die konventionellen T-Zellen (Effektor-T-Zellen (Teff)) hat (Sakaguchi et al. 1995).

Diese CD4⁺ Treg lassen sich in den Kontext weiterer regulatorischer oder inhibitorischer Zellpopulationen einordnen: So ist mittlerweile auch eine (CD4⁻) CD8⁺ Treg-Population bekannt. Außerdem üben auch Th17-Zellen, deren namensgebendes Charakteristikum die Produktion von IL-17 ist, welches unter anderem eine Rolle bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten spielt, suppressive Eigenschaften auf Teff aus. Diese Arbeit soll sich aber auf die CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg (siehe 1.2.2) beschränken.

Um Funktion und Phänotyp der Treg *in vitro* untersuchen zu können, wurde ein Assay etabliert, in dem die Eigenschaft der Treg, die Proliferation der Teff zu inhibieren, untersucht werden konnte: der so genannte Suppressionsassay (Thornton and Shevach 1998; Tran 2013; Methodik siehe 3.8).

1.2.2 Phänotypische Charakterisierung

Eine der zentralen Fragestellungen in den vergangen Jahren und Jahrzehnten war, mittels welcher Marker man die Gruppe der Treg charakterisieren und von den konventionellen T-Zellen unterscheiden kann. Es zeigte sich jedoch, dass die Gruppe der Treg eine heterogene Population darstellt, die anhand der mittlerweile bekannten Marker nicht in eindeutiger Weise charakterisierbar ist. Dies ist nicht zuletzt auch dadurch begründet, dass die Expression der verschiedenen Marker stark vom Aktivierungszustand der Treg abhängt.

Das seit langer Zeit als Treg-Marker etablierte Oberflächenmolekül CD25 (die α-Kette des Interleukin 2- (IL-2-) Rezeptors) wird als der „klassische Treg-Marker“ angesehen. T-Zellen aus CD25-defizienten Mäusen können keine suppressiven Eigenschaften auf andere Zellen ausüben, die Expression von CD25 wurde also als Grundvoraussetzung für die Funktionalität der Treg angesehen (Furtado et al. 2002). CD25 wird aber nicht ausschließlich von CD4⁺ Treg exprimiert: Unter Aktivierung tragen alle T-Zellen CD25 auf ihrer Oberfläche (Yamazaki et al. 2003; Allan et al. 2007), was die Rolle des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 auf die klonale Expansion von T-Zellen verdeutlicht. Mittlerweile wurde aber entdeckt, dass auch Treg-Subpopulationen, die kein CD25 auf ihrer Oberfläche tragen, suppressive Eigenschaften auf Teff ausüben können (siehe 1.2.5).

Der x-chromosomal kodierte Transkriptionsfaktor *forkhead/winged-helix transcription factor box p3* (Foxp3) wird vor allem auf CD4⁺, teils auf CD8⁺ Treg exprimiert und gilt als der zuverlässigste Marker für Treg. Wenn gerade keine Immunreaktion stattfindet, exprimieren

die meisten CD25⁺ Zellen in sekundären lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten auch Foxp3. Eine Koexpression der beiden Moleküle kennzeichnet suppressiv hochpotente Treg (Hori 2003; Fontenot, Gavin, and Rudensky 2003; Khattri et al. 2003).

Foxp3 bindet an Promoter-Regionen von bis zu 1000 Genen. Viele dieser Genloci sind in die T-Zell-Rezeptor- (*T cell receptor-*, TCR-) Signaltransduktion involviert. Eine Aktivierung von Foxp3 kann hierbei sowohl immunologisch aktivierende als auch suppressive Effekte induzieren, wobei der Steigerung der Suppressionsfähigkeit der Treg deutlich größere Bedeutung beigemessen wird.

Ein Fehlen von Foxp3 oder das Blockieren des Foxp3-Signalweges geht mit einer stark beeinträchtigten oder aufgehobenen Suppressionsfähigkeit der Treg *in vitro* einher (Fontenot and Rudensky 2005). *In vivo* führen Mutationen des Foxp3-Genes zu schwerwiegenden Autoimmunerkrankungen wie dem *immune dysfunction, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome* (IPEX), einem Syndrom, das schon im Neugeborenenalter zu diabetischer Stoffwechsellage und autoimmuner Aktivität gegen viele Organe führt (Fontenot, Gavin, and Rudensky 2003).

Weitere Marker für Treg spielen nicht nur für deren phänotypische Identifizierung, sondern auch in funktioneller Hinsicht eine wichtige Rolle:

Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4 oder auch CD152) ist ein negativer Regulator der T-Zellaktivierung. CTLA-4 bindet an CD80 und CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) und wird von allen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwei bis drei Tage nach deren Aktivierung hochreguliert. Es ist im Rahmen der Treg-vermittelten Suppression von entzündlichen Erkrankungen und der Erhaltung der immunologischen Selbttoleranz von funktioneller Relevanz (Read, Malmström, and Powrie 2000; Takahashi et al. 2000).

Glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR) ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Eine Bindung des Rezeptors durch seinen Liganden GITR-L führt zu einer Aktivierung des NF-κB-Signalweges und entfaltet so seine antiapoptotische Wirkung auf die T-Zellen. Antikörper gegen GITR heben die supressive Aktivität der Treg auf (McHugh et al. 2002), was zu einer Verschlechterung von Autoimmunerkrankungen zu führen scheint (Kohm, Williams, and Miller 2004; Morris and Kong 2006; Stephens et al. 2004).

Hohe Oberflächen-Level von *lymphocyte activation gene-3* (LAG-3 oder CD223) treten bei Foxp3⁺ Treg auf. Es spielt eine große Rolle für die Interaktion von Treg mit APC (Huang et al. 2004).

CD127 (die α-Kette des IL-7-Rezeptors) ist in die Entwicklung von T-Zellen involviert, außerdem wird eine Aktivierung des IL-7-Rezeptors mit einer anti-apoptotischen Wirkung in Verbindung gebracht. Treg zeichnen sich generell durch niedrige CD127-Level aus (W. Liu 2006).

Die Expression von CD25, CTLA-4, GITR und LAG-3 wird unter Aktivierung von allen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hochreguliert, jene von CD127 herabreguliert. Sie alle sind also eher allgemeine Marker der T-Zell-Aktivierung, was geradezu impliziert, dass eine Treg-vermittelte Suppression nur auf Basis einer T-Zell-Aktivierung erfolgen kann (Corthay 2009). Umgekehrt sind folglich die momentan verwendeten Treg-Marker nicht im eigentlichen Sinne Treg-spezifisch und stellen damit kein sicheres Unterscheidungskriterium von Treg und konventionellen T-Zellen dar.

1.2.3 Natürliche vorkommende und induzierte Treg

Natürliche vorkommende Treg (*natural Treg*, nTreg) reifen im Thymus heran und stellen mit ca. 10% einen konstanten Anteil der CD4⁺ T-Zellen (Sakaguchi et al. 1995). Treg können aber auch durch Aktivierung in der Peripherie aus normalen CD4⁺ T-Zellen entstehen, sie werden dann als *induced Treg* (iTreg) bezeichnet.

Im Rahmen der physiologischen T-Zell-Reifung werden T-Zellen, die Selbstantigene erkennen, normalerweise aussortiert, die autoreaktive T-Zelle erhält apoptotische Signale. Autoreaktive CD4⁺ T-Zellen, die trotz hoch-avidier TCR-Interaktionen im Thymus nicht zerstört wurden, entwickeln sich zu CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nTreg (Lohr et al. 2009). Diese benötigen für diese Differenzierung im Thymus zusätzlich zu dem starken TCR-Signal einen Kostimulus über CD28 sowie die Anwesenheit von IL-2 oder IL-15 (Curotto de Lafaille and Lafaille 2009). Nach dem Zwei-Stufen-Modell nach Lio und Hsieh führt ein starkes TCR-Signal zu einer Induktion von CD25, was die Empfindlichkeit der Treg-Vorläufer-Zellen für nachfolgende IL-2-Stimuli erhöht. Eine Aktivierung der Zellen mittels IL-2 oder IL-15 führt dann zu einer Induktion der Foxp3-Expression (Lio and Hsieh 2008). nTreg verhindern so

eine Aktivierung des Immunsystems aufgrund relativ schwacher Stimuli und tragen damit unter anderem zur Prävention autoimmuner Geschehen bei.

iTreg entstehen in der Peripherie im Rahmen der allgemeinen T-Zell-Aktivierung aus konventionellen CD4⁺ T-Zellen. So überrascht es nicht, dass zur Generierung von iTreg IL-2 notwendig ist, ebenso wird ein Kostimulus über CTLA-4 benötigt. iTreg supprimieren die Immunantwort auf Allergene und vermindern die Auswirkungen chronischer Infektionen. Im Magen-Darm-Trakt fördern dendritische Zellen durch Produktion von *transforming growth factor-β* (TGF-β) und Retinoinsäure die iTreg-Differenzierung. Deren Anwesenheit ist im Magen-Darm-Trakt essentiell, um ein nicht-inflammatorisches Milieu aufrecht zu erhalten (Curotto de Lafaille and Lafaille 2009). Umgekehrt nutzen auch neoplastische Entitäten die Induktion von Treg mittels Sekretion von TGF-β, um eine immunologische Elimination des Tumorgewebes zu verhindern. Eine Neutralisierung von TGF-β *in vivo* führte durch eine Verminderung der iTreg-Generierung zu einer Reduktion der Tumorlast (V. C. Liu et al. 2007).

Bezüglich der Induktion der Foxp3-Expression wurden inkongruente Daten veröffentlicht. CD4⁺CD25⁻ Maus Teff können *in vivo* nach Stimulierung Foxp3 exprimieren und damit suppressive Eigenschaften erhalten (Apostolou 2004; Cobbold et al. 2004; Curotto de Lafaille et al. 2004). *In vitro* hingegen steigerten CD4⁺CD25⁻ Maus Teff ihre Foxp3-Expression unter Aktivierung nicht (Hori 2003; Fontenot and Rudensky 2005; Khattri et al. 2003). Humane CD4⁺ wie auch CD8⁺ Teff wiederum exprimieren, wie mittlerweile gut untersucht, Foxp3 während ihrer Aktivierung (Allan et al. 2007; Morgan et al. 2005; Wang et al. 2007; Tran, Ramsey, and Shevach 2007; Pillai, Ortega, and Karandikar 2007; Corthay 2009). Diese divergierenden Ergebnisse unter unterschiedlichen Untersuchungsbedingungen bedürfen sicherlich einer weiteren, vertieften Investigation.

Lange wurde diskutiert, ob *in vitro* generierte Foxp3⁺ iTreg in funktioneller Hinsicht ebenso kompetent sind wie nTreg (Aricha et al. 2008; W. Chen et al. 2003; DiPaolo et al. 2007; Hill et al. 2008; Horwitz, Zheng, and Gray 2008; Selvaraj and Geiger 2008), bislang ohne abschließendes Ergebnis. *In vivo* generierte iTreg aber werden als suppressiv voll funktionsfähig angesehen (Apostolou 2004; Cobbold et al. 2004; Curotto de Lafaille et al. 2008; Knoechel 2005).

1.2.4 Funktionelle Charakterisierung

nTreg wie iTreg sind von essentieller Bedeutung für die Prävention von Autoimmunerkrankungen und das Erhalten der immunologischen Selbsttoleranz (Sakaguchi et al. 1995; Wang et al. 2007). Bei der Unterdrückung von allergischen und bakteriellen Geschehen üben sie unerlässliche regulatorische Funktionen aus (Curotto de Lafaille et al. 2001; Akbari et al. 2002; Zuany-Amorim et al. 2002; Hori, Carvalho, and Demengeot 2002; Kullberg et al. 2002), eine Depletion der Treg bei Mäusen oder Menschen führt unweigerlich zu Autoimmunerkrankungen (Fontenot and Rudensky 2005; Sakaguchi 2004). Außerdem sind sie involviert in die Erhaltung der oralen Toleranz gegen Nahrungsantigene (Y. Chen et al. 1994; Weiner 1997; Zhang et al. 2001; Karlsson 2004) und vermitteln die mütterliche Toleranz gegenüber dem Feten (Aluvihare, Kallikourdis, and Betz 2004).

Nach der Erkennung von pathogen-induzierten Zytokinen, zum Beispiel durch konventionelle T-Zellen sezerniertes TNF und IL-2, sammeln sich nTreg im Gebiet der Infektion und expandieren dort. Sie dämpfen die Immunantwort und begrenzen den Gewebeschaden, den diese auslöst. Somit stellen sie einen unerlässlichen Feedback-Mechanismus zur Kontrolle des Umfangs der Immunantwort dar, indem sie eine T-Zell-Aktivierung im Rahmen schwacher Stimuli wie auch eine überschießende Aktivierung des Immunsystems begrenzen (Demengeot et al. 2006; Corthay 2009; X. Chen and Oppenheim 2011).

Die Aktivierung der Treg ist sowohl antigenabhängig als auch antigenspezifisch: Sie benötigen einen Stimulus über den TCR, um ihre suppressive Funktion mittels Interaktion mit APC und Th-Zellen ausüben zu können (*crossregulation model* nach (Leon et al. 2007)). Gleichzeitig ist für Expansion und Aktivität der Treg eine Stimulierung durch Zytokine wie IL-2, IL-1 und IL-15 notwendig. IL-2 ist in besonderem Maße Voraussetzung für die Treg-Funktion: Es induziert über die Phosphorylierung von *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5) die Foxp3-Expression der Treg (M. A. Burchill, Yang, Vogtenhuber, et al. 2007; Passerini et al. 2008; Taylor et al. 2006). Foxp3 wiederum fördert unter anderem die Transkription von CTLA-4, das als eines der Schlüsselmoleküle der Treg-Funktion angesehen wird (Sakaguchi et al. 2009). Eine Defizienz eines der in die IL-2-Signalwege involvierten Proteine, sei es CD25 (die α -Kette des IL-2-Rezeptors), CD122 (die β -Kette des IL-2-Rezeptors) oder IL-2 selbst, führt durch eine gestörte Treg-Funktion zu

schwerwiegenden inflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen. Treg selbst produzieren hingegen kein IL-2, es ist also eine allgemeine T-Zell-Aktivierung notwendig, damit Treg expandieren und funktionell tätig werden können.

Die genauen Mechanismen, mittels derer Treg die beschriebenen suppressiven Effekte bewirken, sind nicht endgültig geklärt, vermutlich spielen folgende Mechanismen eine Rolle:

Mittels direktem Zell-Zell-Kontakt können Treg die Proliferation ihrer Zielzellen hemmen, beispielsweise durch eine Interaktion mit dem nach deren Aktivierung exprimierten B7-Komplex auf Effektor-T-Zellen (Paust et al. 2004). Die Produktion von perizellulärem Adenosin mittels CD39 und CD73 (Deaglio et al. 2007) oder die Hochregulation von intrazellulärem zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) kann die Proliferationsfähigkeit der Teff direkt verringern (Bopp et al. 2007). Auch können Treg eine direkte Zell-Kontakt-induzierte Deletion mittels Granzymen oder Perforinen einleiten (Gondek et al. 2005; Cao et al. 2007).

Ebenso gehört eine Modulation der Funktion von APC zu den Mechanismen, die für die Suppressionsfähigkeit der Treg verantwortlich gemacht werden. So können Treg die Expression von CD80 und CD86, also des für die T-Zell-Aktivierung kostimulatorisch bedeutsamen B7-Komplexes, auf APC modulieren. Auch vermögen sie dendritische Zellen zur Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) anzuregen. Diese baut die essentielle Aminosäure Tryptophan zu N-Formylkynurenin ab, das wiederum toxisch auf benachbarte T-Lymphozyten wirkt (Oderup et al. 2006). In diese APC-modulierenden Mechanismen sind sowohl CTLA-4 als auch LAG-3 involviert (Huang et al. 2004). Des Weiteren sind aktivierte Treg in der Lage, B-Zellen und andere APC schlichtweg mittels Apoptoseeinleitung zu töten (Zhao 2006).

Weiterhin könnten auch humorale Faktoren wie IL-10, IL-35 und TGF- β zur Treg-vermittelten Immunmodulation beitragen. Die veröffentlichten Daten von *in vitro* und *in vivo* Experimenten sind hier aber nicht konsistent (Sakaguchi et al. 2009; Shevach 2009). Weitere Experimente sind vonnöten, um sich ein genaueres Bild der Bedeutung der humoral vermittelten Treg-Suppression machen zu können.

1.2.5 TNFR2 auf Treg

TNFR2 stellt ein gerade für Treg phänotypisch wie funktionell wichtiges Protein dar. Chen et al. beschrieben vor einigen Jahren, dass TNFR2 in wesentlich höherer Anzahl auf der Oberfläche von CD4⁺CD25⁺ Treg vorkommt als auf CD4⁺CD25⁻ Teff (X. Chen et al. 2007). Unter TCR-Stimulierung und folgender Aktivierung exprimieren des weiteren sowohl Treg als auch Teff mehr TNFR2 als in unaktiviertem Zustand. Eine Inkubation der Treg mit TNF führte zu einer Expansion der Treg-Population, außerdem führte TNF zu einer Hochregulation von sowohl CD25 als auch Foxp3 durch die Treg (X. Chen et al. 2007). CD4⁺CD25⁺TNFR2⁺ Treg sind vor allem in Thymus, Milz und Lymphknoten zu finden, während im peripheren Blut nur ca. 10% der CD4⁺CD25⁺ Treg auch TNFR2 trugen (X. Chen et al. 2008). Gleichzeitig stellen diese CD4⁺CD25⁺TNFR2⁺ Treg laut Chen die suppressivsten Zellen dar, während CD4⁺CD25⁺TNFR2⁻ Zellen, die einen großen Anteil der Treg ausmachen, kaum suppressive Funktionen ausüben, was er in weiteren Experimenten auf eine – sogar im Vergleich zu CD25 bessere – Korrelation von TNFR2 mit Foxp3 zurückführte (X. Chen et al. 2010). Weiterhin zeigten CD4⁺CD25⁻TNFR2⁺ T-Zellen moderate suppressive Aktivität, während CD4⁺CD25⁺, aber TNFR2⁻ Zellen sich als kaum suppressiv herausstellten, obwohl Letztere mehr Foxp3 exprimierten als die CD25⁺TNFR2⁺ Zellen (X. Chen et al. 2008). Eine Prästimulierung der Treg mit TNF und IL-2 führte laut Chen zu einer erhöhten suppressiven Aktivität der Treg (X. Chen et al. 2007).

Umgekehrt lässt eine Expression von TNFR2 von CD4⁺CD25⁻ Teff diese resistenter gegen eine Suppression durch Treg werden. Chen zeigte, dass CD4⁺CD25⁻ Teff durch eine Aktivierung des TNFR2-Signalweges keinerlei suppressive Eigenschaften gewinnen (X. Chen et al. 2007; X. Chen et al. 2008).

Zuletzt besaßen Tumor-infiltrierende Treg höhere TNFR2-Level und bessere suppressive Aktivität (X. Chen et al. 2008). Durch diesen lokalen Schutz konnte es nicht zu einer in ausreichendem Maße immunogenen Reaktion des Körpers gegen die Neoplasie kommen, der Tumor wurde durch die ihn umgebenden Treg vor einer Elimination geschützt. Eine Depletion dieser TNFR2⁺ Treg führte nach Gabe des Zytostatikums Cyclophosphamid zu einer Tumoreradikation (Most et al. 2008).

1.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es, die Funktion von T-Zellen unter TNFR2-spezifischer Stimulierung zu untersuchen. Vorarbeiten des Labors und seiner Kooperationspartner (Polz 2010; Grell et al. 1998; Müller et al. 2008; X. Chen et al. 2007; Joedicke et al. 2014; Chopra et al. 2013; Wajant 2002) führten funktionelle Änderungen der T-Zellen unter Stimulierung mit TNF auf Effekte des TNFR2 zurück. Uns standen dafür neuartige Varianten des TNF zur Verfügung, so dass die Effekte einer spezifischen und isolierten TNFR2-Aktivierung untersucht werden konnten.

Im ersten Teil der Arbeit sollte daher untersucht werden, welche der von H. Wajant (Universität Würzburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellten TNF-Varianten für TNFR2 spezifisch sind und diesen auch zu aktivieren vermögen.

Das Hauptziel der Arbeit stellte die Untersuchung funktioneller Einflüsse einer spezifischen Stimulierung des TNFR2 dar. Kernfragen waren hierbei: Inwiefern verändert sich die Proliferation von konventionellen T-Zellen aufgrund einer spezifischen TNFR2-Stimulierung in Proliferationsassays? Inwiefern verändert sich die suppressive Funktion von nTreg sowie deren Phänotyp unter gleichen Bedingungen in Suppressionsassays? Ist weiterhin diese Funktionsänderung der Treg, mit und ohne TNFR2-spezifischer Stimulierung, abhängig von deren Aktivierungszustand und können sie ihre suppressiven Eigenschaften direkt auf die Effektor-T-Zellen ausüben?

2 Materialien

2.1 Zelllinien

Wirbel Wildtyp (wt)

Wirbel TNFR1ed-huFasid

Wirbel TNFR2ed-huFasid

Eine Beschreibung der Zelllinien erfolgt unter 3.3.1.

2.2 Mauslinien

C57BL/6N Wildtyp (wt) (Janvier, Le Genest Saint Isle, Frankreich)

Die in den Experimenten verwendete C57BL/6 (*C57 black 6*) Mauslinie ist eine weit verbreitete Mauslinie. Ihr genetischer Hintergrund wird vor allem für genetisch modifizierte Mauslinien, die als Modelle menschlicher Erkrankungen dienen, verwendet.

C57BL/6N TNFR2^{-/-} (gezüchtet an der Universität Regensburg (Erickson et al. 1994))

Die TNFR2^{-/-} Mauslinie mit C57BL/6 Hintergrund ist defizient für TNFR2 und wird somit nicht durch TNFR2-spezifische Reagenzien beeinflusst.

C57BL/6N Ly5.1 (CD45.1, gezüchtet an der Universität Regensburg (Shen et al. 1985))

Das Vorhandensein von zwei unterscheidbaren Allelen von CD45 (auch genannt Ly5 oder *protein tyrosine phosphatase, receptor type, C*, PTPRC) auf Leukozyten wurde genutzt, um verschiedene Zellgruppen voneinander zu unterscheiden. Die beiden Allele CD45.1 und CD45.2 sind funktionell identisch, normale C57BL/6N Mauslinien besitzen einen CD45.2 Hintergrund.

2.3 TNF-Varianten

Variante	Bezeichnung	Konzentration	Klon, Datum
Flag-TNF	wtTNF(mu)-Flag	[1,5µg/ml]	6/479, 06.09.2011
TNF80	TNF80(mu)-Flag	[2,8µg/ml]	6/488, 06.09.2011
TNCscTNF80	scTNF80(mu)-Flag-TNC	[2,7µg/ml]	6/642, 05.09.2011
Kontroll-Überstand			03.11.2011

Variante	Konzentration	Hersteller
rmTNF	[100µg/ml]	PeproTech GmbH, Hamburg
rhTNF	[1µg/ml]	Rottapharm Madaus, GmbH Köln

2.4 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
ACK Lysing Buffer	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Co., Hamburg
BD OptEIA Substrat Reagent A and B	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Carboxyfluorescein-Succinimidylester	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat	Promega GmbH, Mannheim
DPBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Foxp3-Staining Buffer Set Fixation/Permeabilization (Concentrate & Diluent)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
MTT	Sigma-Aldrich Co., Hamburg
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Permeabilization Buffer for Foxp3 Staining (10 x)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Puromycin	Sigma-Aldrich Co., Hamburg
RPMI 1640 PAA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

2.5 Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
FACS-Puffer	DPBS 1% FCS
MACS-Puffer	DPBS 0,5% BSA, 2 mM Na ₂ EDTA
Freezing medium (2x)	20% DMSO, 80% FCS
Zellkulturmedium	RPMI 1640, 10% FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 U/mL Penicillin, 100 U/mL Streptomycin

Puffer für IL-2- und IFN- γ -ELISA

Wash Buffer (PBS-T)	0.05% Tween 20 in PBS, pH 7,2 - 7,2
Block Buffer	PBS 1% BSA, 0,05% NaN ₃
Reagent Diluent	TBS 0,1% BSA, 0,05% Tween 20
Substrate Solution	1:1-Mischung von Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidin)
Stop solution	2 N H ₂ SO ₄

Puffer für TNFR2-ELISA

Wash Buffer (PBS-T)	0.05% Tween 20 in PBS, pH 7,2 - 7,2
Block Buffer	PBS 1% BSA
Reagent Diluent	PBS 1% BSA
Substrate Solution	1:1-Mischung von Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidin)
Stop solution	2 N H ₂ SO ₄

2.6 Antikörper

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
anti-B220	RA3-6B2	PerCP-Cy5.5	1:600	eBioscience
anti-CD120a	MCA2350	AF647		SeroTec
anti-CD120b	MCA2351	PE		SeroTec
anti-CD25	PC61	PE	1:200	BD Biosciences
anti-CD28	37.51 <i>functional grade</i>			eBioscience
anti-CD3ε	145.2C11			UR
anti-CD4	RM4-5	eFluor450	1:800	eBioscience
anti-CD4	RM4-5	PE	1:1000	eBioscience
anti-CD4	GK1.5	AF488	1:1000	Biolegend
anti-CD16/CD32	2.4G2		1:1000	UR
anti-CD45.1	A20	APC-AF750	1:400	eBioscience
anti-CD45.2	104	FITC	1:400	eBiosciences
anti-CD45.2	104	PerCP-Cy5.5	1:400	eBioscience
anti-CD80	16-10A1	Biotin		BD Biosciences
anti-CD86	GL-1	Biotin		eBioscience

anti-CD8α	53-6.7	AF647	1:800	BD Biosciences
anti-CD8α	53-6.7	AF700	1:800	eBioscience
anti-CD8α	53-6.7	PerCP-eFluor 710	1:1000	eBioscience
anti-Foxp3	FJK-I6s	PE		eBioscience

2.7 Kits (Zellisolation & ELISA)

Bezeichnung	Hersteller
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD4 (L3T4) Micro Beads mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD8(Ly-2) Micro Beads mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mouse IFN-γ ELISA	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Mouse IL-2 DuoSet ELISA	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Mouse sTNF RII/TNFRSF1B ELISA	R&D Systems GmbH, Wiesbaden

2.8 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Biosphere filter tips	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cell culture flasks 75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cell strainer BD Falcon	Wilson Company, Inc., Columbus, USA
Centrifugation tubes (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Eppendorf cups (1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
FACS tubes BD Falcon	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
MACS Cell Separation Columns 25 LS/MS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatten Microtest 96	Becton Dickinson, Heidelberg
Petri dishes	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serological pipettes (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterile filter 0.2 µm	Sartorius AG, Göttingen

2.9 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Cell Safe, Incubator Integra	Bioscience GmbH, Fernwald
Eppendorf 5417R centrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf 5418R centrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf 5810R centrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Laminar Flow HB2448 Herasafe	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
LSRII, Flow cytometer	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnetic stirrer MR3001k	Heidolph GmbH, Schwabach
Microplatereader Emax	Molecular Devices, München
Microscope Zeiss Axiostar plus	Zeiss GmbH, Jena
Microscope Olympus CK2	Olympus GmbH, Hamburg
MACS Multistand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim
OctoMACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
QuadroMACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MS2 Minishaker vortexer	IKA, Staufen
Nitrogen tank	German Cryo GmbH, Jüchen
pH-Meter Inolab	WTW GmbH, Weilheim
Pipetting unit accujet pro	Brand GmbH, Wertheim
Pipetting unit	Thermo Scientific GmbH, Waltham, USA
Pipetting unit	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetting unit labmate	Abimed GmbH, Langenfeld
Sartorius C2245	Sartorius AG, Göttingen
Water-bath TW20	Julabo GmbH, Seelbach

2.10 Software

Das vorliegende Manuskript wurde mit LibreOffice 4.2.6 (The Document Foundation, Berlin) erstellt. Die herangezogene Literatur wurde mit Zotero 4.0.26 (Center for History and New Media, George Mason University, Fairfax, USA) verwaltet. Graphen, Diagramme und statistische Tests wurden unter Benutzung von GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, USA) erstellt. Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit BD CellQuest Pro 5.2.1 oder BD FACSDiva 5.0.3 (BD Biosciences GmbH, Heidelberg).

