

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE
PROF. DR. MARKUS FEUERER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

WIRKUNG EINES TNFR2-SPEZIFISCHEN AGONISTEN
AUF CHRONISCHE ENTZÜNDUNG

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Falter

2018

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE
PROF. DR. MARKUS FEUERER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

WIRKUNG EINES TNFR2-SPEZIFISCHEN AGONISTEN
AUF CHRONISCHE ENTZÜNDUNG

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Falter

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela Männel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2019

Inhalt

1	Einführung.....	4
1.1	Die Immunabwehr.....	4
1.1.1	Das angeborene (unspezifische) Immunsystem	4
1.1.2	Das adaptive (spezifische) Immunsystem	4
1.2	Regulatorische T Zellen	5
1.3	Myeloide Suppressorzellen	7
1.4	Gegenseitige Beeinflussung von MDSC und Treg.....	8
1.5	Tumornekrosefaktor (TNF) und seine Rezeptoren.....	8
1.5.1	Struktur des TNF.....	8
1.5.2	Rezeptoren des TNF.....	9
1.5.3	Intrazelluläre Signaltransduktion.....	9
1.5.4	TNF als therapeutisches Ziel.....	10
1.6	TNCscTNF80-Protein	11
1.7	Zielsetzung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Antikörper	13
2.1.2	Kits	14
2.1.3	Puffer und Medien.....	14
2.1.4	Chemikalien.....	15
2.1.5	Geräte	17
2.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.7	Software.....	19
2.1.8	Zellen.....	19
2.1.9	Versuchstiere	19
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Statistische Analyse.....	21
2.2.2	Genotypisierung	21
2.2.3	TNCscTNF80.....	27
2.2.4	Herstellung der BCG/IFA-Emulsion.....	27
2.2.5	Subkutane Injektion.....	27
2.2.6	Intraperitoneale Injektion	27
2.2.7	Venöse Blutentnahme (retrobulbäre Punktion)	27

2.2.8	Serumgewinnung.....	27
2.2.9	Isolation der Milzzellen.....	27
2.2.10	Isolation der Knochenmarkszellen	28
2.2.11	Bestimmung der Zellzahl	29
2.2.12	Durchflusszytometrie	29
2.2.13	T-Zell-Suppressionsassay.....	30
2.2.14	Zellkultur.....	34
2.2.15	ELISA.....	34
2.2.16	L929-Zell-Zytotoxizitätsassay.....	35
3	Ergebnisse	37
3.1	BCG-Modell.....	37
3.1.1	Wiederholte Injektion von BCG induziert chronische Entzündung	37
3.1.2	Entzündungsinduktion ist unabhängig von der TNFR2-Expression	44
3.2	Effekte von TNF80 in naiven, akut und chronisch entzündeten Mäusen.....	50
3.2.1	Einmalige Injektion von TNF80 zeigt keinen messbaren Effekt.....	50
3.2.2	Zweimalige Injektion von TNF80 induziert in naiven Mäusen eine Entzündungsreaktion.....	52
3.2.3	Zweimalige Injektion von TNF80 induziert Toleranz gegenüber BCG-Challenge	55
3.2.4	Zweimalige Injektion von TNF80 führt in chronischer Entzündung zur Expansion von Treg.....	57
3.3	TNF80-Toleranz.....	60
3.3.1	TNF80 induziert Toleranz gegenüber LPS-Challenge	60
3.3.2	Einmalige Behandlung mit TNF80	60
3.3.3	Zweimalige Behandlung mit TNF80.....	64
3.3.4	Behandlung mit TNF80 erniedrigt IL-10 Konzentration im Serum nach LPS-Challenge.....	67
3.3.5	Toleranz ist nicht sicher auf TNF80 zurückzuführen.....	68
3.4	Suppressive Wirkung der Treg.....	70
3.4.1	Einmalige Behandlung mit TNF80 steigert Treg-Suppressivität	70
3.4.2	Zweimalige Behandlung mit TNF80 mindert Treg-Suppressivität	75
3.5	Effekte einer Nachbehandlung mit TNF80	79
3.5.1	Suppressive Wirkung durch zweimalige TNF80-Nachbehandlung nicht beeinflusst ...	79
3.5.2	Zweimalige Nachbehandlung mit TNF80 erhöht Anteil aktivierter Treg	81
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	82
3.6.1	BCG-Modell für chronische Entzündung.....	82
3.6.2	Wirkung von TNF80 auf die Zellen des Immunsystems.....	82

3.6.3	Wirkung von TNF80 auf die Konzentration verschiedener Zytokine im Serum	82
3.6.4	Wirkung von TNF80 auf die Suppressivität der Treg	83
4	Diskussion	84
4.1	Etablierung eines Modells für chronische Entzündung	84
4.2	Übertragbarkeit des BCG-Modells auf andere Pathologien	86
4.3	Wirkung von TNF80 auf die Zellen des Immunsystems.....	86
4.4	Wirkung von TNF80 auf die Konzentration verschiedener Zytokine im Serum	89
4.5	Wirkung von TNF80 auf die Suppressivität der Treg	90
5	Zusammenfassung.....	93
6	Anhang	95
6.1	Abkürzungsverzeichnis	95
6.2	Abbildungsverzeichnis	98
7	Literaturverzeichnis.....	101
8	Danksagung	109

1 Einführung

1.1 Die Immunabwehr

Das Immunsystem bezeichnet die Vielzahl humoraler und zellulärer Komponenten, deren Aufgabe es ist, Fremdkörper, unerwünschte Mikroorganismen oder fehlerhafte körpereigene Zellen zu zerstören. Man unterscheidet eine schnelle angeborene von einer langsameren adaptiven Immunantwort [1].

1.1.1 Das angeborene (unspezifische) Immunsystem

Die angeborene Immunantwort ist antigenunspezifisch. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Krankheitserreger zu erkennen und eine schnelle Abwehrreaktion am Ort der Infektion einzuleiten [2]. Das angeborene Immunsystem umfasst grundsätzlich vier Bereiche: Physikalische und chemische Barrieren (Haut, Schleimhäute), lösliche Faktoren (Defensine, Lysozym, Interferone, Akute-Phase-Proteine), das Komplementsystem und Abwehrzellen (Dendritische Zellen, Mastzellen, Eosinophile, Basophile, Natürliche Killerzellen und Phagozyten wie Monozyten, Makrophagen und Neutrophile [3]) [4]. Dendritische Zellen und Makrophagen stellen als antigenpräsentierende Zellen (APCs) ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar. Sie erkennen pathogentypische Strukturen, nehmen das Pathogen auf, wandern in periphere lymphatische Gewebe und präsentieren an ihrer Oberfläche Antigenfragmente. Zusätzlich werden Oberflächenproteine produziert, die als kostimulierende Moleküle bezeichnet werden und T-Zellen dazu anregen, sich zu vermehren und zu differenzieren. Makrophagen beseitigen auch Zellen, die von der adaptiven Immunantwort angegriffen werden. Außerdem sezernieren sie Zytokine und Chemokine, die zur Entstehung von Entzündungen beitragen [3]. Zellen des angeborenen Immunsystems tragen eine Vielzahl an Rezeptoren, die pathogentypische Strukturen erkennen. Diese Rezeptoren werden als Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) bezeichnet. Eine besonders wichtige Gruppe der PRRs umfasst die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Es sind mehr als zehn verschiedene TLR bekannt, die jeweils unterschiedliche Strukturen, darunter Lipopolysaccharid (LPS), unmethylierte CpG DNA oder ssRNA erkennen, die in Mikroben, nicht jedoch im gesunden Gewebe von Säugern, vorkommen [3].

1.1.2 Das adaptive (spezifische) Immunsystem

Die adaptive Immunantwort ist antigenspezifisch. Sie wird ausgelöst, wenn die angeborene Immunantwort eine Infektion oder fehlerhafte Zellen nicht beseitigen kann [3, 4]. Lymphozyten

bilden die zelluläre Komponente des adaptiven Immunsystems. Man unterscheidet B-Lymphozyten, die nach Aktivierung zu Plasmazellen differenzieren, und T-Lymphozyten. Beide Zelltypen wandern nach ihrer Reifung in die Peripherie und zirkulieren im Blut, in der Lymphflüssigkeit und in den peripheren lymphatischen Organen. Antikörper bilden die lösliche Komponente des adaptiven Immunsystems [3].

T-Zellen entstammen dem Knochenmark, verlassen dieses jedoch bald, um im Thymus auszureifen. An ihrem T-Zell-Rezeptor kann die T-Zelle Antigene binden. Zur Aktivierung bedarf es jedoch zusätzlich der Stimulierung durch eine antigenpräsentierende Zelle. Man unterscheidet zwei große Unterpopulationen, die CD8⁺ T-Killerzellen und die CD4⁺ T-Effektorzellen. Zu den CD4⁺ Zellen zählen die T-Helferzellen (T_H1-Zellen, T_H2-Zellen, T_H17-Zellen) und die regulatorischen T-Zellen (Treg) [3]. Aktivierte T-Killerzellen töten infizierte oder anderweitig dysfunktionale Zellen durch zytotoxische Substanzen wie Perforin und Granulysin. T-Helferzellen beeinflussen nach Aktivierung die Funktion anderer Immunzellen wie T-Killerzellen, B-Zellen, Makrophagen oder NK-Zellen [2, 3].

B-Lymphozyten stammen ebenfalls aus dem Knochenmark und differenzieren dort zu reifen Zellen. Sie sind an der humoralen Immunantwort beteiligt. Erkennt eine B-Zelle ein Pathogen, so wird es intrazellulär prozessiert und an ihrer Oberfläche präsentiert. Nun kann eine T-Zelle die B-Zelle aktivieren, die sich daraufhin teilt und antigenspezifische Antikörper sezerniert. Diese Antikörper zirkulieren im Körper und binden Pathogene, die das Antigen exprimieren. Markiertes Antigen kann direkt durch den Antikörper neutralisiert, durch das Komplementsystem zerstört oder von Phagozyten aufgenommen werden [1–3].

1.2 Regulatorische T Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind eine Unterpopulation der CD4⁺ T-Helferzellen, die suppressive Eigenschaften besitzen [5]. Die Expression des *forkhead box protein P3* (FoxP3) stellt den Marker mit der größten Spezifität für Treg dar [5, 6]. FoxP3 ist ein Hauptregulator der Entwicklung und Funktion der Treg [5, 7]. Mutationen im FoxP3-Gen führen beim Menschen zum IPEX-Syndrom, einer letalen Autoimmunerkrankung [7, 8]. Eine Aktivierung des TNFR2 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2) stabilisiert die anhaltende Expression von FoxP3 [9] und kennzeichnet die Treg-Population, die maximal suppressiv wirken kann [7, 9, 10]. Marker für humane regulatorische T-Zellen sind die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) und das *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) [5]. Aktuell werden Treg in der Regel als CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen beschrieben [5, 10–12]. Ursprünglich wurden natürliche

Treg (nTreg) und adaptive bzw. induzierbare Treg (iTreg) unterschieden [11, 12]. Eine neuere Unterteilung berücksichtigt den Ursprung der Zellen und differenziert zwischen Treg aus dem Thymus (tTreg, entsprechen den nTreg) bzw. aus der Peripherie (pTreg, entsprechen den iTreg) [5, 13].

1.2.1.1 tTreg

tTreg stellen in etwa 5-10 % der CD4⁺ Zellen im peripheren Blut und in sekundären lymphatischen Organen. In anderem Gewebe oder im Knochenmark kommen sie kaum vor [11]. Die Entwicklung von Treg im Thymus ist abhängig von Signalen des T-Zell-Rezeptors (TCR) und diverser Zytokine [5, 11]. IL-2 scheint ein entscheidender Vermittler in der Entwicklung von FoxP3-positiven Zellen aus CD25⁺FoxP3⁻ Zellen zu sein. Auch TGF- β spielt eine wichtige Rolle in der Induktion der Expression von FoxP3 und somit in der Entwicklung und dem Überleben der tTreg [5].

1.2.1.2 pTreg

Die Zahl an pTreg ist abhängig von ihrer inflammatorischen Umgebung und dem passenden Zytokinmilieu [5, 12]. Grundsätzlich sind auch hier TGF- β und IL-2 notwendig, um CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ naive T-Zellen zu pTreg umzuwandeln. Allerdings haben auch andere Zytokine Einfluss auf die Differenzierung naiver T-Zellen. Während antiinflammatorische Zytokine die Entwicklung der pTreg unterstützen [5], hemmt die Gegenwart proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-6 [5, 9] die Ausbildung von pTreg und fördert die Entwicklung von Th17-Zellen [5, 6, 8, 9]. Andererseits ist die Zahl suppressiver FoxP3-positiver Zellen in einigen Entzündungsherden erhöht. Eine entzündliche Umgebung scheint also auch in der Lage zu sein, die phänotypische und funktionale Stabilität der Treg zu fördern [9].

1.2.1.3 Funktion

Treg sind von großer Bedeutung für die Immuntoleranz [8]. Aktivierte Treg supprimieren proinflammatorische Zellen [5, 11]. Sie hemmen die Aktivierung und Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sowie Neutrophile, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen [11] und NK-Zellen [7]. Die Suppressionsmechanismen können in 4 Gruppen eingeteilt werden: Die Produktion inhibitorischer Zytokine (IL-10, TGF β [8]), Suppression durch Zytolyse, Suppression durch Störung des Zellstoffwechsels und die Modulation von Reifung und Funktion Dendritischer Zellen [11, 13]. Die Expression gewisser Membranmoleküle auf Treg kann ebenfalls zu Suppression führen. CTLA-4 beispielsweise wirkt über seine Liganden

CD80 und CD86 hemmend auf APCs. Das Ekto-Enzym CD39 (E-NTPDase1) wirkt durch den Abbau von ATP suppressiv [13].

Bei Zuständen chronischer Entzündung wie Autoimmunerkrankungen, Infektionen, Sepsis und Tumorerkrankungen akkumulieren Treg. Diese Akkumulation könnte unter anderem TNFR2-vermittelt sein und einen negativen Feedbackmechanismus zur Abschwächung einer protrahierten Immunantwort darstellen [7].

1.3 Myeloide Suppressorzellen

Der Begriff Myeloide Suppressorzellen (*myeloid derived suppressor cells*; MDSC) beschreibt eine heterogene Gruppe unreifer myeloider Zellen [14–16], die sich zu dendritischen Zellen, Makrophagen oder Granulozyten ausdifferenzieren können [14, 16]. MDSC machen etwa 20–30% der Zellen im Knochenmark und 2–4% der Milzzellen aus. Phänotypisch sind MDSC in Mäusen als CD11b⁺Gr1⁺ Zellen definiert [15, 16], wobei zwei funktionell verschiedene Subpopulationen unterschieden werden. Granulozytäre MDSC (G-MDSC) werden als CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low/mid} beschrieben [17, 18]. Sie stellen den Großteil der zirkulierenden MDSC dar [18]. MDSC, die zur monozytären Zelllinie gehören (M-MDSC), sind als CD11b⁺Ly6G[−]Ly6C^{high} charakterisiert [16–18]. Beim Menschen sind MDSC schlechter charakterisiert, da keine einheitlichen phänotypischen Marker zur Verfügung stehen [19]. In der Regel sind sie hier als CD33⁺CD11b⁺HLA-DR^{low/−} definiert. Anhand der Expression von CD14 werden G-MDSC (CD14[−]) und M-MDSC (CD14⁺) unterschieden [19, 20].

Die Akkumulation und suppressive Funktion der MDSC wird durch verschiedene proinflammatorische Moleküle wie IL-1 β , IL-6, PGE₂, den Komplementfaktor C5a [16], die Proteine S100A8 und S100A9 [14, 16] sowie TNF gefördert [14].

Gemeinsam ist beiden Zelllinien die Fähigkeit, sowohl angeborene als auch erworbene Immunantworten zu supprimieren [17]. G-MDSC wirken vor allem durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) [16, 18, 21]. Sie sind allerdings weniger suppressiv für T-Zellen als M-MDSC, die hauptsächlich über die Expression der Enzyme iNOS (*inducible NO Synthase* [19]) und ARG1 (Arginase 1 [19]) sowie durch die Produktion reaktiver Nitrogenspezies wirken [18, 21].

Auch über TGF- β und die Herabregulation der TCR-assoziierten ζ -Kette können MDSC suppressiv wirken [16].

In gesunden Individuen finden sich MDSC vor allem im Knochenmark, aber kaum in sekundären lymphatischen Organen. In vielen Pathologien, die durch chronische Entzündung gekennzeichnet sind, wie Malignome, Infektion, Sepsis oder Trauma, kommt es zur Akkumulation von MDSC in lymphatischen Organen [15, 22]. Die Expansion der MDSC ist mit einer Reduktion reifer myeloider Zellen wie DC und Makrophagen assoziiert und stört die normale Homöostase [17].

1.4 Gegenseitige Beeinflussung von MDSC und Treg

Es fällt auf, dass sowohl MDSC als auch Treg in Zuständen chronischer Entzündung akkumulieren. MDSC fördern über diverse Signalwege die Expansion von Treg [19, 21, 23, 24] sowie die Konversion naiver $CD4^+$ T-Zellen zu pTreg [21]. Neben der Produktion löslicher Faktoren wie TGF- β [20, 21, 23] und IL-10 [20, 21] scheint die Interaktion von CD40/CD40L eine Rolle zu spielen [21, 23]. Die zuvor genannte Suppression von T-Zellen durch reaktive Nitrogenspezies hat keinen Einfluss auf die Induktion von Treg [23].

Treg beeinflussen wiederum die Anzahl und Funktion der MDSC. *Holmgaard et al.* zeigten in einem Tumormodell, dass die Depletion von Treg die Zahl an tumorinfiltrierenden MDSC reduzierte. Dieser Effekt konnte durch die Gabe von Treg umgekehrt werden. Zudem waren MDSC aus Treg-depletierten Mäusen weniger suppressiv auf T-Zellen [25].

1.5 Tumornekrosefaktor (TNF) und seine Rezeptoren

1.5.1 Struktur des TNF

Tumornekrosefaktor (TNF, ehemals TNF- α) ist namensgebendes Mitglied der größten bekannten Zytokinfamilie, der TNF Superfamilie (TNFSF) [26–28]. TNF wird überwiegend von aktivierten Makrophagen und Monozyten [28–31], aber auch von anderen Zelltypen wie glatten Muskelzellen, Adipozyten [32], lymphatischen Zellen, Endothelzellen oder Fibroblasten produziert [33].

TNF wird zunächst als 26 kDa großes Typ II Transmembranprotein (tmTNF) synthetisiert. Durch die Metalloproteinase *TNF- α -converting enzyme* (TACE) kann die Ektodomäne des tmTNF als lösliches TNF (*soluble TNF*, sTNF) mit einer Größe von 17 kDa abgespalten werden [26, 28–35]. Beide Formen liegen als Mono-, Di- und Trimere vor, sind aber nur als Homotrimere biologisch aktiv [26].

1.5.2 Rezeptoren des TNF

Die vielfältigen Effekte von TNF werden über zwei Rezeptoren, TNF Rezeptor 1 (TNFR1, CD120a, p55/60, Tnfrsf1a) und TNF Rezeptor 2 (TNFR2, CD120b, p75/80, Tnfrsf1b) vermittelt [26, 29–31, 33–36]. Während TNFR1 sowohl durch tmTNF als auch durch sTNF aktiviert wird, führt bei TNFR2 nur tmTNF zu einer suffizienten Aktivierung [26, 28–31, 33, 37, 38]. TNFR1 zeigt eine konstitutive Expression auf nahezu allen kernhaltigen Zellen [26, 28, 30, 33, 35]. Im Gegensatz dazu ist die Expression von TNFR2 induzierbar [28, 33] und auf Immunzellen, Endothelzellen und einige Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) begrenzt [30]. Wie auch bei TNF können bei TNFR1 und TNFR2 TNFR-Ektodomänen abgeschieden werden, wodurch lösliche Rezeptorformen entstehen [31, 39], die TNF binden und so als TNF-Antagonisten wirken [31, 33].

1.5.3 Intrazelluläre Signaltransduktion

TNF Rezeptoren wirken über eine Gruppe von Adapterproteinen, die verschiedene Signalwege einleiten und so das Überleben einer Zelle fördern oder den Zelltod einleiten können [26].

1.5.3.1 TNFR1

TNFR1 besitzt eine intrazelluläre Todesdomäne [26, 28, 30, 31, 33, 40]. Bindet TNF an den Rezeptor, so kommt es zur Bildung zweier zeitlich und räumlich getrennter Signalkomplexe. Zunächst entsteht der membrangebundene Komplex I [26, 27], der über TRADD, TRAF2, RIP1 und cIAP Proteine [38] unter anderem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt [26, 27, 29–31]. NF- κ B kann die Transkription antiapoptotischer Gene wie cIAP-1, cIAP-2, cFLIP, TRAF1 und TRAF2 induzieren [26]. Komplex II hingegen formiert sich, nachdem TNFR1 per Endozytose in die Zelle aufgenommen wurde [26, 27]. Es kommt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, so dass nun andere Adapterproteine interagieren können [26]. Komplex II, der auch als DISC (*death-inducing signaling complex*) bezeichnet wird, enthält ebenfalls TRADD und RIP1, aber auch FADD und Procaspase-8 [26, 31]. Über die Aktivierung der Caspase-8 kann er Apoptose induzieren. Ist NF- κ B aktiviert, so kommt es zur Expression von cFLIP, das an Komplex II binden und die Aktivierung der Caspase-8 verhindern kann [26].

1.5.3.2 TNFR2

Die Hauptaufgabe des TNFR2 ist es, das Überleben und die Proliferation von Lymphozyten zu fördern [7]. TNFR2 besitzt keine Todesdomäne, enthält aber TIMs (*TRAF-interacting motifs*), über die der Rezeptor direkt mit TRAF-Proteinen interagieren kann [28, 31]. Über diese

Adaptermoleküle werden vielfältige Signalwege eingeleitet, die zur Aktivierung von NF- κ B [26, 29, 35], AP-1 [35, 35], JNK [26] und PI (Phosphatidyl Inositol) 3-Kinase führen und Zellüberleben, Proliferation und Zytokinproduktion fördern [31]. Die Stimulierung des TNFR2 kann aber auch zum Abbau von TRAF2 führen. TRAF2 verhindert die TNFR1-induzierte Apoptose über zwei Wege. Zum einen spielt es eine Rolle bei der Aktivierung von NF- κ B durch Komplex I [38, 41], zum anderen verhindert es durch die Ubiquitinylierung von RIP1 die Aktivierung der Caspase-8 [41]. TRAF2-Depletion fördert also die zytotoxischen Effekte des TNFR1. Außerdem kann TNFR2 unabhängig von TNFR1 den Zelltod auslösen [26].

1.5.4 TNF als therapeutisches Ziel

TNF ist ein pleiotropes Zytokin, das eine Schlüsselrolle in der Einleitung und Konzertierung von Entzündung und Immunabwehr einnimmt [7, 31, 42]. Neben der wohlbekannten proinflammatorischen Wirkung zeigt TNF aber auch antiinflammatorische und immunsuppressive Effekte [7].

1.5.4.1 Anti-TNF Therapie

Seit den späten 1990er Jahren werden TNF Inhibitoren klinisch eingesetzt [43, 44]. Aktuell sind fünf Medikamente (Infliximab, Adalimumab, Golimumab, Certolizumab, Etanercept) auf dem Markt, die TNF neutralisieren [8, 28, 43, 45, 46, 46, 47]. Infliximab, Adalimumab und Golimumab sind monoklonale TNF-Antikörper, Etanercept ein löslicher TNF-Rezeptor. Certolizumab ist ein Fab Fragment eines humanisierten monoklonalen TNF-Antikörpers [8]. Sie sind für die Therapie vieler Autoimmunerkrankungen zugelassen, darunter rheumatoide Arthritis, Psoriasis-Arthritis, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, und ankylosierende Spondylitis. Neben den erwünschten Effekten der Anti-TNF-Therapie kommt es auch zu ernststen Nebenwirkungen. So steigt das Risiko für bakterielle Infektionen, Pilzkrankungen, demyelinisierende Erkrankungen und Neuropathien. Ob das Risiko für Neoplasien durch die Therapie ebenfalls erhöht ist, ist unklar [43, 48]. Zwar ist besonders die Anzahl an Lymphomen und Nicht-Melanom Hautkrebs bei Patienten, die mit TNF-Inhibitoren behandelt werden, im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht [49–51], doch zeigt sich keine vermehrte Inzidenz an Malignomen im Vergleich zu nicht mit TNF-Inhibitoren therapierten Arthritis-Patienten [48]. Es wird vermutet, dass die Therapie zu schnellerem Wachstum präexistenter Tumoren führt, aber keine neuen Malignome induziert [52].

In entzündlichen Umgebungen tragen Treg entscheidend zur Immunregulation bei. TNFR2-abhängige Signalwege sind für die Funktion dieser Zellen von großer Bedeutung, was erklären

könnte, weshalb eine Anti-TNF-Therapie bei manchen Autoimmunerkrankungen nicht wirkt oder die Krankheit sogar verschlimmert [9]. Die gezielte Aktivierung des TNFR2 stellt einen interessanten neuen Therapieansatz zur Behandlung ausgewählter Autoimmunerkrankungen dar. TNFR2-Aktivierung kann zur Eliminierung autoreaktiver T-Zellen und zur Induktion von Treg führen [53].

1.6 TNCscTNF80-Protein

Das *single chain* (sc) TNF80-Protein wird durch drei monomere Maus-spezifische TNF-Muteine gebildet, die durch Linker-Moleküle verbunden sind. Durch die Bindung an die Trimerisierungsdomäne des Glykoproteins Tenascin C (TNC) kommt es zur Bildung eines funktionellen TNC-scTNF80-Nonamers [54]. Durch die Oligomerisierung kann das Protein tmTNF imitieren [37] und an Maus-TNFR2 binden. Die Mutation zweier Aminosäuren (D143N/A145R) gewährleistet die selektive Bindung an Maus TNFR2 und führt zum Affinitätsverlust für TNFR1. Jedes Trimer ist an das FLAG-Peptid, ein Oktapeptid mit der Sequenz N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C gekoppelt. So kann das Protein durch einen FLAG-Antikörper mittels Immunaffinitätschromatographie isoliert werden [54]. TNCscTNF80 wird in der weiteren Arbeit kurz als TNF80 bezeichnet.

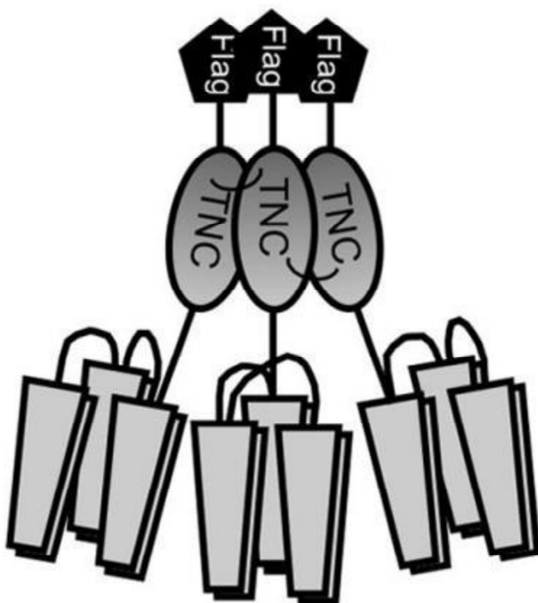


Abbildung 1 | Schematische Darstellung des Aufbaus des TNCscTNF80 [55].

1.7 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten die Effekte des TNFR2-spezifischen Agonisten TNF80 auf chronische Entzündung im Mausmodell untersucht werden. Eine chronische Entzündung kann entweder aus einer persistierenden akuten Entzündung oder durch mehrmalige akute Entzündungsepisoden entstehen. *Mycobacterium tuberculosis* persistiert im Gewebe innerhalb phagozytischer Zellen und kann so zu einer chronischen Entzündung führen [56]. Zur Induktion einer chronischen Entzündung erhielten die Mäuse daher in Intervallen von einer Woche drei subkutane Injektionen mit jeweils 50 µg hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis*-BCG (*Bacille Calmette-Guérin*). Die ersten beiden Injektionen wurden als 1:1 Mischung von BCG und IFA (Inkomplettes Freund-Adjuvans) verabreicht. Die dritte BCG-Injektion erfolgte mit in PBS gelöstem BCG und diente als *Challenge* dazu, eine messbare Reaktion hervorzurufen. Teilweise induzierten wir durch alleinige *Challenges* eine akute Entzündung. Wir untersuchten die Wirkung einer ein- oder zweimaligen Behandlung mit TNF80 zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Als Messgrößen der durch TNF80 bedingten Effekte dienten die Zellverteilung in Milz und Knochenmark, die Konzentration von TNF und weiterer Zytokine im Serum sowie die *in vitro* untersuchte Suppressivität isolierter Treg.

Insgesamt sollte so ein Eindruck der Wirkung von TNF80 im Entzündungskontext geschaffen werden, der hilft, einen möglichen Einsatz zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu prüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die durchflusszytometrische Analyse und die Suppressionsassays verwendet:

Antigen	Konjugat	Verdünnung	Klon	Hersteller	Konzentration
B220	Biotin	1:1000	RA36B2	eBioscience	0,5 mg/ml
CD3	-	1:1000	145-2c11	BD Pharmingen	0,5 mg/ml
CD4	APC	1:1000	RM4-5	BD Biosciences	0,2 mg/ml
CD4	FITC	1:1600	RM4-5	BD Biosciences	0,5 mg/ml
CD4	PE	1:1500	RM4-5	eBioscience	0,2 mg/ml
CD4	PB	1:1600	RM4-5	BD Biosciences	0,2 mg/ml
CD8a	PerCP	1:2000	53-6.7	BD Biosciences	0,2 mg/ml
CD11b	APC	1:2000	M1/70	eBioscience	0,2 mg/ml
CD11c	AF-700	1:100	HL3	BD Biosciences	0,2 mg/ml
CD16/CD32 Fc-Block	-	1:40	2.4G2		1,8µg/ml
CD25	APC	1:400	PC61.5	eBioscience	0,2 mg/ml
CD25	PE	1:200	PC61	BD Pharmingen	0,2 mg/ml
CD28	-	1:4000	37.51	eBioscience	1 mg/ml
CD45.1	PE	1:200	A20	BD Pharmingen	0,2 mg/ml
FoxP3	FITC	1:100	FJK-16s	eBioscience	0,5 mg/ml
Ly6C	FITC	1:400	AL-21	BD Biosciences	0,5 mg/ml
Ly6G	PB/V450	1:400	1A8	BD Biosciences	0,2 mg/ml
Ly6G	PE	1:800		BD Pharmingen	0,2 mg/ml
TNFR2	PE	1:50	TR-75/79	BD Biosciences	0,2 mg/ml

Rat IgG _{2A}	FITC	1:100		BD Pharmingen	
Streptavidin	BV 510	1:80		BioLegend	0,1 mg/ml

2.1.2 Kits

Verwendung und Bezeichnung	Hersteller
ELISA (R&D Duo Set ELISATNF, IL-6, IL-10, IFN- γ)	R&D Systems, Minnesota
MACS (CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
DNA-Isolierung (Qiagen Purgene Centra DNA Purification Kit)	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

2.1.3 Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung bzw. Hersteller
ACK-Puffer	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
DPBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
ELISA Abstopplösung	2N H ₂ SO ₄
ELISA -Waschpuffer	DPBS 0,05% Tween20
ELISA-Blockierpuffer	DPBS 1% BSA
FACS-Puffer	DPBS 1% FKS
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
Loading Dye Solution (6x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % Glycerol in H ₂ O
MACS-Puffer	DPBS 0,5% BSA, 2 mM Na ₂ EDTA
PBS/T	DPBS 0,05% Tween 20
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA
TBS Puffer (1x), pH 7,4	25 mM Tris Base 2,7 mM KCl

	150 mM NaCl
TBS/T	TBS 0,05% Tween 20
Zellkulturmedium	RPMI 1640 10% FCS 50µM β-Mercaptoethanol 100U/mL Penicillin 100 U/mL Streptomycin

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde zweifach entsalztes Wasser aus der Millipore-Anlage MilliQ (Millipore, Schwalbach) verwendet.

2.1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	PAN Biotech, Aidenbach
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung	Roth, Karlsruhe
Agarose, electrophoresis grade	Bio&Sell, Nürnberg
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNA Standard (100 bp ladder)	New England Biolabs, Frankfurt a. Main
Diethylether	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat	Promega GmbH, Mannheim
Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Foxp3-Staining Fix/Perm Buffer Set (Fixation/Permeabilization working solution, Permeabilization Buffer)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg

Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Immersionsöl Immersol 518	Zeiss, Oberkochen
Inkomplettes Freund-Adjuvans	DIFCO Laboratories (FisherScientific, Schwerte)
Isopropanol	Merck, Darmstadt
LPS E. coli O127:B8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Muriner TNF-Standard	Peptotech Germany, Hamburg
<i>Mycobacterium Tuberculosis</i> -BCG	DIFCO Laboratories pw(FisherScientific, Schwerte)
NaCl	Merck, Darmstadt
Nucleasefreies Wasser	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Warrington , USA
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinmarker VI	Applichem, Darmstadt
ReadyMix™Taq PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640 Fertigmedium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Schwefelsäure 95-98%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin-HRP (Meerrettich-Peroxidase)	R+D Systems, Wiesbaden
Tris base	Applichem, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA Lösung	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Viability Dye eFluor 780	eBioscience, Frankfurt

2.1.5 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage CP 224S	Sartorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubatoren	Integra Biosciences
Durchflusszytometer LSRII	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Elektrophoresesystem Mini PROTEAN	Biorad, Göttingen
Geldokumentation	GeneGenius Syngene, Cambridge, UK
Gelelektrophorese-Apparaturen	Biorad, München
ImageQuant LAS4000 mini	GE Healthcare, Solingen
Laser Scanner Typhoon 9200	GE Healthcare, Solingen
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnetrührer MR2002	Heidolph GmbH, Schwabach
Mikroskop Olympus CK2	Olympus GmbH, Hamburg
Mikroskop Zeiss Axiostar plus	Zeiss GmbH, Jena
Mithras, Multicolor Plate Reader LB940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
NanoPhotometer	Implen, München
Netzgerät PowerPac 300	Biorad, München
Netzgerät PowerPack P25 T	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim
PCR-Gerät MyCycler	Biorad, München
pH-Meter Inolab	WTW GmbH, Weilheim
Pipettierhilfe accujet pro	Brand GmbH, Wertheim
Sterilbank HERAsafe KS	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn

Thermoblock Bio TDB-100	Biometra, Göttingen
Vortex MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Waage PJ400	Mettler-Toledo, Gießen
Wasserbad TW20	Julabo GmbH, Seelbach
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5418R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC 6	ThermoScientific, Karlsruhe

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Eppendorf-Cups (1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Röhrchen	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Kanülen (20 G, 22G, 27G, 29G)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
MACS Cell Separation Columns 25 LS/MS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatten Microtest 96	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten Nunc MaxiSorp flat-bottom 96 well plate	eBioscience, Frankfurt
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Pasteurpipetten, 150 mm	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
PCR Disposable Column 1018598	Qiagen, Hilden
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen Biosphere filter tips	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (steril) (1ml, 5ml, 10ml)	BD Biosciences, Heidelberg

Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellsieb Cell strainer 40 µm	BD Biosciences GmbH, Heidelberg

2.1.7 Software

Programm	Anwendung
Citavi 5	Verwaltung der Literaturverweise
FACS Diva (Version 5.03)	Auswertung der FACS-Daten
Graph Pad Prism (Version 6.01; 5.04)	statistische Berechnungen, graphische Darstellungen
MicroWin 2000	Auswertung Plattenreader
Microsoft Office 365 ProPlus (Version 15.0.4805.1003)	Schriftliche Dokumentation, Erstellung von Tabellen, Sortierung der Daten, Verfassen der Promotionsarbeit

2.1.8 Zellen

Zelltyp	Bezogen von
L929 (ATCC, CCL-1)	ATCC, Manassas, Virginia

2.1.9 Versuchstiere

C57BL/6 Mäuse wurden bei Janvier (LeGenest, Frankreich), erworben. TNFR2 defiziente Mäuse (C57BL/6-Tnfrsf1b^{tm1Mwm}) wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME, USA) erworben. C57BL/6N Ly5.1 (CD45.1) Mäuse wurden durch Petra Hoffmann, Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt. Mäuse, die das konditionale TNFR2^{fl^{ox}/fl^{ox}} Allel (TNFR2^{fl/fl}) tragen, wurden durch Kreuzung von Tnfrsf1b^{tm1a}(EUCOMM)Wtsi Mäusen mit FLPe delete Mäusen erzeugt. Die zellspezifische Ablation des TNFR2 auf T-Zellen (CD4cre/TNFR2^{fl/fl}) wurde durch die Kreuzung TNFR2^{fl/fl} Mäuse mit CD4-Cre Mäusen erreicht. CD4cre/TNFR2^{fl/fl} Mäuse exprimieren kein TNFR2 auf T-Zellen, während die Expression auf myeloiden Zellen unverändert ist. Durch Kreuzung TNFR2^{fl/fl} Mäuse mit LysM-Cre Mäusen wurden Mäuse erzeugt, deren Makrophagen und Neutrophile Granulozyten TNFR2-defizient sind (LysMcre/TNFR2^{fl/fl}). Hier exprimieren weniger myeloide Zellen TNFR2 und die Expression wird besonders bei unreifen myeloiden Zellen der MO-MDSC-Subpopulation beobachtet [57].

Das Cre/loxP-System bietet die Möglichkeit, gezielt DNA-Abschnitte zu entfernen. Vor und hinter die jeweilige DNA-Sequenz wird eine loxP-Stelle gesetzt. Die Sequenz wird nun als floxed (*flanked by loxP*) bezeichnet. Das Cre (*causes recombination*)-Enzym erkennt die loxP-Stellen, schneidet den dazwischenliegenden DNA-Abschnitt heraus, wenn beide loxP-Sequenzen in gleicher Richtung orientiert sind, und fügt die verbleibenden Enden zusammen [58]. Ist kein Cre-Enzym vorhanden, so entspricht der Phänotyp dem Wildtyp. Die Mäuse mit dem Genotyp TNFR2^{fl/fl} fungierten daher als „Pseudo-Wildtyp“.

Die Mäuse wurden im Tierstall der Universität Regensburg gemäß den institutionellen Richtlinien gezüchtet und untergebracht. [57, 57]

2.2 Methoden

2.2.1 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism (Version 6.01; 5.04). Dargestellte Fehlerbalken zeigen stets die jeweilige Standardabweichung. Zur statistischen Analyse der Daten wurde der *Welch*-Test oder der *Two-Way-ANOVA*-Test durchgeführt.

2.2.2 Genotypisierung

Von den Mäusen, die im Versuch waren, wurden Schwanzbiopsien zur Genotypisierung mittels PCR entnommen. TNFR2^{-/-} Mäuse wurden anhand der fehlenden Ausscheidung von TNFR2 im Urin charakterisiert. Die Menge an TNFR2 im Urin wurde mittels ELISA festgestellt.

2.2.2.1 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte gemäß dem Protokoll des Qiagen Purgene Centra DNA Purification Kits. Die DNA-Konzentration wurde am NanoPhotometer bestimmt und die Proben mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 50 ng/μl eingestellt.

2.2.2.2 DNA-Amplifikation

Die Amplifikation der DNA erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Mithilfe der PCR lässt sich ein definierter DNA-Abschnitt selektiv vervielfältigen. Grundlage sind zyklische Temperaturänderungen, die optimale Bedingungen für verschiedene Reaktionen (Auftrennung der DNA-Stränge, Hybridisierung der Primer, Amplifizierung, erneute Auftrennung) schaffen [59].

Die untenstehenden Tabellen geben die Sequenzen der verwendeten Primer, den Reaktions-Mastermix und das PCR-Programm wieder.

	<i>Primersequenz</i>	<i>Eingesetztes Volumen</i>
TNFR2 ^{fl/fl} fw	5'- TGT GAG TGC AAG GAC ACA CGG TGC -3'	0,1 µl unverdünnt
TNFR2 ^{fl/fl} rv	5'- GGC CAG GAA GTG GGT TACT TTA GG GC -3'	0,1 µl unverdünnt
CD4-cre fw	5'- CCC AAC CAA CAA GAG CTC -3'	5 µl; 1:20
CD4-cre rv	5'- CCC AGA AAT GCC AGA TTA GG -3'	5 µl; 1:20
LysM-cre fw	5'- CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG -3'	5 µl; 1:20
LysM-cre rv	5'- CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC -3'	5 µl; 1:20
WT fw	5'- CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC -3'	5 µl; 1:20
WT rv	5'- TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC -3'	5 µl; 1:20

Mastermix TNFR2^{fl/fl}

<i>Reagens</i>	<i>Eingesetztes Volumen</i>
ReadyMix TM Taq PCR Reaction Mix	12,5 µl
Primer fw (10µM)	0,1 µl
Primer rv (10µM)	0,1 µl
Nucleasefreies Wasser	9,8 µl
DNA Template (50 ng/µl)	2,5 µl

Mastermix CD4-cre TNFR2^{fl/fl}

<i>Reagens</i>	<i>Eingesetztes Volumen</i>
ReadyMix TM Taq PCR Reaction Mix	12,5 µl
Primer fw (10µM)	2,5 µl
Primer rv (10µM)	2,5 µl
Nucleasefreies Wasser	5,5 µl
DNA Template (50 ng/µl)	2 µl

Mastermix LysM-cre TNFR2^{fl/fl}

<i>Reagens</i>	<i>Eingesetztes Volumen</i>
10x Puffer	5 µl
Primer fw (10µM)	5µl
Primer rv (10µM)	5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Taq homemade	1 µl
Nucleasefreies Wasser	29 µl
DNA Template (50 ng/µl)	4 µl

Mastermix WT

<i>Reagens</i>	<i>Eingesetztes Volumen</i>
10x Puffer	5 µl
Primer fw (10µM)	5µl
Primer rv (10µM)	5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Taq DNA Polymerase (homemade)	1 µl
Nucleasefreies Wasser	29 µl
DNA Template (50 ng/µl)	4 µl

PCR-Programm

Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 4 – 5 min bei 94 - 95°C wurden im Normalfall 35 Zyklen des folgenden Reaktionsschemas durchlaufen:

- DNA-Denaturierung 94 - 95°C, 30 s -1 min
- Primerannealing Temperatur je nach Primer, 30 s - 1 min
- Elongation 72°C, 45 s bis 1min45s

Als Abschluss der PCR-Reaktion erfolgte ein Elongationsschritt für 5 - 7 min bei 72°C.

TNFR2 ^{fl/fl}	95°C 4 min 94°C 30 s 62°C 30 s 72°C 1 min 72°C 7 min	
CD4-cre TNFR2 ^{fl/fl}	95°C 3 min 95°C 45 s 56,7°C 30 s 72°C 45 s 72°C 5 min	35x
LysM-cre TNFR2 ^{fl/fl}	94°C 5 min 94°C 30 s 58°C 1 min 72°C 1 min 45 s 72°C 5 min	35x

Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte mittels Gel-Elektrophorese. Die Proben wurden zusammen mit einem 100 bp-Standard auf 1,5-prozentiges Agarose-Gel (100ml 5x TAE-Puffer, 1,5 g Agarose) mit 0,1 % Ethidiumbromid aufgetragen und bei 140V je nach Größe des Gels für zwanzig bis vierzig Minuten aufgetrennt. Die Proben wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und anschließend mit dem Dokumentationssystem GeneGenius (Syngene) fotografiert (Abbildungen 2-5).

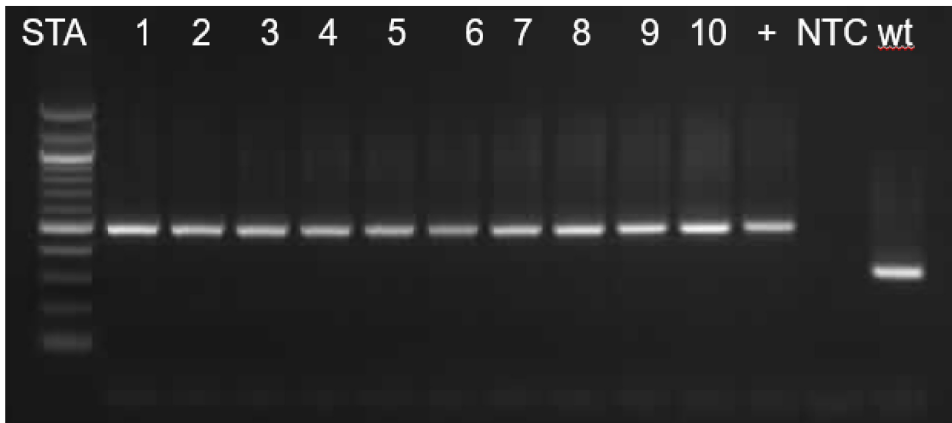


Abbildung 2 | Agarosegel einer exemplarischen Genotypisierung $TNFR2^{fl/fl}$ -Mäuse. Lane STA: DNA-Standard (100 bp ladder); Lane 1-10: Proben der Versuchstiere; Lane 11: Positivkontrolle; Lane 12: NTC; Lane 13: wt.

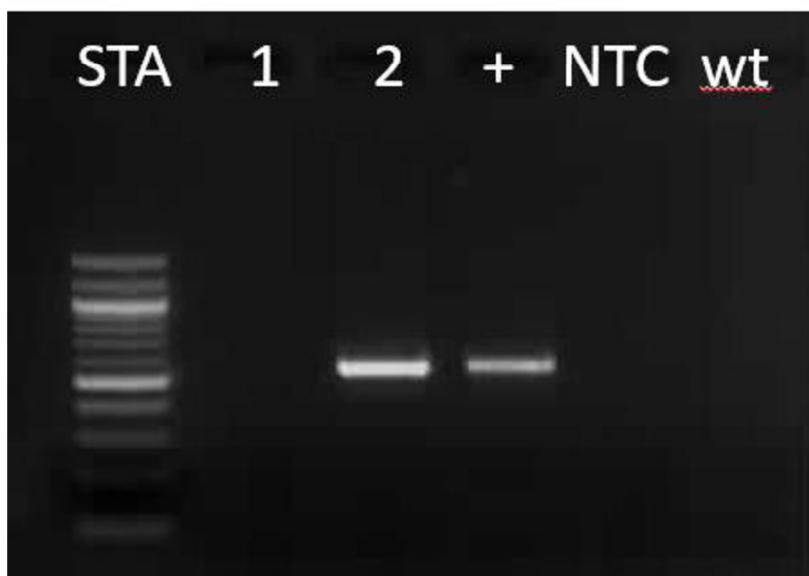


Abbildung 3 | Agarosegel einer exemplarischen Genotypisierung $CD4^{cre}TNFR2^{fl/fl}$ -Mäuse bezüglich der Expression von $CD4^{cre}$. Lane STA: DNA-Standard (100 bp ladder); Lane 1-2: Proben der Versuchstiere; Lane 3: Positivkontrolle; Lane 4: NTC; Lane 5: wt.

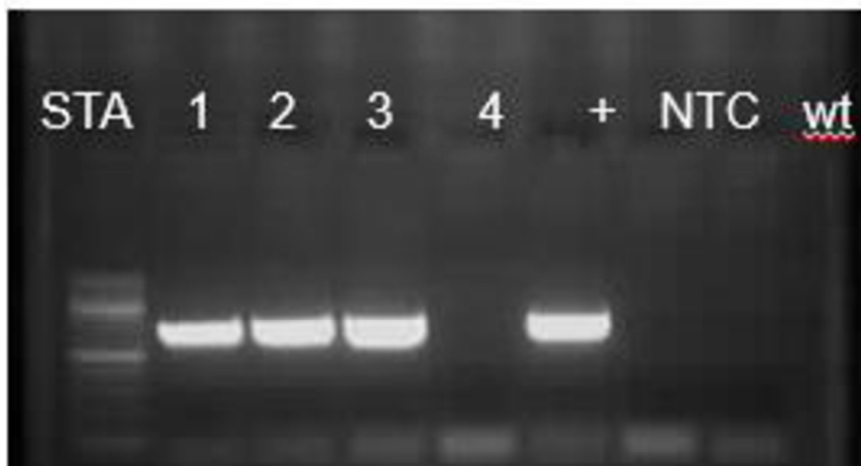


Abbildung 4 | Agarosegel einer exemplarischen Genotypisierung $\text{LysM}^{\text{cre}}\text{TNFR2}^{\text{fl/fl}}$ -Mäuse bezüglich der Expression von LysM^{cre} . Lane STA: DNA-Standard (100 bp ladder); Lane 1-4: Proben der Versuchstiere; Lane 5: Positivkontrolle; Lane 6: NTC; Lane 7: wt.

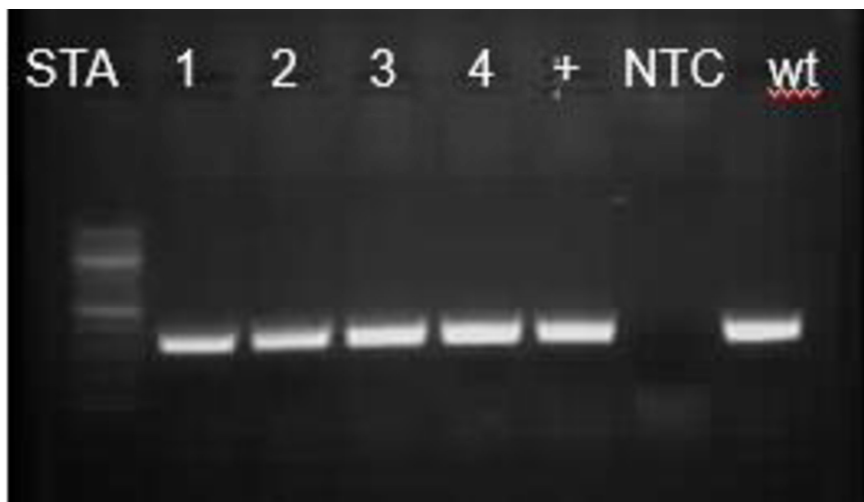


Abbildung 5 | Agarosegel einer exemplarischen Genotypisierung $\text{LysM}^{\text{cre}}\text{TNFR2}^{\text{fl/fl}}$ -Mäuse bezüglich der Expression des wt LysM^{cre} . Lane STA: DNA-Standard (100 bp ladder); Lane 1-4: Proben der Versuchstiere; Lane 5: Positivkontrolle; Lane 6: NTC; Lane 7: wt.

Bei $\text{LysM}^{\text{cre}}\text{TNFR2}^{\text{fl/fl}}$ -Mäusen erfolgte zusätzlich zur Analyse der Expression von LysM^{cre} und $\text{TNFR2}^{\text{fl/fl}}$ die Analyse der Expression von wt LysM^{cre} , da wir heterozygote $\text{LysM}^{\text{cre}}\text{TNFR2}^{\text{fl/fl}}$ Mäuse verwendeten. $\text{CD4}^{\text{cre}}\text{TNFR2}^{\text{fl/fl}}$ Mäuse waren homozygot.

2.2.3 TNCscTNF80

TNCscTNF80 wurde freundlicherweise durch Frau Weber-Steffens, technische Assistentin an unserem Institut, aufbereitet und für die Versuche zur Verfügung gestellt.

2.2.4 Herstellung der BCG/IFA-Emulsion

Die Emulsion wurde aus 2 ml hitzeinaktiviertem *Mycobacterium Tuberculosis*-BCG in PBS (500 µg/ml) und 2 ml IFA (Inkomplettes Freund-Adjuvans) hergestellt. IFA ist eine Wasser-in-Öl-Emulsion, die abgetötete *Mycobacterium bovis* enthält und Immunreaktionen als Adjuvans verstärkt. Zur Fertigung der Emulsion wurden die Substanzen in 5 ml-Spritzen aufgenommen, an ein Verbindungsstück gekoppelt und unter Kühlung durch wiederholtes Hin- und Herspritzen emulsifiziert.

2.2.5 Subkutane Injektion

Die Maus wurde mittels Diethylether-Inhalationsnarkose sediert. Das Rückenfell wurde mit 70% Ethanol befeuchtet. Anschließend wurde vorsichtig eine 27 G-Kanüle mit nach oben weisendem Schliff in flachem Einstichwinkel eingeführt. Die Einstichstelle wurde nach Entfernen der Kanüle für wenige Sekunden komprimiert, um Rückfluss zu verhindern.

2.2.6 Intraperitoneale Injektion

Die Maus wurde im Schwanz-Nackengriff fixiert und leicht kopfüber geneigt, um keine Darmschlingen zu verletzen. 200 µl TNF80 bzw. DPBS wurden mit einer 29 G-Kanüle in den linken Unterbauch injiziert.

2.2.7 Venöse Blutentnahme (retrobulbäre Punktion)

Die Maus wurde mit Diethylether betäubt und im Schwanz-Nacken-Griff fixiert. Dabei wurden die Halsvenen komprimiert, um den retrobulbären Venenplexus zu füllen. Eine 150 µl Pasteur-Pipette wurde medial des Auges eingeführt und der Venenplexus eröffnet.

2.2.8 Serumgewinnung

Zur Isolierung von Serum wurde das geronnene Blut für zehn Minuten bei 1000 rcf und 4 °C zentrifugiert. Das Serum wurde in ein neues Eppendorf-Cup pipettiert und für fünf Minuten erneut bei 1000 rcf abzentrifugiert, um verbleibende Erythrozyten zu pelletieren. Anschließend wurde das Serum nochmals in ein neues Cup überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.9 Isolation der Milzzellen

Die Maus wurde mittels Diethylether-Inhalationsnarkose sediert und durch zervikale Dislokation getötet. Das Rückenfell wurde mit 70% Ethanol befeuchtet. Es wurde ein Schnitt

links lateral am Bauch gesetzt und mit einem weiteren Schnitt das Peritoneum eröffnet. Die Milz wurde freipräpariert, von umliegendem Bindegewebe getrennt und in ein Eppendorf-Cup mit 1 ml kaltem DPBS gegeben.

Die Milz wurde gewogen, ein Teil zur Paraffin-Einbettung weggenommen und der verbleibende Teil erneut gewogen. Die histologischen Schnitte der Milzen wurden schlussendlich nicht ausgewertet, weshalb hier auf die Einbettung und Färbung nicht weiter eingegangen wird.

Sofern die Milzzellen danach in Kultur genommen wurden, wurden alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Milz wurde mit dem Spritzenstempel einer 5 ml Spritze über einem sterilen 40 µm Nylonfilter in ein 50 ml Röhrchen zerdrückt und mit 10 ml kaltem DPBS gespült. Die Zellsuspension wurde bei 300 g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 2 ml 1% FKS/DPBS resuspendiert und mit 3 ml ACK-Puffer versetzt, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lyse mit 10 ml 5% FKS/DPBS abgestoppt. Nun wurde die Suspension bei 300 g und 4 °C für sieben Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet. Sofern die Zellen in Kultur genommen wurden, wurde das Pellet in 5 ml Medium gelöst, die Suspension erneut über ein 40 µm-Sieb filtriert und mit weiteren 5 ml Medium gewaschen. Wurden die Zellen sofort analysiert, so wurden sie direkt in 10 ml 1% FKS/DPBS aufgenommen

2.2.10 Isolation der Knochenmarkszellen

Die Maus wurde mittels Diethylether-Inhalationsnarkose sediert, durch zervikale Dislokation getötet und mit Nadeln auf einer Styroporunterlage fixiert. Das Fell wurde mit 70% Ethanol befeuchtet. Es wurde ein Schnitt entlang des Hinterbeins durchgeführt, das Femur oder in seltenen Fällen auch die Tibia wurden entnommen und in mit kaltem DPBS gefüllte Eppendorf-Cups gegeben.

Die Knochen wurden zunächst in 70% Ethanol und daraufhin in DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Epiphysen abgetrennt und die Diaphysen mittels einer 5 ml Spritze und einer 27 G-Kanüle mit DPBS in ein 50 ml Röhrchen ausgespült. Nach gründlichem Resuspendieren wurden die Zellen bei 300 g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml 1% FKS/DPBS resuspendiert. Die

Suspension wurde über ein 40 µm Nylonsieb filtriert und dabei in ein neues 50 ml Tube überführt. Nach einem weiteren fünfminütigen Zentrifugierschritt bei 300 g wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet in 5 ml 1% FKS/DPBS aufgenommen.

2.2.11 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau bzw. bei Knochenmarkszellen mit Türk'scher Lösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Vier Großquadrate wurden ausgezählt und die Gesamtzellzahl gemäß folgender Formel berechnet:

$$MW \times VF \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

MW= ausgezählte Zellen /ausgezählte Großquadrate

VF= Verdünnungsfaktor (mit Trypanblau / Türk'scher Lösung)

10^4 = Kammerfaktor

2.2.12 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell scanning*) ist ein Laser- basiertes Verfahren zur Zellzählung, Zellsortierung und Zellcharakterisierung. Eine gefärbte Einzelzellsuspension wird in einen schmalen, schnellen Flüssigkeitsstrom aufgenommen und passiert einen fokussierten Laserstrahl. Hierbei entsteht Streu- und Fluoreszenzlicht, die separat detektiert werden. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe und Komplexität der Zelle. Das Vorwärtstreulicht (FSC=Forward Scatter) hängt vom Volumen der Zelle, das Seitwärtstreulicht (SSC=Sidewards Scatter) von der Granularität der Zelle ab. Gleichzeitig werden Fluoreszenzfarben gemessen, die an die betreffenden Marker der Zelle gebunden sind [60].

2.2.12.1 Färbung von Oberflächenmarkern für die durchflusszytometrische Analyse

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde 1 ml/Tube FACS-Puffer (1% FKS/DPBS) vorgelegt und 10^6 Zellen je Tube zugegeben. Die Zellen wurden bei 300 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt. Anschließend wurden je Tube randständig 5 µl Fc-Block-Lösung (0,5µg/stain) hinzugefügt, um eine unspezifische Bindung der Oberflächenmarker zu verhindern. Für die Proben wurde ein Färbecocktail hergestellt (Antikörper s. 2.1.1). Die Proben wurden für eine Minute bei 300 g zentrifugiert, sodass die Fc-Block-Lösung auf die Zellen gelangen konnte.

Nach dreißigminütiger Inkubation wurden 5 µl des jeweiligen Färbecocktails hinzugegeben. Die FACS-Röhrchen wurden erneut für eine Minute bei 300 g und 4 °C zentrifugiert und für dreißig Minuten inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml FACS-Puffer, nach dem die Zellen für fünf Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Röhrchen auf Einmalpapier abgetupft wurden. In die Röhrchen, die nicht weiter gefärbt werden sollten, wurden 200 µl FACS-Puffer und weitere 200 µl 4% PFA/PBS hinzupipettiert.

Die Tubes, die zusätzlich mit intrazellulären Markern gefärbt werden sollten, wurden nach nachfolgendem Protokoll weiter behandelt.