3 Methoden

3.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Benutzung von sterilen Reagenzien, Pipetten und Gefäßen in einer Laminar Flow HB2448 Herasafe Sterilwerkbank durchgeführt.

Die unter 2.1 aufgeführten Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ in Medium (RPMI 1640 mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin und 50 mM β-Mercaptoethanol) kultiviert und, je nach Konfluenz, ein bis drei mal pro Woche passagiert.

3.2 TNF-Varianten

Die biologische Aktivität von TNF wird größtenteils durch Bindung an die Rezeptoren der für die TNF-Rezeptorgruppe namensgebenden TNF-Rezeptoren 1 und 2 vermittelt. Um die Funktionen dieser Rezeptoren unabhängig voneinander betrachten zu können, wurden verschiedene Varianten des Maus TNF (mTNF) verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Prof. H. Wajant (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Natives mTNF liegt als Monomer vor, das spontan trimerisiert (vgl. Abb. 2a). Es kann TNFR1 durch Bindung an diesen vollständig aktivieren, nicht jedoch TNFR2. Letzterer kann *in vivo* nur durch membrangebundes mTNF suffizient aktiviert werden. Um die spezifische Aktivierung des TNFR2 *in vitro* untersuchen zu können, wurden mehrere rekombinante TNF-Varianten verwendet. wtTNF(mu)-Flag (im Folgenden als „Flag-TNF“ bezeichnet) stellt das zum Zwecke der Aufreinigung und Oligomerisierung am N-Terminus mit einem Flag-Tag versehene Wildtyp (wt) mTNF dar. Durch Veränderungen der Aminosäuresequenzen, die denen von humanen TNF-Mutanten entsprechen (D143N/A145R) (Loetscher et al. 1993), ist eine ausschließliche Interaktion mit TNFR2 möglich (TNF80(mu)-Flag, „TNF80“). Durch kurze Peptid-Linker wurden im Folgenden je drei TNFR2-spezifische Monomere zu einem *single-chain* TNF-Trimer (scTNF80(mu)-Flag, „scTNF80“, vgl. Abb. 2b) verknüpft. Je drei dieser Trimere wurden mittels einer Tenascin-C-Trimerisierungs-Domäne (TNC) an deren N-terminalen Enden zu einem Nonamer verlinkt, um eine in vollem Umfang funktionelle Aktivierung des TNFR2 durch den TNFR2-spezifischen Liganden, genannt scTNF80(mu)-Flag-TNC („TNCscTNF80“, vgl. Abb. 2c), zu erzielen.

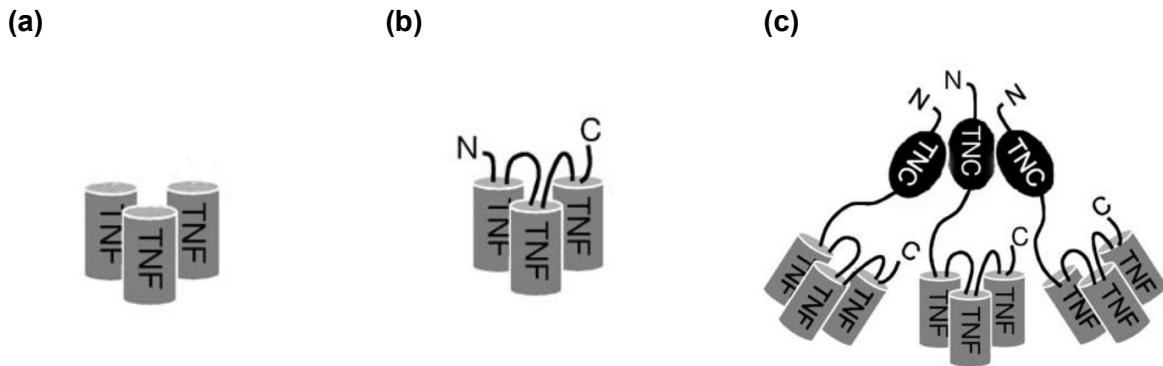


Abb. 2: Schema der TNF-Varianten: (a) TNF-Trimer, (b) scTNF80, (c) TNCscTNF80

(a) zeigt schematisch das nicht kovalent verbundene TNF-Trimer, (b) das über Peptid-Linker verknüpfte single-chain TNF-Trimer (scTNF80), (c) zeigt das mittels Tenascin-C-Trimerisierungs-Domäne (TNC) verbundene Nonamer TNCscTNF80 (Fischer et al. 2011).

Die beschriebenen TNF-Varianten lagen als Zellkulturüberstand in Konzentrationen von 1,5-2,8 μ g/ml vor und wurden in Endkonzentrationen von 1pg/ml bis 1 μ g/ml in Wirbelzellassays, Proliferations- und Suppressionsassays sowie zur Prästimulierung von Treg genutzt.

3.3 TNF-Kill-Assays

3.3.1 Wirbelzellassay

Hintergrund

Um die Rezeptorspezifität der TNF-Varianten testen zu können, wurden stabil transduzierte, eukaryotische, Fibroblasten-ähnliche Zelllinien verwendet, die am Institut für Immunologie Regensburg in einem früheren Projekt generiert wurden (Schneider-Brachert et al. 2004; Polz 2010). Hierfür wurde eine stabile Zelllinie (genannt „Wirbelzellen“) aus einer TNFR1- und TNFR2-doppeldefizienten Maus etabliert und mittels pQCXIP-Plasmiden mit TNF-Rezeptor-Fas-Fusionsprotein-Konstrukten (TNFR1ed-huFasid und TNFR2ed-huFasid) retroviral stabil transduziert. Der extrazelluläre Teil des TNFR1 bzw. TNFR2 wurde dabei mittels der Restriktionsenzyme Bam und EcoRV in die Vektoren kloniert, der zytosolische Teil des humanen Fas-Rezeptors mittels EcoRV und Xho eingefügt (Polz 2010). Bei einer

funktionellen Bindung von TNF an die transduzierten TNF-Fas-Fusionsrezeptoren kann so eine Aktivierung des Fas-Signalweges über die *fas associated death domain* (FADD) erfolgen, was zu einer Aktivierung der Caspasen-Signalwege und somit zur Apoptose der Zelle führt. Mit einem leeren Vektor transduzierte Zellen dienten für die weiteren Experimente mit diesen Zelllinien als Kontrolle.

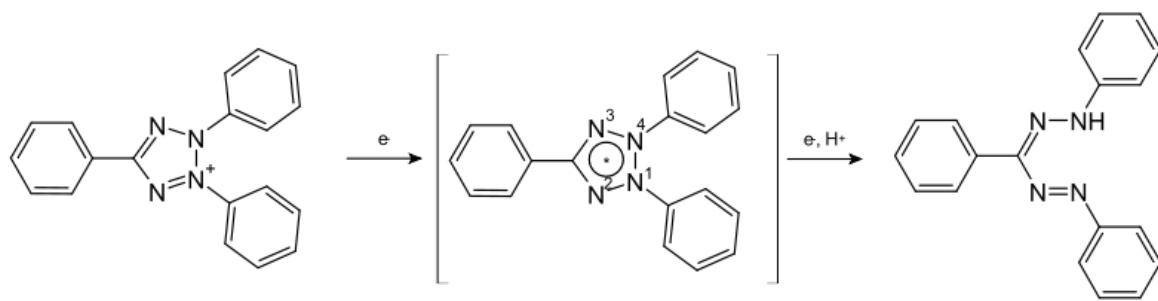
Durchführung

TNFR1ed-huFasid- bzw. TNFR2ed-huFasid-transduzierte Wirbelzellen wurden zusammen mit den mit einem leeren Vektor transduzierten Kontrollen in eine 96 well-Flachboden-Microtiterplatte ausgebracht. Hierfür wurden die Wirbelzellen an Tag 0 durch Inkubation in 1ml Trypsin für 3min bei Raumtemperatur geerntet und bei 300g, 4°C 7min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10ml Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden 5×10^3 Zellen/well in 100µl Medium in eine 96 well-Flachboden-Microtiterplatte ausgebracht und bei 37°C, 5% CO₂ über Nacht inkubiert. An Tag 1 wurden die Überstände der TNF-Varianten in den doppelten der gewünschten Konzentrationen vorbereitet. Die Überstände der Wirbelzellen wurden vorsichtig abgesaugt und 75µl Medium vorgelegt, um ein Austrocknen der wells zu verhindern. Nun wurden je 75µl der TNF-Verdünnungen auf die wells pipettiert und die Platte bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach 48h (Tag 3) erfolgte die Auswertung mittels eines MTT-Assays.

3.3.2 MTT-Assay

Hintergrund

Der MTT- (3-(4,5-Dimethylazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid-) Assay stellt einen klassischen Zytotoxizitätstest dar. Durch ihn lässt sich die Stoffwechselaktivität der in den wells kultivierten Zellen testen. Durch die im Rahmen der Glykolyse gebildeten Reduktionsäquivalente Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) wird das für den Test namensgebende, gelbe Tetrazoliumbromid zu einem blau-violetten Formazan reduziert. Die so gemessene Stoffwechselaktivität der Zellen lässt sich als Äquivalent der Biomasse und somit des Verhältnisses lebender zu apoptotischer Zellen auffassen.

**Abb. 3: Reduktion von MTT**

Reduktase-vermittelte Reduktion des Tetrazoliumbromids zu einem Formazan (Mattern 2010).

Durchführung

Es wurden hierfür 10 μ l MTT-Lösung [5mg/ml] auf die wells der 96 well-Flachboden-Microtiterplatten pipettiert und diese für zwei bis vier Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach Lyse der Zellen mittels 70 μ l 20% Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecyl sulfate, SDS*)/well und einer weiteren Inkubationsdauer von 3h wurde die *optical density* (OD) bei einer Wellenlänge von 540nm im Microplatereader Emax ausgelesen. Die erhaltenen Daten wurden auf den Durchschnitt der Kontroll-wells ohne zugegebene TNF-Varianten normalisiert, dieser wird als 100% Viability dargestellt.

3.4 Maushaltung

Sämtliche Mäuse wurden gemäß den deutschen Tierhaltungsrichtlinien gehalten. Die Mäuse wurden einem 12 Stunden hell/dunkel-Rhythmus ausgesetzt und erhielten Spezies-spezifische Standardnahrung und Leitungswasser ad libitum.

3.5 Präparation der Milzen

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation unter Inhalationsnarkose mit Diethylether getötet, die Milzen entnommen und zur sofortigen weiteren Verwendung in 5ml gekühltem Medium aufgenommen.

3.6 Zellisolation

Hintergrund

Um T-Zell-Subpopulationen aus Milzzellsuspensionen zu isolieren, wurde die Methode der *magnetic cell separation* (MACS) genutzt. Bei der Isolation von CD4⁺CD25⁺ Treg wurden nach Inkubation der Milzzellen mit Microbead-gekoppelten Antikörpern in einem ersten Schritt CD4⁺ T-Zellen durch Negativselektion über eine MACS-LD-Säule isoliert. In einem zweiten Schritt wurden aus diesen CD4⁺ T-Zellen auf MACS-MS-Säulen CD4⁺CD25⁺ Zellen positiv selektiert.

Die Isolation von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell-Populationen aus Milzzellsuspensionen erfolgte mittels Positivselektion über MACS-LS- oder MS-Säulen.

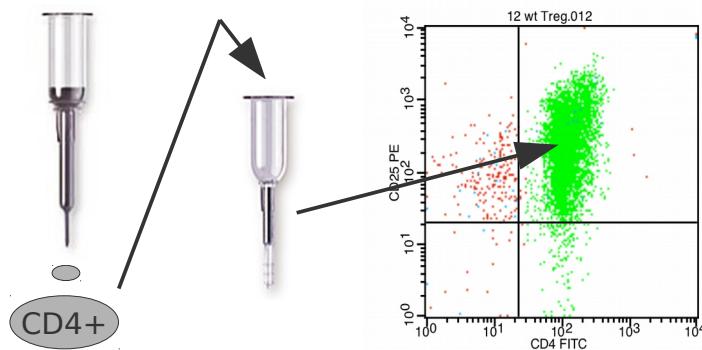


Abb. 4: MACS-Zellisolation am Beispiel der CD4⁺CD25⁺ Treg-Isolation

Isolation der CD4⁺CD25⁺ Treg mittels MACS in zwei Schritten: Negativselektion der CD4⁺ T-Zellen mittels MACS-LD-Säule, dann Positivselektion der CD4⁺CD25⁺ Zellen mittels MACS-MS-Säule und anschließender Kontrolle der Reinheit mittels FACS-Färbung gegen CD4 und CD25 (siehe 3.10.1).

Durchführung

3.6.1 Aufschluss von Milzzellen für MACS-Zellisolation

Für die Isolation von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen wurde das *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit mouse* benutzt. Die Milzen der Einzelmäuse wurden nach Entnahme separat in gekühlten MACS-Puffer (siehe 2.5) gegeben und die Zellen durch Zerdrücken der Milzen mit einem Spritzenstempel durch ein 40µm Filternetz extrahiert. Die Zellen jeder Milz wurden in je ein 15ml-tube überführt, gut resuspendiert und pelletiert (Standard: 300g, 4°C, 5min). Die Zellen wurden während und zwischen allen weiteren Schritten soweit

wie möglich auf Eis gehalten, auch die Puffer wurden gekühlt verwendet. Nach Zentrifugation wurden die Überstände dekantiert, die Zellen in 10ml MACS-Puffer resuspendiert und die Zahl der Lymphozyten pro Milz-Präparation durch Zählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.6.2 CD4⁺CD25⁺ Treg-Isolation

Die Milzzellen wurden wie unter 3.6.1 beschrieben aus den Milzen extrahiert, gewaschen und die Zellzahlen bestimmt. Je 1×10^8 Zellen wurden in ein neues 15ml-tube überführt, erneut pelletiert und die Überstände vorsichtig abgenommen. Die Zellpellets wurden in je 400µl MACS-Puffer resuspendiert, 50µl Biotin-Antikörper-Cocktail zugegeben und für 10min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Es wurden 300µl MACS-Puffer, 100µl Anti-Biotin-Microbeads sowie 50µl CD25-PE zugegeben, resuspendiert und erneut bei 4°C für 15min inkubiert. Die so präparierte Zelllösung wurde mit 10ml MACS-Puffer gewaschen, pelletiert, der Überstand abgenommen und in 500µl MACS-Puffer resuspendiert.

Eine MACS-LD-Säule je Milzpräparation wurde in einen Magnethalter (siehe 2.9) eingespannt und mit 2ml MACS-Puffer equilibriert. Die Zellsuspensionen wurden über 40µm Filternetze auf die Säulen aufgetragen und die Durchflüsse in 15ml-tubes in einem Kühlständer aufgefangen. Die Säulen wurde zweimal mit je 1ml MACS-Puffer gespült, es wurde hierbei darauf geachtet, dass der Inhalt der Säule vor dem darauf folgenden Spülen stets komplett durchgelaufen war.

Der Durchfluss, die CD4⁺ Zellen, wurde daraufhin pelletiert, Überstände verworfen und die Zellpellets in 900µl MACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 50µl Anti-PE-Microbeads wurde erneut 15min bei 4°C inkubiert, mit 10ml MACS-Puffer aufgefüllt und pelletiert. Die Zellen wurden in 500µl MACS-Puffer resuspendiert. Eine MACS-MS-Säule pro Milz-Präparation wurde in den Magnethalter eingespannt und mit 500µl MACS-Puffer equilibriert, die CD4⁺ Zellsuspensionen auf die Säulen aufgetragen und die Säule dreimal mit je 500µl MACS-Puffer gespült. Die Säulen wurden daraufhin vom Magneten entfernt und die CD4⁺CD25⁺ Zellen aus den Säulen mit 1ml MACS-Puffer eluiert. Diese Eluate wurden auf neue, equilibrierte MACS-MS-Säulen gegeben und die obigen Schritte wiederholt. Die Eluate der zweiten Säule wurden zentrifugiert, die Überstände verworfen und die CD4⁺CD25⁺ Zellen in einer geeigneten Menge Medium aufgenommen.

Die Reinheit der auf diese Weise isolierten CD4⁺CD25⁺ Treg wurde durch Färbung gegen CD4, CD25, CD8 und B220 mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting, FACS*) analysiert, sie betrug 85-96%.

3.6.3 CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell-Isolation

Für die Separation von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zell-Populationen wurden CD4 (L3T4) bzw. CD8 (Ly-2) *Micro Beads mouse* verwendet. Die Milzzellen wurden wie unter 3.6.1 beschrieben aus den Milzen extrahiert, gewaschen und die Zellzahlen bestimmt.

Die gewünschte Zellzahl wurde in 100µl MACS-Puffer/10⁷ Zellen resuspendiert und mit 1µg F_c-Block (anti-CD16/32-AK)/10⁷ Zellen in einem 15ml-tube für 10min bei 4°C inkubiert, danach wurden 5µl Microbeads/10⁷ Zellen hinzugefügt und erneut 15min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschnitt mit 10ml MACS-Puffer wurde das Zellpellet in 100µl MACS-Puffer/10⁷ Zellen resuspendiert.

Eine MACS-LS-Säule wurde in einen Magnethalter eingespannt und mit 4ml MACS-Puffer equilibriert. Nach Auftragen der Zellsuspension über ein 40µm Filternetz wurde dreimal mit je 1ml, dann zweimal mit je 3ml gespült. Die Säule wurde vom Magneten entfernt und mit 5ml MACS-Puffer eluiert. Die eluierten Zellen wurden pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 500µl MACS-Puffer aufgenommen und auf eine mit 500µl MACS-Puffer equilibrierte MACS-MS-Säule aufgetragen. Nach dreimaligem Spülen mit je 500µl MACS-Puffer wurden die isolierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen mit 1ml MACS-Puffer eluiert, pelletiert und in einer geeigneten Menge Medium aufgenommen. Wurden 5x10⁷ oder weniger Zellen pro MACS-Säule eingesetzt, wurde auch im ersten Schritt eine MACS-MS-Säule verwendet.

Die Reinheit der auf diese Weise isolierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurde durch Färbung gegen CD4, CD8 und B220 mittels FACS analysiert, sie betrug 96-98%.

3.7 Markierung der Milzzellen mit CFSE

Hintergrund

Um Einflüsse der TNF-Varianten auf die Funktion der regulatorischen und konventionellen T-Zellen beurteilen zu können, wurden die Zellen, die als Effektorzellen dienten, mit 5-(und 6-) Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) markiert.

Das nicht fluoreszente 5-(und 6-) Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFDASE) kann aufgrund seiner membrangängigen Eigenschaften leicht in die Zellen eindringen, dort spalten intrazelluläre Esterasen die Acetatgruppen ab (siehe Abb. 5). Das entstehende fluoreszente Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) ist deutlich weniger membrangängig. Über seine Succinimidyl-Gruppe bildet CFSE mit Aminen intrazellulärer Proteine stabile kovalente Bindungen und bleibt so fest gebunden.

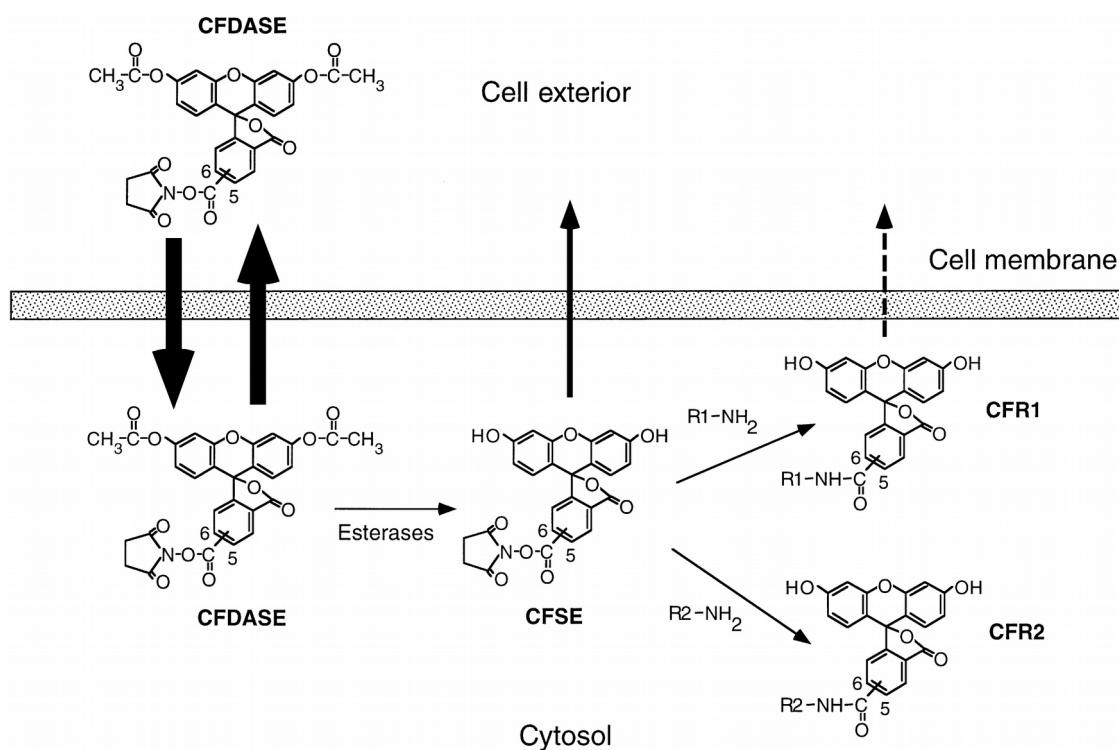


Abb. 5: Kinetik von CFSE in Lymphozyten

Der Farbstoff 5-(und 6-) Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFDASE) kann aufgrund seiner membrangängigen Eigenschaften leicht in die Zellen eindringen, wo intrazelluläre Esterasen die Acetatgruppen abspalten. Das entstehende Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) ist deutlich weniger membrangängig. Über seine Succinimidyl-Gruppe kann CFSE stabile kovalente Bindungen zu Aminen intrazellulärer Proteine herstellen und bleibt so in den Zellen gebunden (Parish 1999).

Die homoquantitative Aufteilung der zellulären Proteine und damit auch des kovalent gebundenen CFSE mit jeder Zellteilung und eine daraus resultierende Halbierung der Fluoreszenzintensität mit jedem Zyklus ermöglicht eine Darstellung der Proliferationszyklen der Zellen. CFSE ist in höheren Konzentrationen zelltoxisch, in niedrigen Konzentrationen aber, wie für diese Arbeit verwendet, zeichnet sich CFSE durch eine vergleichsweise niedrige Toxizität aus und wird daher für Proliferationsstudien *in vitro* wie *in vivo* verwendet.