Die Kompensationsproben für die Einzelfärbungen wurden an Stelle des Färbecocktails mit je 0,5 µl der jeweiligen Farbe-Stammlösung, gekoppelt an CD4, CD8a oder B220 bei Milzzellen bzw. Ly6C, Ly6G, CD11b und B220 bei Knochenmarkszellen, versetzt. Ansonsten wurden die Kompensations-Tubes ebenso behandelt wie die Proben.

2.2.12.2 Färbung von intrazellulären Markern (FoxP3) für die durchflusszytometrische Analyse

Zur intrazellulären Färbung von FoxP3 wurden die Zellen wie zuvor beschrieben (s. 2.2.12.1) behandelt. Die Zellpellets wurden in 500 µl frisch hergestellter Fixation/Permeabilization working solution aufgenommen und kurz gevortext. Die Proben wurden für dreißig Minuten im Dunkeln inkubiert, mit 1 ml Permeabilization Buffer gewaschen und bei 300 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und je Tube 0,5 µl anti-mouse/anti-rat FoxP3-AK in 50 µl Permeabilization Buffer hinzugegeben. Als Isotyp-Kontrolle wurde ein Tube mit 0,5 µl FITC Rat IgG_{2A} in 50 µl Permeabilization Buffer gefärbt. Die Proben wurden bei 300 g und 4 °C für eine Minute zentrifugiert. Nach dreißigminütiger Inkubation und einem weiteren Waschschriff mit 1 ml Permeabilization Buffer wurden die Tubes erneut bei 300 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Die Kompensationen für die Einzelfärbungen wurden an Stelle des Färbecocktails mit je 0,5 µl der jeweiligen Farbe-Stammlösung, gekoppelt an CD4, CD8a oder B220 versetzt. Ansonsten wurden die Kompensations-Tubes ebenso behandelt wie die Proben.

2.2.13 T-Zell-Suppressionsassay

Im T-Zell-Suppressionsassay wurden Milzzellen der Versuchstiere gewonnen und CD4⁺CD25⁺ Treg mittels MACS (*magnetic activated cell sorting*) isoliert. Milzzellen einer CD45.1 Maus wurden ebenfalls isoliert und mit den gewonnenen Treg koinkubiert. Anhand der CD45.1-

Expression der T-Lymphozyten konnten bei der späteren FACS-Analyse die Effektor-T-Zellen von den eingesetzten Treg unterschieden werden.

Die sterile Aufbereitung der Milzzellen erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Milzzellen jeweils einer Gruppe wurden zu $18 \cdot 10^7$ Zellen gepoolt und nochmals über ein $40 \mu\text{m}$ Sieb filtriert. Die Zellpools wurden bei 300 g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

2.2.13.1 MACS-Aufreinigung $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T Zellen

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) ist eine Methode zur Abtrennung von Zellen aus Zellgemischen. Zellen werden dabei mit MicroBeads, Antikörper-gekoppelten magnetischen Nanopartikeln, inkubiert. Die Zellsuspension wird anschließend auf eine Säule, die von einem starken magnetischen Feld umgeben ist, übertragen. Markierte Zellen werden zurückgehalten, während unmarkierte Zellen beim Spülen ausgewaschen werden [61].

Im Anschluss wird das Vorgehen der MACS-Aufreinigung regulatorischer T Zellen für einen einzelnen Zellpool beschrieben. Das Pellet wurde in $720 \mu\text{l}$ MACS-Puffer resuspendiert und mit $180 \mu\text{l}$ Biotin-Antibody-Cocktail (CD8a-Biotin ; CD11b-Biotin ; CD45R-Biotin ; CD49b-Biotin ; Ter-119-Biotin) versetzt. Die Zellsuspension wurde für zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden $540 \mu\text{l}$ MACS-Puffer, $360 \mu\text{l}$ anti-Biotin-MicroBeads und $180 \mu\text{l}$ CD25-PE hinzugegeben und die Suspension gründlich resuspendiert. Nach fünfzehn-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit 20 ml MACS-Puffer gewaschen und bei 300 g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Währenddessen erfolgte das Equilibrieren der LD-Säule mit 2 ml MACS-Puffer. Der Überstand des Zellpellet wurde abgesaugt und die Zellen in $730 \mu\text{l}$ MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die Säule transferiert und zweimal mit je 1 ml MACS-Puffer gewaschen. Die unmarkierten Zellen wurden aufgefangen, bei 300 g und 4°C für zehn Minuten pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in $1620 \mu\text{l}$ MACS-Puffer aufgenommen und mit $180 \mu\text{l}$ Anti-PE-MicroBeads versetzt. Nach fünfzehn-minütiger Inkubation bei 4°C erfolgte ein erneuter Waschschriff der Zellen mit 20 ml MACS-Puffer und die Zentrifugation bei 300g und 4°C für zehn Minuten. Währenddessen wurde die MS-Säule mit $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer equilibriert. Der Überstand der Zellpellets wurde abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in $900 \mu\text{l}$ MACS-Puffer resuspendiert und auf die Säule überführt. Die Säule wurde dreimal mit je $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer gespült. Nun wurde die Säule abgenommen, mit 1 ml MACS-Puffer gefüllt und die gebundenen Zellen mithilfe eines Stempels über einer neuen Säule eluiert. Nach drei weiteren Waschschriffen mit je $500 \mu\text{l}$

MACS-Puffer wurde die neue Säule abgenommen. 1 ml MACS-Puffer wurde hinzugefügt und die gebundenen Zellen über einem Auffanggefäß eluiert.

2.2.13.2 Reinheitsprobe

Von jedem Zellpool wurde vor und nach der MACS-Trennung ein Aliquot entnommen und die Reinheit mittels FACS-Analyse bestimmt.

2.2.13.3 CFSE-Markierung der Effektorzellen

Mithilfe der CFSE-Färbung kann durchflusszytometrisch die Teilung von Zellen nachgewiesen werden. Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der über seine Succinimidylgruppe kovalent an intrazelluläre Moleküle bindet. Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) besitzt zusätzlich zwei Acetatgruppen, die die Membranpermeabilität erhöhen, und zeigt keine Fluoreszenz. Intrazelluläre Esterasen entfernen die Acetatgruppen und ermöglichen die Bildung von CFSE, das in der Zelle verbleibt. Proliferiert eine Zellpopulation, so wird die Menge an CFSE gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt und die Fluoreszenzintensität halbiert sich [62].

Milzzellen einer CD45.1 Maus wurden wie zuvor beschrieben (s. 2.2.9) steril aufbereitet. Etwa $2 \cdot 10^6$ Zellen mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml wurden für die FACS-Kompensationsfärbungen beiseite genommen und nicht markiert. $1 \cdot 10^7$ Milzzellen wurden auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt und bei 300 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1 ml 2,5 µM CFSE-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein neues Tube überführt, um sicherzustellen, dass nur gefärbte Zellen weiterverwendet werden. Das Tube wurde für 10 min im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Nun wurden die Zellen mit 4 ml 5% FKS/PBS versetzt und bei 300 g und 4 °C für fünf Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden erneut gezählt und auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

Zur Kontrolle der CFSE-Färbung wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und mittels FACS analysiert.

2.2.13.4 Suppressionsassay

Die mittels MACS aufgereinigten Treg wurden mit Trypanblau verdünnt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die Zellsuspensionen wurden bei 300 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in 1 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Suspensionen wurden in Eppendorf-Cups auf $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. In weiteren Eppendorf-Cups wurden die Zellsuspensionen in log2-Schritten 1:2 bis 1:8 bzw. 1:16 verdünnt. 100 µl/Well der jeweilig verdünnten Treg wurden auf eine 96-Well Rundbodenplatte ausgebracht und für mindestens eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Nun wurden die CFSE-gefärbten Milzzellen zu $5 \cdot 10^4$ Zellen/Well zugegeben. Die Wells wurden mit 20 µl Stimulationsansatz (0,5 µg/ml anti-CD3; 0,25 µg/ml anti-CD28 bzw. in späteren Versuchen nur 0,5 µg/ml anti-CD3) versetzt und gründlich resuspendiert. Um Austrocknung zu vermeiden, wurden die Randwells mit 220 µl Kulturmedium befüllt. Die Platte wurde für drei Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

An Tag drei wurde die Platte makroskopisch und mikroskopisch auf Kontamination geprüft. Die Überstände wurden abgenommen und für spätere Analysen (ELISA) bei -20 °C gelagert. Die verbleibenden Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert.

Die Zellen wurden in 100 µl DPBS aufgenommen und in mit 1 ml DPBS befüllte FACS-Tubes überführt. Die Tubes wurden bei 300 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abdekantiert und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (300 g, 4 °C, 5 min) wurden die Überstände abgekippt und 0,25 µl Viability Dye in 250 µl DPBS hinzugegeben. Die Tubes wurden gevortext und die Zellen für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Fc-Rezeptor-Blockade folgte die Oberflächenfärbung der Marker CD4, CD8 und CD45.1 nach dem zuvor beschriebenen Färbeprotokoll (s. 2.2.12.1). Nach einem letzten Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer wurden die Zellen in 150 µl FACS-Puffer und 150 µl Counting Beads in 4 % PFA (2000 Beads pro Tube) aufgenommen.

2.2.13.4.1 Auswertung der Suppressionsassays

Zur Auswertung der Suppressionsassays waren einige Rechenschritte notwendig, um ein anschauliches und interpretierbares Ergebnis zu erhalten. Jeder Probe wurden im jeweiligen FACS-Röhrchen 2000 *counting beads* hinzugegeben, um später von der im FACS-Gerät aufgenommenen Zellzahl auf die tatsächliche Zellzahl im FACS-Röhrchen schließen zu können. Zu diesem Zweck wurde der sogenannte *beads factor* nach folgender Formel errechnet:

$$\text{beads factor} = \frac{\text{eingesetzte beads (= 2000)}}{\text{aufgenommene beads}}$$

Die Zahl an aufgenommenen Zellen wurde mit dem *beads factor* multipliziert, um die ursprünglich im FACS-Röhrchen enthaltene Zellzahl zu ermitteln.

Die so errechnete *beads*-bereinigte Zellzahl wurde in % des Mittelwerts der ebenfalls *beads*-bereinigten stimulierten Kontrolle der jeweiligen Zellpopulation (CD4⁺ bzw. CD8⁺) angegeben, die Proliferation stimulierter Milzzellen wurde also gleich 100 % gesetzt.

2.2.14 Zellkultur

2.2.14.1 L929-Zellen

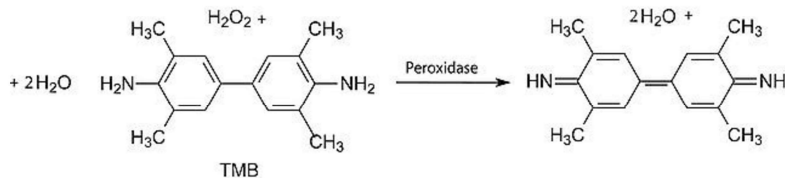
Maus L929 Fibroblasten wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut und in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 300 g und 4 °C wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 20 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden alle 2-4 Tage im Verhältnis 1:10 oder 1:20 gesplittet. Hierzu wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin abgelöst, in 8 ml Kulturmedium aufgenommen und im gewünschten Verdünnungsverhältnis in neue Zellkulturflaschen überführt.

2.2.15 ELISA

Der ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) bietet eine sensitive Methode zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen. Je nach Fragestellung wurden verschiedene Zytokine (TNF; IL-6; IL-17; IFN-γ) nach Herstellerprotokoll nachgewiesen.

Grundsätzlich wurde ein unmarkierter anti-Zytokin-Antikörper (*coating antibody*) auf eine NUNC Maxisorp-Platte ausgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden mit Blockpuffer abgesättigt. Die Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde anschließend gewaschen, um nicht gebundenes Zytokin zu entfernen. Nun wurde ein

biotinylierter Detektionsantikörper zugegeben, der an gebundenes Zytokin bindet. An den Detektionsantikörper wurde nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur HRP (Merrettich-Peroxidase)-konjugiertes Streptavidin gekoppelt. Nach 20 Minuten wurde die Substratlösung zugegeben. Das darin enthaltene Tetramethylbenzidin (TMB) wird durch HRP zu einem Diimin oxidiert und zeigt dann eine blaue Färbung.



3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Diimin

Abbildung 6 | **Peroxidase-Reaktion.** [63]

Die Reaktion wurde mit H_2SO_4 abgestoppt und die jetzt gelbe Färbung photometrisch bei 450 nm vermessen. Die Zytokinkonzentration wurde über eine Standardkurve bestimmt.

2.2.16 L929-Zell-Zytotoxizitätsassay

Der L929-Zell-Zytotoxizitätsassay bietet eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung der Menge an biologisch aktivem löslichem TNF.

Die Mäuse, deren TNF Konzentration im Serum bestimmt werden sollte, wurden 90 min vor der retrobulbären Blutentnahme mit 10 μg LPS (in 200 μl DPBS) i.p. (intraperitoneal) stimuliert. Das Serum wurde wie zuvor beschrieben isoliert (s. 2.2.7) und bei -20°C gelagert.

An Tag 0 wurden $2 \cdot 10^4$ L929 Zellen in 100 μl Medium je Well auf eine 96 Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. An Tag 1 wurden die Überstände abgesaugt. Löslicher mTNF Standard wurde in log2 Verdünnungen titriert und 100 μl in Duplikaten auf die Zellen überführt. Die Serumproben mit unbekannter TNF Konzentration wurden ebenfalls in log2 Verdünnungen titriert und auf die Zellen pipettiert. 100 μl 2-fach Actinomycin D haltiges Medium (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde zugefügt. An Tag 2 wurden zunächst lichtmikroskopisch diejenigen Wells identifiziert, bei denen in etwa ein 50:50 Verhältnis von lebenden zu toten Zellen vorlag (halbmaximaler Kill).

Anschließend wurde ein MTT-Assay durchgeführt, der die Lebensfähigkeit der L929 Zellen testet. Mitochondriale NADH- und NADPH-abhängige Reduktasen reduzieren das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in violettes Formazan [64]. 10 μl der MTT Stocklösung (5 mg/ml) wurden je Well zugegeben und für vier Stunden

inkubiert. Durch Zugabe von 70 μ l 20% SDS wurden die Zellen lysiert und die Formazankristalle über 24 Stunden gelöst.

An Tag 3 wurden die Platten bei 540 nm ausgelesen.

3 Ergebnisse

Für die nachfolgenden Auswertungen wurde ein Signifikanzniveau von $p = 0.05$ festgesetzt, sodass Werte von $p \leq 0.05$ als signifikant bezeichnet werden. Zur statistischen Analyse wurden entweder der *Welch*-Test oder der *Two-Way-ANOVA*-Test durchgeführt. Die Signifikanz der Unterschiede wurde in den Graphiken wie folgt durch * anhand des Signifikanzwertes (p) gekennzeichnet:

* entspricht $p < 0,05$

** entsprechen $p < 0,01$

*** entsprechen $p < 0,001$

**** entsprechen $p < 0,0001$

3.1 BCG-Modell

3.1.1 Wiederholte Injektion von BCG induziert chronische Entzündung

In einem ersten Versuch überprüften wir den Effekt des BCG-Entzündungsmodells auf naive Mäuse.

Zur Induktion der chronischen Entzündung erfolgte an Tag -14 und -7 die subkutane Injektion von 200 μ l BCG-/IFA-Emulsion ($c=250 \mu\text{g/ml}$, 50 μg). An Tag 0 wurden 200 μ l BCG in PBS ($c=250 \mu\text{g/ml}$, 50 μg) injiziert, um als *Challenge* einen messbaren Entzündungsschub zu provozieren. Zwei Tage später wurden Milz und Femur entnommen und die Milz- und Knochenmarkszellen isoliert und gezählt. Weiterhin wurde das Milzgewicht ermittelt. Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Milz- und Knochenmarkszellen. Als Vergleichsgruppe dienten naive Mäuse (Abb. 7).

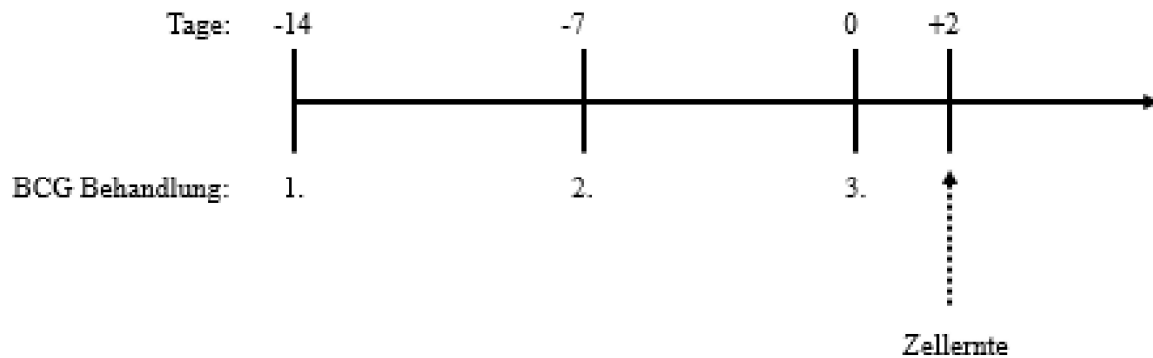


Abbildung 7 | **BCG-Modell.** Die Mäuse erhielten an Tag -14 und Tag -7 je eine subkutane Injektion von 200 μ l BCG in IFA (c=250 μ g/ml; 50 μ g). An Tag 0 wurden 200 μ l BCG in PBS (c=250 μ g/ml; 50 μ g) injiziert. An Tag 2 erfolgten die Zellernte und die anschließende FACS-Analyse.

Um zu prüfen, ob die dreimalige Injektion von BCG zu einem messbaren Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF führt, wurde an Tag 2 zusätzlich retrobulbär Blut entnommen, das Serum isoliert und mittels ELISA hinsichtlich der IL-6 und TNF-Konzentration untersucht. Allerdings zeigten sich in keiner der Proben detektable Mengen der genannten Zytokine (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 8 sind die Mittelwerte der Milzgewichte und der Gesamtzellzahl in der Milz mit der zugehörigen Standardabweichung dargestellt. Die Gesamtzellzahl beschreibt die Zahl aller aus einer Milz gewonnenen Zellen. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($p > 0,05$). Allerdings scheinen sowohl das Milzgewicht als auch die Zellzahl in Mäusen, die die BCG-Injektionen erhalten haben, etwas erhöht.

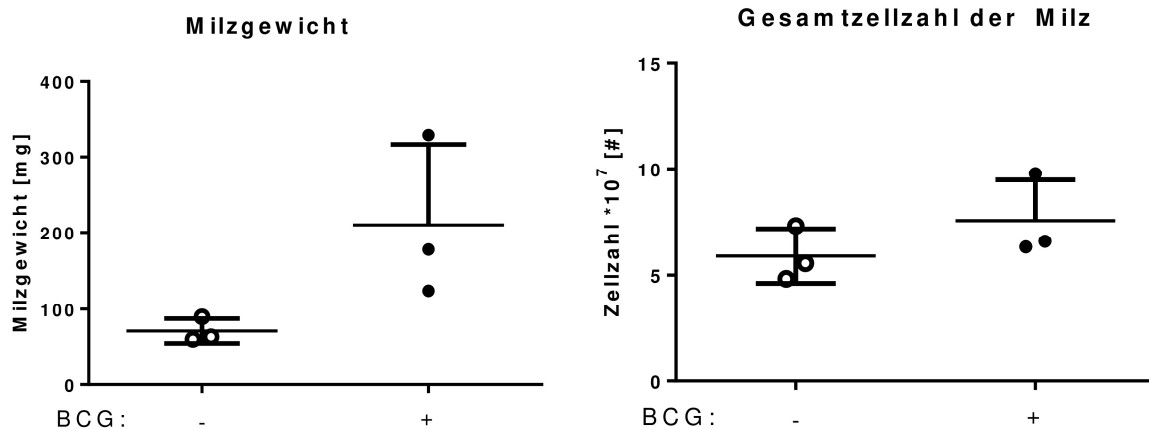


Abbildung 8 | **Milzgewicht und Gesamtzellzahl der Milz.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate mit der zugehörigen Standardabweichung von naiven Mäusen (offene Kreise) bzw. BCG-behandelten Mäusen (gefüllte Kreise). Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

In Abbildung 9 ist der prozentuale Anteil der myeloiden Zellen, also der $CD11b^+$ Leukozyten, der $Ly6G^+Ly6C^{mid}$ und der $Ly6G^+Ly6C^{high}$ MDSC, an der Gesamtzellzahl in der Milz abgebildet. Es zeigt sich eine signifikante Steigerung im relativen Anteil der granulozytären ($Ly6G^+Ly6C^{mid}$; $p < 0,0001$) MDSC nach BCG-Injektion im Vergleich zu naiven Mäusen. Der Anteil aller $CD11b^+$ Zellen sowie der monozytären ($Ly6G^+Ly6C^{high}$) an der Gesamtzellzahl in der Milz MDSC wirkt nach BCG-Behandlung ebenfalls erhöht, wenn auch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Betrachtet man hingegen den prozentualen Anteil der T- und B-Zellen, so findet sich nach BCG-Injektion eine Erniedrigung sowohl der $CD4^+$ wie auch der $CD8^+$ T-Zellen und der $B220^+$ B-Zellen. Dieser augenscheinliche Unterschied ist bei den $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten nicht signifikant ($p > 0,5$) (Abb. 10).

In Abbildung 11 ist der prozentuale Anteil der Treg an allen $CD4^+$ T-Zellen in der Milz dargestellt. Es zeigt sich kein Unterschied im Anteil der Treg zwischen naiven Mäusen und denjenigen, die BCG-Injektionen erhalten haben.

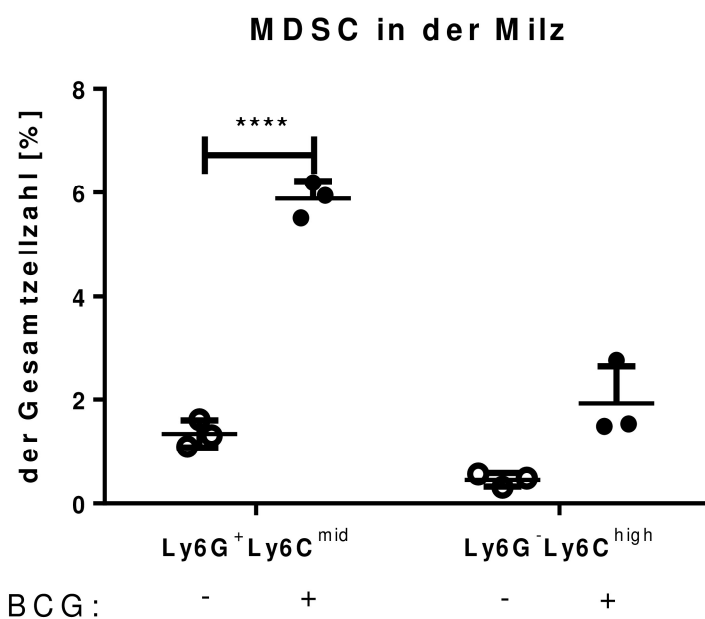
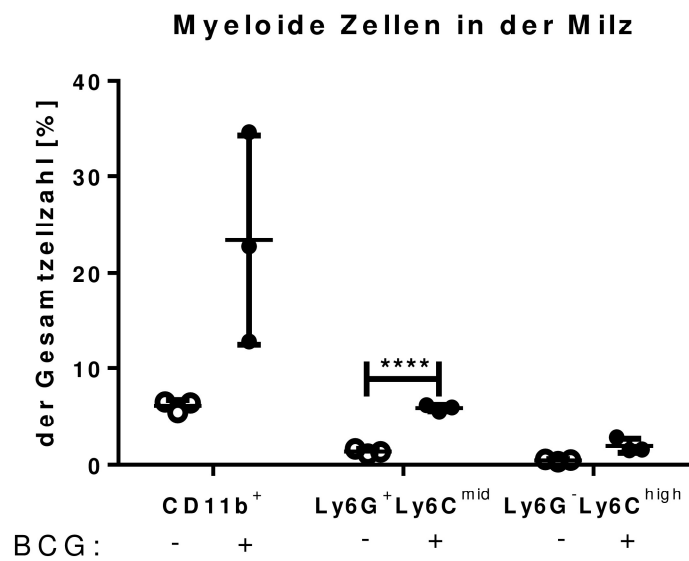


Abbildung 9 | **Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen an der Gesamtzellzahl in der Milz.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate mit der zugehörigen Standardabweichung von naiven Mäusen (offene Kreise) bzw. BCG-behandelten Mäusen (gefüllte Kreise). Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

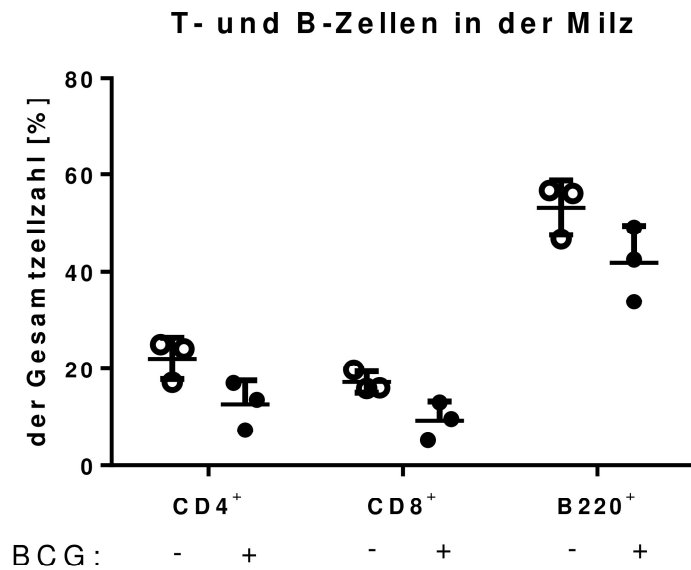


Abbildung 10 | **Prozentualer Anteil der T- und B-Zellen an der Gesamtzellzahl in der Milz.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate mit der zugehörigen Standardabweichung von naiven Mäusen (offene Kreise) bzw. BCG-behandelten Mäusen (gefüllte Kreise). Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

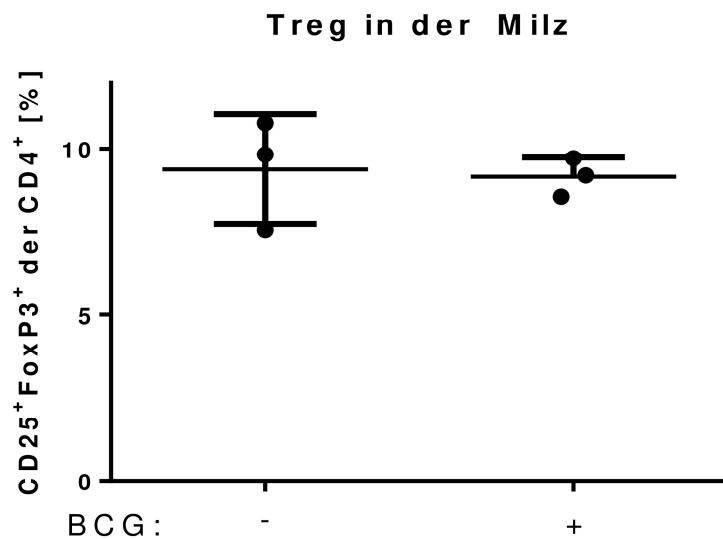


Abbildung 11 | **Prozentualer Anteil CD25⁺FoxP3⁺ Treg an CD4⁺ T-Lymphozyten in der Milz.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von naiven Mäusen (offene Kreise) bzw. BCG-behandelten Mäusen (gefüllte Kreise) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

Im Knochenmark untersuchten wir den prozentualen Anteil der myeloiden Zellen sowie der B-Lymphozyten. In Abbildung 12 ist der prozentuale Anteil der myeloiden Zellen und B-Zellen im Knochenmark dargestellt. Es findet sich ein signifikanter Zuwachs an CD11b⁺ Zellen in den Mäusen, die BCG-Injektionen erhalten haben ($p < 0,05$). Der Anteil an MDSC hingegen blieb unverändert. In den BCG-Mäusen zeigt sich außerdem eine signifikante Reduktion der B-Lymphozyten nach BCG-Injektion ($p < 0,001$).

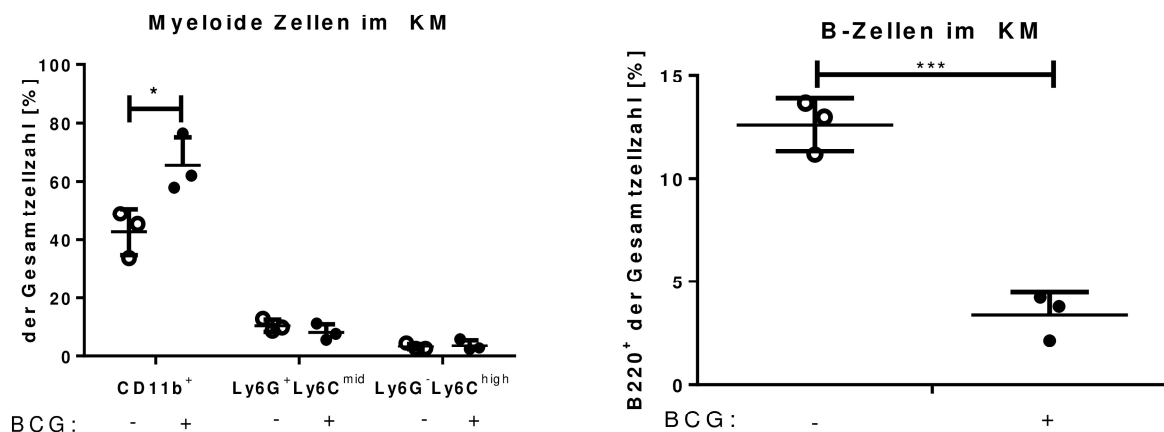


Abbildung 12 | **Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und B-Lymphozyten im Knochenmark.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von naiven Mäusen (offene Kreise) bzw. BCG-behandelten Mäusen (gefüllte Kreise) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

Insgesamt deutet die Expansion der myeloiden Zellen im Knochenmark und in der Peripherie sowie die verminderte Zellzahl der B- und T-Zellen, also der Effektorzellen, auf ein chronisch-entzündliches Geschehen hin. Somit stellt das BCG-Modell ein schnelles, geeignetes Modell für chronische Entzündung dar.

Neben den soeben beschriebenen generalisierten Effekten des BCG-Modells ließ sich bei den Mäusen auch eine lokal-entzündliche Reaktion beobachten. Durch das Verabreichen der ersten beiden BCG-Injektion in Form einer Fettemulsion kam es zur Ausbildung eines lokalen BCG-Reservoirs. An der Einstichstelle zeigte sich eine deutliche Schwellung mit einer teilweise ulzerierenden Lokalreaktion. Das Depot ermöglichte zudem die langsame und kontinuierliche Abgabe des BCG, das so die systemische Entzündung unterhalten konnte.

3.1.2 Entzündungsinduktion ist unabhängig von der TNFR2-Expression

Wir untersuchten die Wirkung des BCG-Modells abhängig von der Expression des TNFR2. Wir verglichen TNFR2^{fl/fl} Mäuse (Pseudowildtyp), TNFR2^{-/-} Mäuse (denen auf allen Zellen der TNFR2 fehlt) LysM-Cre Mäuse (bei denen ein Großteil der myeloiden Zellen keinen TNFR2 exprimiert) und CD4-Cre Mäuse (deren CD4⁺ und CD8⁺ Zellen keinen TNFR2 exprimieren).

In all diesen Gruppen zeigt sich jedoch nach BCG-Injektion die gleiche, bereits zuvor beschriebene Tendenz der chronischen Entzündung, die durch die Expansion des myeloiden und die Kompression des lymphatischen Zellkompartiments sowohl im Knochenmark als auch in der Milz gekennzeichnet ist (Abb. 13-16). Auch hier wurde der Anteil der Treg in der Milz durch die BCG-Injektion nicht wesentlich beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

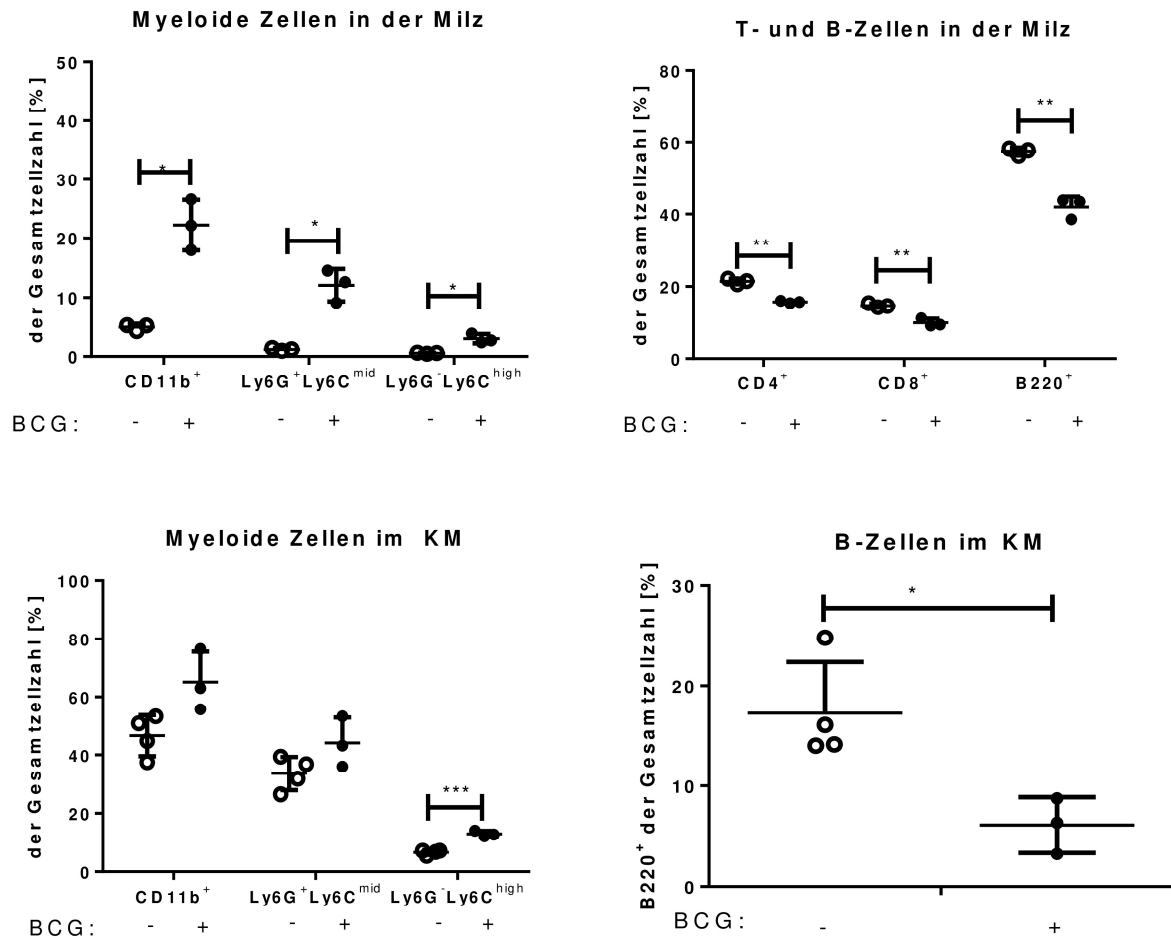


Abbildung 13 | **Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und B-Zellen in Milz und Knochenmark sowie der T-Zellen in der Milz von TNFR2^{fl/fl} Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von naiven Mäusen (offene Kreise) bzw. BCG-behandelten Mäusen (gefüllte Kreise) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

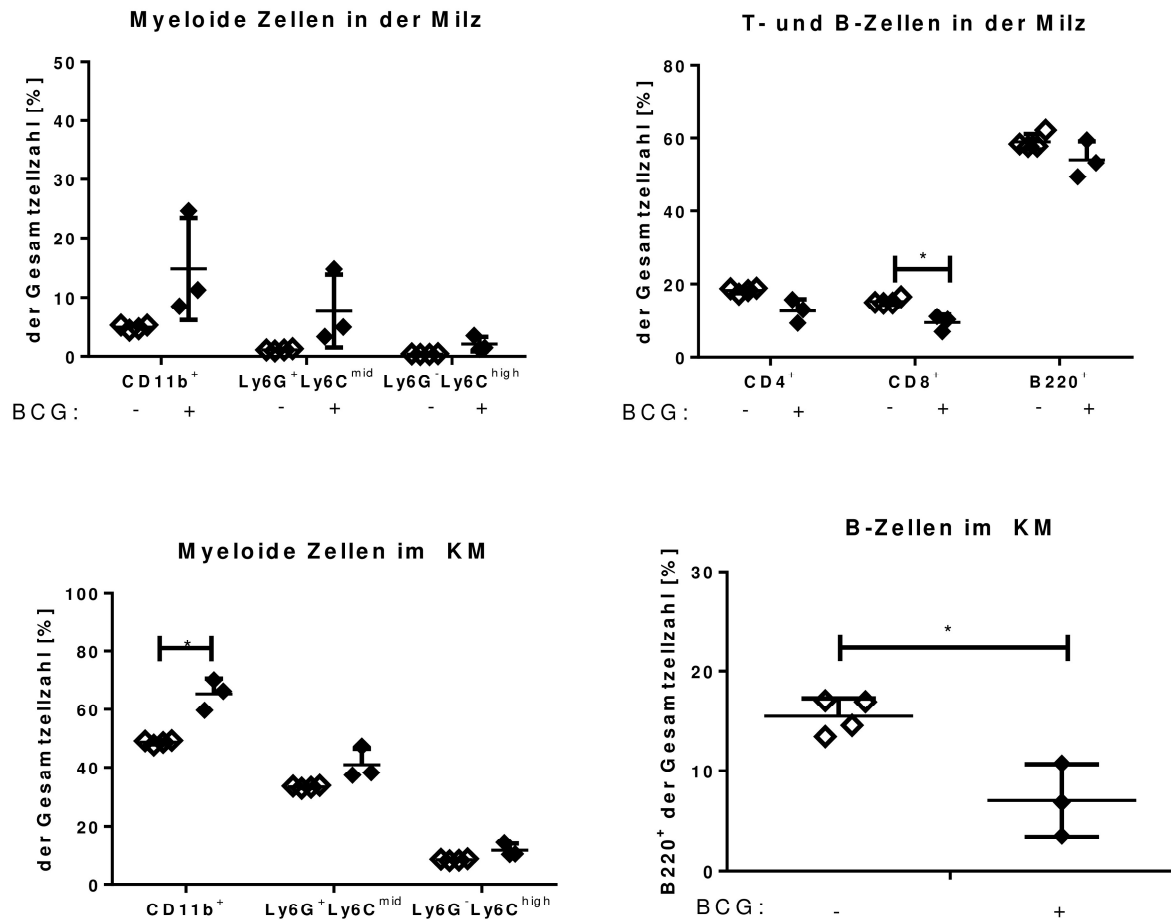


Abbildung 14 | **Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und B-Zellen in Milz und Knochenmark sowie der T-Zellen in der Milz von TNFR2^{-/-} Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von naiven Mäusen (offene Rauten) bzw. BCG-behandelten Mäusen (gefüllte Rauten) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

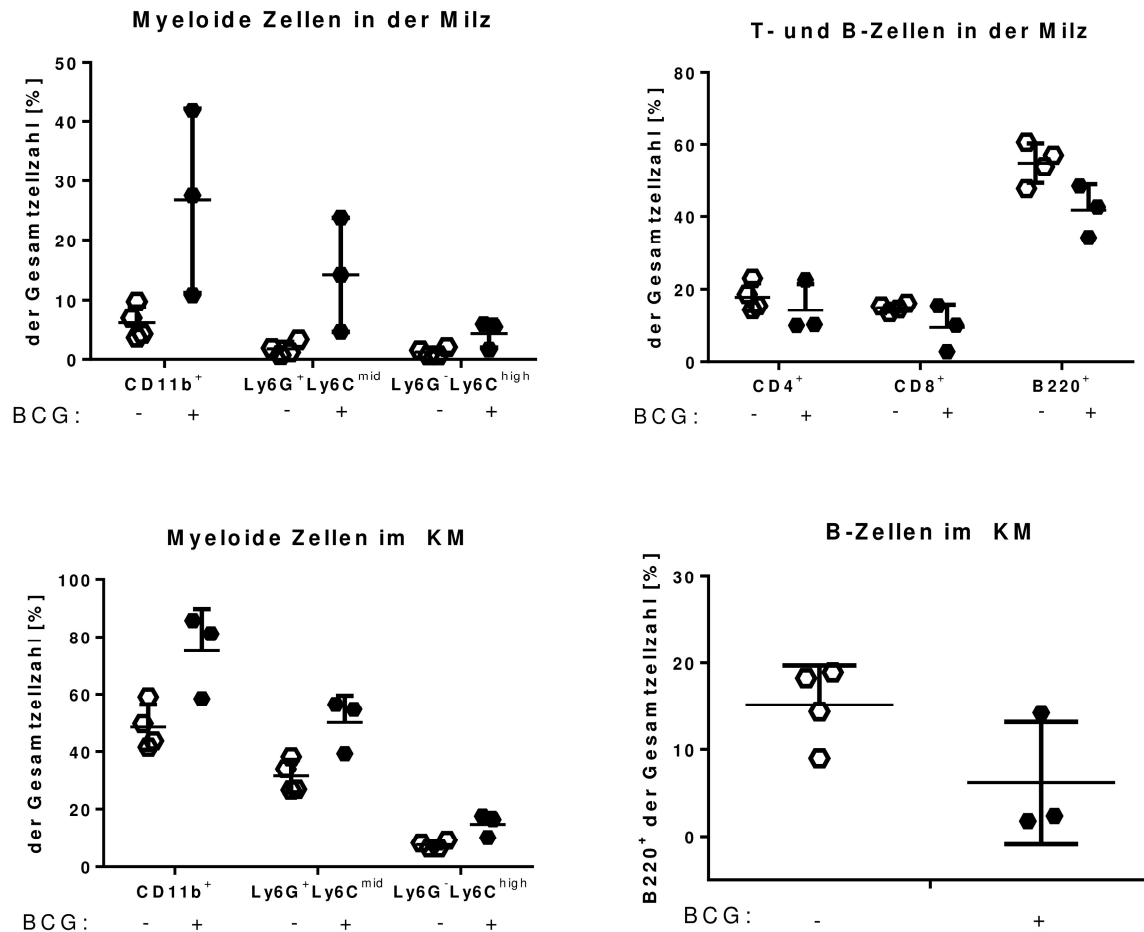


Abbildung 15 | **Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und B-Zellen in Milz und Knochenmark sowie der T-Zellen in der Milz von $\text{LysM}^{\text{cre}} \text{TNFR2}^{\text{fl/fl}}$ Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von naiven Mäusen (offene Sechsecke) bzw. BCG-behandelten Mäusen (gefüllte Sechsecke) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

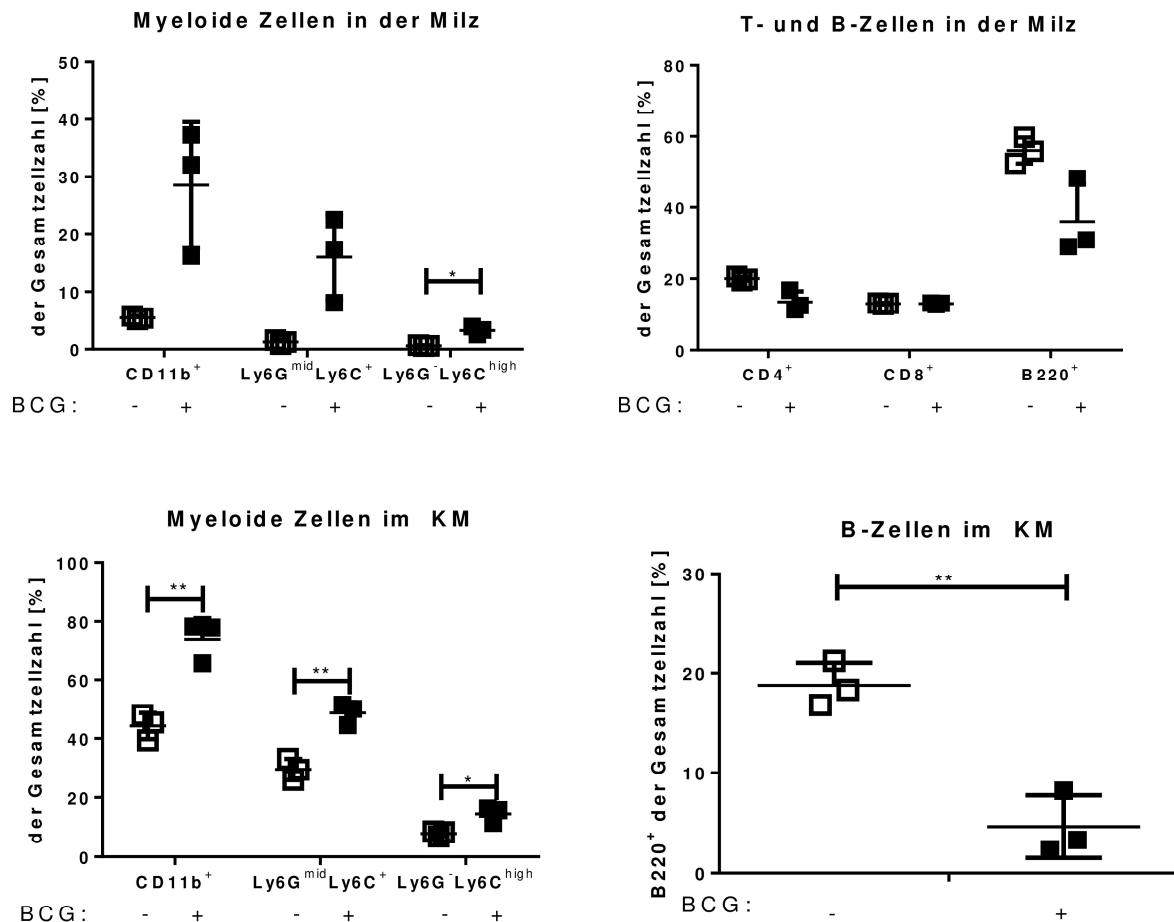


Abbildung 16 | **Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und B-Zellen in Milz und Knochenmark sowie der T-Zellen in der Milz von CD4^{cre} TNFR2^{fl/fl} Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von naiven Mäusen (offene Quadrate) bzw. BCG-behandelten Mäusen (gefüllte Quadrate) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

Um die komplexen Effekte eines TNFR2-Mangels zu meiden, führten wir die folgenden Versuche mit TNFR2^{fl/fl} Mäusen, also mit phänotypischen Wildtyp-Mäusen fort.

3.2 Effekte von TNF80 in naiven, akut und chronisch entzündeten Mäusen

Wir untersuchten die Effekte einer ein- bzw. zweimaligen Behandlung mit dem TNFR2-spezifischen Agonisten TNF80 in naiven Mäusen und Mäusen mit akuter bzw. chronischer Entzündung. Die Induktion der chronischen Entzündung erfolgte mittels des zuvor beschriebenen BCG-Modells. Um eine akute Entzündung herbeizuführen, erhielten die Mäuse eine einmalige subkutane Injektion von 200 μ l BCG ($c=250 \mu\text{g/ml}$; 50 μg) (BCG-Challenge). TNF80 wurde intraperitoneal injiziert. Als Messgrößen dienten Milzgewicht, Gesamtzellzahl in der Milz sowie die durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen hinsichtlich der prozentualen Verteilung der myeloiden Zellen, der B-Zellen und der T-Zellen.

3.2.1 Einmalige Injektion von TNF80 zeigt keinen messbaren Effekt

Wir betrachteten die Wirkung einer einmaligen Behandlung mit TNF80 in naiven, akut und chronisch entzündeten Mäusen. Alle Mäuse erhielten an Tag -2 200 μ l TNF80 ($c=375 \mu\text{g/ml}$; 75 μg) bzw. 200 μ l PBS intraperitoneal. Wir untersuchten naive Mäuse, Mäuse, die an Tag 0 im Sinne eines Entzündungsstimulus mit BCG stimuliert wurden (BCG-Challenge) und eine dritte Gruppe, die drei BCG-Injektionen erhielt (BCG-Modell) (Abb. 17).

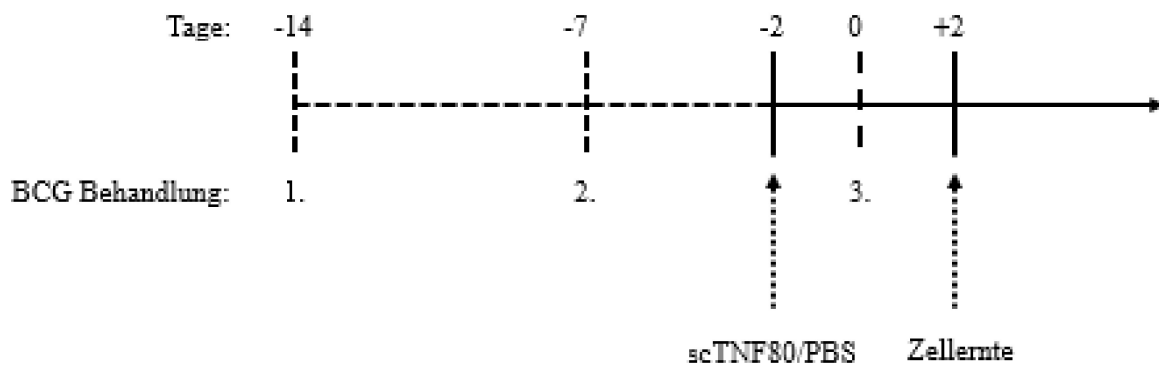


Abbildung 17 | **Behandlungsschema naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse.** Die Mäuse wurden an Tag -2 mit 200 μ l TNF80 ($c=375 \mu\text{g/ml}$; 75 μg) bzw. 200 μ l PBS behandelt. Die erste Gruppe erhielt keine weiteren Injektionen. Gruppe 2 und Gruppe 3 wurden an Tag 0 subkutan mit 200 μ l BCG in PBS ($c=250 \mu\text{g/ml}$; 50 μg) stimuliert. Gruppe 3 erhielt zusätzlich an Tag -14 und Tag -7 je eine subkutane Injektion von 200 μ l BCG in IFA ($c=250 \mu\text{g/ml}$; 50 μg). An Tag 2 erfolgte die Zellernte und die anschließende FACS-Analyse.

Abbildung 18 zeigt in der linken Spalte Punktdiagramme der naiven Mäuse. In der mittleren Spalte sind die Graphiken der Mäuse abgebildet, die eine BCG-Challenge erhalten haben. In der rechten Spalte sind Punktdiagramme der Mäuse dargestellt, die das BCG-Modell durchlaufen haben.

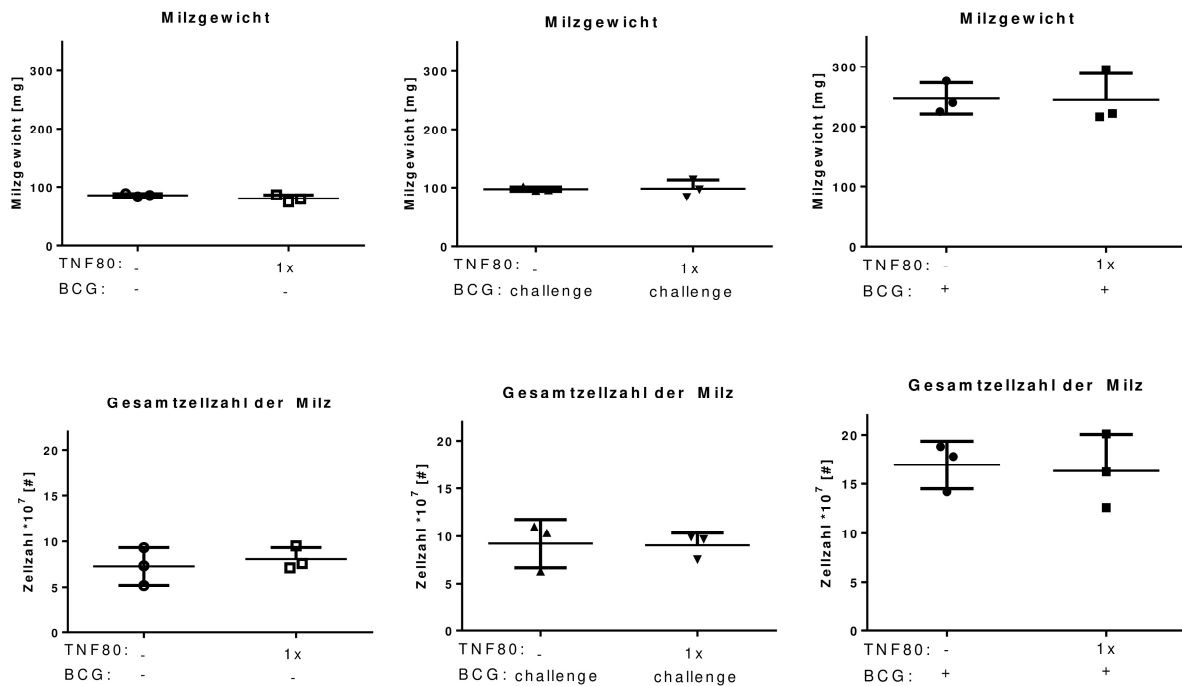


Abbildung 18 | **Milzgewicht und Gesamtzellzahl in der Milz von naiven Mäusen, Mäusen mit BCG-Challenge und BCG-Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von naiven unbehandelten Mäusen (offene Kreise) bzw. naiven TNF80-behandelten Mäusen (offene Quadrate), BCG-Challenge-Mäusen ohne (nach oben weisende Pfeile) bzw. mit TNF80-Behandlung (nach unten weisende Pfeile) und BCG-Modell-Mäusen ohne (gefüllte Kreise) bzw. mit TNF80-Behandlung (gefüllte Quadrate) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

In keiner der drei Gruppen konnte die einmalige Injektion von 75 µg TNF80 einen relevanten genuine Effekt herbeiführen. Milzgewicht und Gesamtzellzahl (Abb. 18) sowie die Verteilung der einzelnen Zellfraktionen, insbesondere der Treg, blieben durch die Behandlung weitestgehend unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Allerdings fällt auch hier wieder auf, dass durch die chronische Entzündung Milzgewicht und Gesamtzellzahl tendenziell steigen.

3.2.2 Zweimalige Injektion von TNF80 induziert in naiven Mäusen eine Entzündungsreaktion

Um zu prüfen, ob eine zweimalige TNF80-Behandlung zu einem messbaren Effekt führt, behandelten wir naive Mäuse zweimal mit jeweils 200 μ l TNF80 (c=375 μ g/ml; 75 μ g). Als Vergleich dienten Mäuse, die anstelle von TNF80 mit PBS behandelt wurden (Abb. 19).

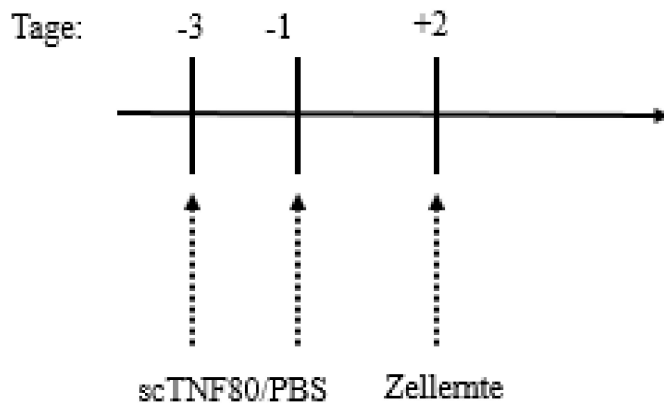


Abbildung 19 | **Behandlungsschema naiver Mäuse.** Die Mäuse wurden an Tag -3 und Tag -1 mit 200 μ l TNF80 (c=375 μ g/ml; 75 μ g) bzw. 200 μ l PBS behandelt. An Tag 2 erfolgten die Zellernte und die anschließende FACS-Analyse.

In Abbildung 20 sind die Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen des Milzgewichts und der Gesamtzellzahl in der Milz mit TNF80 behandelter und nicht behandelter naiver Mäuse dargestellt. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($p > 0,05$). Ähnlich wie eine dreimalige BCG-Vorbehandlung führt die zweimalige Behandlung naiver Mäuse mit TNF80 allerdings tendenziell zu einer Steigerung von Milzgewicht und Gesamtzellzahl. Der relative Anteil der myeloiden Zellen sowie der B- und T-Zellen an der Gesamtzellzahl sowie der Anteil der CD25⁺FoxP3⁺ Treg an allen CD4⁺ Zellen blieb durch die Behandlung weitestgehend unbeeinflusst (Abb. 21), wobei die FoxP3-Expression der CD4⁺ Zellen jedoch etwas erhöht schien.