Durchführung

Um die Milzzellen zu extrahieren, wurden die Milzen mit einem Spritzenstempel durch ein 40µm Filternetz zerdrückt und dieses anschließend mit 5ml Medium gespült. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml-Falcon überführt, gut resuspendiert und pelletiert (300g, 4°C, 5min). Die Zellen wurden zwischen den folgenden Schritten soweit wie möglich auf Eis gehalten. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 5ml ACK-Puffer resuspendiert, um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren, und sofort erneut wie oben beschrieben pelletiert. Es folgten ein Waschschritt mit 10ml Medium und zwei weitere Waschschritte mit je 10ml DPBS. Während des letzten Waschschrittes wurde die Zellzahl der Lymphozyten bestimmt. Das Zellpellet wurde danach in 1ml CFSE-Lösung (PBS-FCS 1% mit 2µM CFSE)/10⁷ Zellen schnell und sorgfältig resuspendiert und bei 37°C für 10min im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 4ml kaltem PBS-FCS 5%/10⁷ Zellen wurden die Zellen pelletiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS-FCS 5% gewaschen, ihre Anzahl bestimmt und in einer geeigneten Menge Medium aufgenommen.

3.8 Proliferations- und Suppressionsassays

Hintergrund

Der T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) ist ein multimerer Komplex, bestehend aus einem antigenbindenden Teil und den signaltransduzierenden CD3-Ketten. Je eine α- und β-Kette (selten eine γ- und eine δ-Kette) bilden ein durch alternatives *splicing* hochvariables Heterodimer, das Kernstück des TCR, welches das Antigen erkennt und bindet. Der invariable CD3-Komplex besteht aus je einem Heterodimer aus einer γ- bzw. δ- mit je einer ε-Kette sowie einem zytosolischen Homodimer aus ζ-Ketten. Er ist vor allem für die Signaltransduktion, aber auch für den Transport des TCR auf die Zelloberfläche zuständig.

Erkennt der TCR ein durch professionelle APC auf *major histocompatibility complex* (MHC) präsentiertes Antigen, so wird das Signal über den CD3-Komplex weitergeleitet, was zu einer Phosphorylierung der ζ -Ketten an sogenannten *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAM) führt. Dies setzt nach Binden von *zeta-chain-associated protein kinase 70* (ZAP-70) an die ζ -Kette über die Aktivierung weiterer Tyrosin-Kinasen intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, die im Endeffekt eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, insbesondere NF- κ B, AP-1 sowie *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) initiieren, welche vor allem eine Differenzierung und Proliferation der T-Zellen vermitteln.

Zusätzlich zu einem physiologischen Stimulus über den TCR benötigt eine T-Zelle jedoch ein kostimulatorisches Signal, in der Regel über das Oberflächenmolekül CD28, um die beschriebenen Signalkaskaden in Gang zu setzen. Der für die Aktivierung der T-Zelle notwendige zweite Stimulus wird von professionellen APC übermittelt, indem diese mit dem B7-Komplex (CD80/CD86) an CD28 binden.

In den durchgeföhrten Proliferations- und Suppressionsassays wurden die T-Zellen mit löslichem anti-CD3 ϵ -Antikörper stimuliert. Die Aktivierung der T-Zellen mittels anti-CD3 ϵ -AK stellt eine alternative Methode zum physiologischen Stimulus über den antigenbindenden Teil des TCR dar. Das Signal führt direkt zu einer Aktivierung der intrazellulären Signalwege, der benötigte Kostimulus wird mittels physiologischer B7-CD28-Interaktion mit APC vermittelt. Auf diese Weise kann der physiologisch benötigte Antigen-spezifische Reiz über den TCR umgangen und die Zellen somit Antigen-unabhängig aktiviert werden.

Durchführung

150 000 CFSE-markierte Milzzellen je *well* wurden in 150 μ l Medium in einer 96 *well*-Flachboden-Microtiterplatte eingesetzt. Dies entspricht in etwa 50 000 - 60 000 T-Zellen, die als Effektor-T-Zellen (Teff) dienten. In den Suppressionsassays wurden je 50 000 Treg in 50 μ l Medium hinzugegeben. Das Endvolumen der *wells* betrug stets 200 μ l. Insofern in den Proliferationsassays keine Treg eingesetzt wurden, wurden 50 μ l Medium hinzugegeben.

Diese Methode unterscheidet sich von der in der Literatur oft beschriebenen, Effektor-T-Zellen und APC zu separieren und dann in definierten Verhältnissen wieder zusammen für

Proliferations- und Suppressionsassays in Kultur zu geben (X. Chen et al. 2007; X. Chen et al. 2008).

Die Tatsache, dass wir *in vitro* Kulturen mit vollständigen, unseparierten Milzzell-Populationen verwendeten, zeigte keinerlei Nachteile hinsichtlich Proliferation der Teff oder deren Suppression durch Treg. Diese Methode verbindet im Gegenteil möglichst wenig manipulierte Bedingungen und eine im Verhältnis relativ einfache Handhabbarkeit.

In der Regel wurden die Lymphozyten in den verschiedenen Experimenten mit 0,5 μ g/ml oder 0,015 μ g/ml löslichem anti-CD3ε-AK stimuliert. Die verschiedenen TNF-Varianten wurden in den gewünschten Konzentrationen zugegeben und für 72h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Es wurden jeweils technische Duplikate oder Triplikate angelegt.

3.9 Prästimulierung der Treg

In einigen Experimenten wurden Treg für 72h mit IL-2 vorstimuliert. Dies ist notwendig für die *in vitro* Kultivierung von Treg, da diese das für ihr Überleben unabkömmliche Zytokin nicht selbst produzieren können (X. Chen et al. 2004). In Prästimulierungsassays wurden 200 000 durch MACS-Isolation separierte Treg in 200 μ l Medium in die *wells* einer 96 *well*-Rundboden-Microtiterplatte eingesetzt. Sie wurden mit 10ng/ml IL-2 und/oder 10ng/ml TNCscTNF80, rmTNF oder rhTNF für 72h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. In einigen Experimenten wurden die auf diese Weise prästimulierten Treg geerntet, bei 300g, 4°C, 5min pelletiert, in 100 μ l Medium resuspendiert und gezählt. Je 50 000 prästimulierte Treg wurden daraufhin wie unter 3.8 beschrieben in einen Suppressionsassay mit 0,5 μ g/ml löslichem anti-CD3ε-AK eingesetzt. In anderen Experimenten wurde eine FACS-Färbung gegen Foxp3, CD25, CD4, CD8 und B220 durchgeführt.

3.10 FACS-Färbung

Hintergrund

Das FACS stellt eine geeignete Methode dar, um Zellen sowohl phänotypisch als auch funktionell zu analysieren. Es können hierbei sowohl intra- als auch extrazelluläre Proteine für die FACS-Analyse gefärbt werden, indem die Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen die jeweils gewünschten Proteine inkubiert werden. Die durch Laser induzierte emittierte Fluoreszenz der Zellen kann daraufhin gemessen werden. Auch die Proliferation der Zellen lässt sich mittels der in 3.7 dargestellten Färbung mit CFSE gut beurteilen.

Durchführung

Die verwendeten Antikörper und die jeweils benutzten Fluorochrome sind unter 2.6 aufgelistet.

3.10.1 Oberflächenfärbung

Die Zellen aus Proliferations- bzw. Suppressionsassays wurden durch gründliches Resuspendieren geerntet, in FACS-tubes mit 2ml PBS-FCS 1% überführt und bei 300g, 4°C 5min pelletiert. Durch Invertieren der tubes und anschließendes Abtupfen auf Papierhandtüchern wurden die Überstände entfernt, es verblieben ca. 40µl im tube. Es wurde 1µg F_c-Block (anti-CD16/CD32)/tube hinzugegeben, um eine unspezifische Bindung der Fluorochrom-konjugierten Antikörper zu verhindern, und 5min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die benötigten Fluorochrom-gekoppelten Antikörper wurden in den unter 2.6 aufgelisteten Verdünnungen in PBS-FCS 1% zugegeben. Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde mit 1ml PBS-FCS 1% gewaschen und bei 300g 5min 4°C zentrifugiert. Die tubes wurden erneut invertiert und abgetupft, mit 200µl PBS-FCS 1% mit 2% Formaldehyd für mindestens 15min bei 4°C fixiert und binnen 3 Tagen, meist noch am selben, im FACS analysiert.

In einigen Experimenten wurden die Proben nicht fixiert, sondern mit 200µl PBS-FCS 1% verdünnt und direkt im FACS analysiert.

3.10.2 Intrazelluläre Foxp3-Färbung

Um Foxp3-Level der Treg bestimmen zu können, wurden die Zellen nach erfolgter Oberflächenfärbung unter Benutzung des Foxp3 Staining Buffer Sets gefärbt. Die nicht Formaldehyd-fixierten Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS-FCS 1% mit 500µl Foxp3-Fixations/Permeabilisationslösung (*Fixation/Permeabilization Concentrate:Diluent = 1:4*) bei 4°C im Kühlschrank für 1h inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte mit je 1ml *Permeabilization Buffer*, Zentrifugation (Standard: 300g, 4°C, 5min), Invertieren und Abtupfen. Nach Zugabe von 1µg F_c-Block (anti-CD16/CD32)/tube und 15min Inkubation bei 4°C wurde 1µl anti-Foxp3-AK/tube hinzugefügt und für 30min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit 1ml Permeabilization Buffer gewaschen, pelletiert, die tubes invertiert und abgetupft. Die Zellen wurden hierauf in 200µl PBS-FCS 1% aufgenommen und innerhalb von 3 Tagen im FACS analysiert.

3.11 FACS-Analyse und Auswertung

Nach FACS-Färbung (wie unter 3.10 beschrieben) und erfolgter durchflusszytometrischer Analyse, unter Benutzung des LSR II oder des FACSCalibur, wurden die Teff mittels *gating* auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellpopulationen separiert betrachtet (Abb. 6). In den *wells* vorhandene Treg konnten aufgrund der Tatsache, dass sie nicht CFSE-markiert waren, von den CFSE-positiven Teff unterschieden und aus deren Analyse ausgeschlossen werden (Abb. 6c, d).

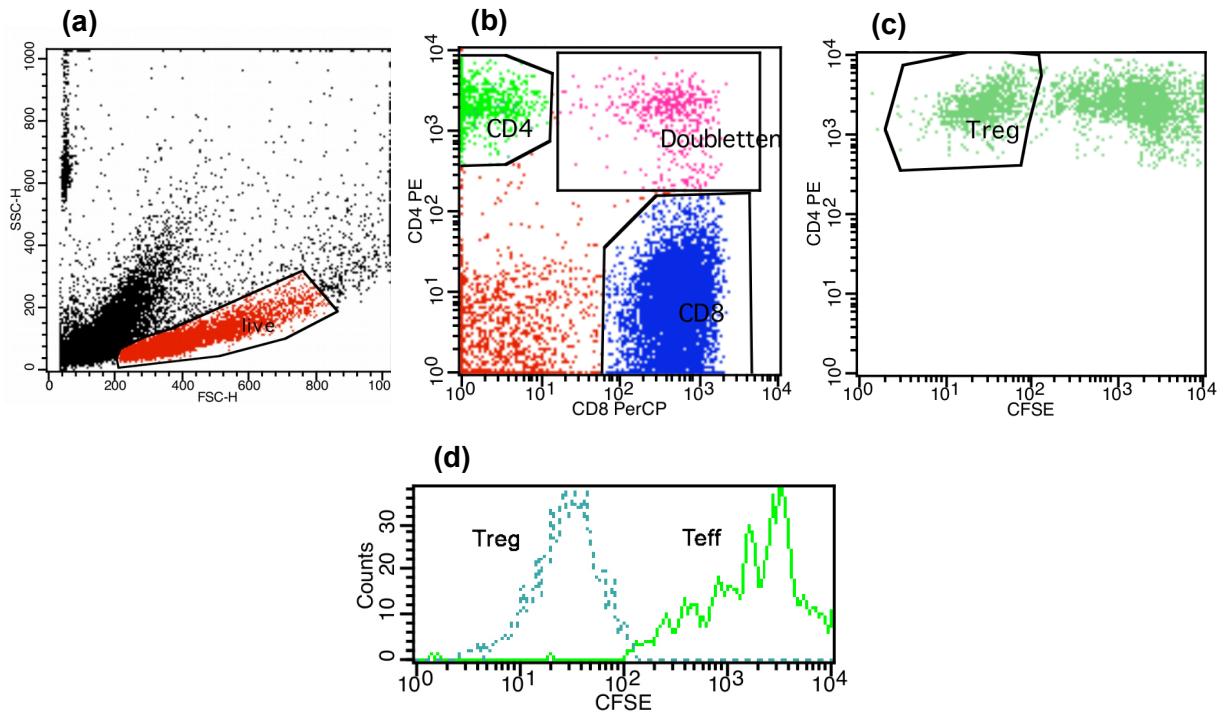


Abb. 6: gating Strategie nach FACS-Analyse der Proliferations- und Suppressionsassays

Nach erfolgter FACS-Analyse der Kulturen wurde zunächst ein *live cell gate* (a) erstellt, um tote Zellen, Zelltrümmer und Verunreinigungen aus der Analyse auszuschließen. Daraufhin wurden *gates* für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erstellt, CD4-CD8-doppelpositive Zellen („Doubletten“, b) wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die CD4⁺ Zellpopulationen wurden in einem weiteren Schritt anhand der CFSE-Level in CD25⁺ (CFSE-negative Treg) und CD25⁻ Zellen (CFSE-positive Teff) unterteilt (c). Ein Histogramm-Overlay konnte der optimalen Trennung der Zellpopulationen dienen (d). In Histogrammdarstellung konnten nun die vorher durch *gating* definierten CD4⁺ Teff bzw. CD8⁺ Teff hinsichtlich ihrer proliferativen Eigenschaften beurteilt werden (siehe Abb. 7).

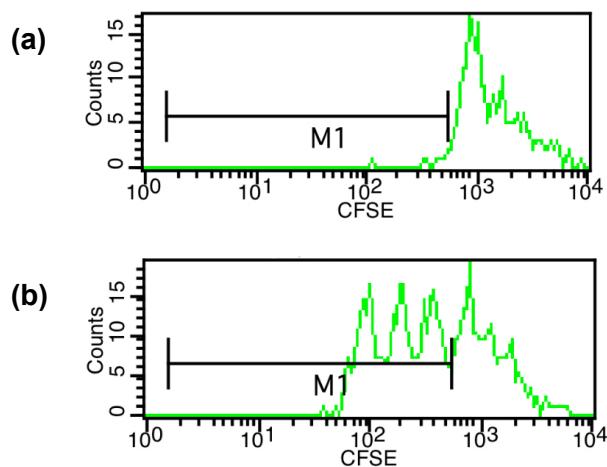


Abb. 7: Auswertung der Proliferationszyklen mittels CFSE-Färbung

Nach *gating* auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen (Abb. 6) wurde die Proliferation der Teff bestimmt, die Proliferationszyklen wurden hierzu in Histogrammen im CFSE-Kanal dargestellt. Der die Zellproliferation definierende Marker M1 wurde anhand der unstimulierten Negativ-Kontrollen (a) und der nur mit anti-CD3-stimulierten Positiv-Kontrollen (b) gesetzt.

Unter Ausschluss der nicht proliferierten Zellen anhand der unstimulierten Negativ-Kontrolle (kein anti-CD3ε-AK, Abb. 7a) wurde der Anteil der proliferierenden CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen in Prozent im CFSE-Kanal ermittelt (% proliferierende Zellen, Abb. 7b). Für die Darstellung als relative Proliferation (%) wurden die Daten auf die Positivkontrolle (Milzzellen stimuliert mit anti-CD3ε-AK ohne Treg und ohne TNF-Agonisten) normalisiert.

3.12 Enzyme-linked immunosorbent assay

Hintergrund

Die Methode des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde sowohl genutzt, um die Zytokine IFN-γ und IL-2 in den Überständen der Proliferations- und Suppressionsassays nachzuweisen, als auch um den Phänotyp der verwendeten TNFR2^{-/-} Mäuse zu überprüfen. Ein für die zu untersuchenden Zytokine bzw. TNFR2 spezifischer Antikörper (*Capture Antibody*) wird hierbei genutzt, um diese in den *wells* zu binden. Daraufhin wird ein weiterer antigenspezifischer Antikörper (*Detection Antibody*) für den Nachweis der gebundenen Antigene zugegeben, an den ein Enzym gekoppelt ist. Im Falle der benutzten Assays war dies die Meerrettich-Peroxidase. Diese setzt ein im folgenden Schritt zugegebenes Substrat um, das Reaktionsprodukt kann dann durch Farbumschlag

nachgewiesen werden. Die im Microplatereader bestimmmbare OD ist eine Funktion der Antigenkonzentration, welche sich anhand eines Standards quantifizieren lässt.

Durchführung

Es wurden die ELISA-Sets mouse IFN- γ , mouse IL-2 DuoSet und mouse sTNF RII/TNFRSF1B verwendet. Der *Capture Antibody* wurde in PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und mit 50 μ l/well in die wells einer 96 well-Microtiterplatte pipettiert. Die Platte wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt und über Nacht (12-18h) inkubiert. Alle Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur im Dunkeln statt. Die Platte wurde dreimal mit 400 μ l *Wash Buffer* (PBS mit 0,05% Tween 20, pH 7,2 – 7,4)/well gewaschen, 150 μ l *Block Buffer* (PBS mit 1% BSA, 0,05% NaN3)/well auf die Platte gegeben und für mindestens 1h inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit *Wash Buffer* wurden 50 μ l/well der in *Reagent Diluent* (Tris-buffered Saline (TBS) mit 0,1% BSA, 0,05% Tween 20, pH 7,2 – 7,4) im Verhältnis 1:2 bzw. 1:100 verdünnten Proben bzw. Standards auf die Platte pipettiert und 2h inkubiert. Es wurde dreimal mit *Wash Buffer* gewaschen, 50 μ l des *Detection Antibody* in *Reagent Diluent*/well hinzugegeben und erneut 2h inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden 50 μ l Streptavidin-HRP (1:200 in *Reagent Diluent*) auf die wells pipettiert und 20min inkubiert. Es folgten drei Waschschritte und die Zugabe von 50 μ l *Substrate Solution* (1:1-Mischung von Tetramethylbenzidin (TMB) und H₂O₂)/well. Die Platte wurde 15min inkubiert, dann 25 μ l *Stop Solution* (2 N H₂SO₄)/well zugegeben. Die OD wurde im Microplatereader bei 450 - 540nm bestimmt.

3.13 Statistische Analyse

Bei allen Experimenten wurden Kulturen mit technischen Duplikaten oder Triplikaten angelegt. Dargestellte Fehlerbalken zeigen stets die jeweilige Standardabweichung (*standard deviation*, SD). Zur statistischen Analyse der Daten wurde der t Test oder der 2way ANOVA, mit Post-hoc-Testung nach Bonferroni, verwendet, p-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant (*) bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Spezifität der TNF-Varianten

Bevor die beschriebenen TNF-Varianten in Proliferations- und Suppressionsassays eingesetzt wurden, um die Auswirkung einer Aktivierung des TNFR2 auf Phänotyp und Funktion von T-Zellen zu untersuchen, wurde deren Spezifität anhand der mit TNF-Rezeptor-Fas-Fusionsprotein-Konstrukten transduzierten Wirbelzellen (siehe 3.3.1) überprüft.

4.1.1 Technische Kontrolle des Wirbelzellen-Systems

Als interne technische Kontrolle des Wirbelzellen-Systems wurden mit einem leeren Vektor transduzierte wt Kontrollen der Wirbelzellen verwendet. Die Inkubation mit den TNF-Varianten Flag-TNF, TNF80, TNCscTNF80 bzw. rekombinantem humanem TNF (rhTNF) zeigte keine Reduktion der Viability (Abb. 8). Ebenso hatte rekombinantes Maus-TNF (rmTNF) keinen Einfluss auf die Viability von wt Wirbelzellen (Daten nicht gezeigt).

Dies diente als technische Kontrolle der Transfektion. Die TNFR1- und TNFR2-doppeldefizienten wt Wirbelzellen reagierten auf eine TNF-Behandlung nicht mit einer Aktivierung des Caspasen-Systems und daraus resultierender Apoptose-Induktion. Eine Reduktion der Viability unter TNF-Behandlung der TNFR1- bzw. TNFR2-transduzierten Wirbelzellen konnte so sicher auf eine Aktivierung der Fas-fusionierten TNF-Rezeptoren zurückgeführt werden.

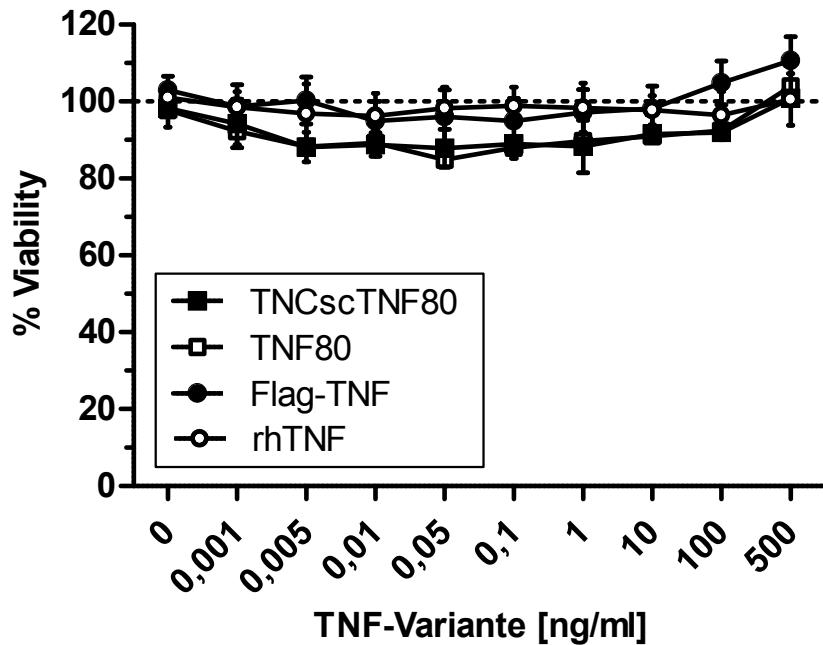


Abb. 8: Wirkung der TNF-Varianten auf kontrolltransduzierte Wirbelzellen

Mit einem leeren Vektor kontrolltransduzierte Wirbelzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der TNF-Varianten behandelt. 72h später wurde die Viability durch einen MTT-Assay bestimmt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) von drei technischen Replikaten eines repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten. Einzelne Konzentrationen der TNF-Varianten wurden in bis zu drei weiteren Experimenten wiederholt.

4.1.2 Spezifische Aktivierung von TNFR1 durch Flag-TNF und rhTNF

TNFR1-transduzierte Wirbelzellen wurden mit den TNF-Varianten inkubiert, um eine mögliche Kreuzreaktivität der TNFR2-spezifischen TNF-Varianten mit TNFR1 auszuschließen. Ferner sollte eine funktionelle Aktivierung von TNFR1 durch Flag-TNF und rhTNF bestätigt werden.

Nach Inkubation der TNFR1-transduzierten Wirbelzellen mit den TNF-Varianten stellte sich der TNFR1 als durch TNF80 wie auch durch TNCscTNF80 nicht funktionell aktivierbar dar (Abb. 9). rhTNF sowie Flag-TNF konnten mit TNFR1 erwartungsgemäß funktionell interagieren, die Kinetik der beiden TNF-Varianten unterschied sich jedoch: Flag-TNF zeigte im Vergleich zu rhTNF erst ab Konzentrationen über 1ng/ml eine signifikante TNFR1-aktivierende Wirkung.

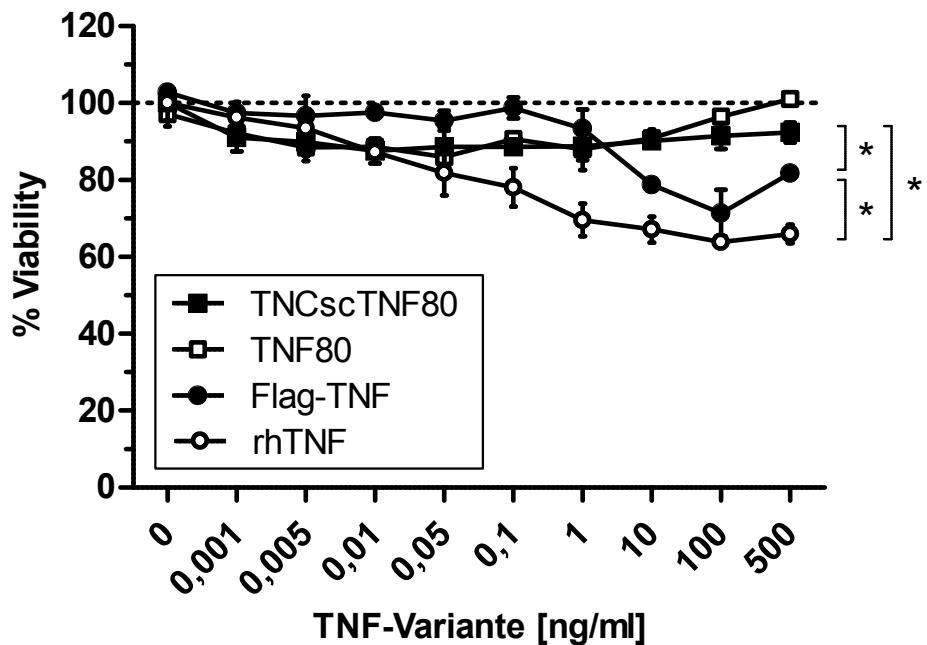


Abb. 9: Wirkung der TNF-Varianten auf TNFR1-transduzierten Wirbelzellen

TNFR1-transduzierte Wirbelzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der TNF-Varianten behandelt. 72h später wurde die Viability durch einen MTT-Assay bestimmt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SD von drei technischen Replikaten eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. Einzelne Konzentrationen der TNF-Varianten wurden bis zu zwei weitere Male wiederholt.

4.1.3 Spezifische Aktivierung von TNFR2 durch TNCscTNF80, nicht aber TNF80

Eine Aktivierung von TNFR2 durch die TNFR2-spezifischen TNF-Varianten TNF80 und TNCscTNF80 sollte mittels der TNFR2-transduzierten Wirbelzellen nachgewiesen werden. TNCscTNF80 zeigte hierbei ab einer Konzentration von 0,1ng/ml eine Aktivierung des TNFR2 mit daraus resultierender Apoptoseinduktion der Zellen (Abb. 10). TNF80 hingegen zeigte keinerlei Reduktion der Viability in allen benutzten Konzentrationen, das unverknüpfte TNF-Trimer scheint, ebenso wie das nicht-TNFR2-spezifische Flag-TNF, keine stabile Bindung zu TNFR2 herstellen zu können, die zu einer Signaltransduktion führen könnte. Auch rhTNF zeigte keinerlei Apoptose-induzierende Wirkung, es konnte so eine mögliche Anwesenheit von TNFR1 auf den TNFR2-transduzierten Wirbelzellen ausgeschlossen und eine TNFR1-spezifische Wirkung von rhTNF bestätigt werden.

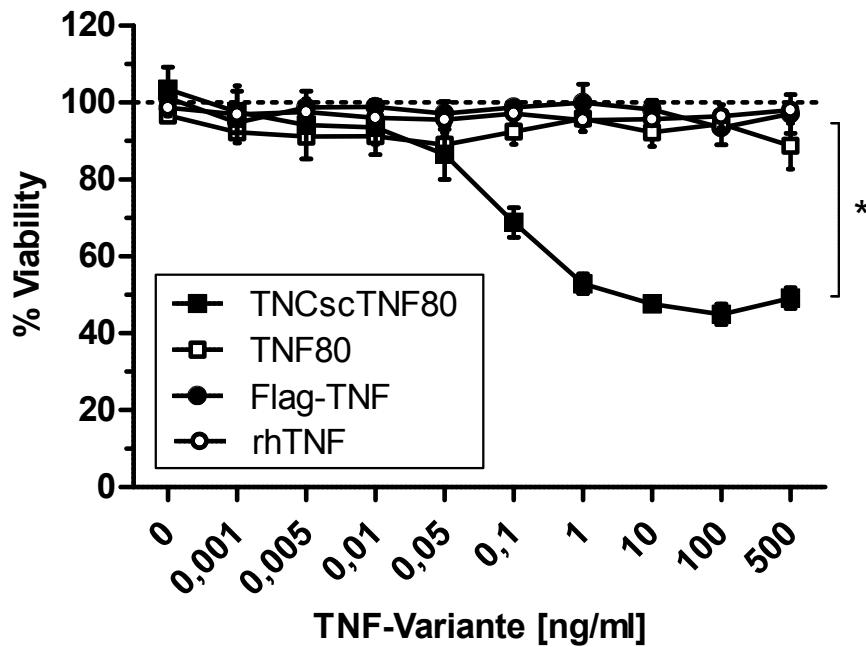


Abb. 10: Wirkung der TNF-Varianten auf TNFR2-transduzierten Wirbelzellen

TNFR2-transduzierte Wirbelzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der TNF-Varianten behandelt. 72h später wurde die Viability durch einen MTT-Assay bestimmt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SD von drei technischen Replikaten eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. Einzelne Konzentrationen der TNF-Varianten wurden bis zu drei weitere Male wiederholt.

TNCscTNF80 stellt sich somit als TNFR2-spezifisch dar und ist im Gegensatz zu TNF80 in der Lage, TNFR2 zu aktivieren. In allen folgenden Experimenten wurde daher TNCscTNF80 als TNFR2-spezifisches Agens eingesetzt.

4.2 Proliferationsassays

4.2.1 Verringerte Proliferation von TNFR2-defizienten Effektor-T-Zellen unter anti-CD3ε-Stimulierung

Um den Einfluss des TNFR2 auf die Proliferation von Effektor-T-Zellen (Teff) zu untersuchen, wurden Milzzellen von wt bzw. TNFR2^{-/-} Mäusen in vitro zur Proliferation angeregt. Unter anti-CD3ε-Stimulierung der T-Zellen zeigte sich, dass die Proliferation TNFR2-defizienter Teff im Vergleich zu wt Teff herabgesetzt ist. CD4⁺ (Abb. 11a) wie auch CD8⁺ (Abb. 11b) T-Zellen aus TNFR2-defizienten Mäusen scheinen sich durch den CD3ε-Stimulus schlechter aktivieren zu lassen als die aus wt Mäusen. Ist die anti-CD3ε-Konzentration hoch genug, erreicht die Proliferation sowohl von wt als auch von TNFR2^{-/-} Teff ein konstantes Plateau (Daten nicht gezeigt). Grundsätzlich waren für eine Proliferation der CD8⁺ T-Zellen niedrigere anti-CD3ε-Konzentrationen vonnöten als bei CD4⁺ T-Zellen.

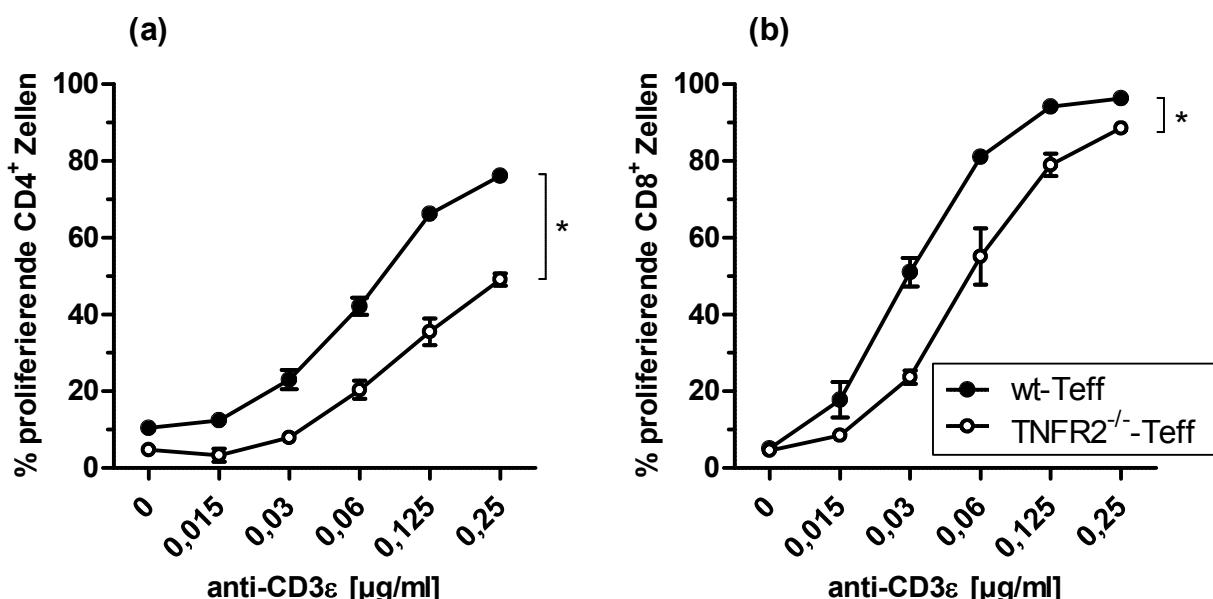


Abb. 11: Proliferation von wt bzw. TNFR2^{-/-} Teff unter anti-CD3ε-Stimulierung

wt bzw. TNFR2^{-/-} Milzzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen anti-CD3ε-AK für 72h stimuliert. Gezeigt sind % proliferierende Zellen der (a) CD4⁺ bzw. (b) CD8⁺ Teff, Mittelwerte ± SD von zwei technischen Replikaten eines repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten.

4.2.2 Gesteigerte Proliferation von Effektor-T-Zellen aufgrund spezifischer Aktivierung von TNFR2

Mit TNCscTNF80 lässt sich, wie in 4.1.3 gezeigt, eine spezifische Aktivierung ausschließlich des TNFR2 sicherstellen. Es schien interessant, welchen Einfluss diese selektive TNFR2-Aktivierung – ohne simultane TNFR1-Aktivierung – auf die proliferativen Eigenschaften von Effektor-T-Zellen hat. Hierfür wurden wt bzw. TNFR2^{-/-} Milzzellen mit TNCscTNF80 sowie anti-CD3ε-AK stimuliert.

Eine Stimulierung des TNFR2 auf wt Teff zusätzlich zu einem TCR-Stimulus führte zu einer verbesserten Aktivierung und somit einer gesteigerten Proliferation der Teff. Diese war sowohl von der eingesetzten Konzentration des anti-CD3ε-AK (Abb. 12) als auch des TNFR2-spezifischen Agens TNCscTNF80 (Abb. 13) abhängig. Dieser Effekt lässt sich auf eine tatsächliche Aktivierung des TNFR2 durch TNCscTNF80 zurückführen, da er bei TNFR2^{-/-} Teff nicht auftrat (Abb. 12).

Ferner zeigten die voneinander abweichenden Kinetiken der CD8⁺ T-Zellen (Abb. 12b), die generell bei gleichen anti-CD3ε-AK-Konzentrationen stärker aktiviert wurden, dass der Proliferationsvorsprung der TNFR2-stimulierten T-Zellen ab einer gewissen Stärke der TCR-Signaltransduktion (ca. 0,25µg/ml anti-CD3ε-AK) von den nicht-TNFR2-stimulierten Kontrollen aufgeholt werden kann.

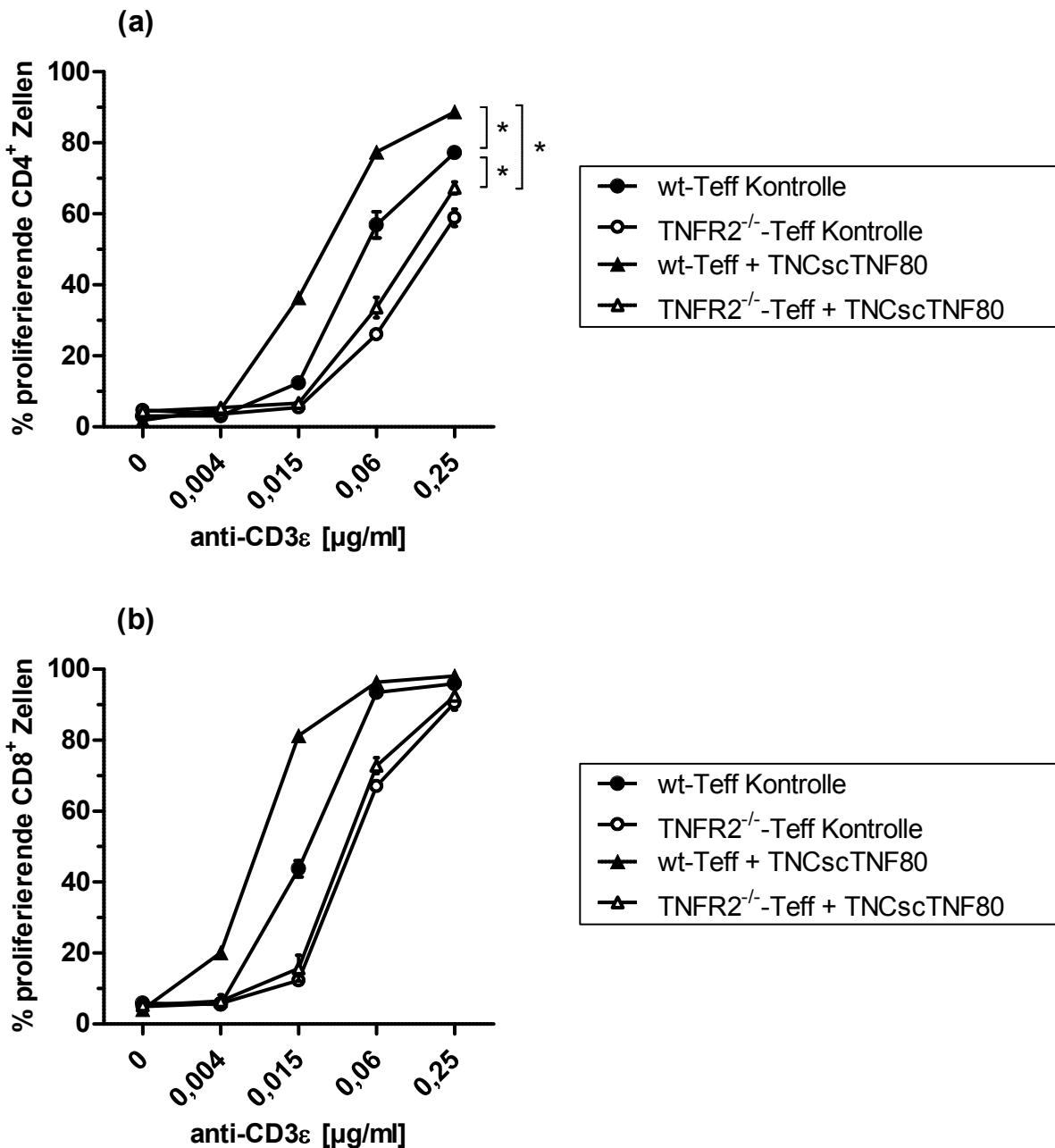


Abb. 12: Aktivierung von TNFR2 auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen durch TNCscTNF80

wt bzw. TNFR2 $^{-/-}$ Milzzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen anti-CD3 ϵ -AK sowie 10ng/ml TNCscTNF80 für 72h stimuliert. Gezeigt sind % proliferierende Zellen der (a) CD4⁺ bzw. (b) CD8⁺ Teff, Mittelwerte \pm SD von zwei technischen Replikaten eines repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten. Signifikanzniveau von Abb. 12b analog Abb. 12a.

In weiteren Experimenten wurden Konzentrationsreihen der TNF-Varianten bei konstanten anti-CD3ε-AK-Konzentrationen angelegt. Da rhTNF nicht an TNFR2 binden kann, ist im Gegensatz zu TNCscTNF80 unter gleicher Behandlung der Teff mit rhTNF keine Steigerung der Aktivierung zu beobachten (Abb. 13). Eine Inkubation der Teff mit rmTNF, welches sowohl TNFR1 als auch TNFR2 zu aktivieren vermag, führte im Vergleich zu TNCscTNF80 erst bei höheren Konzentrationen von 10ng/ml zu einer gesteigerten Proliferation. Dies dürfte auf eine schwächere Aktivierung des TNFR2 durch das unverknüpfte, in monomerer Form, vorliegende rmTNF zurückzuführen sein. Ferner kann aber eine Hemmung der TNFR2-vermittelten Stimulierung der T-Zellen durch gleichzeitige Aktivierung des TNFR1 nicht ausgeschlossen werden.

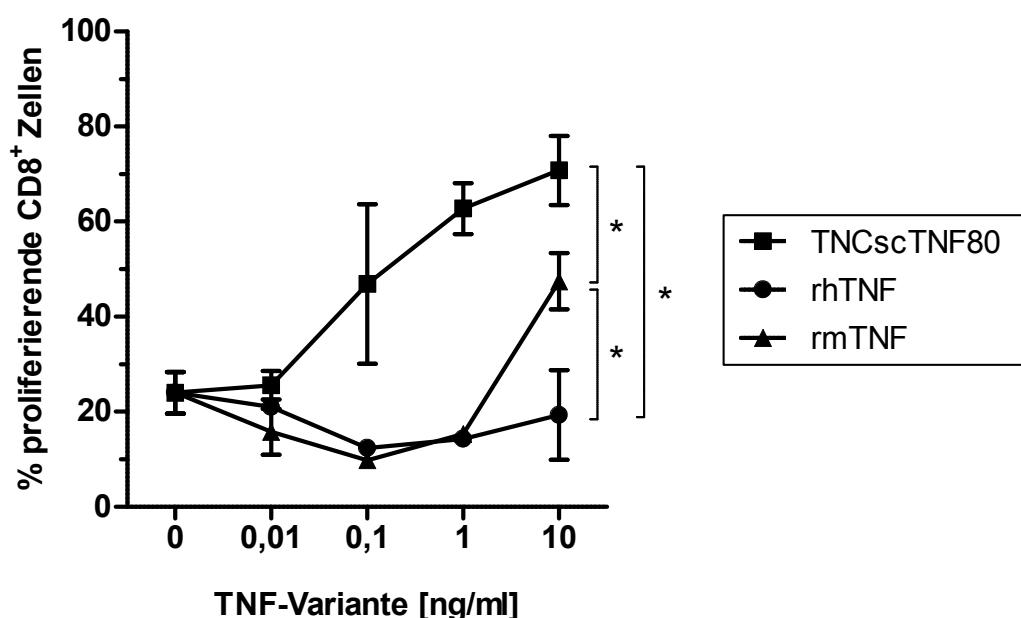


Abb. 13: Proliferation von CD8⁺ T-Zellen unter Stimulierung mit TNCscTNF80, rmTNF bzw. rhTNF
wt Milzzellen wurden mit 0,015μg/ml anti-CD3ε-AK sowie verschiedenen Konzentrationen TNCscTNF80, rmTNF bzw. rhTNF für 72h stimuliert. Gezeigt sind % proliferierende CD8⁺ Teff, Mittelwerte ± SD von zwei technischen Replikaten eines repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten.

4.2.3 TNFR2-Aktivierung kann CD28-Kostimulus nicht ersetzen

Der beobachtete T-Zell-aktivierende Effekt von TNCscTNF80 könnte auf mögliche kostimulatorische Eigenschaften des TNFR2 zurückgeführt werden. Zur Diskussion stand, ob TNFR2 im Rahmen der TCR-Signaltransduktion den klassischen CD28-Kostimulus ersetzen und somit selbst das von der T-Zelle benötigte „zweite Signal“ übermitteln könnte. Um TNFR2 auf diese mögliche kostimulatorische Eigenschaft hin zu überprüfen, wurden aus Milzzellen von wt Mäusen mittels MACS-Prozedur CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen separiert. In APC-freien Kulturen sollte so der Einfluss der Stimuli über den TCR (mittels stimulierendem anti-CD3ε-AK), über CD28 (mittels stimulierendem anti-CD28-AK) sowie über den TNFR2 untersucht werden.

Es zeigte sich erwartungsgemäß, dass eine Stimulierung mit anti-CD28-AK allein nicht genügte, um die Zellen zu aktivieren (Abb. 14). Verglichen mit den mit anti-CD3ε- sowie anti-CD28-AK stimulierten Teff gingen die nur mit anti-CD3ε-AK stimulierten Teff bereits recht stark in Proliferation, trotz einer Reinheit der CD4⁺ T-Zellen von 96-98%. Um dieses technische Problem von geringen Spuren der CD28-Liganden CD80 und CD86 in den Kulturen zu umgehen, wurde blockierender anti-CD80/86-AK mit in Kultur gegeben, was eine Aktivierung der Teff durch bloßen TCR-Stimulus unterband.

Die Inkubation der Teff mit TNCscTNF80 zeigte, dass die Proliferation der bereits mittels TCR- und CD28-Kostimulus aktvierten T-Zellen durch Stimulierung des TNFR2 deutlich gesteigert werden kann. Wurden die Zellen jedoch nur mittels anti-CD3ε-AK über den TCR, nicht aber über CD28 stimuliert, konnte TNCscTNF80 keine Aktivierungssteigerung bewirken. TNFR2 ist folglich nicht in der Lage, den klassischen CD28-Kostimulus zu ersetzen.

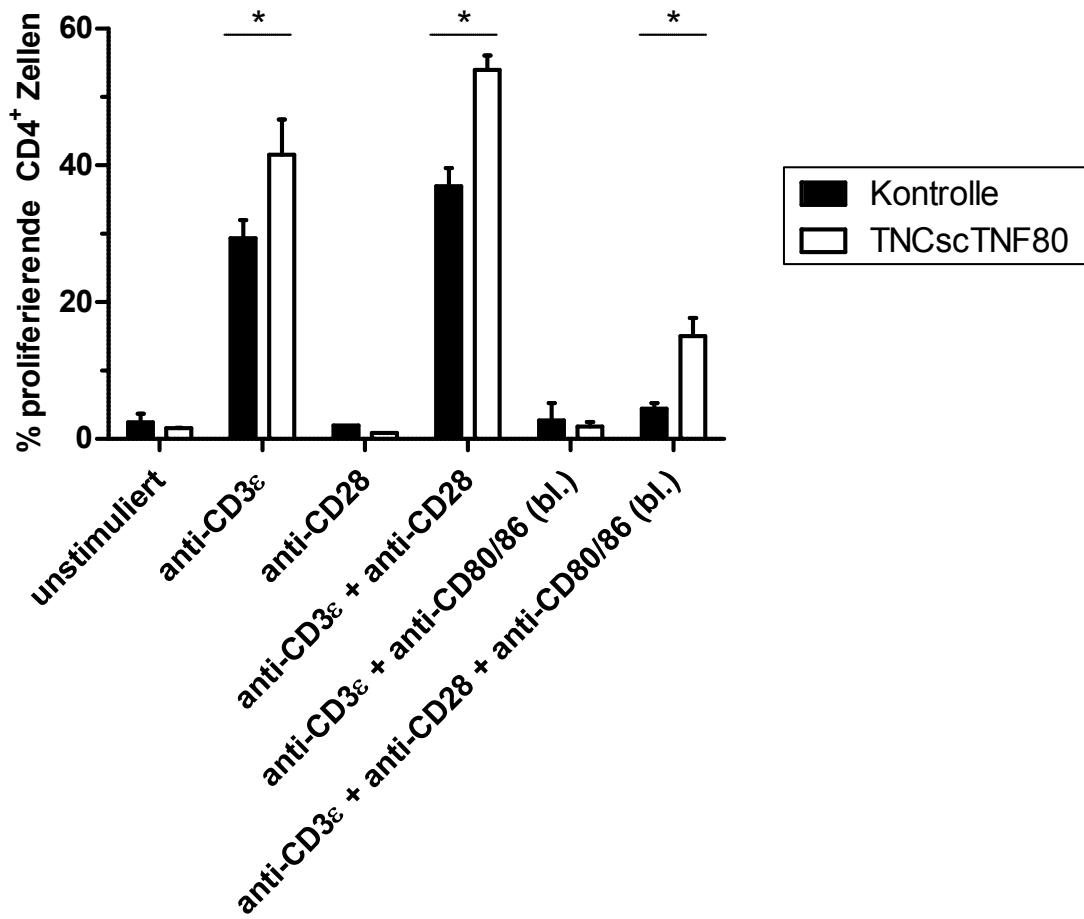


Abb. 14: Proliferation von MACS-separierten CD4 $^{+}$ T-Zellen unter Stimulierung von CD3, CD28 und TNFR2

CD4 $^{+}$ wt Teff wurden mit 0,5 μ g/ml anti-CD3 ϵ -AK, 2,5 μ g/ml stimulierendem anti-CD28-AK, 10 μ g/ml blockierendem anti-CD80/86-AK und/oder 10ng/ml TNCscTNF80 für 72h stimuliert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei technischen Replikaten (Gruppe anti-CD28 nur Unikate) eines repräsentativen zweier unabhängiger Experimente.

4.2.4 „Bystander effects“ in Milzzellkulturen

In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, inwiefern sich die Anwesenheit von wt Milzzellen in den Kulturen auf die Proliferation von TNFR2^{-/-} Milzzellen auswirkt und vice versa.

Unter identischen Bedingungen wurden sowohl Kulturen mit nur wt bzw. TNFR2^{-/-} Teff („reine Kulturen“) als auch Kulturen mit wt und TNFR2^{-/-} Teff im Verhältnis 1:1 („gemischte Kulturen“) angelegt und mit TNCscTNF80 sowie rhTNF inkubiert. Es wurden bei Anlage der Kulturen jeweils nur entweder wt oder TNFR2^{-/-} Teff mit CFSE markiert, so dass die Zellpopulationen bei der Analyse anhand der CFSE-Markierung unterschieden werden konnten.