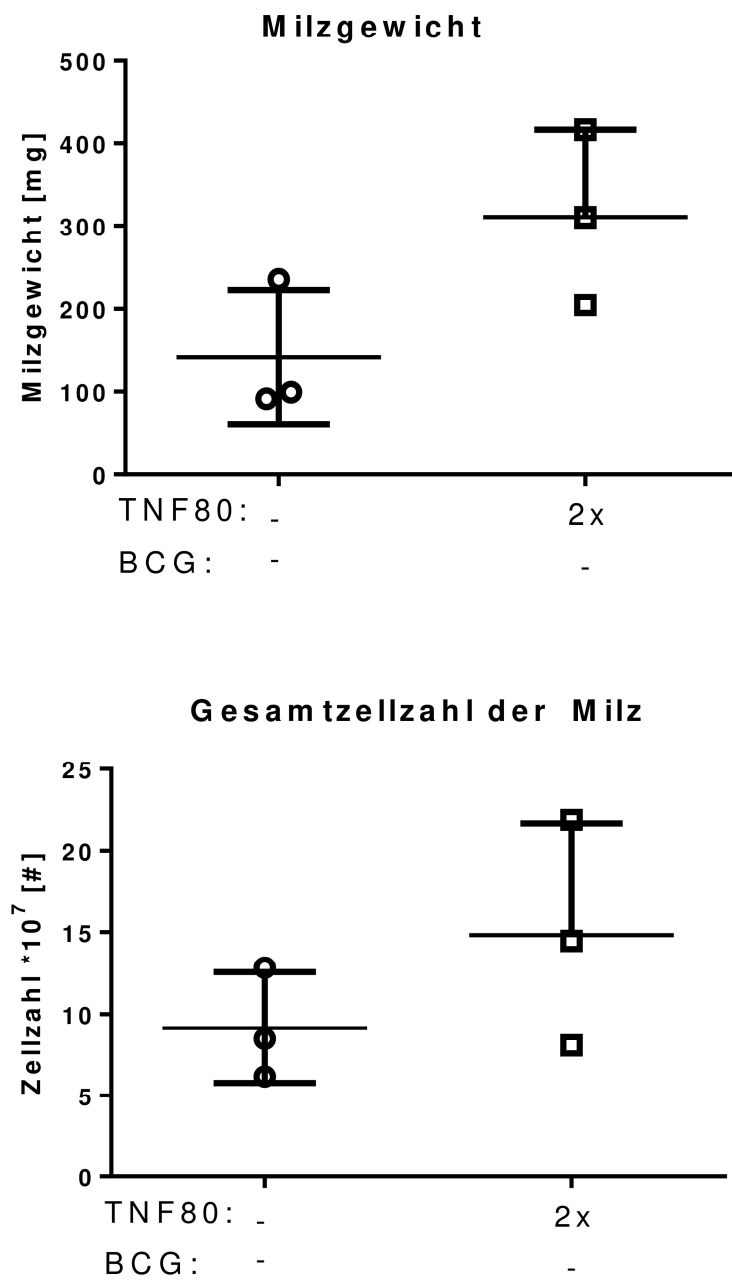


Abbildung 20 | **Milzgewicht und Gesamtzellzahl in der Milz naiver Mäuse.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate mit der zugehörigen Standardabweichung von naiven Mäusen (offene Kreise) bzw. TNF80-behandelter Mäuse (offene Quadrate). Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

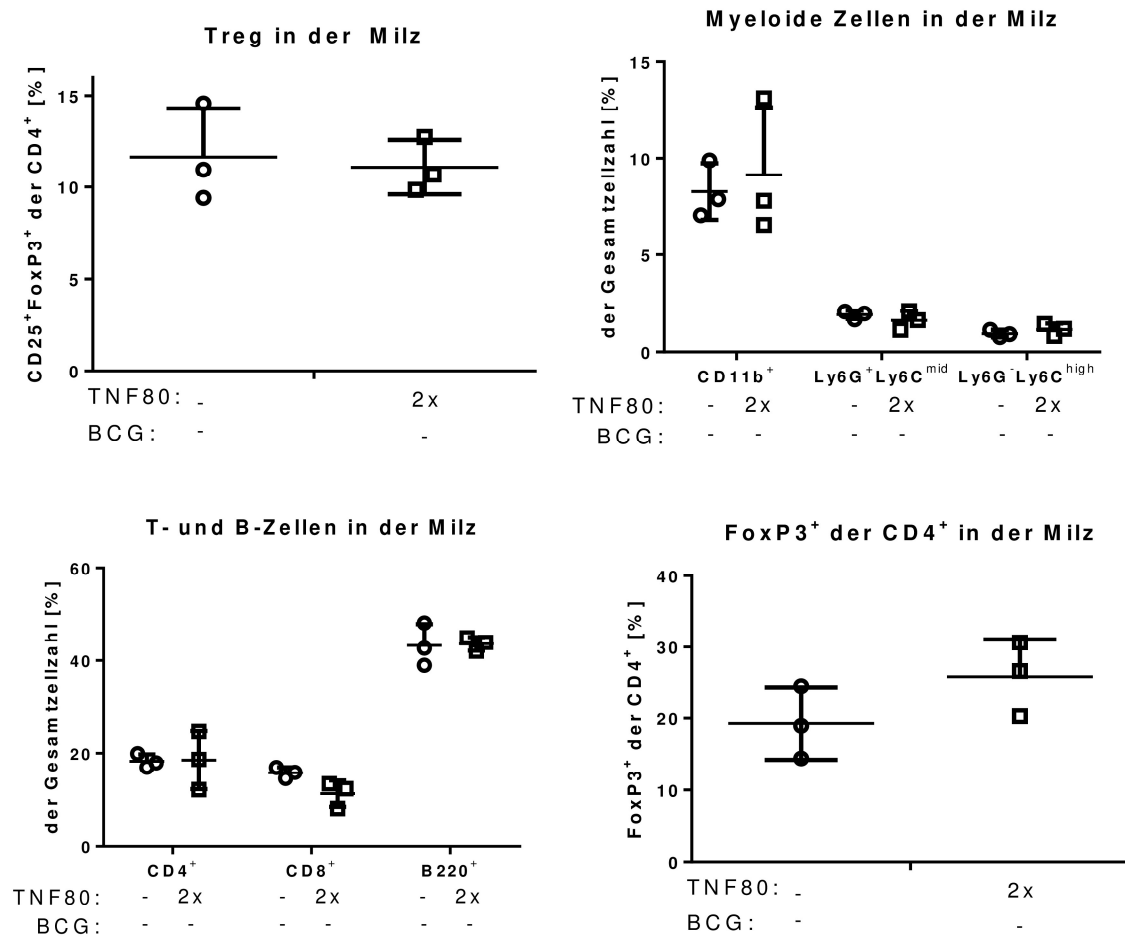


Abbildung 21 | **Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und der T- und B-Zellen an der Gesamtzellzahl in der Milz; prozentualer Anteil der Treg an CD4⁺ T-Zellen naiver Mäuse, prozentualer Anteil FoxP3⁺ Zellen an CD4⁺ T-Zellen naiver Mäuse.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate mit der zugehörigen Standardabweichung von naiven Mäusen (offene Kreise) bzw. TNF80-behandelter Mäuse (offene Quadrate). Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

3.2.3 Zweimalige Injektion von TNF80 induziert Toleranz gegenüber BCG-Challenge

Um die Wirkung der zweimaligen TNF80-Behandlung in akut entzündeten Mäusen zu untersuchen, erhielten die Mäuse in diesem Versuch nach der zweimaligen Behandlung mit TNF80 an Tag 0 eine Injektion von 200 μ l BCG in PBS (c=250 μ g/ml; 50 μ g) (BCG-Challenge). Als Vergleich dienten Mäuse, die anstelle von TNF80 mit PBS behandelt wurden (Abb. 22).

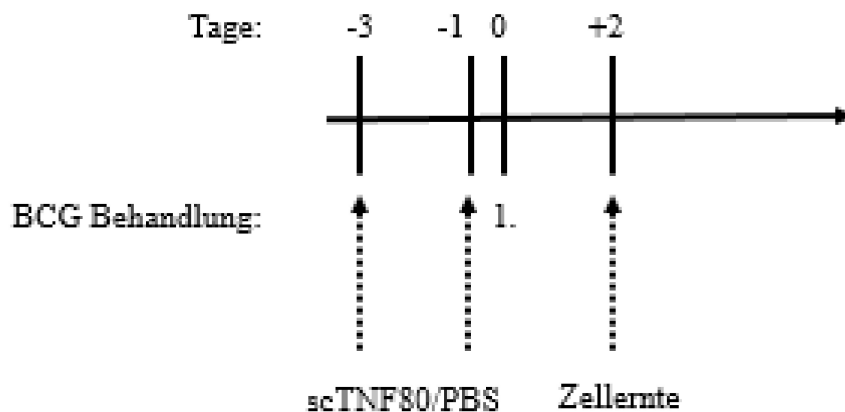


Abbildung 22 | **Behandlungsschema akut entzündeter Mäuse.** Die Mäuse wurden an Tag -3 und Tag -1 mit 200 μ l TNF80 (c=375 μ g/ml; 75 μ g) bzw. 200 μ l PBS behandelt. An Tag 0 wurden 200 μ l BCG in PBS (c=250 μ g/ml; 50 μ g) injiziert. An Tag 2 erfolgten die Zellernte und die anschließende FACS-Analyse.

Abbildung 23 zeigt die Mittelwerte des Milzgewichts und der Gesamtzellzahl in der Milz mit zugehöriger Standardabweichung.

Mäuse, die keine Vorbehandlung erhielten und einmalig mit BCG stimuliert wurden, reagierten mit einer Zunahme des Milzgewichtes und einem Anstieg der Gesamtzellzahl in der Milz. Erfolgte hingegen eine zweimalige Behandlung mit TNF80 vor der BCG-Challenge, so zeigen sich normale Milzgewichte und Gesamtzellzahlen in der Milz ähnlich derer in naiven Mäusen. Diese Beobachtungen sind jedoch nicht statistisch signifikant.

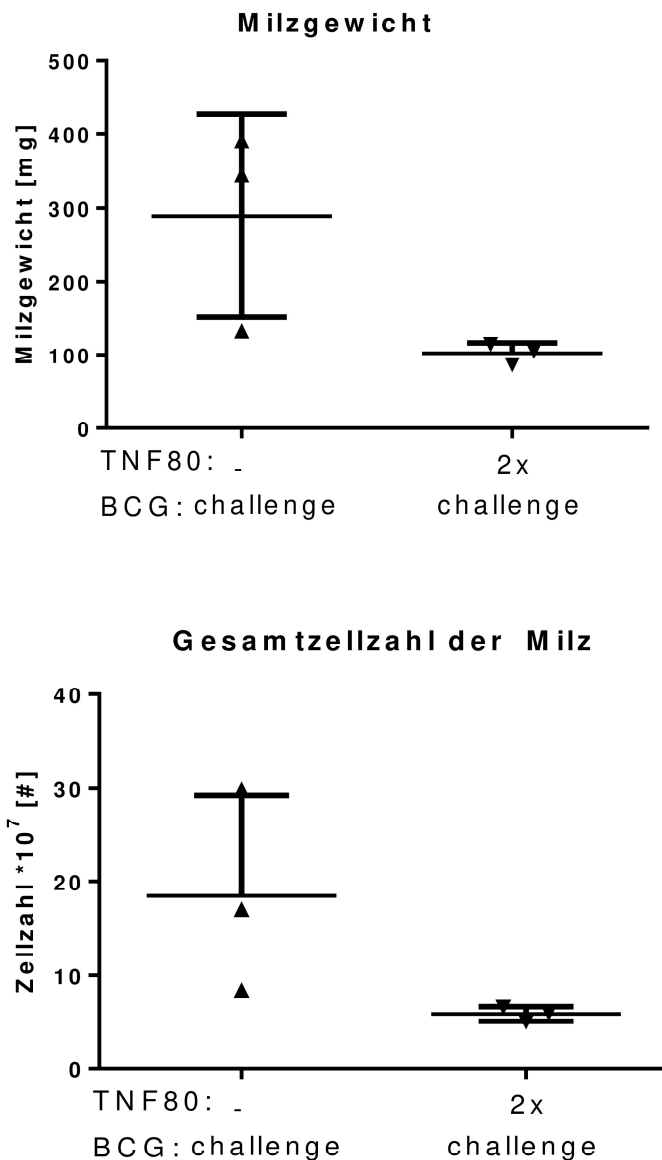


Abbildung 23 | **Milzgewicht und Gesamtzellzahl in der Milz von Mäusen nach BCG-Challenge.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate mit der zugehörigen Standardabweichung von BCG-Challenge-Mäusen ohne (nach oben weisende Pfeile) bzw. mit TNF80-Behandlung (nach unten weisende Pfeile). Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

In der Verteilung der Zellpopulationen (myeloide Zellen, T- und B-Lymphozyten) zeigt sich kein Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten akut entzündeten Mäusen. Sie ähnelt der Zellverteilung in naiven Mäusen (Daten nicht gezeigt).

Die Wirkung der *BCG-Challenge* erinnert an die Effekte einer TNF80-Behandlung in naiven Mäusen. Durch den Stimulus wird auch hier eine akute Entzündung herbeigeführt. Eine zweimalige Vorbehandlung mit TNF80 scheint jedoch zusätzlich eine Toleranz gegenüber der *BCG-Challenge* zu induzieren.

3.2.4 Zweimalige Injektion von TNF80 führt in chronischer Entzündung zur Expansion von Treg

Wir prüften den Einfluss der zweimaligen TNF80-Behandlung auf Mäuse, in denen durch das BCG-Entzündungsmodell eine chronische Entzündung induziert worden war (BCG-Mäuse). Als Vergleich dienten Mäuse, die anstelle von TNF80 mit PBS behandelt wurden (Abb. 24).

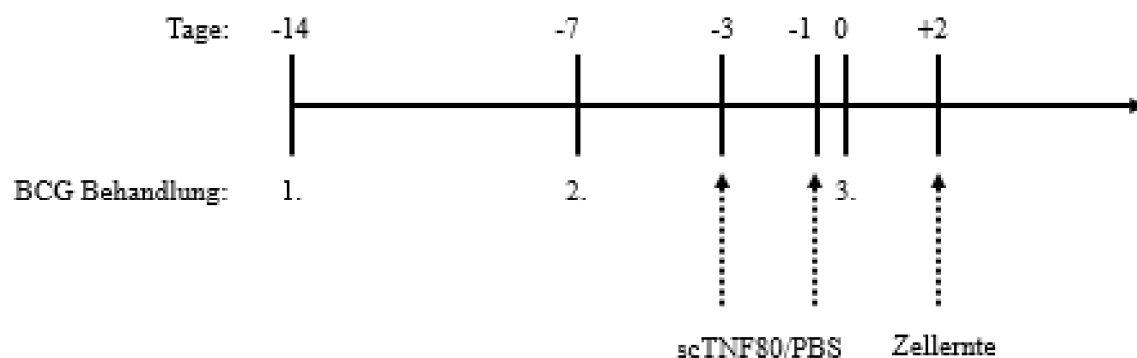


Abbildung 24 | **Behandlungsschema chronisch entzündeter BCG-Mäuse.** Die Mäuse erhielten an -14 und Tag -7 je eine subkutane Injektion von 200 μ l BCG in IFA (c=250 μ g/ml; 50 μ g). An Tag 0 wurden 200 μ l BCG in PBS (c=250 μ g/ml; 50 μ g) injiziert. An Tag -3 und Tag -1 wurde mit 200 μ l TNF80 (c=375 μ g/ml; 75 μ g) bzw. 200 μ l PBS behandelt. An Tag 2 erfolgten die Zellernte und die anschließende FACS-Analyse.

In chronisch entzündeten BCG-Mäusen hatte die zweimalige Behandlung mit TNF80 keinen relevanten über den BCG-Effekt hinausgehenden Einfluss auf Milzgewicht oder Gesamtzellzahl in der Milz. Die zuvor bereits beschriebene Expansion der myeloiden Zellen naiver Mäuse durch das BCG-Entzündungsmodell (s. 3.1.1) ist auch hier zu sehen, war jedoch in Mäusen, die mit TNF80 behandelt worden waren, nicht so stark ausgeprägt. Dieser augenscheinliche Unterschied im Anteil myeloider Zellen ist nicht statistisch signifikant. Die zweimalige TNF80-Behandlung führte zudem zu einem leichten, aber nicht signifikanten, Anstieg der T- und B-Zellen im Vergleich zu unbehandelten chronisch entzündeten Mäusen (Abb. 25).

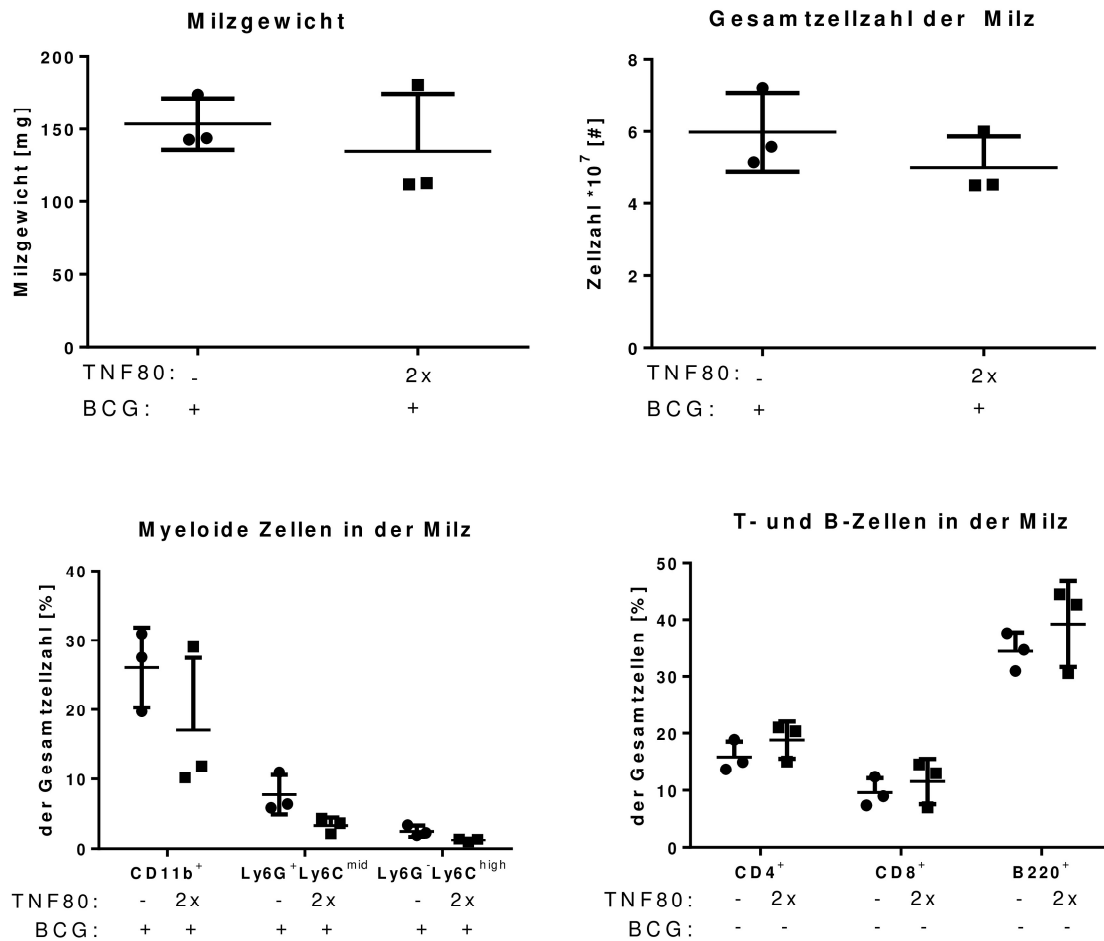


Abbildung 25 | **Milzgewicht und Gesamtzellzahl in der Milz; prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und der T- und B-Zellen an der Gesamtzellzahl in der Milz der BCG-Mäuse.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von BCG-Mäusen ohne (gefüllte Kreise) bzw. mit TNF80-Behandlung (gefüllte Quadrate) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

In Abbildung 26 ist der prozentuale Anteil CD25⁺FoxP3⁺ Treg an den CD4⁺ T-Lymphozyten sowie an allen Milzzellen dargestellt. Die zweimalige Behandlung der BCG-Mäuse mit TNF80 führte zu einer deutlichen, aber nicht signifikanten Expansion der CD25⁺FoxP3⁺ Treg innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Population sowie erstmalig zu einer signifikanten Expansion der Treg-Fraktion bezogen auf die Gesamtzellzahl in der Milz ($p < 0,05$).

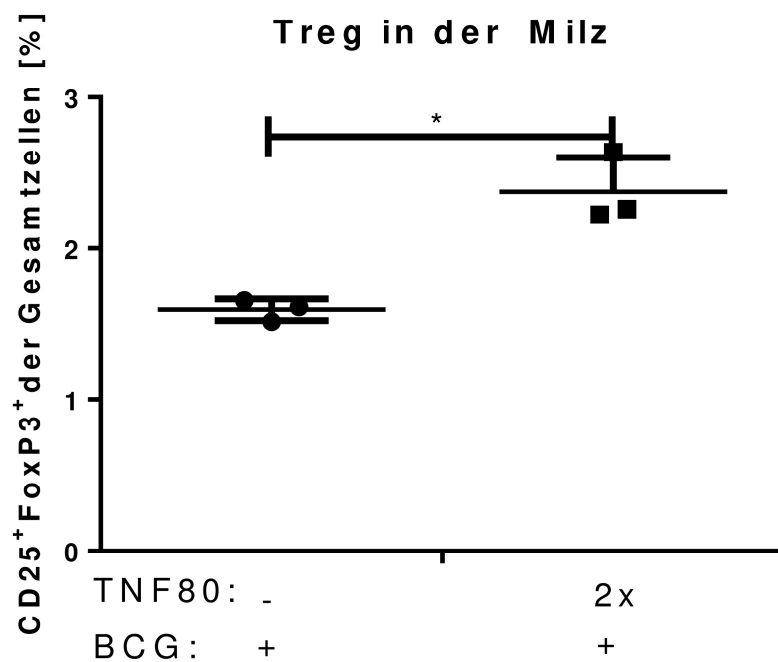
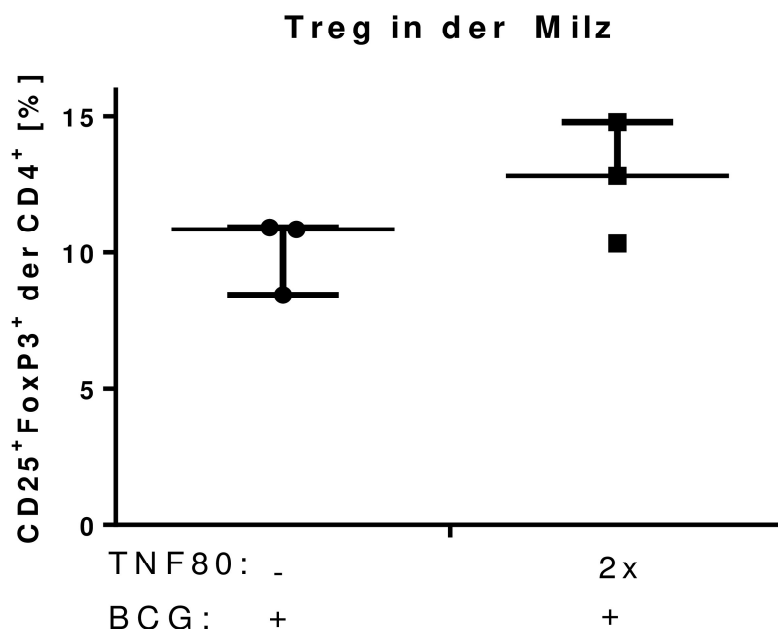


Abbildung 26 | **Prozentualer Anteil der Treg an CD4⁺ Zellen und an der Gesamtzellzahl in der Milz der BCG-Mäuse.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von BCG-Mäusen ohne (gefüllte Kreise) bzw. mit TNF80-Behandlung (gefüllte Quadrate) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

3.3 TNF80-Toleranz

3.3.1 TNF80 induziert Toleranz gegenüber LPS-Challenge

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Wirkung einer intraperitonealen TNF80-Injektion auf die Konzentration von biologisch aktivem TNF im Serum zu bestimmen. Da TNF-Serumkonzentrationen wegen einer möglichen Kreuzreaktion von appliziertem TNF80 mit anti-TNF-Antikörpern nicht im ELISA gemessen werden konnten, wurde zur endogenen TNF-Quantifizierung der L929-Zell-Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Die Auswertung des L929-Zell-Zytotoxizitätsassays erfolgte auf zwei Wegen. Zum einen wurden an Tag 2 zunächst lichtmikroskopisch diejenigen Kulturen identifiziert, bei denen visuell annähernd ein 50:50 Verhältnis von lebenden zu toten Zellen vorlag (halbmaximaler Kill = LD50). Die TNF-Konzentration, die in dem Well des halbmaximalen Kills des mTNF Standards vorlag, wurde gleich der TNF-Konzentration in den jeweiligen Kulturen gesetzt. Anhand der jeweiligen Verdünnungen wurde die entsprechende TNF-Serumkonzentration ermittelt. Zum anderen wurden die Konzentrationen photometrisch bestimmt. An Tag 3 wurde die Absorption der einzelnen Kulturen gemessen, anhand des mTNF Standards eine Standardkurve errechnet und anhand dieser Standardkurve die TNF-Konzentration ermittelt.

3.3.2 Einmalige Behandlung mit TNF80

In einem ersten Versuch wurden drei Experimentalgruppen an Tag -2 mit 75 µg TNF80 bzw. mit PBS behandelt. An Tag 0 erfolgte die retrobulbäre Blutentnahme. Um die TNF-Produktion anzuregen, wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von 10 µg LPS (Lipopolysaccharid) 90 min vor der Blutentnahme stimuliert (*LPS-Challenge*). Wir verglichen naive Mäuse, Mäuse, die nur mit LPS stimuliert wurden und eine dritte Gruppe, die zwei BCG-Injektionen und eine LPS-Injektion erhielt (BCG-Mäuse) (Abb. 27).

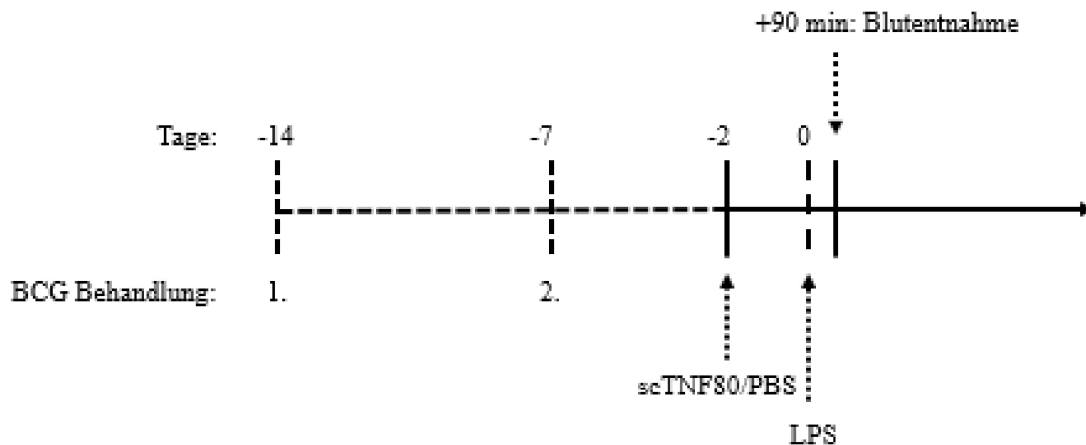


Abbildung 27 | **Behandlungsschema naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse.** Die Mäuse wurden an Tag -2 mit 200 μ l TNF80 ($c=375 \mu\text{g/ml}$; $75 \mu\text{g}$) bzw. 200 μ l PBS behandelt. Die erste Gruppe erhielt keine weiteren Injektionen. Gruppe 2 und Gruppe 3 wurden an Tag 0 intraperitoneal mit $10 \mu\text{g}$ / 200 μ l LPS stimuliert. Gruppe 3 erhielt zusätzlich zur LPS-Stimulierung an Tag -14 und Tag -7 je eine subkutane Injektion von 200 μ l BCG in IFA ($c=250 \mu\text{g/ml}$; $50 \mu\text{g}$). 90 min nach der LPS-Injektion erfolgte die retrobulbäre Blutentnahme.

Abbildung 28 zeigt die photometrisch bestimmte TNF-Konzentration im Serum der jeweiligen Versuchsgruppen in $[\text{pg/ml}]$. In naiven Mäusen ohne LPS-Challenge konnte unabhängig von der Behandlung durch TNF80 oder PBS kein TNF im Serum nachgewiesen werden. Die Stimulation mit LPS (LPS-Challenge), entsprechend einem akuten Entzündungsreiz, bewirkte in naiven Mäusen einen Anstieg der TNF-Produktion, die durch die vorausgegangene TNF80-Behandlung wieder reduziert werden konnte. In Mäusen, die zusätzlich zur LPS-Challenge im Sinne einer chronischen Entzündung mit BCG stimuliert worden waren (BCG-Mäuse), zeigt sich ebenfalls eine Reduktion der TNF-Konzentration nach Behandlung mit TNF80. Diese Reduktion erinnert an die „LPS-Toleranz“, die durch die Hyporeagibilität auf eine LPS-Stimulation gekennzeichnet ist [65]. Eine vorausgehende TNF80-Behandlung mindert die Empfindlichkeit der Mäuse auf die spätere LPS-Stimulierung, macht sie also toleranter. Diese Beobachtung bezeichneten wir als TNF80-Toleranz. In beiden Fällen war die Reduktion jedoch statistisch nicht signifikant ($p>0,05$).