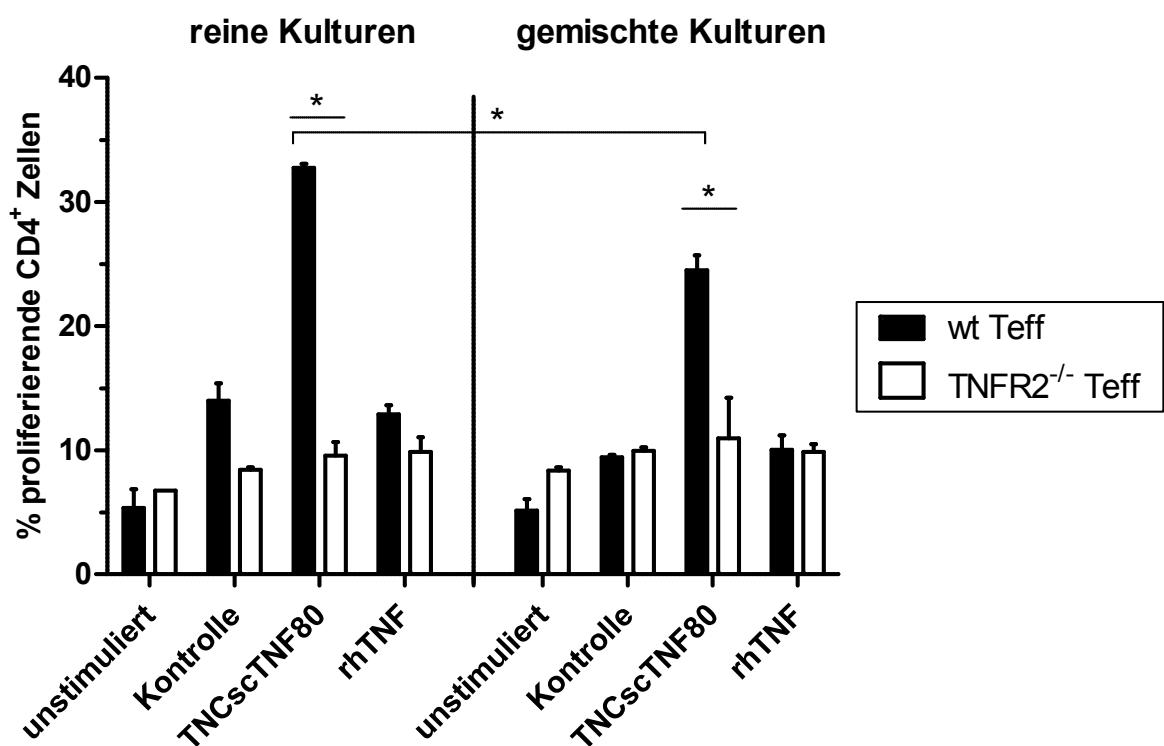


Abb. 15: Proliferation von wt bzw. TNFR2^{-/-} Teff in gemischten Kulturen

wt Teff, TNFR2^{-/-} Teff bzw. wt und TNFR2^{-/-} Teff im Verhältnis 1:1 wurden mit 0,015µg/ml anti-CD3ε-AK und 10ng/ml TNCscTNF80 oder rhTNF für 72h stimuliert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SD von zwei technischen Replikaten eines von zwei unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, dass in gemischten Kulturen unter TNFR2-Stimulierung weniger wt Zellen in Proliferation gingen als in reinen wt Kulturen (Abb. 15). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die TNFR2^{-/-} Teff nicht zum Zytokin- (v.a. wohl IL-2-) vermittelten positiven Feedback-loop der T-Zell-Aktivierung beitragen konnten. Die TNFR2^{-/-} Teff könnten kompetitiv zu den wt Teff in den Kulturen beispielsweise vorhandenes IL-2 binden, aber selbst aufgrund der fehlenden Kostimulation über TNFR2 weniger IL-2 als wt Teff sezernieren. Die wt Teff in den Kulturen waren nicht in der Lage, diese „fehlende“ auto- und parakrine Zytokinproduktion zu kompensieren und zeigten so eine reduzierte Proliferation.

Beinahe bedeutsamer erscheint umgekehrt, dass die Anwesenheit von wt Teff in Kulturen mit TNFR2^{-/-} Teff nicht bewirkte, dass letztere ihren Proliferationsrückstand im Vergleich zu den wt Teff aufholen konnten.

Eine Stimulierung des TNFR1 mittels rhTNF führte weder in reinen noch in gemischten Kulturen zu einem veränderten Proliferationsverhalten.

4.3 Suppressionsassays

4.3.1 T-Zell-Suppression durch Treg abhängig vom Teff:Treg-Verhältnis

Ein weiteres Ziel der Arbeit sollte die Klärung der Frage darstellen, wie die Subpopulation der regulatorischen T-Zellen auf eine Stimulierung durch ein TNFR2-spezifisches Agens reagiert.

Eine in der Literatur oft beschriebene Kinetik der Suppression von Effektor-T-Zellen, abhängig vom eingesetzten Teff:Treg-Verhältnis (X. Chen et al. 2007; X. Chen et al. 2008), konnte auch mit unserer, von der üblichen Praxis abweichenden Methode, Milzzellen ohne vorherige Separation von Effektor-T-Zellen und APC in die Assays einzusetzen (siehe 3.8), bestätigt werden (Abb. 16). Interexperimentelle Schwankungen des Ausmaßes der Treg-vermittelten Teff-Suppression sind wohl auf leicht abweichende Kulturbedingungen zurückzuführen, ausgelöst beispielsweise durch schwankende Qualität und Frische der anti-CD3ε-AK und CFSE-Färbelösung.

Wir konnten eine direkte Korrelation des Teff:Treg-Verhältnisses zu der durch Treg vermittelten Suppression der Proliferation der Teff feststellen. Ein Verhältnis von 1:4, das heißt 50 000 Treg auf 200 000 Zellen insgesamt im *well*, entspricht etwa einem Verhältnis von Teff:Treg von 1:1. Dieses Verhältnis von 1:4 erschien günstig, um eine Beeinflussung der Suppressionsfähigkeit der Treg zu untersuchen und wurde folglich in einem Großteil der Suppressionsassays verwendet (Methodik siehe 3.8).

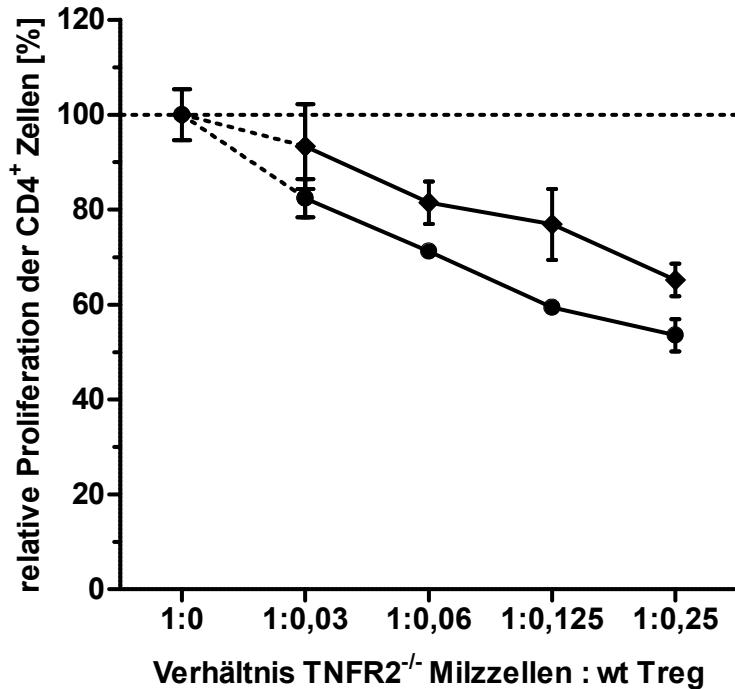


Abb. 16: Suppression der TNFR2^{-/-} Teff Proliferation bei verschiedenen Teff:Treg-Verhältnissen

TNFR2^{-/-} Milzzellen und wt Treg in verschiedenen Verhältnissen wurden mit 0,015µg/ml anti-CD3ε-AK für 72h stimuliert. Gezeigt ist die Proliferation der CD4⁺ Teff relativ zu Kontrollen ohne Treg zweier unabhängiger Experimente, Symbol repräsentiert den Mittelwert ± SD zweier technischer Replikate eines Experiments.

4.3.2 Aktivierung von TNFR2 verbessert Proliferation von Effektor-T-Zellen trotz Suppression durch Treg

In weiteren Experimenten, in denen wt Teff eingesetzt wurden, konnten die Einflüsse einer TNFR2-spezifischen Stimulierung auf die gesamte T-Zellpopulation untersucht werden (Abb. 17). TNCscTNF80 konnte in diesem Setting sowohl mit von CD25⁻ Teff als auch von CD4⁺CD25⁺ Treg exprimiertem TNFR2 interagieren. Dies führte zu einer Proliferationssteigerung der Teff trotz Suppression durch Treg, die die nur anti-CD3ε-stimulierten Kontrollen deutlich übertraf. TNFR2^{-/-} Treg konnten hierbei die Proliferation besser supprimieren als wt Treg. rmTNF im Gegensatz konnte eine nur sehr geringe Proliferationssteigerung der Teff bewirken.

Diese Ergebnisse weisen auf eine Verringerung der Suppressionsfähigkeit der Treg durch TNCscTNF80 hin. In weiterführenden Experimenten (4.3.3) wurden, um die Auswirkungen

einer TNFR2-spezifischen Stimulierung auf Treg selektiv analysieren zu können, TNFR2^{-/-} Teff eingesetzt.

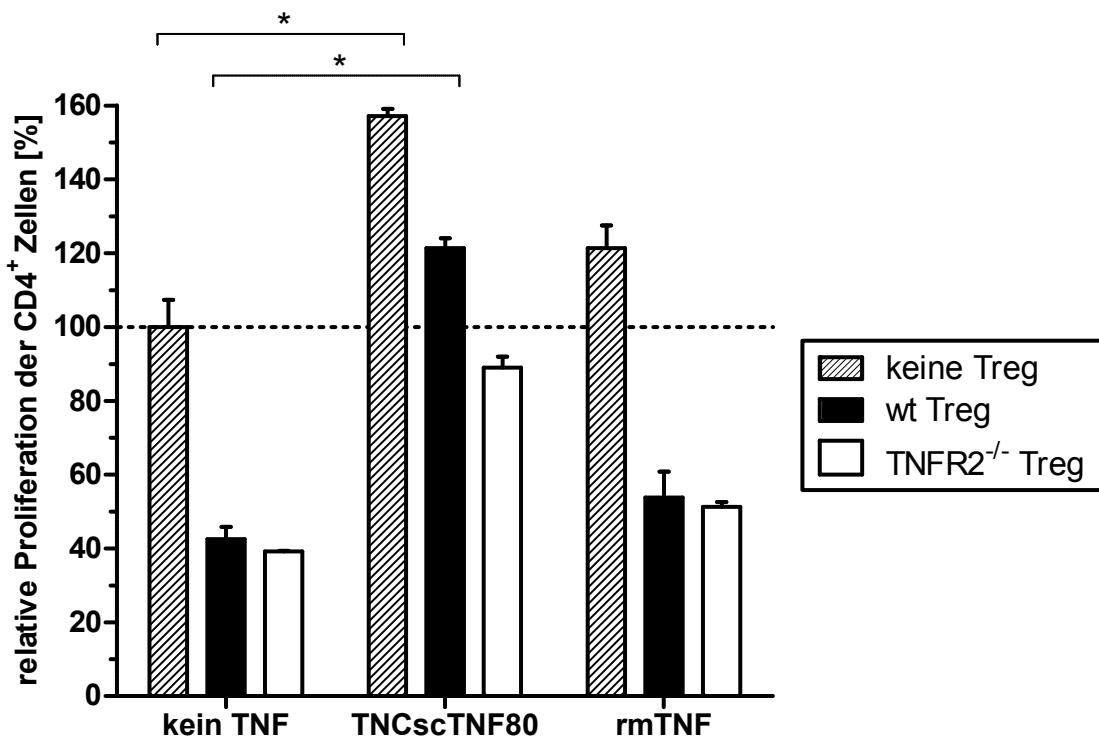


Abb. 17: Relative Proliferation von wt Teff unter Suppression durch Treg

wt Treg bzw. TNFR2^{-/-} Treg und wt Milzzellen wurden mit 0,015µg/ml anti-CD3ε-AK sowie mit 10ng/ml TNCscTNF80 oder rmTNF für 72h stimuliert. Gezeigt ist die Proliferation der CD4⁺ Teff relativ zu Kontrollen ohne Treg, Mittelwerte ± SD von technischen Duplikaten eines repräsentativen von fünf unabhängigen Experimenten.

4.3.3 Aktivierung von TNFR2 vermindert suppressive Funktion von Treg

In Suppressionsassays, in denen TNFR2-defiziente Teff verwendet wurden und somit nur die Treg auf einen Stimulus durch TNCscTNF80-TNFR2-Interaktion reagieren konnten, sollte eine mögliche Modulation der Suppression von Treg durch TNFR2-spezifische Stimulierung untersucht werden (Abb. 18). Hierbei zeigte sich, dass eine TNFR2-Stimulierung ausschließlich auf Treg zu einer besseren Proliferation der TNFR2^{-/-} Teff führte (Abb. 18a). Die Aktivierung von TNFR2 auf Treg resultierte folglich in einer verminderten Fähigkeit der Treg zur Suppression der Teff.

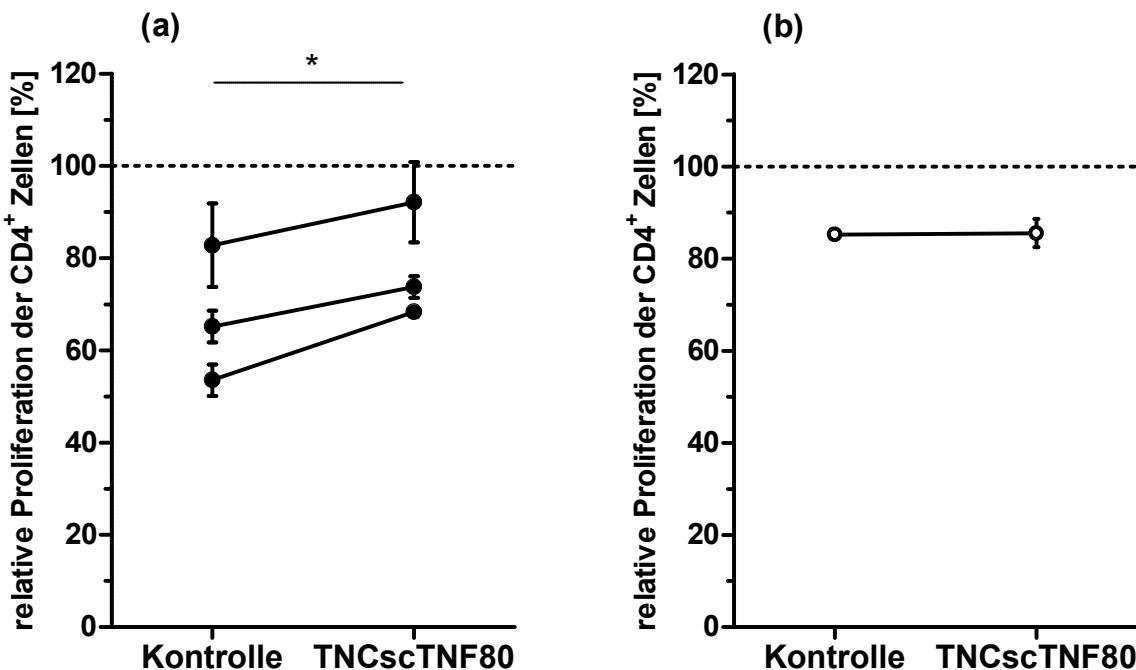


Abb. 18: Effekt des TNFR2-spezifischen Agonisten auf die Treg-Funktion

(a) wt bzw. (b) TNFR2^{-/-} Treg und TNFR2^{-/-} Milzzellen wurden mit 0,015µg/ml anti-CD3ε-AK sowie 10ng/ml TNCscTNF80 für 72h stimuliert. Gezeigt ist die Proliferation der CD4⁺ Teff relativ zu Kontrollen ohne Treg dreier unabhängiger Experimente, Symbol repräsentiert den Mittelwert ± SD eines bis dreier technischer Replikate eines Experiments.

Um mögliche Bystander-Effekte auszuschließen, wurden zur Kontrolle auch Assays mit TNFR2-defizienten Treg durchgeführt (Abb. 18b). Eine Anwesenheit von TNCscTNF80 in diesen Kulturen führte jedoch zu keinerlei Änderung der Proliferationsfähigkeit der Teff, der

oben beschriebene Effekt lässt sich also tatsächlich auf die Stimulierung von TNFR2 auf Treg zurückführen.

Wie in Abb. 19 zu erkennen, ließ sich der Suppressions-mindernde Effekt durch TNCscTNF80-TNFR2-Interaktion auf Treg auch bei verringerten Teff:Treg-Verhältnissen beobachten. Je mehr Suppression der Teff-Proliferation hierbei durch die Treg in der Kontrollgruppe vermittelt werden konnte, desto ausgeprägter war die durch selektive TNFR2-Stimulierung herbeigeführte Hemmung der suppressiven Eigenschaften der Treg.

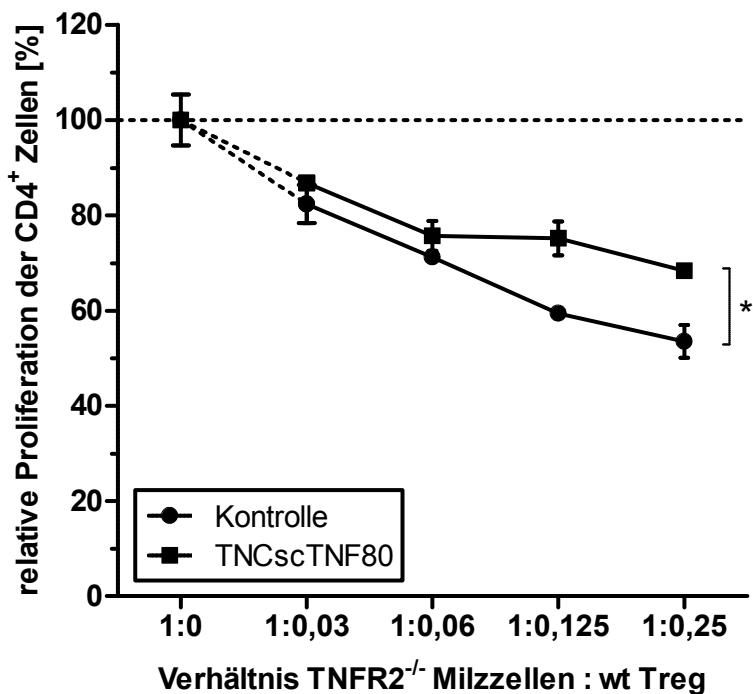


Abb. 19: Effekt des TNFR2-spezifischen Agonisten bei unterschiedlichen Teff:Treg-Verhältnissen
 TNFR2^{-/-} Milzellen und wt Treg in verschiedenen Verhältnissen wurden mit 0,015µg/ml anti-CD3ε-AK sowie 10ng/ml TNCscTNF80 für 72h stimuliert. Gezeigt ist die Proliferation der CD4⁺ Teff relativ zu Kontrollen ohne Treg, Symbol repräsentiert den Mittelwert ± SD eines repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

4.3.4 Aktivierter Phänotyp der Treg nach TNFR2-Stimulierung

Um Veränderungen der phänotypischen Ausprägung von klassischen Treg-Markern wie der Expression von CD25 und Foxp3 unter TNFR2-Stimulierung zu untersuchen, wurden Treg nach einem Suppressionsassay mittels Oberflächen- und intrazellulärer Foxp3-Färbung einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. In den Assays wurde hierbei das CD45-System genutzt, um die eingesetzten isolierten Treg (CD45.2-Mauslinie) sicher von aktivierte Teff (CD45.1-Mauslinie) unterscheiden zu können.

Eine Interaktion von TNCscTNF80 mit TNFR2 auf Treg führte zu einem deutlichen Anstieg der Oberflächenlevel von CD25 um ca. 50%, jedoch nur zu einer verhältnismäßig geringen Induktion von Foxp3 (Abb. 20).

Auf den Effektor-T-Zellen führte die Co-Kultur mit Treg und TNFR2-spezifischem Stimulans zu einer, auf eine Aktivierung hindeutenden, Induktion von CD25, jedoch keinerlei Induktion von Foxp3 (Daten nicht gezeigt).

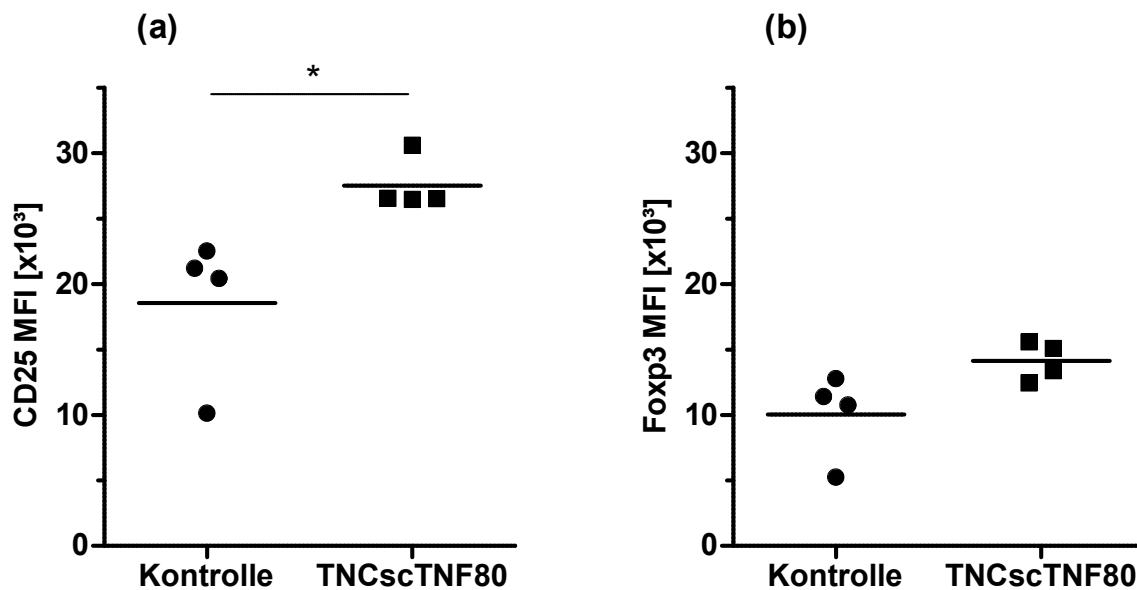


Abb. 20: Expression von CD25 und Foxp3 auf Treg nach TNFR2-Stimulierung im Suppressionsassay
wt Treg ($CD45.2^+$) wurden mit wt Milzzellen ($CD45.1^+$) und $0,015\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3ε-AK sowie $10\text{ng}/\text{ml}$ TNCscTNF80 für 72h stimuliert. Gezeigt ist die MFI von (a) CD25 bzw. (b) Foxp3 auf Treg. Symbol repräsentiert eine Maus ($n=4$), Linie stellt den Mittelwert dar.

4.3.5 Erhöhte Oberflächenlevel von CD25 auf Treg nach TNFR2-agonistischer Prästimulierung

In weiteren Experimenten wurden zuvor isolierte Treg, wie von Chen et al. beschrieben, in Kulturen ohne weitere Zellpopulationen mit IL-2 stimuliert (X. Chen et al. 2007).

Wie erwartet konnten die Treg in diesen Kulturen nicht ohne einen IL-2-Stimulus überleben, dies konnte auch durch eine singuläre Stimulierung des TNFR2 mittels TNCscTNF80 nicht aufgehoben werden (Abb. 21a). Eine simultane Stimulierung des IL-2-Rezeptors und des TNFR2 hingegen führte zu einer deutlichen Steigerung der Expression von CD25 auf den Treg. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 hingegen wurde durch TNCscTNF80 nicht verstärkt induziert (Abb. 21b).

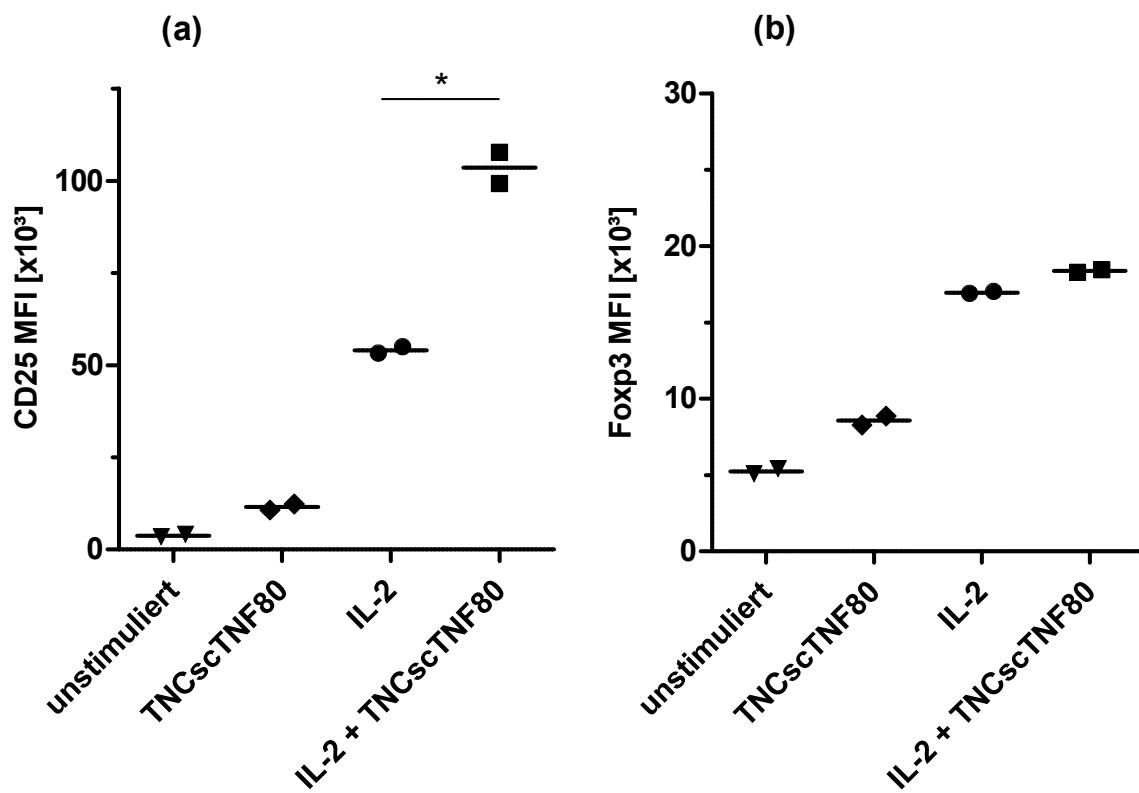


Abb. 21: Expression von CD25 und Foxp3 auf Treg nach Prästimulierung mit IL-2

wt Treg wurden mit 10ng/ml IL-2 und/oder 10ng/ml TNCscTNF80 für 72h stimuliert. Gezeigt ist die MFI von (a) CD25 und (b) Foxp3 der Treg eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. Symbol repräsentiert eine Maus (n=2), Linie stellt den Mittelwert dar.