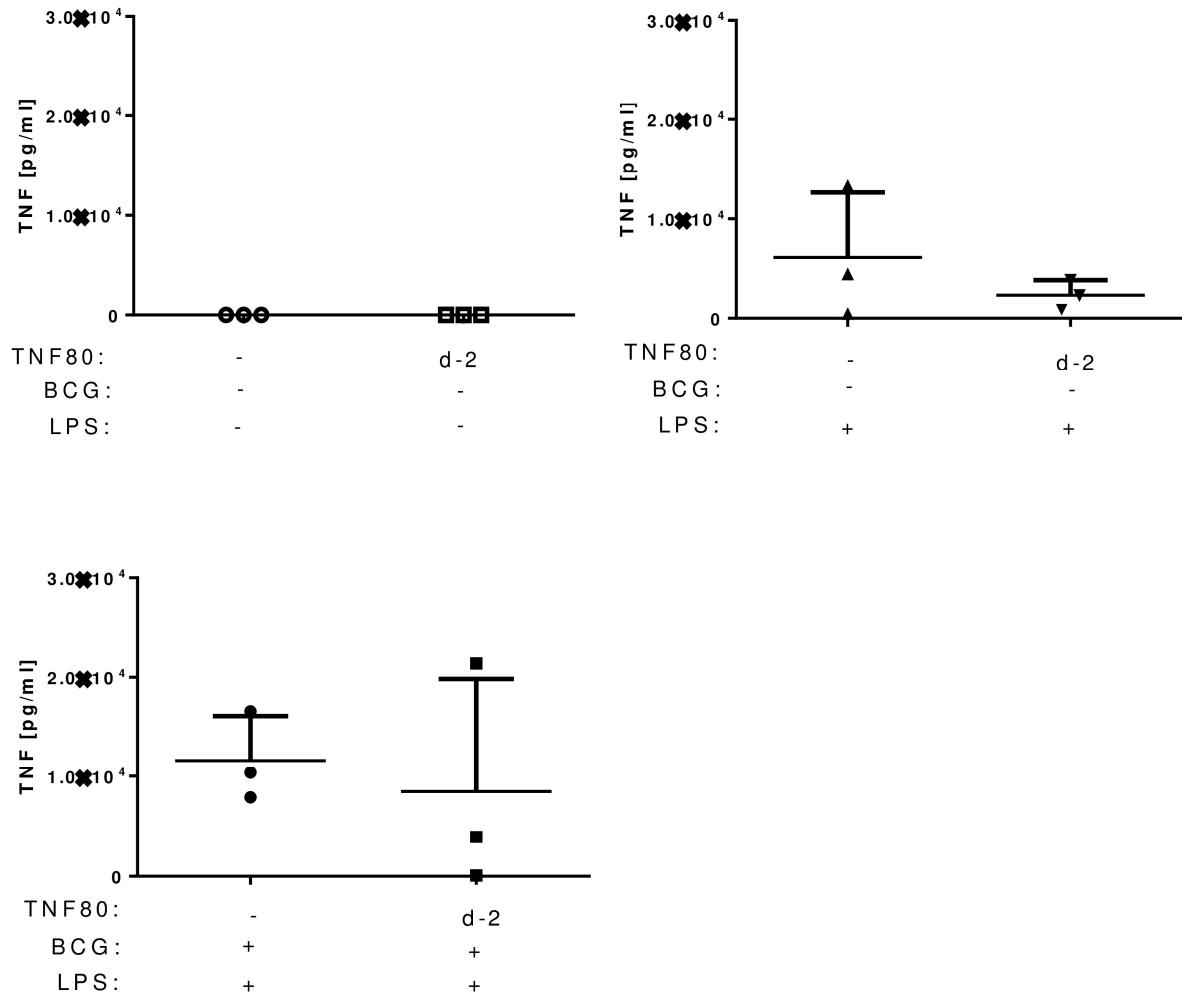


Abbildung 28 | **Mittels Standardkurve ermittelte TNF-Serumkonzentrationen naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von naiven unbehandelten Mäusen (offene Kreise) bzw. naiven TNF80-behandelten Mäusen (offene Quadrate), LPS-Challenge-Mäusen ohne (nach oben weisende Pfeile) bzw. mit TNF80-Behandlung (nach unten weisende Pfeile) und BCG-Mäusen ohne (gefüllte Kreise) bzw. mit TNF80-Behandlung (gefüllte Quadrate) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der Welch-Test verwendet.

Abbildung 29 zeigt die Mittelwerte der mittels LD50 bestimmten TNF-Serumkonzentration naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse mit und ohne einmalige TNF80-Behandlung. Es fällt auf, dass hier eine TNF80-Behandlung vor der LPS-Challenge zu einem tendenziellen Anstieg des Mittelwertes der TNF-Konzentration im Serum führte. Jedoch findet sich hier eine sehr große Standardabweichung aufgrund eines starken Ausreißers innerhalb der mit TNF80 behandelten Gruppe. Dieser Ausreißer kann in der Auswertung mittels Standardkurve nicht nachvollzogen werden. Ebenso wie in der anderen Auswertung zeigt sich eine tendenzielle Reduktion der TNF-Serumkonzentration chronisch entzündeter BCG-Mäuse, die mit TNF80 behandelt worden waren.

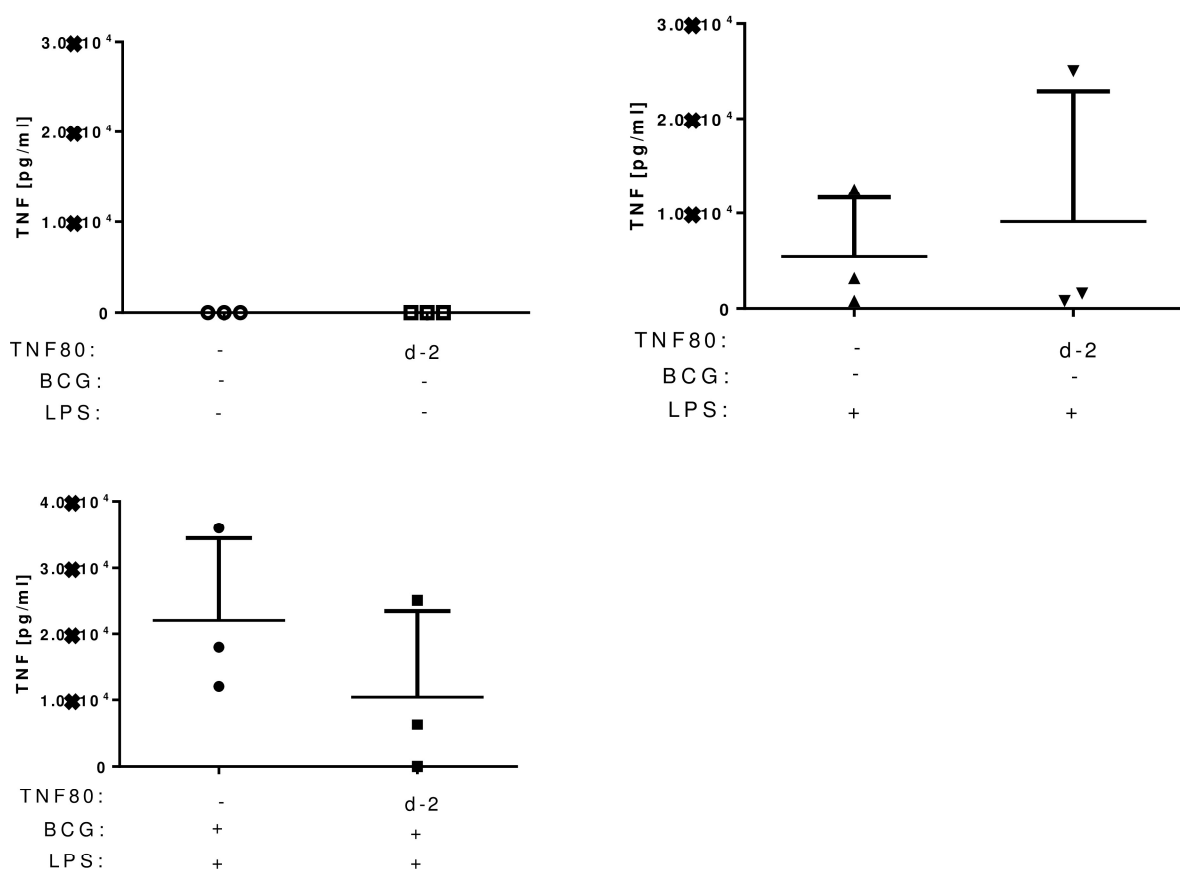


Abbildung 29 | **Mittels LD50 ermittelte TNF-Serumkonzentrationen naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier biologischer Replikate von naiven unbehandelten Mäusen (offene Kreise) bzw. naiven TNF80-behandelten Mäusen (offene Quadrate), LPS-Challenge-Mäusen ohne (nach oben weisende Pfeile) bzw. mit TNF80-Behandlung (nach unten weisende Pfeile) und BCG-Mäusen ohne (gefüllte Kreise) bzw. mit TNF80-Behandlung (gefüllte Quadrate) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der Welch-Test verwendet.

3.3.3 Zweimalige Behandlung mit TNF80

Wir untersuchten zudem die Wirkung einer zweimaligen TNF80-Behandlung auf die endogene TNF-Serumkonzentration. Hierzu behandelten wir 2 Versuchsgruppen an Tag -3 und Tag -1 mit jeweils 75 μg TNF80 bzw. mit PBS. An Tag 0 erfolgte die Stimulierung mit 10 μg LPS. Wir verglichen Mäuse, die nur mit LPS stimuliert wurden (*LPS-Challenge*), und eine zweite Gruppe, die zwei BCG-Injektionen und eine LPS-Injektion erhielt (BCG-Mäuse) (Abb. 30).

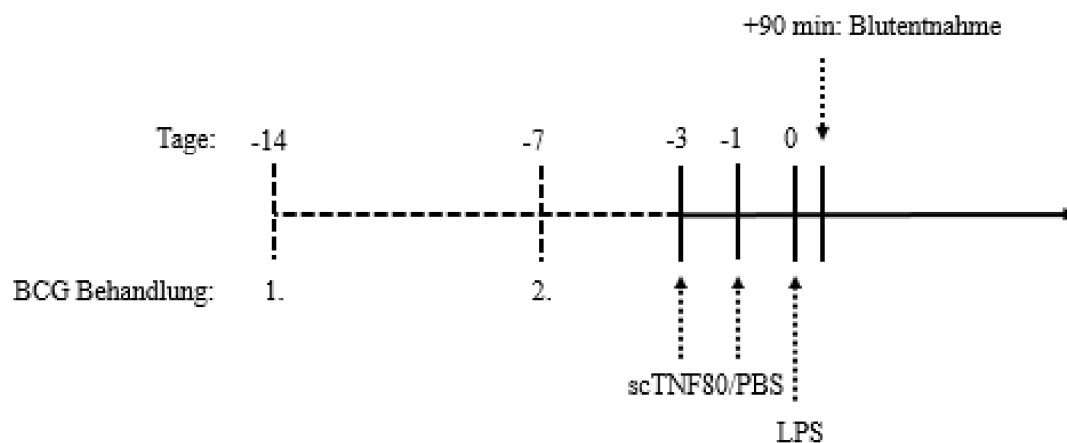


Abbildung 30 | **Behandlungsschema akut und chronisch entzündeter Mäuse.** Die Mäuse wurden an Tag -3 und Tag -1 mit jeweils 200 μl TNF80 ($c=375 \mu\text{g/ml}$; 75 μg) bzw. 200 μl PBS behandelt. Beide Gruppen wurden an Tag 0 intraperitoneal mit 10 μg / 200 μl LPS stimuliert. Gruppe 2 erhielt zusätzlich zur LPS-Stimulierung an Tag -14 und Tag -7 je eine subkutane Injektion von 200 μl BCG in IFA ($c=250 \mu\text{g/ml}$; 50 μg). 90 min nach der LPS-Injektion erfolgte die retrobulbäre Blutentnahme.

Auch nach zweimaliger Behandlung mit TNF80 zeigt sich in der photometrischen Auswertung mittels Standardkurve eine tendenzielle, wenn auch wieder nicht signifikante Reduktion der TNF-Serumkonzentration, sowohl bei alleiniger LPS-Stimulierung (*LPS-Challenge*) als auch bei *LPS-Challenge* mit vorausgegangener BCG-Behandlung (BCG-Mäuse) (Abb. 31). Bei Auswertung mittels LD50 fiel die Reduktion in der *LPS-Challenge* Gruppe statistisch signifikant aus ($p<0,01$) (Abb. 32).

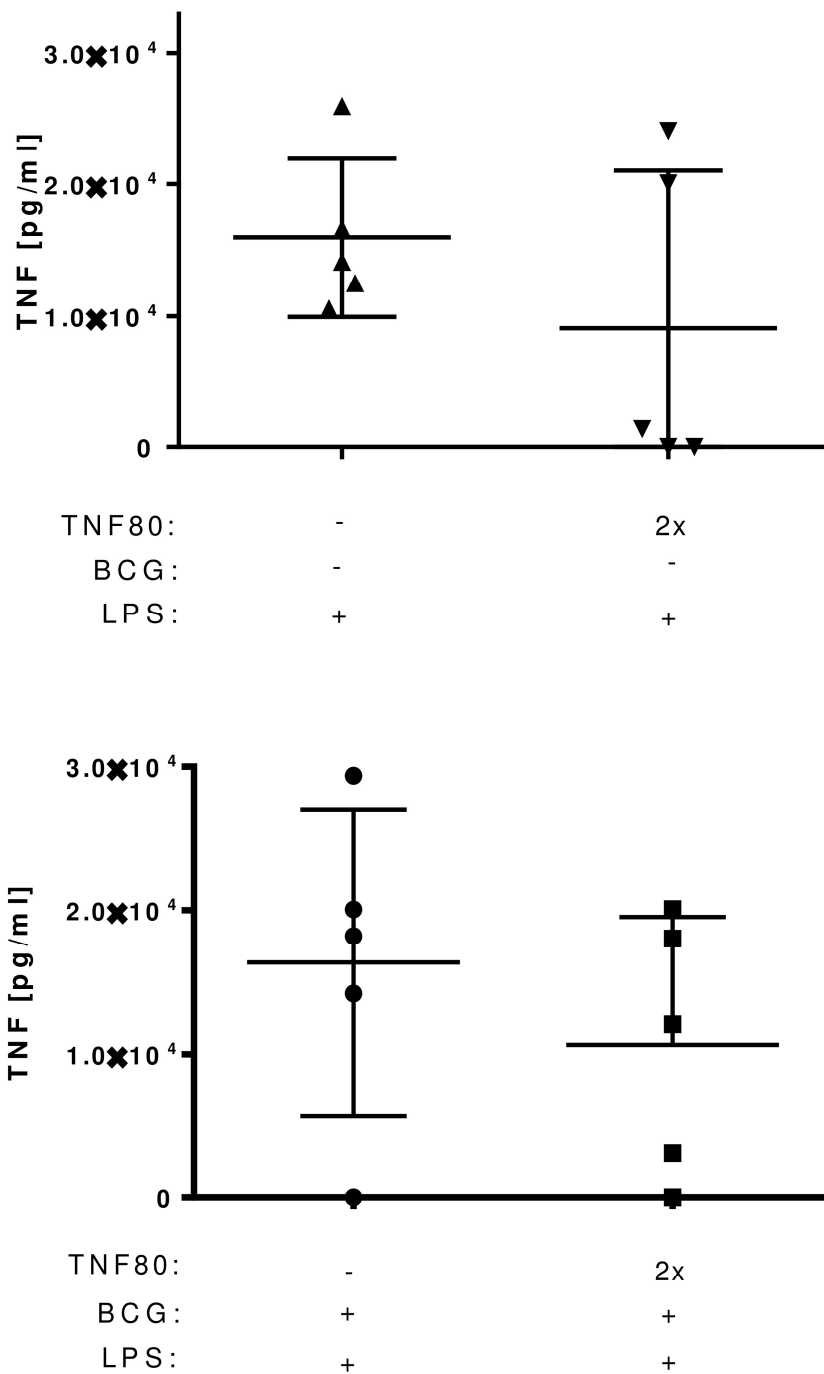


Abbildung 31 | **Mittels Standardkurve errechnete TNF-Serumkonzentrationen akut und chronisch entzündeter Mäuse.** Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf biologischen Replikaten mit der zugehörigen Standardabweichung von LPS-Challenge-Mäusen ohne (nach oben weisende Pfeile) bzw. mit TNF80-Behandlung (nach unten weisende Pfeile) und von BCG-Mäusen ohne (gefüllte Kreise) bzw. mit (gefüllte Quadrate) TNF80-Behandlung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

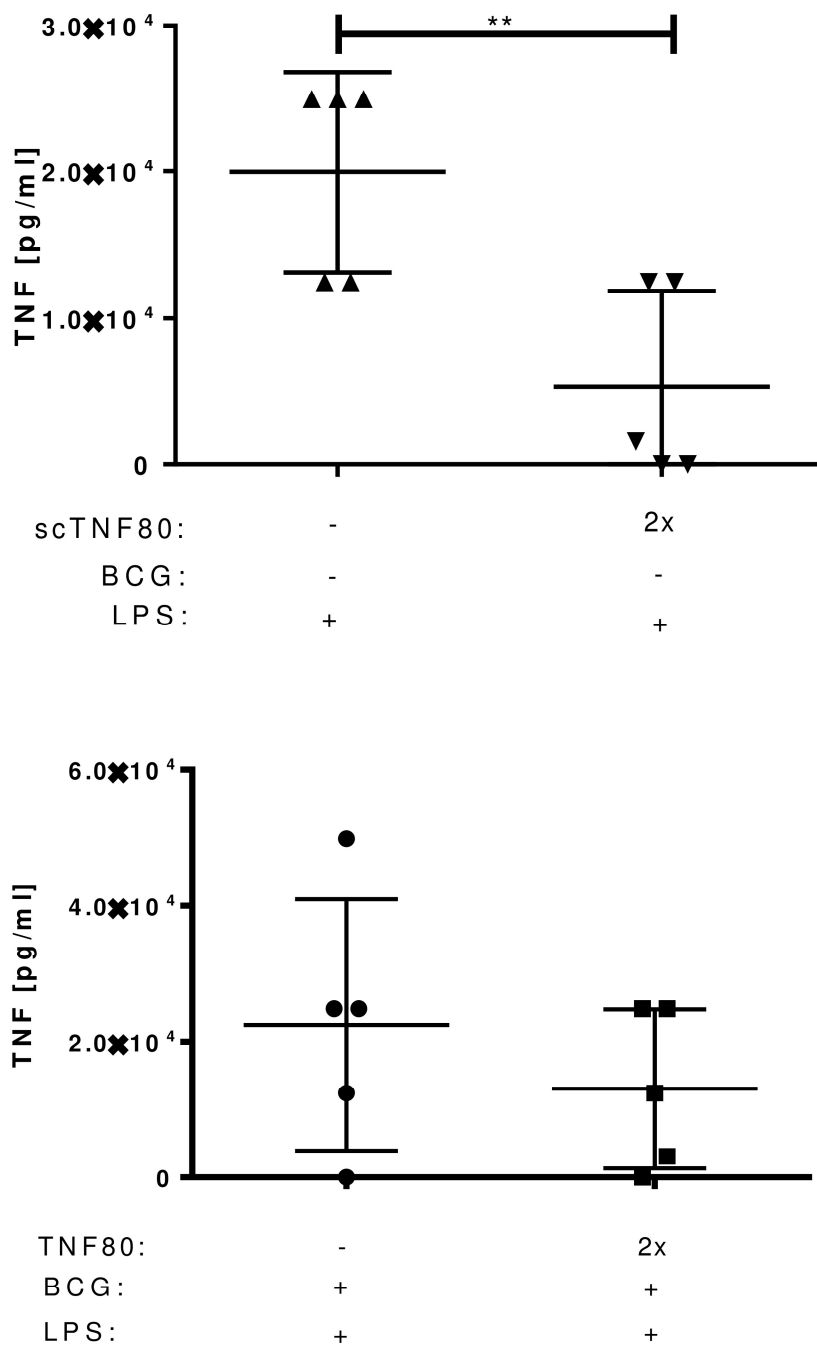


Abbildung 32 | **Mittels LD50 errechnete TNF-Serumkonzentrationen akut und chronisch entzündeter Mäuse.** Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf biologischen Replikaten mit der zugehörigen Standardabweichung von LPS-Challenge-Mäusen ohne (nach oben weisende Pfeile) bzw. mit TNF80-Behandlung (nach unten weisende Pfeile) und von BCG-Mäusen ohne (gefüllte Kreise) bzw. mit (gefüllte Quadrate) TNF80-Behandlung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

3.3.4 Behandlung mit TNF80 erniedrigt IL-10 Konzentration im Serum nach LPS-Challenge

Die Rolle von IL-10 in der Entstehung der oben genannten LPS-Toleranz ist nicht eindeutig geklärt [65]. Um zu prüfen, ob ein Anstieg der IL-10 Produktion womöglich einen Mechanismus der TNF80-Toleranz darstellt, untersuchten wir mittels ELISA die IL-10 Konzentration im Serum, das 90 min nach LPS-Challenge gewonnen wurde. Wir verglichen naive Mäuse, die mit PBS oder ein bzw. zwei Mal mit TNF80 behandelt wurden und chronisch entzündete BCG-Mäuse, die mit PBS bzw. zweimal mit TNF80 behandelt wurden. Alle Mäuse erhielten 90 min vor Blutentnahme eine intraperitoneale Injektion von 10 µg/200 µl LPS.

Es zeigt sich eine teils signifikant ausfallende Erniedrigung der IL-10 Serumkonzentration aller mit TNF80 behandelten Mäuse im Vergleich zur entsprechenden unbehandelten Gruppe (Abb. 33).

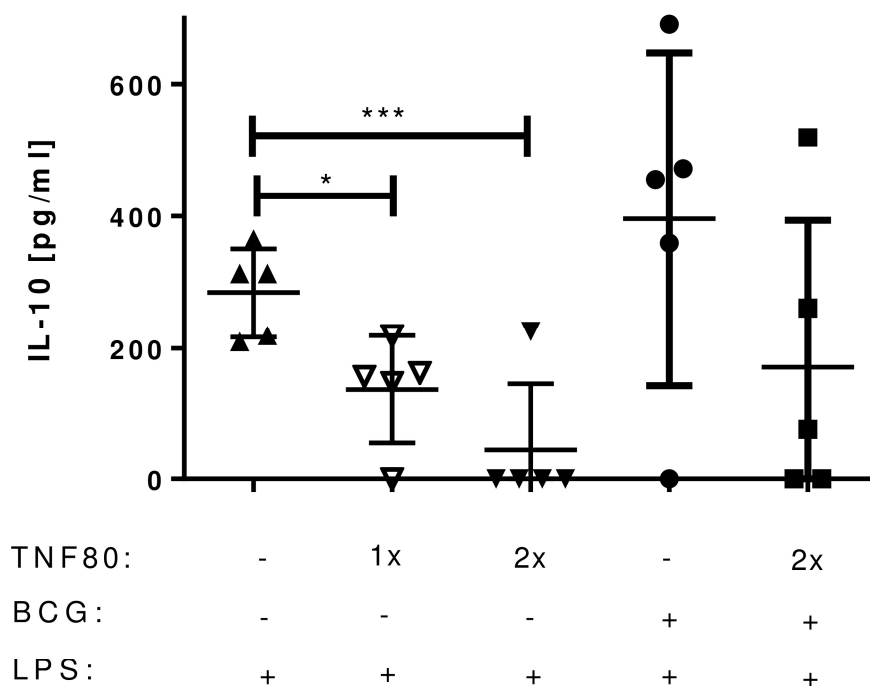


Abbildung 33 | **IL-10 Serumkonzentration naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse mit und ohne TNF80-Behandlung.** Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf biologischen Replikaten mit der zugehörigen Standardabweichung von LPS-Challenge-Mäusen ohne (nach oben weisende Pfeile) bzw. mit einmaliger (leere nach unten weisende Pfeile) und zweimaliger (gefüllte nach unten weisende Pfeile) TNF80-Behandlung und von BCG-Mäusen ohne (gefüllte Kreise) bzw. mit (gefüllte Quadrate) zweimaliger TNF80-Behandlung. Zur statistischen Analyse wurde die *Two-Way-ANOVA* verwendet.

3.3.5 Toleranz ist nicht sicher auf TNF80 zurückzuführen

Um sicherzustellen, dass der Effekt der TNF80-Toleranz auf die TNF80-Behandlung zurückzuführen ist und nicht aufgrund einer möglichen Verunreinigung mit LPS auftritt, führten wir einen entsprechenden Versuch mit hitzeinaktiviertem TNF80 durch. Das Protein TNF80 denaturiert bei Hitzezufuhr und wird damit inaktiv. Das Lipopolysaccharid LPS hingegen ist hitzestabil und kann weiterhin als Stimulus wirken.

Wir untersuchten drei Versuchsgruppen. Die Mäuse wurden an Tag -3 und Tag -1 jeweils mit 75 µg TNF80, mit 75 µg hitzeinaktiviertem TNF80 oder mit PBS behandelt. An Tag 0 erfolgte die Stimulierung mit 10 µg LPS. Um das TNF80 zu inaktivieren, kochten wir es für 30 min bei 95° C.

In Abbildung 34 sind die Mittelwerte der photometrisch bzw. mittels LD50 bestimmten TNF-Serumkonzentration mit der jeweiligen Standardabweichung als Punktdiagramm dargestellt. Die linke Gruppe erhielt PBS, die mittlere Gruppe TNF80 und die rechte Gruppe hitzeinaktiviertes TNF80 intraperitoneal injiziert.

Wieder zeigt sich nach TNF80-Behandlung eine Erniedrigung der TNF-Serumkonzentration, die jetzt statistisch signifikant ausfällt ($p < 0,001$). Die Injektion von hitzeinaktiviertem TNF80 hingegen brachte keine signifikante Reduktion der TNF-Serumlevel. Hier ähnelt die TNF-Konzentration der Konzentration in unbehandelten Mäusen, wobei die Streuung der Einzelwerte sehr groß ist. Es fällt daher schwer, dieses Ergebnis eindeutig zu interpretieren. Eine Kontamination des TNF80 mit LPS ist nicht sicher auszuschließen.

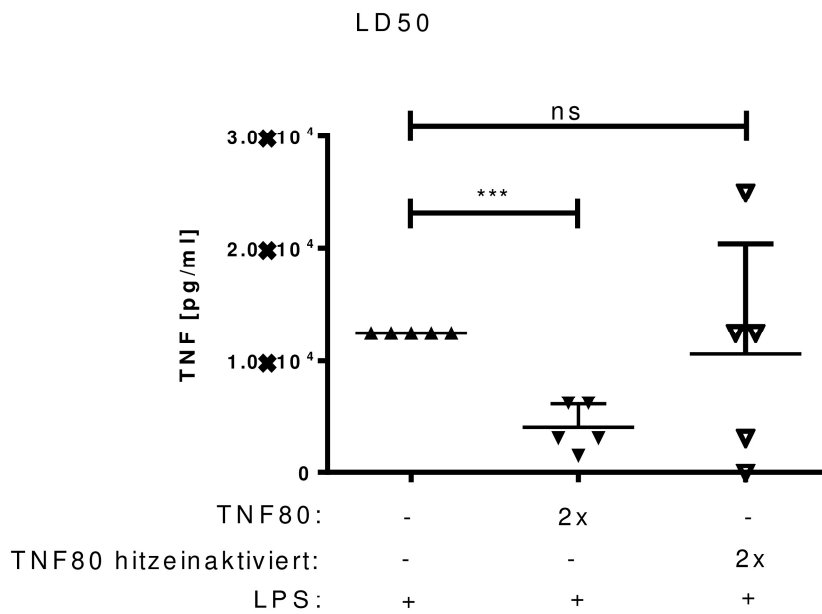
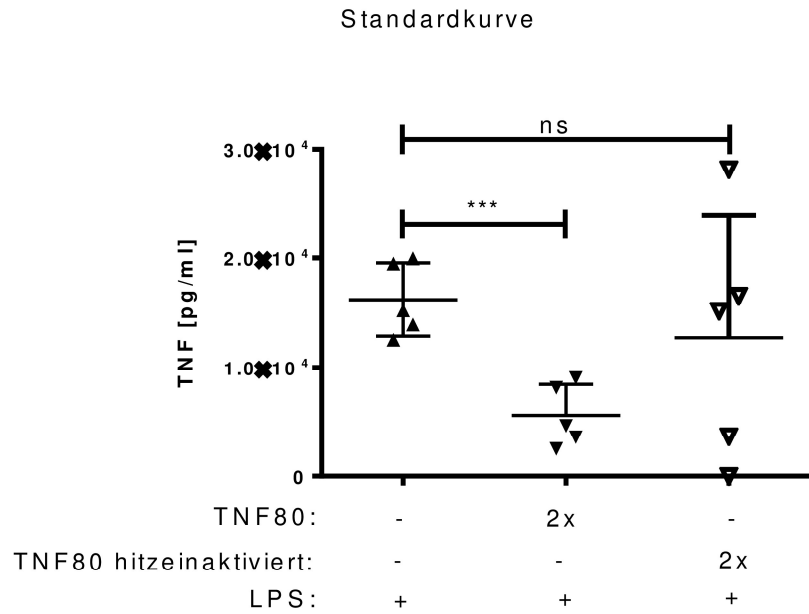


Abbildung 34 | **Mittels Standardkurve bzw. LD50 errechnete TNF-Serumkonzentration akut entzündeter Mäuse nach PBS bzw. TNF80 bzw. hitzeinaktiviertem TNF80.** Die Mäuse wurden an Tag -3 und Tag -1 mit jeweils 200 µl TNF80 (c=375 µg/ml; 75 µg), 200 µl hitzeinaktiviertem TNF80 (c=375 µg/ml; 75 µg) oder 200 µl PBS behandelt. Alle Mäuse wurden an Tag 0 intraperitoneal mit 10 µg / 200 µl LPS stimuliert. 90 min nach der LPS-Injektion erfolgte die retrobulbäre Blutentnahme. Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf biologischen Replikaten mit Standardabweichung von LPS-Challenge-Mäusen ohne (nach oben weisende gefüllte Pfeile) bzw. mit TNF80-Behandlung (nach unten weisende gefüllte Pfeile) bzw. mit Behandlung durch hitzeinaktiviertes TNF80 (nach unten weisende leere Pfeile). Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

3.4 Suppressive Wirkung der Treg

In diesem Versuch prüften wir die suppressiven Eigenschaften der Treg chronisch entzündeter BCG-Mäuse auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in Abhängigkeit einer Behandlung mit TNF80.

Die Mäuse erhielten drei BCG-Injektionen und eine bzw. zwei TNF80-Injektionen. An Tag 2 wurden Milzzellen steril gewonnen und Treg mittels MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) isoliert. Die Treg wurden in verschiedenen Verdünnungen mit Milzzellen einer CD45.1 Maus für drei Tage koinkubiert und das Zellgemisch mit anti-CD3 und anti-CD28 bzw. nur anti-CD3 stimuliert. Das Zellgemisch wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der Anzahl an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen analysiert.