Wurden die Treg unter gleichen Bedingungen mit IL-2 und rhTNF stimuliert (Abb. 22), führte dies zu keiner signifikanten Erhöhung der CD25-Level auf der Treg-Oberfläche. Ein spezifischer TNFR1-Stimulus genügte also nicht, um Treg unter diesen Bedingungen zu aktivieren. Auch konnte rmTNF keine stärkere Induktion von CD25 bewirken.

Bei Kontroll-Kulturen mit TNFR2^{-/-} Treg führte eine Inkubation weder mit TNCscTNF80 noch mit rhTNF oder rmTNF zu einer Steigerung der CD25-Expression und ebensowenig der von Foxp3. Dies belegt, dass eine TNFR1-Stimulierung unter diesen Bedingungen nicht in einer Aktivierung der Treg resultiert.

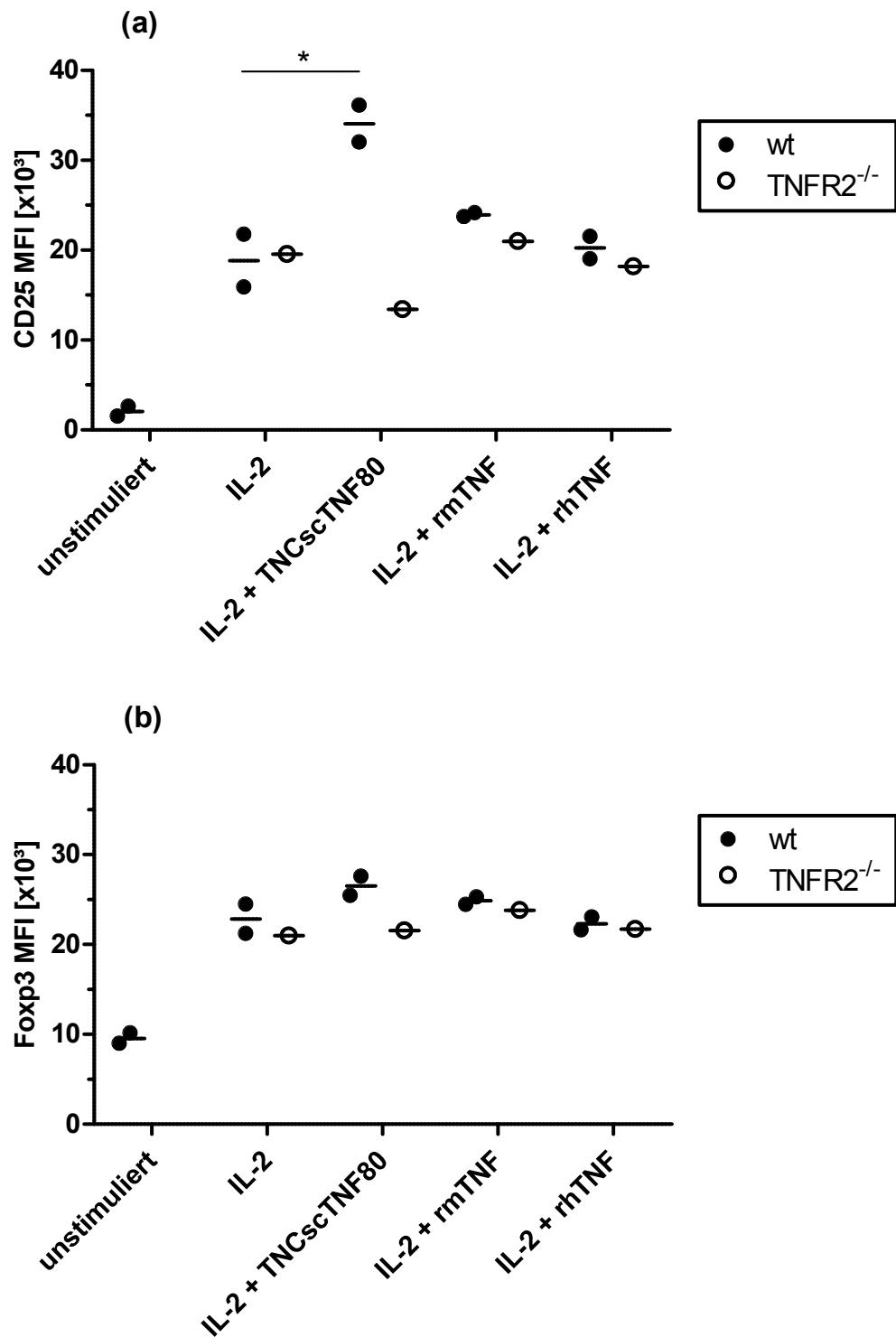


Abb. 22: Expression von CD25 bzw. Foxp3 auf Treg nach Prästimulierung mit IL-2 und verschiedenen TNF-Varianten

wt bzw. TNFR2^{-/-} Treg wurden mit 10ng/ml IL-2 und 10ng/ml TNF-Varianten für 72h stimuliert. Gezeigt ist die MFI von (a) CD25 bzw. (b) Foxp3 der Treg. Symbol repräsentiert eine Maus, Linie stellt den Mittelwert dar.

4.3.6 Aufgehobene Treg-vermittelte Suppression nach TNFR2-Prästimulierung

Interessante Ergebnisse erzielte das Einsetzen der wie unter 3.9 beschrieben TNFR2-vorstimulierten Treg in einen 72h-Suppressionsassay. Die prästimulierten Treg verloren gänzlich ihre suppressiven Eigenschaften (Abb. 23). Die Teff konnten um ca. 50% stärker proliferieren als Kontrollen ohne vorstimulierte Treg, unabhängig davon, ob die eingesetzten Treg nur mit IL-2 oder aber mit IL-2 und TNF80 vorstimuliert worden waren.

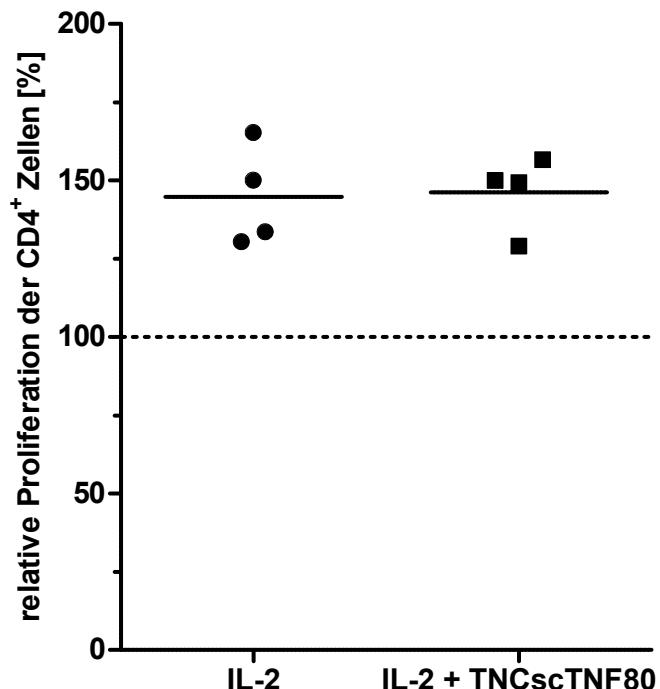


Abb. 23: Suppressive Funktion von Treg nach Prästimulierung mit IL-2 und TNF80

wt Treg wurden mit 10ng/ml IL-2 und mit oder ohne 10ng/ml TNF80 für 72h prästimuliert und daraufhin mit TNFR2^{-/-} Milzzellen und 0,5µg/ml anti-CD3ε-AK in einem Suppressionsassay für weitere 72h inkubiert. Gezeigt ist die Proliferation der CD4⁺ Teff relativ zu Kontrollen ohne Treg (=100%) eines von zwei unabhängigen Experimenten. Symbol repräsentiert eine Maus, Linie stellt den Mittelwert dar. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch bei Analyse der CD8⁺ Teff (Daten nicht gezeigt).

4.3.7 Erniedrigte Oberflächenlevel von CD25 auf TNFR2-prästimulierten Treg nach Suppressionsassay

Diese prästimulierten, in Suppressionsassays funktionell kompromittierten, Treg sollten im Weiteren auf ihre CD25-Expression hin untersucht werden. Die Analyse der CD25-Level auf den Treg mittels Oberflächenfärbung erfolgte nach 72h Prästimulierung, mit IL-2 und jeweils mit und ohne TNCscTNF80, und anschließendem 72h-Suppressionsassay.

Treg, die während der Prästimulierung einen TNFR2-Stimulus durch TNCscTNF80 erhalten hatten, exprimierten deutlich weniger CD25 als nur mit IL-2 vorstimulierte Treg (Abb. 24). Sie zeigten also einen weniger aktivierte Phänotyp.

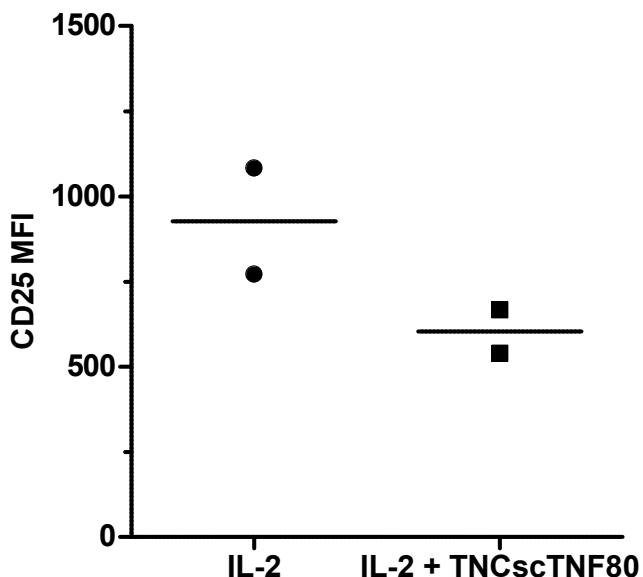


Abb. 24: Expression von CD25 auf prästimulierten Treg nach Suppressionsassay

wt Treg wurden mit 10ng/ml IL-2 und mit oder ohne 10ng/ml TNCscTNF80 für 72h prästimuliert und daraufhin mit TNFR2^{-/-} Milzzellen und 0,015µg/ml anti-CD3ε-AK in einem Suppressionsassay für weitere 72h inkubiert. Gezeigt ist die MFI von CD25 eines von drei unabhängigen Experimenten. Symbol repräsentiert eine Maus, Linie stellt den Mittelwert dar. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch bei Analyse der CD8⁺ Teff (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

Regulatorische T-Zellen besitzen enormen Einfluss im Rahmen von entzündlichen, autoimmunen und neoplastischen Erkrankungen im Allgemeinen. Ihr moderierender, eine überschießende Immunantwort limitierender, Beitrag ist von großer Bedeutung für das Erhalten der immunologischen Homöostase. Eine Depletion der Treg *in vivo* führt unweigerlich zu schwerwiegenden immunologischen Pathologien (Fontenot and Rudensky 2005; Sakaguchi 2004). Der von regulatorischen wie auch Effektor-T-Zellen exprimierte TNF-Rezeptor 2 ist für diese Zellen phänotypisch wie auch funktionell von nicht zu unterschätzender Relevanz. Die TNFR2-vermittelten Effekte sind, nicht zuletzt im Vergleich zu denen des TNFR1, bei Weitem noch nicht in umfassender Detailliertheit bekannt, sie stellen seit Jahren einen Schwerpunkt der weiterführenden funktionellen Untersuchungen der T-Zell-Population dar. Die Auseinandersetzung mit den Auswirkungen einer spezifischen TNFR2-Aktivierung, unter Verwendung von TNFR2-spezifischen TNF-Varianten, und eine durch sie bedingte Beeinflussung der Funktion von regulatorischen wie auch Effektor-T-Zellen war das Hauptziel dieser Arbeit.

5.1 Spezifität der TNF-Varianten

Die Spezifität der TNF-Varianten für TNFR2 stellt eine unbedingt notwendige Voraussetzung für die Analyse einer funktionellen Änderung der T-Zellen unter TNFR2-Stimulierung dar.

Bei der Analyse der von H. Wajant freundlicherweise zur Verfügung gestellten TNF-Varianten auf Wirbelzellkulturen zeigte sich, dass nicht kovalent verbundenes, TNFR2-spezifisches, TNF80 den Rezeptor nicht in solchem Umfang zu aktivieren vermag, dass eine Signaltransduktion angestoßen wird (Abb. 10). Wie auch bei sTNF der Fall, ist wohl die Rezeptoraffinität des spontan zusammengelagerten Trimers, zumindest *in vitro*, nicht hoch genug, um eine funktionelle Ligand-Rezeptor-Interaktion mit TNFR2 zu initiieren (Grell et al. 1998; Wyzgol et al. 2009).

TNCscTNF80 als kovalent verknüpftes Nonamer hingegen ist, *in vitro* ebenso wie membranständiges TNF unter physiologischen Bedingungen *in vivo*, aufgrund eben dieser benötigten höheren Affinität zu TNFR2 in der Lage, diesen zu aktivieren (Abb. 10). TNFR1 hingegen, und mit ihm überwiegend apoptotische Signalwege, wird durch TNCscTNF80 nicht aktiviert (Abb. 9).

Dies bestätigt die Analysen von Fischer und Wajant, die einer, dem in dieser Arbeit verwendeten TNCscTNF80 ähnlichen, TNC-verknüpften Variante des humanen TNF (TNCscTNF_{R2}) TNFR2-spezifische Eigenschaften und mem-TNF-mimetische Aktivität zusprachen und eine Cluster-Bildung von TNFR2 aufgrund dieser TNCscTNF_{R2}-TNFR2-Interaktion mit einer daraus resultierenden Signaltransduktion (unter Anderem einer Aktivierung von NF-κB) beobachteten. Auf humanen neuronalen Zellen konnten sie weiterhin Zelltod-inhibierende Eigenschaften durch eine TNFR2-Aktivierung nachweisen (Fischer et al. 2011).

5.2 Effekte einer TNFR2-Aktivierung auf Effektor-T-Zellen

TNFR2 besitzt kostimulatorische Eigenschaften auf T-Zellen (E. Y. Kim and Teh 2004; E. Y. Kim et al. 2006). So ist es nicht verwunderlich, dass TNFR2^{-/-} T-Zellen auf einen Proliferationsstimulus (durch anti-CD3ε-AK und B-Zell-Interaktion über CD28) *in vitro* weniger proliferative Aktivität zeigen als wt T-Zellen (Abb. 11). Dies gilt sowohl für CD4⁺ T-Helfer-Zellen als auch für CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Aufgrund einer TCR-Stimulierung durch die T-Zellen selbst gebildetes TNF kann die TNFR2^{-/-} Zellen dann nicht im Sinne eines positiven Feedbacks weiter aktivieren. wt T-Zellen gehen somit „leichter“ in Proliferation. Weiterhin konnte die These, dass aufgrund des fehlenden TNFR2 auf TNFR2^{-/-} T-Zellen stattdessen TNFR1 stärker aktiviert würde, nicht bestätigt werden. TNFR2^{-/-} T-Zellen sind nicht in der Lage, ihren Proliferationsrückstand durch die Anwesenheit von durch wt T-Zellen produziertem sTNFR2 in gemischten wt-TNFR2^{-/-}-Kulturen aufzuholen (Abb. 15). Ist der TCR-Stimulus stark genug, proliferieren die TNFR2^{-/-} T-Zellen aber ebenso stark wie wt T-Zellen (Abb. 11), eine zusätzliche TNFR2-Stimulierung ist also wohl bei einer starken Immunreaktion nicht zwingend notwendig.

Eine Stimulierung des TNFR2 auf T-Zellen führt zu einer stärkeren Proliferation der CD4⁺ wie auch der CD8⁺ T-Zellen (Abb. 12). Ein möglicher Grund hierfür könnte eine verstärkte Expression von CD25 (der α-Kette des IL-2-Rezeptors) sein, welche zu einer verbesserten Aktivierbarkeit durch IL-2 führt, da CD25 Voraussetzung für einen funktionsfähigen IL-2-Rezeptor ist. Befinden sich die T-Zellen in einem nicht aktivierte Zustand, so kann eine ausschließliche TNFR2-Stimulierung nicht zu einer Aktivierung der Zielzellen führen (Abb. 12, Abb. 14). Sie ermöglicht den TNFR2-tragenden T-Zellen jedoch einen

Proliferationsvorsprung, wenn diese einen nur schwachen TCR-Stimulus erhalten. Generell benötigen hierbei CD8⁺ T-Zellen geringere TCR-Stimuli als CD4⁺ Zellen, um in Proliferation zu gehen. Sie scheinen generell „leichter“ aktivierbar zu sein. Je stärker die Zellen bereits über den TCR aktiviert sind, desto geringer fällt der Effekt der TNFR2-Stimulierung auf diesen Zellen aus. Eine TNFR2-Stimulierung kann also vor allem eine erfolgreiche Aktivierung von T-Zellen sicherstellen, die durch Erkennung eines Antigens mittels TCR nur ungenügend aktiviert wurden. Den klassischen kostimulatorischen Impuls, der bei der Interaktion von CD28 mit dem B7-Komplex auf B-Zellen das für eine Aktivierung der T-Zelle benötigte zweite Signal darstellt, kann eine Interaktion von TNF mit TNFR2 aber nicht ersetzen (Abb. 14). Dies bestätigen auch die Beobachtungen, dass eine koordinierte Aktivierung des TCR, CD28 und TNFR2 für die optimale Stimulierung der T-Zellen nötig ist und dass CD28 und TNFR2 dabei distinkte Funktionen ausüben (E. Y. Kim and Teh 2004; X. Chen et al. 2007). TNFR2 scheint hierbei das erste aktive der kostimulatorischen TNFR-Familienmitglieder innerhalb der ersten 24 Stunden der T-Zell-Antwort zu sein (E. Y. Kim and Teh 2004). Das Ausmaß des proliferationsfördernden Effektes ist sicher einerseits von der Stärke des simultanen TCR-Stimulus abhängig, andererseits aber auch von der Intensität des TNFR2-spezifischen Stimulus. Lösliches rmTNF (als Trimer) führt in hohen Konzentrationen durch Interaktion mit TNFR2 zu einer erhöhten Proliferation der T-Zellen (Abb. 13). Das mit TNC-Linkern verknüpfte Nonamer TNCscTNF80, das strukturell wie kinetisch memTNF ähnelt (Fischer et al. 2011), kann im Vergleich bereits in deutlich niedrigeren Konzentrationen eine relevante Steigerung der Proliferation induzieren. Die Affinität von Ligand zu Rezeptor einerseits sowie die vorliegende Konzentration des Liganden andererseits sind also von großer Bedeutung für das Zustandekommen einer TNFR2-Aktivierung, die zu einer Signaltransduktion im Zellinneren führt. Über eine Aktivierung von NF-κB oder der MAPK- und JNK-Signalwege kann so eine inflammatorische Reaktion auf den Reiz erfolgen.

Dies bestätigt die essentielle Rolle des TNFR2 bei der Initiierung der immunologischen Antwort im Zusammenspiel mit Stimuli über den T-Zell-Rezeptor und weitere kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD28. Eine Pathogen-induzierte endogene Produktion von TNF durch aktivierte Effektor-T-Zellen kann somit in Form eines positiven

Rückkopplungsmechanismus über eine TNFR2-Stimulierung eine weitere Aktivierung und Expansion der T-Zell-Population bewirken.

5.3 Effekte einer TNFR2-Aktivierung auf regulatorischen T-Zellen

Wie bereits vielerorts beschrieben, ist die Treg-vermittelte Suppression *in vitro* proportional zu dem in den Assays eingesetzten Verhältnis der Teff zu Treg (X. Chen et al. 2007; X. Chen et al. 2008). Dies konnte auch mit der von unserem Labor benutzten Methodik der Suppressionsassays (siehe 3.8) bestätigt werden (Abb. 16). *In vivo* wird die Abhängigkeit der suppressiven Wirkung von der Anzahl der Treg genutzt, indem mittels Induktion von iTreg die Treg-Dichte am Ort des inflammatorischen Geschehens erhöht wird und so die suppressiven Kapazitäten in diesem Gebiet bedarfsabhängig gesteigert werden können.

5.3.1 Aktivierung von TNFR2 auf Treg verhindert deren suppressive Eigenschaften

In Experimenten mit Kulturen mit wt nTreg und wt Teff zeigte sich, dass unter simultaner TNFR2-spezifischer Stimulierung beider Zelltypen mittels TNCscTNF80 die proliferative Aktivität der Teff nach 48h (Daten nicht gezeigt) und 72h *in vitro* deutlich gesteigert ist (Abb. 17). Die Treg konnten eine relativ geringe suppressive Wirkung auf die Proliferation der Teff ausüben. So proliferierten TNCscTNF80-stimulierte Teff trotz Suppression durch Treg stärker als Kontroll-Teff (ohne Treg und ohne TNCscTNF80). Interessanterweise zeigte sich in diesen Experimenten, dass TNFR2^{-/-} Treg die Proliferation von TNFR2-kostimulierten Teff besser unterdrückten als wt Treg, die selbst auf die TNFR2-Stimulierung reagieren konnten.

Eine Stimulierung der Treg und Teff mit rmTNF, das als lösliches TNF-Molekül vornehmlich TNFR1 aktiviert, führte zu einer nur leicht gesteigerten Proliferationsrate der Teff im Verhältnis zu nicht TNF-stimulierten Kulturen (Abb. 17). Dies ist sicher einerseits durch die nur minimale Stimulierung der Teff durch das löslich vorliegende rmTNF, das zu TNFR2 eine nur geringe Bindungsaffinität besitzt, zurückzuführen. Andererseits wurde in diesen Kulturen auch TNFR2 auf den Treg nur minimal stimuliert, so dass die Funktion der Treg letztendlich kaum beeinflusst werden konnte. Dies zeigt auch die identische Proliferationsrate der Teff, unabhängig ob wt oder TNFR2^{-/-} Treg unter Stimulierung mit rmTNF in den Assays eingesetzt wurden.

Eine selektive Stimulierung von TNFR2, nicht aber TNFR1, auf nTreg scheint also deren suppressive Funktionen negativ zu beeinflussen. Um den Suppressions-inhibierenden Effekt einer TNFR2-spezifischen Stimulierung der Treg genauer analysieren zu können, wurden in den weiteren Experimenten TNFR2^{-/-} Teff verwendet. Es bestätigte sich die These, dass eine TNFR2-Stimulierung der Treg durch TNFcscTNF80 zu einer Verringerung der suppressiven Eigenschaften derselben führt (Abb. 18). Dieser Effekt konnte über verschiedene Teff:Treg-Verhältnisse beobachtet werden, die Hemmung der suppressiven Eigenschaften der Treg war dabei abhängig vom Ausmaß der Suppressionsfähigkeit der Treg (Abb. 19). Kontrollen mit TNFR2^{-/-} Treg zeigten, dass die beobachteten Suppressions-mindernden Effekte tatsächlich auf eine Stimulierung des TNFR2 auf den Treg zurückzuführen sind (Abb. 18).

Diese Beobachtungen mit Maus Treg bestätigen die von Valencia et al. im humanen System durchgeführten Untersuchungen: Sie führten eine verminderte suppressive Funktion der humanen CD4⁺CD25^{hi} Treg auf eine Stimulierung des TNFR2 durch TNF zurück. Diesen proinflammatorischen Effekt stellten sie als von der TNF-Konzentration abhängig dar (Valencia 2006).

Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen stehen vorliegende Untersuchungen von Chen et al., der ähnliche Experimente mit Maus Treg unter Verwendung von rmTNF, also nicht TNFR2-spezifischem TNF, durchführte. Eine TNF-Behandlung der Treg resultierte nach Chen in einer vorübergehend (<48h) aufgehobenen Suppression, diese waren aber fähig, ihre Suppressionsfähigkeit im Verlauf (>48h) wiederzuerlangen (X. Chen et al. 2007). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Chen in seinen Experimenten rmTNF und nicht wie in unseren Experimenten TNFR2-spezifisches polymerisiertes TNF verwendete. Durch die rmTNF-Aktivierung von Teff endogen produziertes memTNF könnte TNFR2 auf Treg aktiviert haben, die Suppressionsfähigkeit der Treg sank. Da im Verlauf der Entzündungsreaktion memTNF schnell von TACE abgespalten wird, konnte das nun vor allem löslich vorliegende TNF TNFR2 auf Treg nicht mehr stimulieren, sie gewannen im Verlauf ihre Suppressionsfähigkeit wieder.