Des Weiteren untersuchten wir die Überstände der Zellgemische mit ELISA bezüglich der Konzentration von Interleukin 10 (IL-10), dessen Sekretion einen bedeutenden Suppressionsmechanismus der Treg darstellt [8].

3.4.1 Einmalige Behandlung mit TNF80 steigert Treg-Suppressivität

Wir betrachteten den Effekt einer einmaligen TNF80-Behandlung in chronisch entzündeten BCG-Mäusen. Zum Vergleich dienten BCG-Mäuse, die mit PBS behandelt wurden, und naive Mäuse (Abb. 35). Die Proliferation mit anti-CD3 und anti-CD28 stimulierter Milzzellen der CD45.1 Maus in Abwesenheit von Treg wurde gleich 100% gesetzt (stimulierte Kontrolle).

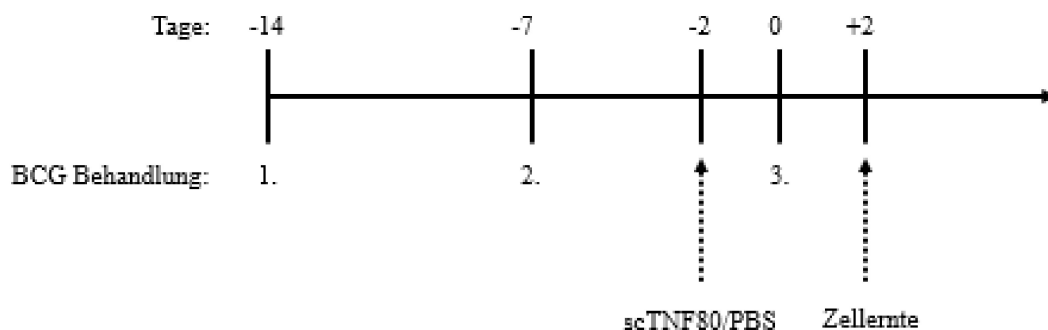


Abbildung 35 | **Behandlungsmodell chronisch entzündeter BCG-Mäuse.** Die Mäuse erhielten an -14 und Tag -7 je eine subkutane Injektion von 200 μ l BCG in IFA ($c=250 \mu\text{g/ml}$; 50 μg). An Tag 0 wurden 200 μ l BCG in PBS ($c=250 \mu\text{g/ml}$; 50 μg) injiziert. An Tag -2 wurde mit 200 μ l TNF80 ($c=375 \mu\text{g/ml}$; 75 μg) bzw. 200 μ l PBS behandelt. An Tag 2 erfolgten die Zellernte und die Treg-Isolierung mittels MACS. Die Treg wurden im Anschluss in einem T-Zell-Suppressionsassay untersucht.

Abbildung 36 zeigt die Proliferation der $CD4^+$ respektive der $CD8^+$ T-Lymphozyten in % der Proliferation der stimulierten Kontrolle.

Es findet sich kein signifikanter Unterschied in der relativen Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen ($p > 0,05$), jedoch führte die einmalige Behandlung mit TNF80 tendenziell zu einer verminderten Proliferation im Sinne einer stärkeren suppressiven Wirkung der Treg. Zwischen naiven Mäusen und chronisch entzündeten BCG-Mäusen, die keine TNF80-Behandlung erhielten, findet sich kein signifikanter Unterschied.

Betrachtet man die relative Proliferation der $CD8^+$ T-Lymphozyten, so scheint die chronische Entzündung in BCG-Mäusen ohne TNF80-Behandlung zu einer verminderten Suppressivität der Treg zu führen, also zu einer vermehrten Proliferation im Vergleich zu Treg aus naiven Mäusen, was jedoch nicht statistisch signifikant ist ($p > 0,05$). Vergleicht man jedoch die mit TNF80 behandelte mit der nicht behandelten BCG-Maus-Gruppe, so findet sich eine signifikante Verminderung der relativen Proliferation $CD8^+$ T-Zellen durch die TNF80-Behandlung ($p < 0,01$). Die einmalige Behandlung mit TNF80 führt also zu einer gesteigerten Suppressivität der Treg gegenüber $CD8^+$ T-Lymphozyten.

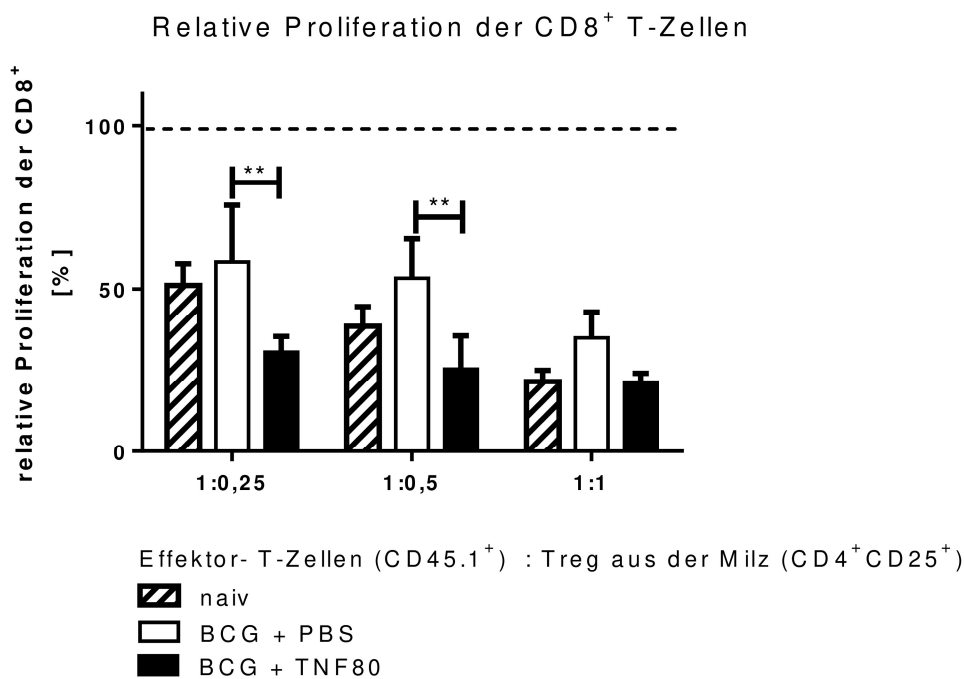
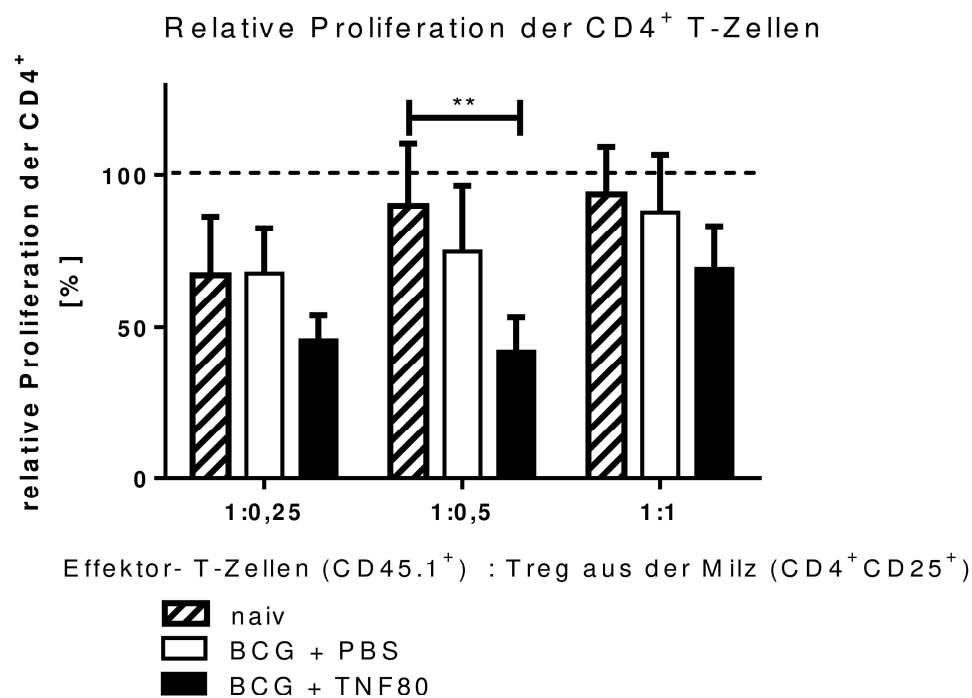
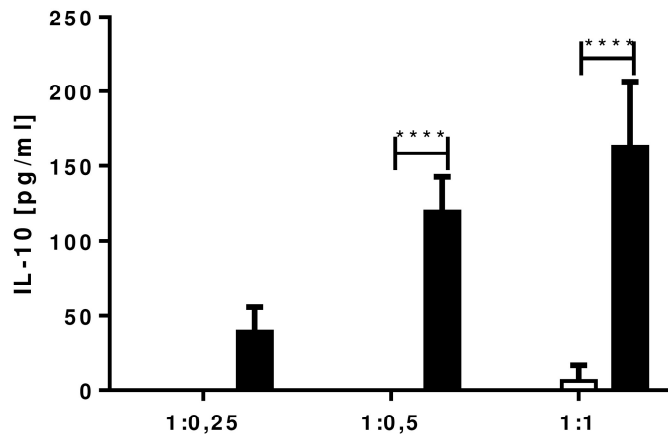


Abbildung 36 | **Relative Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.** Stimulation mit 0,5µg/ml anti-CD3 und 0,25 µg/ml anti-CD28. CD3 und CD28 werden in der experimentellen Aktivierung von T-Lymphozyten eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate naiver Mäuse (schraffierte Balken) und von BCG-Mäusen ohne (weiße Balken) bzw. mit (schwarze Balken) TNF80-Behandlung mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde eine *Two-Way-ANOVA* durchgeführt.




Mittels ELISA bestimmten wir zusätzlich die Konzentration des immunsuppressiven IL-10 und des entzündungsfördernden IFN- γ im Überstand des Suppressionsassays. In den Kulturen der einmal mit TNF80 behandelten Treg aus BCG-Mäusen finden sich signifikant erhöhte IL-10-Mengen ($p > 0,0001$), was für eine stärkere Suppression spricht. Zellen aus naiven Mäusen produzierten kein IL-10, Zellen aus unbehandelten BCG-Mäusen nur sehr geringe Mengen. Die IFN- γ Konzentration wurde durch die BCG-Behandlung insgesamt im Vergleich zu naiven Mäusen gesteigert. Die Behandlung der BCG-Mäuse mit TNF80 hatte keinen relevanten Einfluss auf die Menge an IFN- γ im Überstand. Es fällt auf, dass mit zunehmender Treg-Zahl die IFN- γ Konzentration im Überstand sinkt (Abb. 37).

Insgesamt weisen diese Befunde auf eine Erhöhung der T-Zell-Suppressivität der Treg chronisch entzündeter Mäuse (BCG-Mäuse) durch die einmalige Behandlung mit TNF80 hin. Ein Suppressionsmechanismus scheint dabei die Sekretion von IL-10 zu sein.

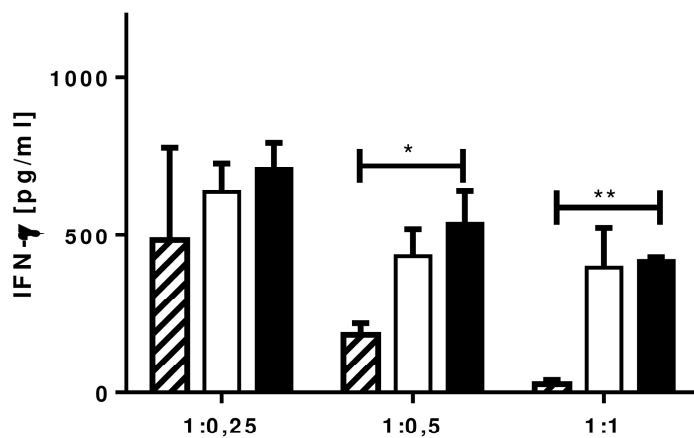
IL-10 Konzentration im Überstand



Effektor- T-Zellen ($CD45.1^+$) : Treg aus der Milz ($CD4^+CD25^+$)

 naiv
 BCG + PBS
 BCG + TNF80

IFN- γ Konzentration im Überstand



Effektor- T-Zellen ($CD45.1^+$) : Treg aus der Milz ($CD4^+CD25^+$)




 naiv
 BCG + PBS
 BCG + TNF80

Abbildung 37 | **Interleukin-10 und Interferon- γ Konzentration in den Überständen der Kulturen des T-Zell-Suppressionsassays.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate naiver Mäuse (gestreifte Balken) und von BCG-Mäusen ohne (weiße Balken) bzw. mit (schwarze Balken) TNF80-Behandlung mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde eine *Two-Way-ANOVA* durchgeführt.

3.4.2 Zweimalige Behandlung mit TNF80 mindert Treg-Suppressivität

Außerdem untersuchten wir die Wirkung einer zweimaligen TNF80-Behandlung in chronisch entzündeten BCG-Mäusen. Zum Vergleich dienten BCG-Mäuse, die mit PBS behandelt wurden (Abb. 38).

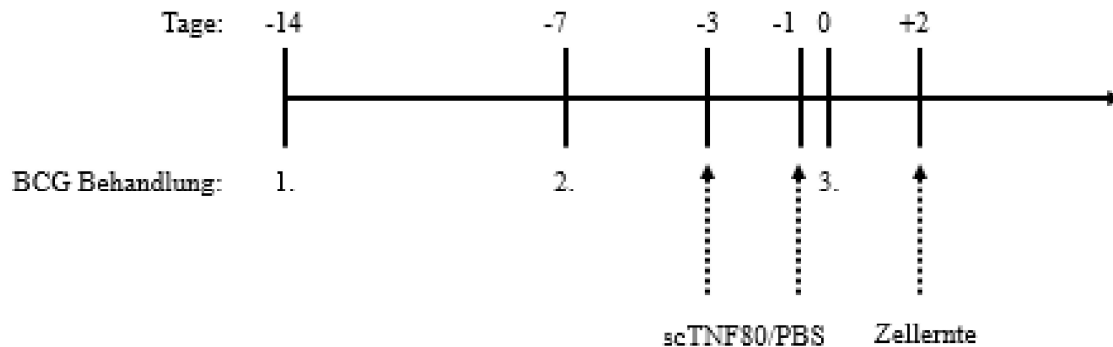
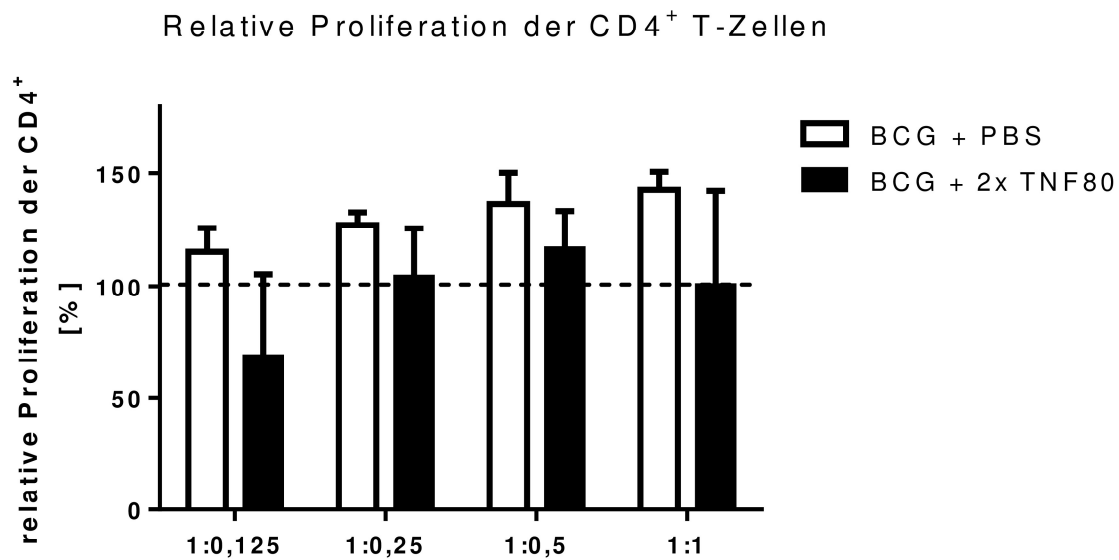


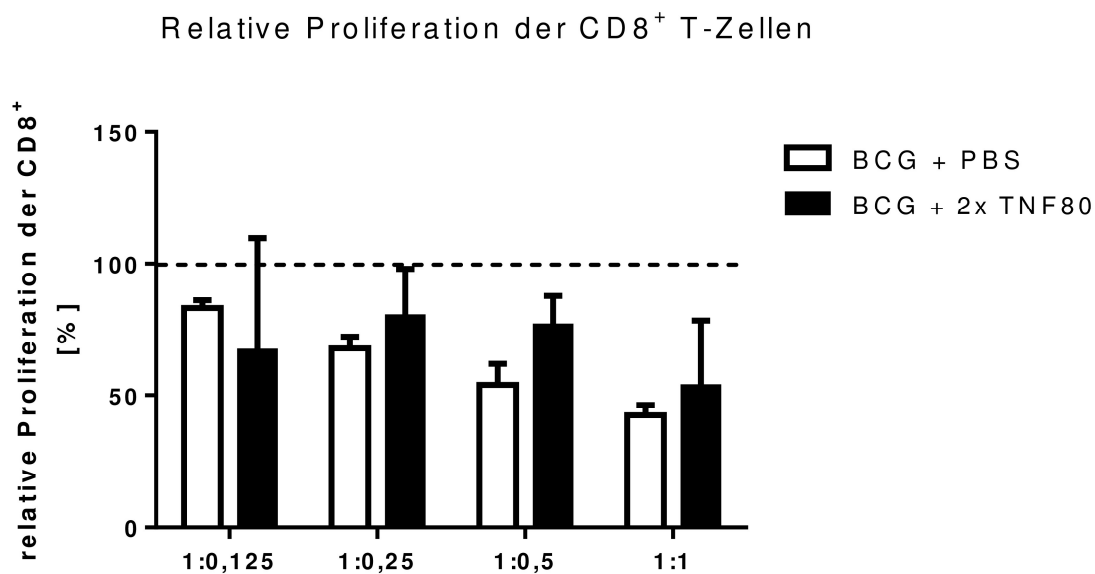
Abbildung 38 | **Behandlungsmodell chronisch entzündeter BCG-Mäuse.** Die Mäuse erhielten an -14 und Tag -7 je eine subkutane Injektion von 200 μ l BCG in IFA (c=250 μ g/ml; 50 μ g). An Tag 0 wurden 200 μ l BCG in PBS (c=250 μ g/ml; 50 μ g) injiziert. An Tag -3 und Tag -1 wurde mit 200 μ l TNF80 (c=375 μ g/ml; 75 μ g) bzw. 200 μ l PBS behandelt. An Tag 2 erfolgten die Zellernte und die Treg-Isolierung mittels MACS. Die Treg wurden im Anschluss in einem T-Zell-Suppressionsassay untersucht.

In diesem Versuch wurden die Zellgemische mit anti-CD3 und anti-CD28 bzw. nur mit anti-CD3 stimuliert. Abbildung 39 zeigt die Proliferation der CD4⁺ respektive der CD8⁺ T-Lymphozyten in % der Proliferation der stimulierten Kontrolle.

Bei Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 beobachteten wir nach zweimaliger TNF80-Behandlung der BCG-Mäuse eine etwas erhöhte Suppressivität auf CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu unbehandelten, aber chronisch entzündeten Mäusen. Die Treg waren in diesem Experiment jedoch nicht in der Lage, die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen signifikant zu senken. Auf CD8⁺ T-Zellen zeigten die Treg mit TNF80 behandelter BCG-Mäuse eine tendenziell verminderte Suppressivität im Vergleich zu unbehandelten, aber chronisch entzündeten Mäusen ($p > 0,05$).



Effektor- T-Zellen (CD45.1⁺) : Treg aus der Milz (CD4⁺CD25⁺)



Effektor- T-Zellen (CD45.1⁺) : Treg aus der Milz (CD4⁺CD25⁺)

Abbildung 39 | **Relative Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.** Stimulation mit 0,5µg/ml anti-CD3 und 0,25 µg/ml anti-CD28. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate von BCG-Mäusen ohne (weiße Balken) bzw. mit (schwarze Balken) TNF80-Behandlung mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde eine *Two-Way-ANOVA* durchgeführt.

Abbildung 40 zeigt die relative Proliferation der $CD4^+$ respektive der $CD8^+$ T-Lymphozyten nach schwächerer Stimulation der T-Zellen mit lediglich anti-CD3.

Hier zeigen sich signifikante Unterschiede in der relativen Proliferation sowohl der $CD4^+$ wie auch der $CD8^+$ T-Zellen ($p < 0,05$). Die zweimalige Behandlung der BCG-Mäuse mit TNF80 führte zu einer gesteigerten relativen Proliferation der T-Effektorzellen im Vergleich zu unbehandelten chronisch entzündeten Mäusen, was auf eine geringere suppressive Wirkung der Treg hindeutet.

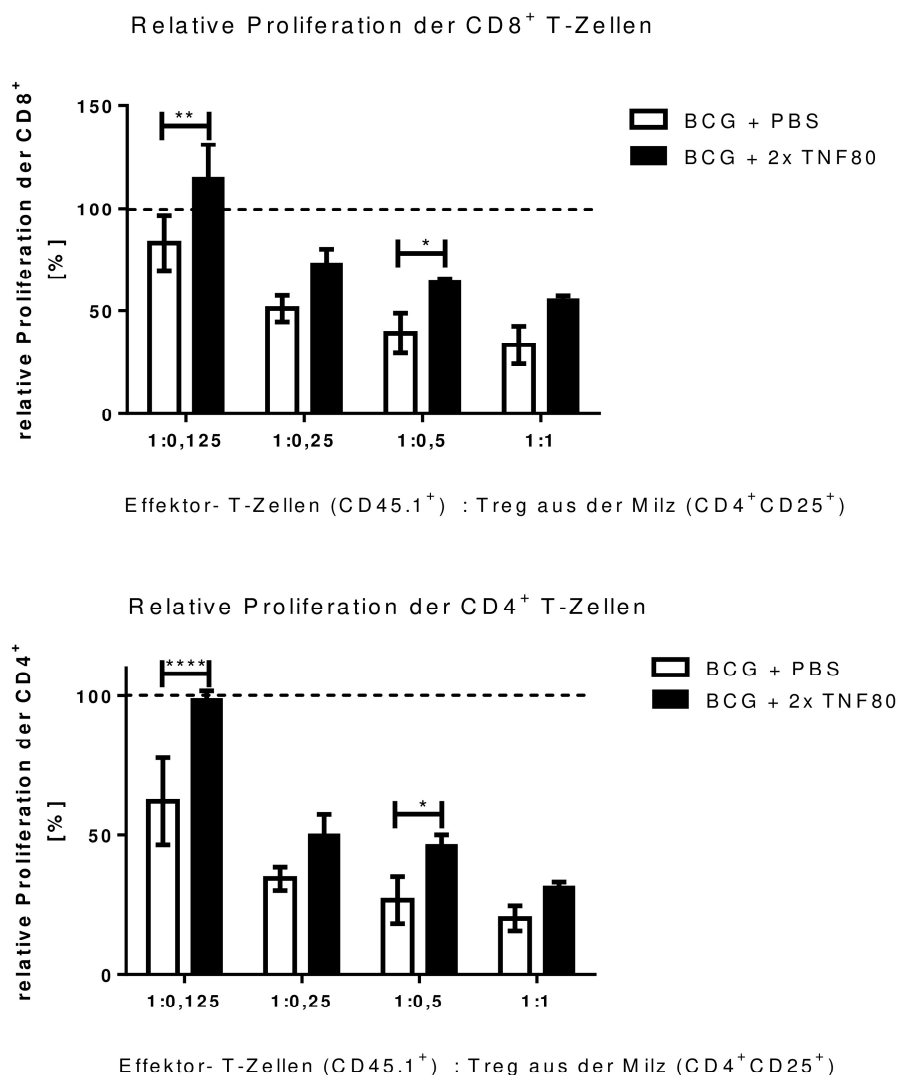


Abbildung 40 | **Relative Proliferation $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen.** Stimulation mit 0,5µg/ml anti-CD3. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate von BCG-Mäusen ohne (weiße Balken) bzw. mit (schwarze Balken) TNF80-Behandlung mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde eine *Two-Way-ANOVA* durchgeführt.

Auch konnte im Überstand der Treg zweimal mit TNF80 behandelter BCG-Mäuse nahezu kein IL-10 nachgewiesen werden, während Treg unbehandelter, aber chronisch entzündeter BCG-Mäuse, wie bereits beobachtet, wenn auch sehr geringe Mengen an IL-10 produzierten. Betrachtet man IFN- γ , so fällt erneut die Konzentrationsreduktion mit zunehmender Treg-Zahl auf. Die zweimalige Behandlung mit TNF80 scheint hier tendenziell zu einer vermehrten IFN- γ Produktion bzw. zu einer verminderten Suppression der Produktion zu führen (Abb. 41). Die Konzentration der Zytokine wurde in Überständen mit anti-CD3 und anti-CD28 stimulierter Zellen bestimmt.

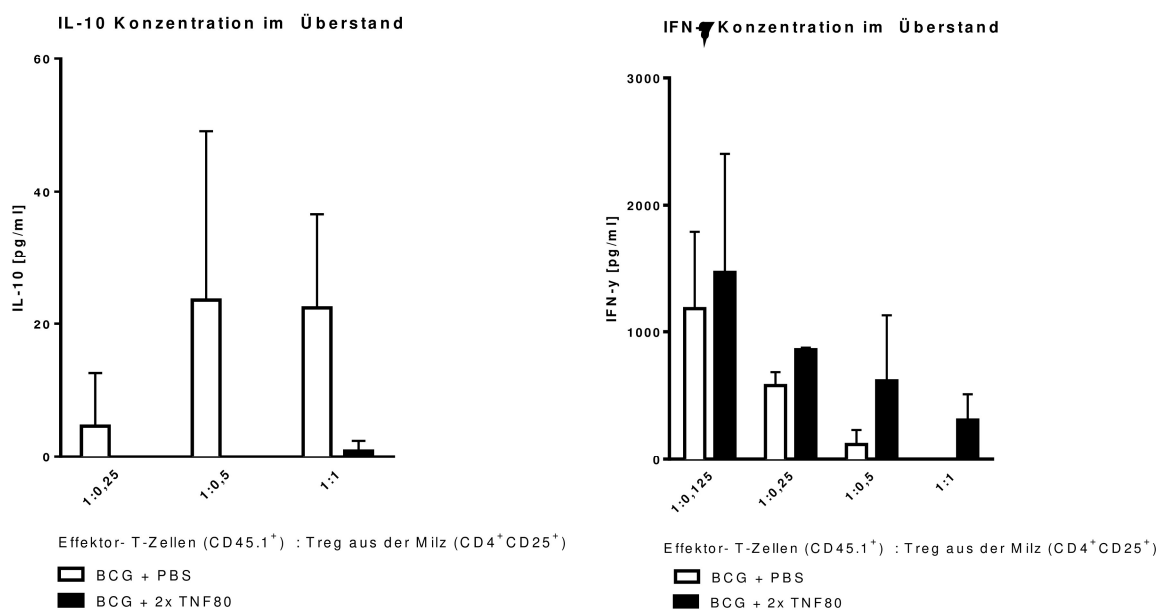


Abbildung 41 | **Interleukin-10 und Interferon- γ Konzentration in den Überständen der Kulturen des T-Zell-Suppressionsassays.** Dargestellt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate von BCG-Mäusen ohne (weiße Balken) bzw. mit (schwarze Balken) TNF80-Behandlung mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde eine *Two-Way-ANOVA* durchgeführt.

Insgesamt scheint eine zweimalige Behandlung der BCG-Mäuse mit TNF80 die suppressive Wirkung der Treg eher einzuschränken.

3.5 Effekte einer Nachbehandlung mit TNF80

In einem letzten Versuch betrachteten wir die Wirkung einer zweimaligen Behandlung mit TNF80 nach Abschluss des BCG-Modells auf die Zellverteilung und die Suppressivität der Treg. Zum Vergleich dienten Mäuse, die mit PBS behandelt wurden (Abb. 42).