5.3.2 TNFR2-Stimulierung führt zu erhöhten CD25-Spiegeln, nicht aber zu einer erhöhten Foxp3-Expression

Die phänotypische Untersuchung der Treg am Ende der Suppressionsassays offenbarte, dass diese ihre CD25-Expression unter TNFR2-Stimulierung deutlich steigerten (Abb. 20). Foxp3 hingegen wurde durch die TNFR2-spezifische Aktivierung nicht in signifikantem Umfang induziert. Die Hochregulation von CD25 auf Treg lässt sich wohl auf eine Aktivierung der Treg durch von Teff aufgrund der TCR-Stimulierung ausgeschüttete Zytokine wie IL-2 und nicht zuletzt TNF zurückführen.

Parallel ließen sich auch auf Effektor-T-Zellen erhöhte CD25-Spiegel messen, Zeichen einer Aktivierung durch den TCR-Stimulus (Yamazaki et al. 2003; Allan et al. 2007), eine Steigerung der Foxp3-Expression konnte jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Kongruente Ergebnisse lieferten die Analysen der Präinkubationsexperimente: Treg selbst produzieren kein IL-2, das Zytokin ist aber unbedingt notwendig für deren Funktionalität und ihr Überleben *in vitro* (X. Chen et al. 2004; M. A. Burchill, Yang, Vang, et al. 2007; M. A. Burchill, Yang, Vogtenhuber, et al. 2007). So überraschte es nicht, dass die Treg in den 72h dauernden Prästimulierungsassays nicht überleben konnten, wenn kein IL-2 mit in Kultur gegeben wurde (Abb. 21, Abb. 22). Dies konnte auch die Anwesenheit von TNF_{csc}TNF80 nicht aufheben.

Nach einer Prästimulierung der Treg mit IL-2 und TNFR2-spezifischem Agens exprimierten die Treg mehr CD25 als unter reiner Stimulierung mit IL-2. Eine Aktivierung von Foxp3, beispielsweise über die Aktivierung von STAT5, konnte aber nicht nachgewiesen werden. Nach ähnlichen Experimenten im humanen System beobachteten Valencia et al. sogar eine verringerte Foxp3-Expression der TNF-stimulierten Treg (Valencia 2006). Chen et al. hingegen berichteten von einer Steigerung der CD25- als auch der Foxp3-Expression von Maus Treg nach deren Prästimulierung mit IL-2 und TNF (X. Chen et al. 2007). Wurden in dieser Arbeit mittels rhTNF nur TNFR1 oder aber mittels rmTNF beide TNF-Rezeptoren stimuliert, so konnten keine erhöhten CD25-Spiegel nachgewiesen werden. Eine Blockierung des TNFR2-Signalweges beim Einsatz von TNFR2^{-/-} Treg resultierte in keiner erhöhten Expression von CD25 (Abb. 22). Unsere Ergebnisse bestätigen also, dass eine Stimulierung von Treg mit IL-2 und TNF direkt über eine Aktivierung des TNFR2-Signalweges

zu einer Expressionssteigerung von CD25 durch die Treg führt. Eine funktionell bedeutsame Veränderung der Foxp3-Expression konnte hingegen nicht belegt werden.

5.3.3 Verminderte Suppressionsfähigkeit von Treg nach deren Prästimulierung

Valencia et al. berichteten, dass eine Vorinkubation humaner Treg mit IL-2 deren anergische Eigenschaften verstärken und suppressive Funktionen verringern würde (Valencia 2006). Im Gegensatz hierzu proklamierten Chen et al., dass eine Prästimulierung der Treg mit IL-2 generell zu einer gesteigerten immunsuppressiven Aktivität der Maus Treg führt. Ein Einsatz der prästimulierten Maus nTreg in unseren Suppressionsassays legte überraschenderweise offen, dass die phänotypisch aktiviert erscheinenden Treg (erhöhte CD25-Expression) funktionell kompromittiert waren (Abb. 23). Sie zeigten keinerlei Fähigkeit zur Suppression der Effektor-T-Zellen, unabhängig davon, ob ihre Prästimulierung nur mit IL-2 oder aber mit IL-2 und TNFR2-spezifischem Agens erfolgte. Passend zu Valencias Ergebnissen legte unsere Analyse der CD25-Spiegel auf IL-2- und TNFR2-prästimulierten Maus Treg nach den Suppressionsassays im Vergleich zu nur IL-2-prästimulierten Treg sogar eine erniedrigte Expression von CD25 offen (Abb. 24). Diese blieb aber aufgrund der ohnehin aufgehobenen Suppressivität der Maus Treg ohne funktionelle Folgen.

5.4 Interpretation und Ausblick

Im Rahmen einer beginnenden Immunantwort – physiologisch wie pathologisch – kann durch T-Zellen endogen gebildetes TNF zusammenfassend nicht nur eine direkte Aktivierung der Effektor-T-Zellen verstärken, sondern gleichzeitig auch eine zu starke Hemmung der Effektor-Klasse durch Treg verhindern. Wird genügend endogenes TNF von T-Zellen produziert, könnte eine Aktivierung des TNFR2-Signalweges so die Treg-vermittelte Suppression der Immunantwort reduzieren und für eine ausreichende Aktivierung der Effektor-T-Zellen sorgen. Im weiteren Verlauf der Immunreaktion, mit fallenden TNF-Konzentrationen, können die Treg ihre suppressiven Eigenschaften wiedergewinnen und limitieren den Verlauf der Inflammation. Ebenso könnten sie eine überschießende Immunantwort aufgrund zu schwacher Stimuli, die nicht mit einer ausreichenden Induktion der Effektor-T-Zellen und somit einer allenfalls geringen TNFR2-Stimulierung der Treg einhergeht, verhindern. Sie stellen so sicher, dass nur Stimuli, die eine gewisse Aktivierungsschwelle übersteigen, auch zu einer umfassenden Reaktion des adaptiven Immunsystems führen.

Eine detailliertere Untersuchung der Effekte einer selektiven TNFR2-Aktivierung wird vonnöten sein, um diese therapeutisch gezielt nutzen zu können.

Eine spezifische Stimulierung von TNFR2, ohne eine gleichzeitig damit einhergehende Beeinflussung von TNFR1, könnte im klinischen Gebrauch, zum Beispiel im Rahmen von neoplastischen Erkrankungen, erhebliche Vorteile gegenüber Therapien mit TNF aufweisen. Ebenso könnte eine spezifische Blockade des TNFR2 im Rahmen autoimmuner Erkrankungen im Vergleich zur Therapie mit universellen TNF-Antikörpern wie Infliximab oder Adalimumab unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Nebeneffekte der Therapie reduzieren und letztere für den Patienten verträglicher machen.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von T-Lymphozyten, insbesondere regulatorischer T-Lymphozyten, unter spezifischer Stimulierung des TNFR2 *in vitro* zu untersuchen. Die mittels TNC-Domäne verknüpfte TNF-Variante TNCscTNF80 stellte sich in Assays mit TNFR2-transduzierten Fibroblasten-ähnlichen Zelllinien als spezifisch für TNFR2 dar und vermag diesen Rezeptor in vollem Umfang zu aktivieren.

Es wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des TNFR2 auf Effektor-T-Zellen mittels des spezifischen Agonisten aufgrund der kostimulatorischen Eigenschaften einer TNF-TNFR2-Interaktion zu einer Steigerung der zellulären Proliferation führt. Den klassischen CD28-Kostimulus kann eine TNFR2-Aktivierung aber nicht ersetzen. Außerdem wurde bestätigt, dass TNFR2-defiziente T-Zellen aufgrund des Fehlens des Rezeptors nicht in vergleichbarem Umfang auf eine generelle Zellaktivierung reagieren können und somit bezüglich ihres Aktivierungsgrades hinter wt T-Zellen zurückbleiben. Dies bestätigt die verstärkende Rolle des TNFR2 bei der Aktivierung der immunologischen Antwort im Zusammenspiel mit Stimuli über den T-Zell-Rezeptor und weitere kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD28.

Weiterhin wurde dargestellt, dass eine Aktivierung des TNFR2 auf regulatorischen T-Zellen zu einer gesteigerten Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf diesen Zellen führt. Eine signifikant erhöhte Foxp3-Expression konnte hierbei aber nicht beobachtet werden. Die funktionellen Analysen der durchgeführten Suppressionsassays zeigten interessanterweise, dass eine Stimulierung des TNFR2 auf Treg deren supressive Eigenschaften vermindert. Generell war der Umfang der Treg-vermittelten Suppression dabei abhängig vom eingesetzten Verhältnis der Treg zu Teff. Eine Prästimulierung der isolierten Treg mit IL-2 und TNFR2-spezifischem Agens bestätigte, dass TNF seine Effekte direkt über eine Wechselwirkung mit Treg ausübt. Auch hier konnten erhöhte Spiegel von CD25 nach TNFR2-agonistischer Stimulierung der Treg beobachtet werden. Nach dieser Prästimulierung zeigten die Treg aber keinerlei Suppressionsfähigkeit mehr. Dies unterstreicht auch die stark verminderte Expression von CD25 nach Einsatz der vorstimulierten Treg in Suppressionsassays.

Im Rahmen einer beginnenden Immunantwort – physiologisch wie pathologisch – kann durch T-Zellen endogen gebildetes TNF also nicht nur eine direkte Aktivierung der Effektor-

T-Zellen verstärken, sondern gleichzeitig auch eine zu starke indirekte Hemmung der Effektor-Klasse durch Treg verhindern. So kann eine ausreichende Aktivierung der Effektor-T-Zellen sichergestellt werden. Im weiteren Verlauf der Immunreaktion, mit fallenden TNF-Konzentrationen, können die Treg ihre suppressiven Eigenschaften wiedergewinnen und limitieren den Verlauf der Inflammation. Gleichzeitig stellt die Treg-vermittelte Suppression der Effektor-Klasse eine gewisse Aktivierungsschwelle dar, zu schwache Reize können somit keine umfassende Immunreaktion auslösen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur von TNF und TNFR2.....	14
Abb. 2: Schema der TNF-Varianten: (a) TNF-Trimer, (b) scTNF80, (c) TNCscTNF80.....	34
Abb. 3: Reduktion von MTT.....	36
Abb. 4: MACS-Zellisolation am Beispiel der CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-Isolation.....	37
Abb. 5: Kinetik von CFSE in Lymphozyten.....	40
Abb. 6: gating Strategie nach FACS-Analyse der Proliferations- und Suppressionsassays...	46
Abb. 7: Auswertung der Proliferationszyklen mittels CFSE-Färbung.....	47
Abb. 8: Wirkung der TNF-Varianten auf kontrolltransduzierte Wirbelzellen.....	50
Abb. 9: Wirkung der TNF-Varianten auf TNFR1-transduzierten Wirbelzellen.....	51
Abb. 10: Wirkung der TNF-Varianten auf TNFR2-transduzierten Wirbelzellen.....	52
Abb. 11: Proliferation von wt bzw. TNFR2 ^{-/-} Teff unter anti-CD3ε-Stimulierung.....	53
Abb. 12: Aktivierung von TNFR2 auf CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ T-Zellen durch TNCscTNF80.....	55
Abb. 13: Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen unter Stimulierung mit TNCscTNF80, rmTNF bzw. rhTNF.....	56
Abb. 14: Proliferation von MACS-separierten CD4 ⁺ T-Zellen unter Stimulierung von CD3, CD28 und TNFR2.....	58
Abb. 15: Proliferation von wt bzw. TNFR2 ^{-/-} Teff in gemischten Kulturen.....	59
Abb. 16: Suppression der TNFR2 ^{-/-} Teff Proliferation bei verschiedenen Teff:Treg- Verhältnissen.....	61
Abb. 17: Relative Proliferation von wt Teff unter Suppression durch Treg.....	62
Abb. 18: Effekt des TNFR2-spezifischen Agonisten auf die Treg-Funktion.....	63
Abb. 19: Effekt des TNFR2-spezifischen Agonisten bei unterschiedlichen Teff:Treg- Verhältnissen.....	64
Abb. 20: Expression von CD25 und Foxp3 auf Treg nach Prästimulierung mit IL-2.....	66
Abb. 21: Expression von CD25 bzw. Foxp3 auf Treg nach Prästimulierung mit IL-2 und verschiedenen TNF-Varianten.....	68
Abb. 22: Suppressive Funktion von Treg nach Prästimulierung mit IL-2 und TNCscTNF80...69	69
Abb. 23: Expression von CD25 auf prästimulierten Treg nach Suppressionsassay.....	70

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
AK	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Caspase	<i>Cysteinyl-aspartate specific protease</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFDASE	5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
CFSE	5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Succinimidylester
c-IAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CRD	<i>Cystein-rich domain</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
DC	<i>Dendritic cells</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FasL	Fas-Ligand
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1b-converting enzyme</i>
Foxp3	<i>Forkhead/winged-helix transcription factor box p3</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN-γ	Interferon-γ
IκB	<i>Inhibitor of κB</i>
IKK	<i>Inhibitor of κB kinase</i>

IL	Interleukin
IPEX	<i>Immune dysfunction, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zellen
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
κB	<i>Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene-3</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT-α	Lymphotoxin-α
MACS	<i>Magnetic cell separation</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
memTNF	<i>Membrane bound TNF</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MS	Multiple Sklerose
mTNF	Maus TNF
MTT	3-(4,5-Dimethylazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nikotinamiddinukleotid
NADPH	Nikotinamiddinukleotidphosphat
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
nTreg	Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen
OD	<i>Optical density</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PLAD	<i>Extracellular pre-ligand-binding assembly domain</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
rekomb.	rekombinant
RIP	<i>Receptor interacting protein</i>

rhTNF	Rekombinant hergestelltes humanes TNF
rmTNF	Rekombinant hergestelltes Maus TNF
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STNF	<i>Soluble TNF</i>
STNFR2	<i>Soluble TNFR2</i>
TACE	<i>Tumor necrosis factor-α converting enzyme</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
Teff	Effektor-T-Zellen
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Teff	Effektor-T-Zellen
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TMB	Tetramethylbenzidin
TNC	<i>Tenascin-C trimerization domain</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	<i>TNF receptor-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associating factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Treg	Regulatorische T-Zellen
TWEAK	<i>TNF-related weak inducer of apoptosis</i>
t _{1/2}	Halbwertszeit
wt	Wildtyp
ZAP-70	<i>Zeta chain-associated protein kinase 70</i>

9 Literaturverzeichnis

- Ablamunits, V., B. Bisikirska, and K. C. Herold. 2010. "Acquisition of Regulatory Function by Human CD8+ T Cells Treated with Anti-CD3 Antibody Requires TNF." *European Journal of Immunology* 40 (10): 2891–2901.
- Akbari, O., G. J. Freeman, et al. 2002. "Antigen-Specific Regulatory T Cells Develop via the ICOS–ICOS-Ligand Pathway and Inhibit Allergen-Induced Airway Hyperreactivity." *Nature Medicine* 8 (9): 1024–32.
- Allan, S. E., S. Q. Crome, et al. 2007. "Activation-Induced FOXP3 in Human T Effector Cells Does Not Suppress Proliferation or Cytokine Production." *International Immunology* 19 (4): 345–54.
- Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis, and A. G. Betz. 2004. "Regulatory T Cells Mediate Maternal Tolerance to the Fetus." *Nature Immunology* 5 (3): 266–71.
- Apostolou, I. 2004. "In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 199 (10): 1401–8.
- Aricha, R., T. Feferman, et al. 2008. "Ex Vivo Generated Regulatory T Cells Modulate Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis." *The Journal of Immunology* 180 (4): 2132–39.
- Belkaid, Y. 2008. "Role of Foxp3-Positive Regulatory T Cells during Infection." *European Journal of Immunology* 38 (4): 918–21.
- Belkaid, Y., and K. V. Tarbell. 2009. "Arming Treg Cells at the Inflammatory Site." *Immunity* 30 (3): 322–23.
- Berg, D., T. Stühmer, D. Siegmund, N. Müller, T. Giner, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, R. Bargou, and H. Wajant. 2009. "Oligomerized Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand Strongly Induces Cell Death in Myeloma Cells, but Also Activates Proinflammatory Signaling Pathways: TRAIL Signaling in Multiple Myeloma." *FEBS Journal* 276 (23): 6912–27.
- Biton, J., L. Semerano, L. Delavallee, D. Lemeiter, M. Laborie, G. Grouard-Vogel, M.-C. Boissier, and N. Bessis. 2011. "Interplay between TNF and Regulatory T Cells in a TNF-Driven Murine Model of Arthritis." *The Journal of Immunology* 186 (7): 3899–3910.
- Bopp, T., C. Becker, et al. 2007. "Cyclic Adenosine Monophosphate Is a Key Component of Regulatory T Cell Mediated Suppression." *Journal of Experimental Medicine* 204 (6): 1303–10.
- Burchill, M. A., J. Yang, K. B. Vang, J. J. Moon, H. Hamlet Chu, C.-W. J. Lio, A. L. Vegoe, C.-S. Hsieh, M. K. Jenkins, and M. A. Farrar. 2008. "Linked T Cell Receptor and Cytokine Signaling Govern the Development of the Regulatory T Cell Repertoire." *Immunity* 28 (1): 112–21.
- Burchill, M. A., J. Yang, et al. 2007. "Interleukin-2 Receptor Signaling in Regulatory T Cell Development and Homeostasis." *Immunology Letters* 114 (1): 1–8.

- Burchill, M. A., J. Yang, et al. 2007. "IL-2 Receptor B-Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3+ Regulatory T Cells." *The Journal of Immunology* 178 (1): 280–90.
- Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, and T. J. Ley. 2007. "Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance." *Immunity* 27 (4): 635–46.
- Carswell, E. A., L. Jâ Old, R. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. "An Endotoxin-Induced Serum Factor That Causes Necrosis of Tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72 (9): 3666–70.
- Chan, F. K.-M. 2000. "The Pre-Ligand Binding Assembly Domain: A Potential Target of Inhibition of Tumour Necrosis Factor Receptor Function." *Annals of the Rheumatic Diseases* 59 (suppl 1): i50–53.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S. M. Wahl. 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, X., M. Bäumel, D. N. Männel, O. M. Z. Howard, and J. J. Oppenheim. 2007. "Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+ CD25+ T Regulatory Cells." *The Journal of Immunology* 179 (1): 154–61.
- Chen, X., R. Hamano, J. J. Subleski, A. A. Hurwitz, O. M. Z. Howard, and J. J. Oppenheim. 2010. "Expression of Costimulatory TNFR2 Induces Resistance of CD4+FoxP3- Conventional T Cells to Suppression by CD4+FoxP3+ Regulatory T Cells." *The Journal of Immunology* 185 (1): 174–82.
- Chen, X., M. Bäumel, D. N. Männel, O. Z. Howard, and J. J. Oppenheim. 2007. "Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+ CD25+ T Regulatory Cells." *The Journal of Immunology* 179 (1): 154–61.
- Chen, X., T. Murakami, J. J. Oppenheim, and O. M. Howard. 2004. "Differential Response of Murine CD4+ CD25+ and CD4+ CD25-T Cells to Dexamethasone-Induced Cell Death." *European Journal of Immunology* 34 (3): 859–69.
- Chen, X., and J. J. Oppenheim. 2011a. "The Phenotypic and Functional Consequences of Tumour Necrosis Factor Receptor Type 2 Expression on CD4+ FoxP3+ Regulatory T Cells: TNFR2+ Treg Cells." *Immunology* 133 (4): 426–33.
- Chen, X., and J. J. Oppenheim. 2011b. "Resolving the Identity Myth: Key Markers of Functional CD4+FoxP3+ Regulatory T Cells." *International Immunopharmacology* 11 (10): 1489–96.
- Chen, X., T. Murakami, J. J. Oppenheim, and O. M. Z. Howard. 2004. "Differential Response of Murine CD4+CD25+ and CD4+CD25-T Cells to Dexamethasone-Induced Cell Death." *European Journal of Immunology* 34 (3): 859–69.
- Chen, X., and J. J. Oppenheim. 2011. "The Phenotypic and Functional Consequences of Tumour Necrosis Factor Receptor Type 2 Expression on CD4+FoxP3+ Regulatory T Cells." *Immunology* 133 (4): 426–33.

- Chen, X., J. J. Subleski, H. Kopf, O. M. Z. Howard, D. N. Männel, and J. J. Oppenheim. 2008. "Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4+ CD25+ FoxP3+ T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells." *The Journal of Immunology* 180 (10): 6467–71.
- Chen, X., J. Willette-Brown, X. Wu, Y. Hu, O. M. Z. Howard, Y. Hu, and J. J. Oppenheim. 2015. "IKK Is Required for the Homeostasis of Regulatory T Cells and for the Expansion of Both Regulatory and Effector CD4 T Cells." *The FASEB Journal* 29 (2): 443–54.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner. 1994. "Regulatory T Cell Clones Induced by Oral Tolerance: Suppression of Autoimmune Encephalomyelitis." *Science* 265: 1237–40.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari, and V. M. Dixit. 1995. "FADD, a Novel Death Domain-Containing Protein, Interacts with the Death Domain of Fas and Initiates Apoptosis." *Cell* 81 (4): 505–12.
- Chopra, M., S. S. Riedel, M. Biehl, S. Krieger, V. von Krosigk, C. A. Bauerlein, C. Brede, et al. 2013. "Tumor Necrosis Factor Receptor 2-Dependent Homeostasis of Regulatory T Cells as a Player in TNF-Induced Experimental Metastasis." *Carcinogenesis* 34 (6): 1296–1303.
- Cobbold, S. P., R. Castejon, E. Adams, D. Zelenika, L. Graca, S. Humm, and H. Waldmann. 2004. "Induction of foxP3+ Regulatory T Cells in the Periphery of T Cell Receptor Transgenic Mice Tolerized to Transplants." *The Journal of Immunology* 172 (10): 6003–10.
- Corthay, A. 2009. "How Do Regulatory T Cells Work?" *Scandinavian Journal of Immunology* 70 (4): 326–36.
- Curotto de Lafaille, M. A., N. Kutchukhidze, S. Shen, Y. Ding, H. Yee, and J. J. Lafaille. 2008. "Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation." *Immunity* 29 (1): 114–26.
- Curotto de Lafaille, M. A., and J. J. Lafaille. 2009. "Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor?" *Immunity* 30 (5): 626–35.
- Curotto de Lafaille, M. A., A. C. Lino, N. Kutchukhidze, and J. J. Lafaille. 2004. "CD25- T Cells Generate CD25+ Foxp3+ Regulatory T Cells by Peripheral Expansion." *The Journal of Immunology* 173 (12): 7259–68.
- Curotto de Lafaille, M. A., S. Muriglan, M.-J. Sunshine, Y. Lei, N. Kutchukhidze, G. C. Furtado, A. K. Wensky, D. Olivares-Villagómez, and J. J. Lafaille. 2001. "Hyper Immunoglobulin E Response in Mice with Monoclonal Populations of B and T Lymphocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 194 (9): 1349–60.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.-F. Chen, et al. 2007. "Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression." *Journal of Experimental Medicine* 204 (6): 1257–65.
- De Lafaille, M. A. C., S. Muriglan, M.-J. Sunshine, Y. Lei, N. Kutchukhidze, G. C. Furtado, A. K. Wensky, D. Olivares-Villagómez, and J. J. Lafaille. 2001. "Hyper Immunoglobulin E Response in Mice with Monoclonal Populations of B and T Lymphocytes." *The Journal of Experimental Medicine* 194 (9): 1349–60.

- Demengeot, J., S. Zelenay, M. F. Moraes-Fontes, I. Caramalho, and A. Coutinho. 2006. "Regulatory T Cells in Microbial Infection." *Springer Seminars in Immunopathology* 28 (1): 41–50.
- DiPaolo, R. J., C. Brinster, T. S. Davidson, J. Andersson, D. Glass, and E. M. Shevach. 2007. "Autoantigen-Specific TGF β -Induced Foxp3+ Regulatory T Cells Prevent Autoimmunity by Inhibiting Dendritic Cells from Activating Autoreactive T Cells." *The Journal of Immunology* 179 (7): 4685–93.
- Edward Y. K., and H.-S. Teh. 2004. "Critical Role of TNF Receptor Type-2 (p75) as a Costimulator for IL-2 Induction and T Cell Survival: A Functional Link to CD28." *The Journal of Immunology* 173: 4500–4509.
- Eissner, G., W. Kolch, and P. Scheurich. 2004. "Ligands Working as Receptors: Reverse Signaling by Members of the TNF Superfamily Enhance the Plasticity of the Immune System." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15 (5): 353–66.
- Erickson, S. L., F. J. de Sauvage, K. Kikly, K. Carver-Moore, S. Pitts-Meek, N. Gillett, K. C. F. Sheehan, R. D. Schreiber, D. V. Goeddel, and M. W. Moore. 1994. "Decreased Sensitivity to Tumor-Necrosis Factor but Normal T-Cell Development in TNF Receptor-2-Deficient Mice." *Nature* 372: 560–63.
- Faustman, D., and M. Davis. 2010. "TNF Receptor 2 Pathway: Drug Target for Autoimmune Diseases." *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (6): 482–93.
- Figgett, W. A., F. B. Vincent, D. Saulep-Easton, and F. Mackay. 2014. "Roles of Ligands from the TNF Superfamily in B Cell Development, Function, and Regulation." *Seminars in Immunology* 26 (3): 191–202.
- Fischer, R., O. Maier, M. Siegemund, H. Wajant, P. Scheurich, and K. Pfizenmaier. 2011. "A TNF Receptor 2 Selective Agonist Rescues Human Neurons from Oxidative Stress-Induced Cell Death." Edited by M. G. Tansey. *PLoS ONE* 6 (11): e27621.
- Flores-García, Y., J. L. Rosales-Encina, V. H. Rosales-García, A. R. Satoskar, and P. Talamás-Rohana. 2013. "Treg Cells Induced by rSSP4 Derived from *T. Cruzi* Amastigotes Increase Parasitemia in an Experimental Chagas Disease Model." *BioMed Research International* 2013: 1–10.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. "Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells." *Nature Immunology* 4 (4): 330–36.
- Fontenot, J. D., and A. Y. Rudensky. 2005. "A Well Adapted Regulatory Contrivance: Regulatory T Cell Development and the Forkhead Family Transcription Factor Foxp3." *Nature Immunology* 6 (4): 331–37.
- Furtado, G. C., M. A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze, and J. J. Lafaille. 2002. "Interleukin 2 Signaling Is Required for CD4+ Regulatory T Cell Function." *Journal of Experimental Medicine* 196 (6): 851–57.
- Gearing, A. J. H., P. Beckett, M. Christodoulou, L. M. Wood, and K. Woolley. 1994. "Processing of Tumor Necrosis Factor-Alpha Precursor by Metalloproteinases." *Letters to Nature* 370: 555–57.
- Gershon, R. K., and K. Kondo. 1970. "Cell Interactions in the Induction of Tolerance: The Role of Thymic Lymphocytes." *Immunology* 18 (5): 723.

- Gery, I., R. K. Gershon, and B. H. Waksman. 1972. "Potentiation of the T-Lymphocyte Response to Mitogens I. The Responding Cell." *The Journal of Experimental Medicine* 136 (1): 128–42.
- Gondek, D. C., L.-F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, and R. J. Noelle. 2005. "Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+ CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism." *The Journal of Immunology* 174 (4): 1783–86.
- Grech, A. P. 2005. "Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2) Signaling Is Negatively Regulated by a Novel, Carboxyl-Terminal TNFR-Associated Factor 2 (TRAF2)-Binding Site." *Journal of Biological Chemistry* 280 (36): 31572–81.
- Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann, and P. Scheurich. 1998. "The Type 1 Receptor (CD120a) Is the High-Affinity Receptor for Soluble Tumor Necrosis Factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (2): 570–75.
- Grell, M., G. Zimmermann, D. Hülser, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 1994. "TNF Receptors TR60 and TR80 Can Mediate Apoptosis Via Induction of Distinct Signaling Pathways." *The Journal of Immunology* 153: 1963–72.
- Hehlgans, T., and K. Pfeffer. 2005. "The Intriguing Biology of the Tumour Necrosis Factor/tumour Necrosis Factor Receptor Superfamily: Players, Rules and the Games." *Immunology* 115 (1): 1–20.
- Higuchi, M., and B. B. Aggarwal. 1994. "TNF Induces Internalization of the p60 Receptor and Shedding of the p80 Receptor." *The Journal of Immunology* 152 (7): 3550–58.
- Hill, J. A., J. A. Hall, C.-M. Sun, Q. Cai, N. Ghyselinck, P. Chambon, Y. Belkaid, D. Mathis, and C. Benoist. 2008. "Retinoic Acid Enhances Foxp3 Induction Indirectly by Relieving Inhibition from CD4+CD44hi Cells." *Immunity* 29 (5): 758–70.
- Hoffmann, U., T. Bergler, M. Rihm, C. Pace, B. Krüger, P. Rümmele, B. Stoelcker, B. Banas, D. N. Männel, and B. K. Krämer. 2009. "Upregulation of TNF Receptor Type 2 in Human and Experimental Renal Allograft Rejection." *American Journal of Transplantation* 9 (4): 675–86.
- Holtmann, M. H., E. Douni, M. Schütz, G. Zeller, J. Mudter, H.-A. Lehr, J. Gerspach, P. Scheurich, P. R. Galle, and G. Kollias. 2002. "Tumor Necrosis Factor-Receptor 2 Is up-Regulated on Lamina Propria T Cells in Crohn's Disease and Promotes Experimental Colitis in Vivo." *European Journal of Immunology* 32 (11): 3142–51.
- Hori, S. 2003. "Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3." *Science* 299 (5609): 1057–61.
- Hori, S., T. L. Carvalho, and J. Demengeot. 2002. "CD25+CD4+ Regulatory T Cells Suppress CD4+ T Cell-Mediated Pulmonary Hyperinflammation Driven by *Pneumocystis Carinii* in Immunodeficient Mice." *European Journal of Immunology* 32: 1282–91.
- Horwitz, D. A., S. G. Zheng, and J. D. Gray. 2008. "Natural and TGF-B-induced Foxp3+CD4+ CD25+ Regulatory T Cells Are Not Mirror Images of Each Other." *Trends in Immunology* 29 (9): 429–35.
- Hsu, H., J. Xiong, and D. V. Goeddel. 1995. "The TNF Receptor 1-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF-κB Activation." *Cell* 81 (4): 495–504.

- Huang, C.-T., C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, and H. I. Levitsky. 2004. "Role of LAG-3 in Regulatory T Cells." *Immunity* 21 (4): 503–13.
- Joedicke, J. J., L. Myers, A. B. Carmody, R. J. Messer, H. Wajant, K. S. Lang, P. A. Lang, T. W. Mak, K. J. Hasenkrug, and U. Dittmer. 2014. "Activated CD8+ T Cells Induce Expansion of V⁵⁺ Regulatory T Cells via TNFR2 Signaling." *The Journal of Immunology* 193 (6): 2952–60.
- Karl, I., M. Jossberger-Werner, N. Schmidt, S. Horn, M. Goebeler, M. Leverkus, H. Wajant, and T. Giner. 2014. "TRAF2 Inhibits TRAIL- and CD95L-Induced Apoptosis and Necroptosis." *Cell Death and Disease* 5 (10): e1444.
- Karlsson, M. R. 2004. "Allergen-Responsive CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Children Who Have Outgrown Cow's Milk Allergy." *Journal of Experimental Medicine* 199 (12): 1679–88.
- Khattri, R., T. Cox, S.-A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. "An Essential Role for Scurfin in CD4+CD25+ T Regulatory Cells." *Nature Immunology* 4 (4): 337–42.
- Kim, E. Y., J. J. Priatel, S.-J. Teh, and H.-S. Teh. 2006. "TNF Receptor Type 2 (p75) Functions as a Costimulator for Antigen-Driven T Cell Responses in Vivo." *The Journal of Immunology* 176 (2): 1026–35.
- Kim, E. Y., and H.-S. Teh. 2001. "TNF Type 2 Receptor (p75) Lowers the Threshold of T Cell Activation." *The Journal of Immunology* 167 (12): 6812–20.
- Kim, E. Y., J. J. Priatel, S.-J. Teh, and H.-S. Teh. 2006. "TNF Receptor Type 2 (p75) Functions as a Costimulator for Antigen-Driven T Cell Responses in Vivo." *The Journal of Immunology* 176 (2): 1026–35.
- Kim, E. Y., and H.-S. Teh. 2004. "Critical Role of TNF Receptor Type-2 (p75) as a Costimulator for IL-2 Induction and T Cell Survival: A Functional Link to CD28." *The Journal of Immunology* 173: 4500–4509.
- Kim, G.-M., J. Xu, J. Xu, S.-K. Song, P. Yan, G. Ku, X. M. Xu, and C. Y. Hsu. 2001. "Tumor Necrosis Factor Receptor Deletion Reduces Nuclear Factor- κ B Activation, Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2 Expression, and Functional Recovery after Traumatic Spinal Cord Injury." *The Journal of Neuroscience* 21 (17): 6617–25.
- Knoechel, B. 2005. "Sequential Development of Interleukin 2-Dependent Effector and Regulatory T Cells in Response to Endogenous Systemic Antigen." *Journal of Experimental Medicine* 202 (10): 1375–86.
- Kohm, A. P., J. S. Williams, and S. D. Miller. 2004. "Cutting Edge: Ligation of the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Enhances Autoreactive CD4+ T Cell Activation and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *The Journal of Immunology* 172 (8): 4686–90.
- Krippner-Heidenreich, A., I. Grunwald, G. Zimmermann, M. Kühnle, J. Gerspach, T. Sterns, S. D. Shnyder, et al. 2008. "Single-Chain TNF, a TNF Derivative with Enhanced Stability and Antitumoral Activity." *The Journal of Immunology* 180 (12): 8176–83.

- Kullberg, M. C., D. Jankovic, P. L. Gorelick, P. Caspar, J. J. Letterio, A. W. Cheever, and A. Sher. 2002. "Bacteria-Triggered CD4+ T Regulatory Cells Suppress Helicobacter Hepaticus-Induced Colitis." *Journal of Experimental Medicine* 196 (4): 505–15.
- Lainez, B. 2004. "Identification and Characterization of a Novel Spliced Variant That Encodes Human Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor 2." *International Immunology* 16 (1): 169–77.
- Leon, K., I. Caramalho, C. Van Den Dool, R. Gardner, V. Oliveira, M.-L. Bergman, N. Sepúlveda, T. Paixao, J. Faro, and J. Carneiro. 2007. "When Three Is Not a Crowd: A Crossregulation Model of the Dynamics and Repertoire Selection of Regulatory CD4+ T Cells." *Immunological Reviews* 216 (1): 48–68.
- Ling, Y.-H., C. Tornos, and R. Perez-Soler. 1998. "Phosphorylation of Bcl-2 Is a Marker of M Phase Events and Not a Determinant of Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 273 (30): 18984–91.
- Lio, C.-W. J., and C.-S. Hsieh. 2008. "A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development." *Immunity* 28 (1): 100–111.
- Liu, V. C., L. Y. Wong, T. Jang, A. H. Shah, I. Park, X. Yang, Q. Zhang, S. Lonning, B. A. Teicher, and C. Lee. 2007. "Tumor Evasion of the Immune System by Converting CD4+ CD25- T Cells into CD4+ CD25+ T Regulatory Cells: Role of Tumor-Derived TGF-B." *The Journal of Immunology* 178 (5): 2883–92.
- Liu, W. 2006. "CD127 Expression Inversely Correlates with FoxP3 and Suppressive Function of Human CD4+ T Reg Cells." *Journal of Experimental Medicine* 203 (7): 1701–11.
- Loetscher, H., D. Stueber, D. Banner, F. Mackay, and W. Lesslauer. 1993. "Human Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF Alpha) Mutants with Exclusive Specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 268 (35): 26350–57.
- Lohr, J., B. Knoechel, D. Caretto, and A. K. Abbas. 2009. "Balance of Th1 and Th17 Effector and Peripheral Regulatory T Cells." *Microbes and Infection* 11 (5): 589–93.
- MacEwan, D. J. 2002. "TNF Ligands and Receptors – a Matter of Life and Death." *British Journal of Pharmacology* 135 (4): 855–75.
- Mannel, D. 2007. "Advances in Sepsis Research Derived from Animal Models." *International Journal of Medical Microbiology* 297 (5): 393–400.
- Mattern, R. 2010. "Triphenyltetrazolium." <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Triphenyltetrazolium.svg>. (Stand 01.09.2015)
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins, and M. C. Byrne. 2002. "CD4+CD25+Immunoregulatory T Cells: Gene Expression Analysis Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor." *Immunity* 16 (2): 311–23.
- Möller, G. 1988. "Do Suppressor T Cells Exist?" *Scandinavian Journal of Immunology* 27 (3): 247–50.
- Morgan, M. E., J. H. M. van Bilsen, A. M. Bakker, B. Heemskerk, M. W. Schilham, F. C. Hartgers, B. G. Elferink, et al. 2005. "Expression of FOXP3 mRNA Is Not Confined to CD4+CD25+ T Regulatory Cells in Humans." *Human Immunology* 66 (1): 13–20.

- Morris, Gerald P., and Yi-chi M. Kong. 2006. "Interference with CD4+CD25+ T-Cell-Mediated Tolerance to Experimental Autoimmune Thyroiditis by Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Monoclonal Antibody." *Journal of Autoimmunity* 26 (1): 24–31.
- Most, R. G., A. J. Currie, S. Mahendran, A. Prosser, A. Darabi, B. W. S. Robinson, A. K. Nowak, and R. A. Lake. 2008. "Tumor Eradication after Cyclophosphamide Depends on Concurrent Depletion of Regulatory T Cells: A Role for Cycling TNFR2-Expressing Effector-Suppressor T Cells in Limiting Effective Chemotherapy." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58 (8): 1219–28.
- Mukai, Y., T. Nakamura, M. Yoshikawa, Y. Yoshioka, S.-I. Tsunoda, S. Nakagawa, Y. Yamagata, and Y. Tsutsumi. 2010. "Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex." *Science Signaling* 3 (148): ra83.
- Müller, N., A. Wyzgol, S. Münkel, K. Pfizenmaier, and H. Wajant. 2008. "Activity of Soluble OX40 Ligand Is Enhanced by Oligomerization and Cell Surface Immobilization." *FEBS Journal* 275 (9): 2296–2304.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, and R. Gentz. 1996. "FLICE, a Novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death-Inducing Signaling Complex." *Cell* 85 (6): 817.
- Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C. M. Cilio, and F. Ivars. 2006. "Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4-Dependent down-Modulation of Costimulatory Molecules on Dendritic Cells in CD4+ CD25+ Regulatory T-Cell-Mediated Suppression." *Immunology* 118 (2): 240–49.
- Old, L. J., R. Kassel, S. Green, N. Fiore, B. Williamson, and E. A. Carswell. 1975. "An Endotoxin-Induced Serum Factor That Causes Necrosis of Tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72 (9): 3666–70.
- Oppenheim, J. J., and Chen X. 2010. "TNF-A: An Activator of CD4+ FoxP3+ TNFR2+ RegulatoryT Cells." *TNF Pathophysiology: Molecular and Cellular Mechanisms* 11: 119–34.
- Parish, C. R. 1999. "Fluorescent Dyes for Lymphocyte Migration and Proliferation Studies." *Immunology and Cell Biology* 77 (6): 499–508.
- Passerini, L., S. E. Allan, M. Battaglia, S. Di Nunzio, A. N. Alstad, M. K. Levings, M. G. Roncarolo, and R. Bacchetta. 2008. "STAT5-Signaling Cytokines Regulate the Expression of FOXP3 in CD4+CD25+ Regulatory T Cells and CD4+CD25- Effector T Cells." *International Immunology* 20 (3): 421–31.
- Paust, S., L. Lu, N. McCarty, and H. Cantor. 2004. "Engagement of B7 on Effector T Cells by Regulatory T Cells Prevents Autoimmune Disease." *Science Signaling* 101 (28): 10398–403.
- Peschon, J. J., J. L. Slack, R. A. Black, P. Reddy, and K. L. Stocking. 1998. "An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development." *Science* 282 (5392): 1281–84.
- Peter, M. El, and P. H. Krammer. 2003. "The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond." *Cell Death & Differentiation* 10 (1): 26–35.

- Pfeffer, K. 2003. "Biological Functions of Tumor Necrosis Factor Cytokines and Their Receptors." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14 (3-4): 185–91.
- Pillai, V., S. B. Ortega, and N. J. Karandikar. 2007. "Transient Regulatory T-Cells: A State Attained By All Activated Human T-Cells." *Clin. Immunol.* 123 (1): 18–29.
- Pimentel-Muinos, F. X., and B. Seed. 1999. "Regulated Commitment of TNF Receptor Signaling: A Molecular Switch for Death or Activation." *Immunity* 11: 783–93.
- Polz, J. 2010. "The Role of TNF Receptor Type 2 on Myeloid Cells in Sepsis-Functional Analysis." http://epub.uni-regensburg.de/17090/1/2010-10-13_Johannes_Polz_-_The_role_of_TNF_receptor_type_2_on_myeloid_cells_in_sepsis_-_functional_analysis.pdf. (Stand 01.09.2015)
- Polz, J., A. Remke, S. Weber, D. Schmidt, D. Weber-Steffens, A. Pietryga-Krieger, N. Müller, U. Ritter, S. Mostböck, and D. N. Männel. 2014. "Myeloid Suppressor Cells Require Membrane TNFR2 Expression for Suppressive Activity: TNFR2 and MDSC." *Immunity, Inflammation and Disease* 2 (2): 121–30.
- Read, S., V. Malmström, and F. Powrie. 2000. "Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of CD25+ CD4+ Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation." *The Journal of Experimental Medicine* 192 (2): 295–302.
- Rothe, M., S. C. Wong, W. J. Henzel, and D. V. Goeddel. 1994. "A Novel Family of Putative Signal Transducers Associated with the Cytoplasmic Domain of the 75 kDa Tumor Necrosis Factor Receptor." *Cell* 78: 681–92.
- Sakaguchi, S. 2004. "Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses." *Annual Review of Immunology* 22 (1): 531–62.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 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." *The Journal of Immunology* 155 (3): 1151–64.
- Sakaguchi, S., K. Wing, and M. Miyara. 2007. "Regulatory T Cells—a Brief History and Perspective." *European Journal of Immunology* 37 (S1): S116–23.
- Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, and T. Yamaguchi. 2009. "Regulatory T Cells: How Do They Suppress Immune Responses?" *International Immunology* 21 (10): 1105–11.
- Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, and D. Adam. 2004. "Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling: Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles." *Immunity* 21 (3): 415–28.
- Selvaraj, R. K., and T. L. Geiger. 2008. "Mitigation of Experimental Allergic Encephalomyelitis by TGF-Beta Induced Foxp3+ Regulatory T Lymphocytes through the Induction of Anergy and Infectious Tolerance." *The Journal of Immunology* 180: 2830–38.
- Semenza, G. L. 1998. "Hypoxia-Inducible Factor 1 and the Molecular Physiology of Oxygen Homeostasis." *J. Lab. Clin. Med.* 131: 207–14.

- Shen, F. W., Y. Saga, G. Litman, G. Freeman, J. S. Tung, H. Cantor, and E. A. Boyse. 1985. "Cloning of Ly-5 cDNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (21): 7360–63.
- Shevach, E. M. 2009. "Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression." *Immunity* 30 (5): 636–45.
- Srivastava, S. 2003. "Receptor Activator of NF- B Ligand Induction via Jak2 and Stat5a in Mammary Epithelial Cells." *Journal of Biological Chemistry* 278 (46): 46171–78.
- Stephens, G. L., R. S. McHugh, M. J. Whitters, D. A. Young, D. Luxenberg, B. M. Carreno, M. Collins, and E. M. Shevach. 2004. "Engagement of Glucocorticoid-Induced TNFR Family-Related Receptor on Effector T Cells by Its Ligand Mediates Resistance to Suppression by CD4+CD25+ T Cells." *The Journal of Immunology* 173 (8): 5008–20.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. "Immunologic Self-Tolerance Maintained by CD25(+)CD4(+) Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4." *J. Exp. Med.* 192: 303–9.
- Tartaglia, L. A., R. F. Weber, I. S. Figari, C. Reynolds, M. A. Palladino, and D. V. Goeddel. 1991. "The Two Different Receptors for Tumor Necrosis Factor Mediate Distinct Cellular Responses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (20): 9292–96.
- Taylor, D. K., P. T. Walsh, D. F. LaRosa, J. Zhang, M. A. Burchill, M. A. Farrar, and L. A. Turka. 2006. "Constitutive Activation of STAT5 Supersedes the Requirement for Cytokine and TCR Engagement of CD4+ T Cells in Steady-State Homeostasis." *The Journal of Immunology* 177 (4): 2216–23.
- Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. "CD4+ CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation in Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production." *The Journal of Experimental Medicine* 188 (2): 287–96.
- Tran, D. Q. 2013. "In Vitro Suppression Assay for Functional Assessment of Human Regulatory T Cells." In *Immune Homeostasis*, edited by A. L. Snow and M. J. Lenardo, 979:199–212. Methods in Molecular Biology. Humana Press.
- Tran, D. Q., H. Ramsey, and E. M. Shevach. 2007. "Induction of FOXP3 Expression in Naive Human CD4+FOXP3 T Cells by T-Cell Receptor Stimulation Is Transforming Growth Factor-Dependent but Does Not Confer a Regulatory Phenotype." *Blood* 110 (8): 2983–90.
- Valencia, X. 2006. "TNF Downmodulates the Function of Human CD4+CD25hi T-Regulatory Cells." *Blood* 108 (1): 253–61.
- Van Mierlo, G. J. D., H. U. Scherer, M. Hameetman, M. E. Morgan, R. Flierman, T. W. J. Huizinga, and R. E. M. Toes. 2008. "Cutting Edge: TNFR-Shedding by CD4+ CD25+ Regulatory T Cells Inhibits the Induction of Inflammatory Mediators." *The Journal of Immunology* 180 (5): 2747–51.
- Wajant, H. 2002. "The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm." *Science* 296 (5573): 1635–36.

- Wang, J., A. Ioan-Facsinay, E. I. H. van der Voort, T. W. J. Huizinga, and R. E. M. Toes. 2007. "Transient Expression of FOXP3 in Human Activated Nonregulatory CD4+ T Cells." *European Journal of Immunology* 37 (1): 129–38.
- Weiner, M. D. 1997. "Oral Tolerance for the Treatment of Autoimmune Diseases." *Annual Review of Medicine* 48 (1): 341–51.
- Wyzgol, A., N. Muller, A. Fick, S. Munkel, G. U. Grigoleit, K. Pfizenmaier, and H. Wajant. 2009. "Trimer Stabilization, Oligomerization, and Antibody-Mediated Cell Surface Immobilization Improve the Activity of Soluble Trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligand." *The Journal of Immunology* 183 (3): 1851–61.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, and R. M. Steinman. 2003. "Direct Expansion of Functional CD25+ CD4+ Regulatory T Cells by Antigen-Processing Dendritic Cells." *Journal of Experimental Medicine* 198 (2): 235–47.
- Zhang, X., L. Izikson, L. Liu, and H. L. Weiner. 2001. "Activation of CD25+ CD4+ Regulatory T Cells by Oral Antigen Administration." *The Journal of Immunology* 167 (8): 4245–53.
- Zhao, D.-M. 2006. "Activated CD4+CD25+ T Cells Selectively Kill B Lymphocytes." *Blood* 107 (10): 3925–32.
- Zuany-Amorim, C., E. Sawicka, C. Manlius, A. Le Moine, L. R. Brunet, D. M. Kemeny, G. Bowen, G. Rook, and C. Walker. 2002. "Suppression of Airway Eosinophilia by Killed Mycobacterium Vaccae-Induced Allergen-Specific Regulatory T-Cells." *Nature Medicine* 8 (6): 625–29.

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Konstantin Bertold Molitor
Geburtsdatum	19. Februar 1987
Geburtsort	Frankfurt/ Main
Familienstand	ledig

PRAKТИSCHE ERFAHRUNG

WEITERBILDUNG ZUM FACHARZT NEUROLOGIE

seit Jan. 2015 Klinik für Neurologie mit überregionaler Stroke Unit und Neurogeriatrie
PD Dr. Dr. Marquardt, Asklepios Klinikum Wandsbek, Hamburg

PRAKТИSCHES JAHR

Apr. 2014 - Jul. 2014	Klinik für Chirurgie Prof. Dr. Fürst, Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg
Dez. 2013 - Apr. 2014	Klinik für Innere Medizin Prof. Dr. Genné, Spitalzentrum Biel, Schweiz
Aug. 2013 - Dez. 2013	Klinik für Neurologie Prof. Dr. Gerloff, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

FAMULATUREN

Okt. 2012	Interdisziplinäre Intensivstation Dr. Stigler, Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg
Aug. 2012 - Sept. 2012	Klinik für Neurologie Dr. Molitor, Juliusspital, Würzburg
Aug. 2011 - Sept. 2011	Institut für Immunologie Prof. Dr. Männel, Universitätsklinikum Regensburg
Mrz. 2011 - Apr. 2011	Praxis für Dermatologie und Allergologie Drs. Schubert et al., Würzburg
Apr. 2010	Klinik für Anästhesiologie Dr. Kirchhoff, Missionsärztliche Klinik, Würzburg

PROMOTION

Aug. 2011 - Sept. 2015	Modulation der T-Zell-Funktion durch Aktivierung von TNFR2 mit Fokus auf regulatorische T-Zellen Prof. Dr. Männel, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Regensburg
Sept. 2011 - Mrz. 2012	Forschungssemester Planung und Durchführung der Experimente, Analyse der Ergebnisse, statistische Auswertung, Progress Reports

AUSBILDUNG

- | | |
|------------------------|--|
| Okt. 2007 - Nov. 2014 | Studium der Humanmedizin
Universität Regensburg |
| Nov. 2014 | Zweites Staatsexamen
Noten: schriftlich 3, mündlich-praktisch 2 |
| Aug. 2009 | Erstes Staatsexamen
Note 3 |
| Okt. 2006 - Jun. 2007 | Zivildienst
Abteilung für Chirurgie, Missionsärztliche Klinik, Würzburg |
| Sept. 1997 - Jul. 2006 | Besuch des Gymnasiums
Siebold Gymnasium Würzburg, Abiturnote 1,1 |

QUALIFIKATIONEN

gute Englisch- und Französischkenntnisse in Wort und Schrift
sicherer Umgang mit MS-Office, Soarian Clinicals, NEXUS / KIS

INTERESSEN

Aktives Mitglied des Kammerchores am Würzburger Dom
Klassisches und Jazz-Piano
Mitglied der Sail Training Association Germany
Jährliche Törns auf traditionellen Segelschiffen und ehrenamtliche Mitarbeit
in der Werft von Clipper DJS e.V.
Rennrad- und Mountainbike-Touren

Hamburg, den 27. September 2015