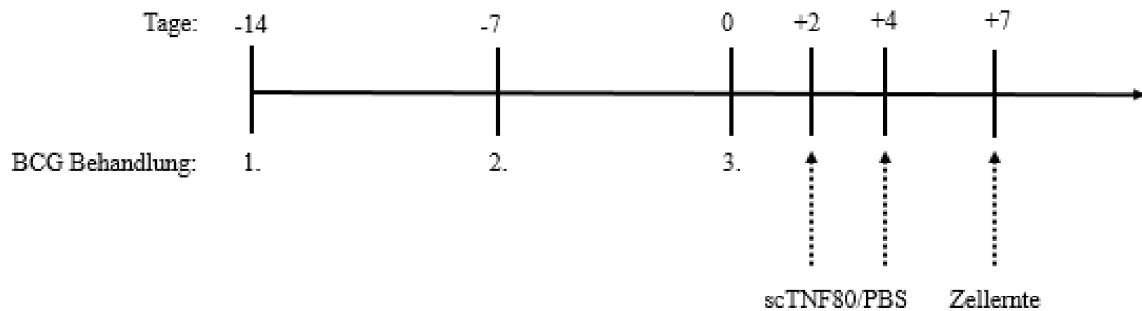
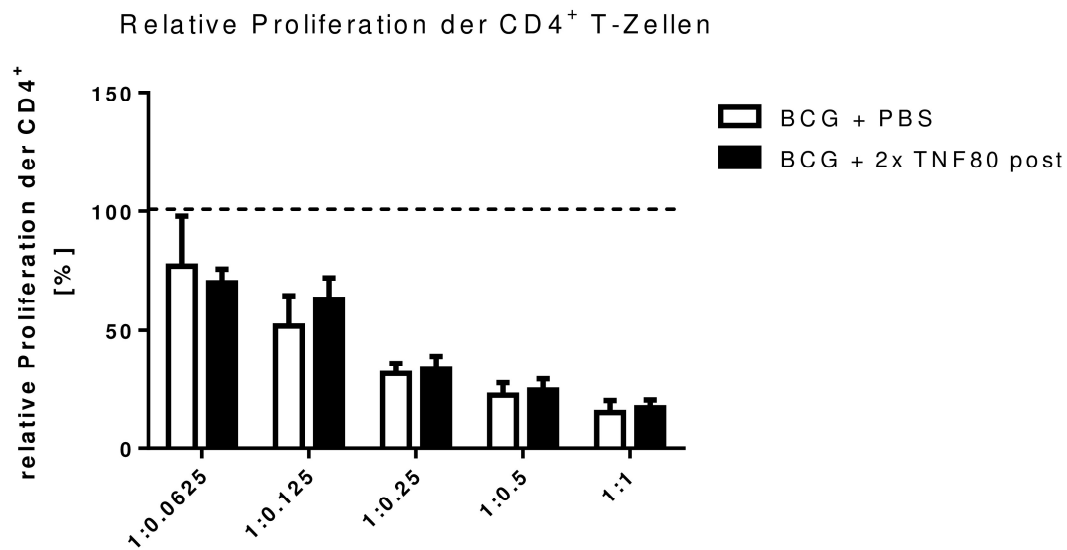


Abbildung 42 | **Nachbehandlungsschema chronisch entzündeter Mäuse.** Die Mäuse erhielten an -14 und Tag -7 je eine subkutane Injektion von 200 μ l BCG/IFA ($c=250 \mu\text{g/ml}$; 50 μg). An Tag 0 wurden 200 μ l BCG in PBS ($c=250 \mu\text{g/ml}$; 50 μg) injiziert. An Tag 2 und Tag 4 wurde mit 300 μ l TNF80 ($c=375 \mu\text{g/ml}$; 75 μg) bzw. 200 μ l PBS behandelt. An Tag 7 erfolgten die Zellernte, die durchflusszytometrische Analyse sowie die Treg-Isolierung mittels MACS. Die Treg wurden im Anschluss in einem T-Zell-Suppressionsassay untersucht.

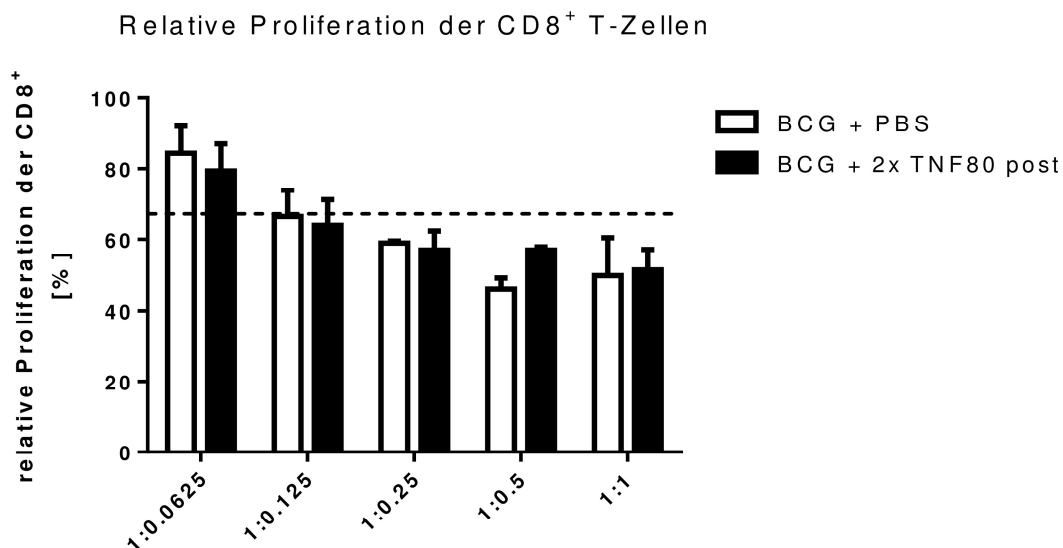
3.5.1 Suppressive Wirkung durch zweimalige TNF80-Nachbehandlung nicht beeinflusst

Zur Bestimmung der Suppressivität der Treg wurden diese nach MACS-Isolation wie in den Vorversuchen im T-Zell-Suppressionsassay eingesetzt. Wieder stimulierten wir nur mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3, da sich hier zuvor deutlichere Ergebnisse gezeigt hatten.

Abbildung 43 zeigt die relative Proliferation der CD4^+ bzw. der CD8^+ T-Lymphozyten. Es ist kein relevanter Unterschied zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe zu erkennen.



Effektor- T-Zellen (CD45.1⁺) : Treg aus der Milz (CD4⁺CD25⁺)



Effektor- T-Zellen (CD45.1⁺) : Treg aus der Milz (CD4⁺CD25⁺)

Abbildung 43 | **Relative Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.** Stimulation mit 0,5µg/ml anti-CD3. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate naiver Mäuse (gestreifte Balken) und von BCG-Mäusen ohne (weiße Balken) bzw. mit (schwarze Balken) TNF80-Behandlung mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde eine *Two-Way-ANOVA* durchgeführt.

3.5.2 Zweimalige Nachbehandlung mit TNF80 erhöht Anteil aktivierter Treg

Zusätzlich untersuchten wir durchflusszytometrisch den Anteil $CD62L^+$ bzw. $CD62L^-$ Treg. $CD62L$ (L-Selectin) ist ein Marker der T-Zell-Entwicklung. Naive T-Lymphozyten sind $CD62L^+$. Als Homingrezeptor spielt $CD62L$ eine entscheidende Rolle in der Migration der T-Zellen in den Lymphknoten. Kommt es zu Antigenkontakt, wird $CD62L$ rasch nicht mehr exprimiert. $CD62L^-$ T-Zellen werden daher als aktivierte, reife Zellen angesehen [66].

Abbildung 44 zeigt den prozentualen Anteil $CD62L^+$ und $CD62L^-$ Treg an allen $CD4^+$ T-Lymphozyten in der Milz. Die zweimalige Nachbehandlung der BCG-Mäuse mit TNF80 führte zu keinem signifikanten Unterschied im Anteil $CD62L^+$ Treg ($p > 0,05$). Allerdings kam es zu einem signifikanten Anstieg im Anteil $CD62L^-$, also aktivierter, Treg im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ($p < 0,05$).

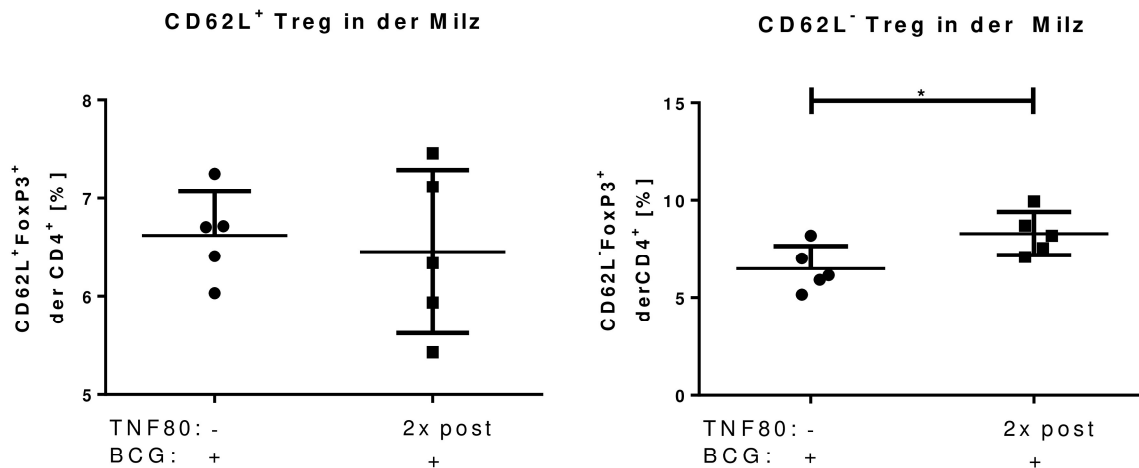


Abbildung 44 | **Prozentualer Anteil unreifer bzw. reifer Treg an $CD4^+$ Zellen.** Dargestellt sind die Mittelwerte von fünf biologischen Replikaten von BCG-Mäusen ohne (gefüllte Kreise) bzw. mit TNF80-Nachbehandlung (gefüllte Quadrate) mit der zugehörigen Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der *Welch*-Test verwendet.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.6.1 BCG-Modell für chronische Entzündung

Die dreimalige Injektion von *mycobacterium tuberculosis* – BCG führte zu einer relativen Expansion myeloider Zellen in der Milz und im Knochenmark. Es fanden sich signifikant erhöhte Fraktionen CD11b⁺ myeloider Zellen im Knochenmark und ausdifferenzierter MDSC in der Milz. Außerdem kam es zu einer signifikanten Verminderung der B-Zellen im Knochenmark. In der Milz zeigte sich eine Verminderung der B-Zell-Fraktion und eine Reduktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten.

Die chronische Entzündungsreaktion nach wiederholter BCG-Injektion war weitestgehend unabhängig von der TNFR2-Expression der einzelnen Zellen. Fehlte TNFR2 bzw. war die TNFR2-Expression auf myeloiden Zellen, CD4⁺ Zellen oder allen Mauszellen vermindert, so kam es ebenfalls zu der oben beschriebenen Veränderung von Milzgewicht, Zellzahl und Zellverteilung in Milz und Knochenmark.

3.6.2 Wirkung von TNF80 auf die Zellen des Immunsystems

Eine einmalige Behandlung mit TNF80 hatte keinen Effekt auf das Milzgewicht, die Gesamtzellzahl in der Milz oder die Verteilung der Zellpopulationen.

Die zweimalige TNF80-Behandlung naiver Mäuse führte zu einer Zunahme von Milzgewicht und Milzzellzahl, ohne die Zellverteilung zu beeinflussen. Erfolgte zusätzlich zur Behandlung mit TNF80 eine BCG-Challenge, so ähnelten Milzgewicht, Zellzahl sowie Zellverteilung derer naiver Mäuse. Im chronischen Entzündungsmodell mit dreimaliger Injektion von BCG führte die zweimalige TNF80-Behandlung zur Expansion der Treg-Fraktion. Ebenso wie in chronisch entzündeten nicht behandelten Mäusen kam es zu einer Zunahme des Milzgewichts und der Zellzahl sowie zur Expansion myeloider Zellen.

3.6.3 Wirkung von TNF80 auf die Konzentration verschiedener Zytokine im Serum

Nach Stimulation mit LPS zeigten sich in Abhängigkeit der Entzündungssituation und einer Vorbehandlung mit TNF80 verschiedene TNF-Serumkonzentrationen. Eine einmalige Vorbehandlung mit TNF80 führte in Mäusen, die mit LPS stimuliert wurden, zu verminderten TNF-Serumlevel. Auch im chronischen Entzündungsmodell mit zweimaliger BCG-Injektion und LPS-Challenge kam es durch die TNF80-Behandlung zu erniedrigten TNF-Konzentrationen. Nach einer einmaligen Behandlung mit TNF80 beobachteten wir in akut und chronisch entzündeten Mäusen ebenfalls niedrigere Mengen an TNF im Serum. Die

Behandlung mit hitzeinaktiviertem TNF führte nicht zu einer Verminderung der TNF-Serumkonzentration im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. Die Streuung der Einzelwerte fiel allerdings sehr groß aus, sodass eine Kontamination des TNF80 mit LPS nicht sicher auszuschließen war.

Nach TNF80-Behandlung zeigten sich außerdem verminderte IL-10-Spiegel im Serum, sowohl bei alleiniger LPS-*Challenge* als auch im BCG-Modell.

3.6.4 Wirkung von TNF80 auf die Suppressivität der Treg

Die einmalige Vorbehandlung mit TNF80 führte in chronisch entzündeten BCG-Mäusen zu einer Steigerung der Treg-Suppressivität im Vergleich zu unbehandelten BCG-Mäusen mit einer signifikant verminderten Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Parallel hierzu zeigte sich eine erhöhte IL-10-Konzentration im Überstand der Treg aus mit TNF80 vorbehandelten Mäusen. Gleichzeitig kam es hier zu höheren IFN- γ -Konzentrationen.

Eine zweimalige TNF80-Vorbehandlung der BCG-Mäuse führte bei Costimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 zu einer erhöhten Suppressivität auf CD4⁺ und einer verminderten Suppressivität auf CD8⁺ T-Zellen. Stimulierten wir die Zellgemische nur mit anti-CD3, so war auch die Suppression der CD4⁺ T-Lymphozyten durch die zweimalige TNF80-Behandlung vermindert.

Behandelten wir nach der letzten BCG-Injektion, so zeigte sich kein Unterschied in der Suppressivität der Treg mit TNF80 behandelter und nicht behandelter BCG-Mäuse. Allerdings fand sich bei zweimaliger Nachbehandlung ein signifikant erhöhter Anteil CD62L⁻, also aktivierter, Treg in der Milz.

4 Diskussion

TNF stellt bereits seit mehr als zwei Jahrzehnten ein therapeutisches Ziel in der Behandlung verschiedenster Autoimmunerkrankungen dar [43, 44]. Die Hemmung von TNF führt jedoch, neben den erwünschten Effekten, auch zu schwerwiegenden Nebenwirkungen [43, 48]. Mitunter führt eine Anti-TNF-Therapie sogar zu einer Progression der Beschwerden [9] oder zur Induktion einer Autoimmunreaktion [43, 67]. TNF wirkt über zwei Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, die überwiegend gegensätzliche Effekte haben: Die Aktivierung des TNFR1 führt vorwiegend zu Zelluntergang sowie Initiierung und Aufrechterhalten einer Entzündungsreaktion. TNFR2 hingegen spielt eine wichtige Rolle in der Immunmodulation und fördert das Zellüberleben [28, 30]. Die selektive Hemmung von löslichem TNF, das ausschließlich den TNFR1 aktiviert, führt zu einer effizienten Abmilderung einer Entzündungsreaktion und erhält im Gegensatz zur Therapie mit unselektiven TNF-Inhibitoren gleichzeitig eine ausreichende Immunantwort gegen bakterielle Erreger [30]. Eine Veränderung im Gleichgewicht von TNFR1- und TNFR2-Blockade zugunsten einer vermehrten TNFR2-Aktivierung scheint daher von Nutzen zu sein. Die direkte Aktivierung des TNFR2 als immunregulatorischem Rezeptor stellt somit eine interessante Möglichkeit zur gezielten Immunmodulation in verschiedenen Krankheitsprozessen, die durch chronische Entzündung gekennzeichnet sind, dar.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell für chronische Entzündung zu etablieren und die Effekte des TNFR2-selektiven Agonisten TNF80 zu beurteilen.

4.1 Etablierung eines Modells für chronische Entzündung

Zunächst untersuchten wir daher, in Anlehnung an das BCG-Modell von *Sade-Feldman et al.* [14], die Auswirkungen wiederholter BCG-Injektionen auf den Immunstatus naiver Mäuse. BCG aktiviert Toll-like-Rezeptoren und führt so zu einer Aktivierung zunächst des angeborenen und später auch des adaptiven Immunsystems [68].

Die dreimalige Injektion von BCG führte zu einer relativen Expansion myeloider Zellen in der Milz und im Knochenmark. Es fanden sich signifikant erhöhte Fraktionen CD11b⁺ myeloider Zellen im Knochenmark und ausdifferenzierter MDSC in der Milz. Eine derartige Expansion myeloider Zellen im Knochenmark und Akkumulation myeloider Suppressorzellen in der Milz findet sich bei der Notfallmyelopoese (*emergency myelopoiesis*) [69]. Bei Krebserkrankungen und Infektionen besteht ein erhöhter Bedarf an myeloiden Zellen. Unreife myeloide Zellen proliferieren anhaltend und verlassen das Knochenmark, um in der Peripherie zu aktivieren,

suppressiven MDSC auszureifen. Die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren scheint eine zentrale Rolle in der Induktion der MDSC zu spielen. Zudem konnte gezeigt werden, dass LPS die extramedulläre Akkumulation von MDSC fördert [69], sodass bei einer Stimulation mit BCG von ähnlichen Effekten auszugehen ist.

Konsekutiv kam es zu einer signifikanten Reduktion der B-Zellen im Knochenmark. Die Verminderung könnte durch eine Kompetition myeloider Zellen und B-Zellen um Knochenmarksnischen und Verdrängung der B-Zellen durch myeloide Zellen begründet sein. Diese Verdrängungseffekte spiegelten sich auch in der Peripherie wieder: In der Milz kam es ebenfalls zu einer Verkleinerung der B-Zell-Fraktion. Die Reduktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in der Milz lässt sich durch die Expansion der MDSC begründen, welche über diverse Mechanismen T-Zellen supprimieren können [19, 21]. So hemmen MDSC einerseits die Proliferation und Rezirkulation der T-Lymphozyten [21, 70], andererseits führen sie über eine Herabregulation der TCR-assoziierten ζ -Kette zu einer verminderten Suppressivität der T-Zellen [70]. Auch Verdrängungseffekte im Knochenmark, dem primären Entstehungsort der T-Lymphozyten, könnten eine Rolle spielen. Eine Bestimmung der Expression der ζ -Kette wäre in künftigen Studien interessant, zumal sie vermutlich als Biomarker für den Immunstatus und als Hilfsmittel in der Unterscheidung von akuter und chronischer Entzündung genutzt werden könnte [70]. Womöglich lässt sich die erniedrigte Zahl an B- und T-Zellen jedoch auch dadurch erklären, dass diese Effektorzellen auf den Entzündungsreiz hin aus der Milz emigrierten, um lokal zu wirken. Diese These wird dadurch unterstützt, dass die Mäuse an der Einstichstelle der BCG-Gabe Zeichen einer lokalen Entzündung aufwiesen. Um zu klären, ob die erniedrigte Fraktion der T- und B-Lymphozyten in der Milz durch eine Emigration in die Peripherie begründet ist, müsste man periphere Lymphknoten, die den Einstichbereich drainieren, hinsichtlich der Zellpopulationen untersuchen. Wie auch *Sade-Feldman et al.* konnten wir keinen Effekt der BCG-Injektionen auf den relativen Anteil der Treg an der Gesamtzellzahl in der Milz feststellen [14].

Die chronische Entzündungsreaktion nach wiederholter BCG-Injektion ist weitestgehend unabhängig von der TNFR2-Expression der einzelnen Zellen. Fehlte TNFR2 bzw. war die TNFR2-Expression auf myeloiden Zellen, CD4⁺ Zellen oder allen Mauszellen vermindert, so führte das BCG-Modell dennoch weiterhin zu einer chronischen Entzündung, gekennzeichnet durch Notfallmyelopoese und Reduktion der B- und T-Zell-Fraktion. Obwohl es sich hierbei um ein TNF-abhängiges Entzündungsmodell handelt [14], scheint also die TNFR2-Expression keine wesentliche Rolle in der BCG-induzierten Entzündungsinduktion zu spielen. Die

wiederholte BCG-Injektion führt anscheinend besonders zu einer Aktivierung des TNFR1. Es gilt jedoch, die komplexen Folgen eines Mangels bzw. des Fehlens von TNFR2 zu bedenken: Neben der fehlenden TNFR2-abhängigen Signaltransduktion, die sowohl zum Überleben als auch zur Apoptose der exprimierenden Zelle führen kann, mangelt es auch an löslichem TNFR2. Löslicher TNFR2 kann lösliches und membrangebundenes TNF binden [71] und so als TNF-Antagonist fungieren [31]. Ist nun die TNFR2-Expression und somit auch die Produktion von löslichem TNFR2 vermindert, so verbleibt mehr biologisch aktives TNF, das den TNFR1 aktivieren und die inflammatorische Antwort unterhalten kann. Eine sichere Interpretation der Ergebnisse in $TNFR2^{-/-}$, $LysM^{cre}TNFR2^{fl/fl}$ und $CD4^{cre}TNFR2^{fl/fl}$ Mäusen kann daher nicht erfolgen. Zudem führte in einer anderen Studie die Injektion von LPS zu einer Herabregulation der TNF-Rezeptoren durch die proteolytische Abspaltung von vorzugsweise TNFR2 [72]. Ähnliche Effekte sind in einem BCG-Modell zu erwarten, da BCG ebenso wie LPS [70] über eine Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren zu einer Immunantwort führt [68]. Daher kann ein partieller oder kompletter TNFR2-Mangel schwer zu interpretierende Effekte nach sich ziehen. Aus diesem Grund verzichteten wir in der weiteren Arbeit auf Versuche mit diesen Mauslinien.

4.2 Übertragbarkeit des BCG-Modells auf andere Pathologien

Die wiederholte Injektion von BCG imitiert primär eine chronische bakterielle Infektion und scheint so zunächst nicht auf andere Pathologien wie Tumor- oder Autoimmunerkrankungen übertragbar. Jedoch konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass all diesen Pathologien eine chronische Entzündungsreaktion mit Herabregulation der ζ -Kette gemein ist. In anderen Modellen, in denen wiederholt bakterielle Antigene verabreicht wurden, zeigte sich ebenfalls eine ζ -Ketten-Herabregulation. Durch die Verwendung hitzeinaktivierter Bakterien können die Symptome einer spezifischen Erkrankung vermieden und ein allgemein chronisch-entzündliches Milieu generiert werden [73]. Somit stellt die wiederholte Applikation von BCG durchaus ein probates Mittel für ein rasch durchführbares allgemeines Modell für chronische Entzündung dar.

4.3 Wirkung von TNF80 auf die Zellen des Immunsystems

Wir konnten zeigen, dass die zweimalige TNF80-Behandlung naiver Mäuse eine akute Entzündungsreaktion mit einer Zunahme von Milzgewicht und -zellzahl - ähnlich der Entzündungsreaktion nach alleiniger BCG-Challenge - hervorruft. Erfolgte vor einer BCG-Challenge eine zweimalige Behandlung mit TNF80, so zeigten die Mäuse eine Toleranz:

Milzgewicht, -zellzahl sowie die Verteilung der einzelnen Zellpopulationen waren hier ähnlich denen naiver Mäuse. Diese Beobachtungen erinnern an eine Studie von *Dalpke et al.* [65] aus dem Jahr 2005. Darin wurde festgestellt, dass die LPS-Toleranz, also die Toleranz auf eine LPS-Challenge nach vorausgegangener LPS-Stimulierung, auch bei vorausgehender Stimulierung mit anderen TLR-Aktivatoren zu beobachten ist [65]. BCG führt ebenso wie LPS zunächst zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Dass TNF-Signalwege in der Entstehung der LPS-Toleranz eine Rolle spielen, ist ebenfalls bekannt [74]. Die zweimalige Behandlung mit TNF80 könnte zu einer solchen Kreuztoleranz bzw. bei alleiniger Administration zu einer akuten Entzündungsreaktion führen. Weitere Studien wären nötig, um zu klären, welche Signalwege für diese Toleranz verantwortlich sind.

Im chronischen Entzündungsmodell konnte die TNF80-Behandlung zwar nicht die Zunahme des Milzgewichts und der Zellzahl verhindern, jedoch führte sie zu einer relativen Expansion der Treg-Fraktion. Zudem zeigte sich eine, wenn auch nicht signifikante, relative Reduktion der myeloiden Zellzahl in der Milz. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des TNFR2 die Suppressivität und Proliferation regulatorischer T-Zellen fördert [9, 67]. In einer anderen Studie, die die Effekte einer direkten TNFR2-Aktivierung in naiven Mäusen testete, waren jedoch mehrfache Applikationen von TNF80 nötig, um Treg zu vermehren [57]. Die chronisch-entzündliche Umgebung scheint die Treg also empfänglicher gegenüber einer TNFR2-Aktivierung zu machen. Womöglich erhöht aufgrund der chronischen Entzündung endogen produziertes TNF die Empfindlichkeit für eine Stimulierung des TNFR2. Eine mögliche Ursache hierfür ist eine erhöhte TNFR2-Expression auf regulatorischen T-Zellen, weshalb die Bestimmung von TNFR2 auf Treg chronisch entzündeter Versuchstiere in weiteren Studien von Interesse sein könnte.

Welche Bedeutung die Vermehrung und höhere Aktivität der Treg letztendlich in der chronischen Entzündung hat, ist schwer einzuschätzen. So gibt es Hinweise, dass ein vermehrtes Treg-Vorkommen beim Menschen mit einem erhöhten Risiko für die Chronifizierung einer Hepatitis B-Infektion assoziiert ist und die Pathogenpersistenz bei Hepatitis C-Infektionen fördert [13]. Andererseits könnten Treg Leberschäden durch chronische Hepatiden mindern [13] und ernsthafte Kollateralschäden durch eine anhaltende Immunantwort verhindern [67]. In einem Modell für chronische Arthritis führte die wiederholte Therapie mit einem TNFR2-spezifischen Agonisten zu einer Vermehrung regulatorischer T-Zellen und einer histologischen Besserung der Gelenkentzündung [75]. Die Rolle regulatorischer T-Zellen bei Sepsis ist unklar. Verschiedene Studien zeigen teils

widersprüchliche Ergebnisse. So konnte der adoptive Transfer *in vitro*-stimulierter Treg das Überleben in einem Mausmodell für Sepsis erhöhen [76]. Das verbesserte Überleben war in dieser Studie jedoch nicht auf die Treg-vermittelte T-Zell-Suppression zurückzuführen, da eine T-Zell-Depletion mit einem schlechteren Outcome assoziiert war. *Hein et al.* [77] zeigten im Sepsis-Modell hingegen keinen Unterschied im Überleben nach Treg-Depletion. Auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-1 β , IL-6) blieb durch die Treg unbeeinflusst. *Stieglitz et al.* demonstrierten, dass eine Depletion regulatorischer T-Zellen im Sepsis-Modell die zuvor supprimierte T-Zell-Proliferation wieder herstellt [78].

Es ist zu vermuten, dass die Aktivierung von Treg in Abhängigkeit der Pathogenese einer chronischen Entzündung, beispielsweise Infektion, Autoimmunität oder Tumorerkrankung, unterschiedliche Konsequenzen haben kann. Da der Expansionseffekt der Treg durch die TNF80-Behandlung nicht durchgehend signifikant war und sich auch nur nach einer zweimaligen TNF80-Behandlung gezeigt hat, ist unser BCG-Modell möglicherweise nicht ideal, um die Treg-Expansion nach Aktivierung des TNFR2 zu demonstrieren. Weitere Untersuchungen der Wirkung von TNF80 in etablierten pathologiespezifischen Krankheitsmodellen sind nötig, um die Folgen abzuschätzen.

Die tendenzielle Reduktion der myeloiden Zellen durch die Behandlung bei chronischer Entzündung ist am ehesten auch im Rahmen einer Toleranz zu werten. Zwar führte die zweimalige Applikation von TNF80 in naiven Mäusen nicht zu einer Expansion der myeloiden Zellen in der Milz, dennoch scheint die Behandlung mit TNF80 eine Toleranz gegenüber einem neuen Stimulus in Form der BCG-Challenge zu bewirken. TNFR2 scheint für die Bildung und suppressive Funktion von MDSC von Bedeutung zu sein [57, 79, 80]. Womöglich induziert die Therapie mit TNF80 in naiven Mäusen eine geordnete Proliferation von MDSC im Knochenmark, die sich jedoch nicht wie bei der Notfallmyelopoese in der Peripherie niederschlägt. Eine Analyse der Zellverteilung im Knochenmark naiver Mäuse nach wiederholter TNF80-Behandlung wäre daher interessant.

4.4 Wirkung von TNF80 auf die Konzentration verschiedener Zytokine im Serum

Um die Veränderungen auf zellulärer Ebene nach TNF80-Behandlung im Entzündungskontext weiter einzuordnen, untersuchten wir die Konzentration von Serum-TNF als Schlüsselenzym in der Einleitung und Konzertierung von Entzündung und Immunabwehr [7, 31, 42].

Das Phänomen der Toleranz auf einen Entzündungsstimulus (*Challenge*) nach vorausgegangener TNF80-Behandlung spiegelte sich auch in der TNF-Serumkonzentration wieder. In naiven Mäusen fand sich wie zu erwarten kein messbares TNF im Serum. Unabhängig von der Auswertmethode zeigte sich als allgemeiner Trend eine Erniedrigung der in entzündeten Mäusen erhöhten TNF-Konzentration nach Behandlung mit TNF80. Die nach LPS-*Challenge* deutlich erhöhten TNF-Serumlevel waren sowohl bei einmaliger als auch bei zweimaliger vorheriger TNF80-Behandlung erniedrigt. Auch im chronischen Entzündungsmodell konnte die ein- bzw. zweimalige Behandlung mit TNF80 die erhöhten TNF-Serumlevel reduzieren, allerdings waren die Ergebnisse hier weniger deutlich. Insgesamt sind diese Effekte nicht signifikant. Die große Streuung lässt sich möglicherweise durch das Detektionsverfahren erklären: Aufgrund der möglichen Kreuzreaktion von TNF80 mit ELISA-anti-TNF-Antikörpern bedienten wir uns des L929-Zell-Zytotoxizitätsassays. In diesem Assay sind viele Arbeitsschritte notwendig, sodass sich mögliche Titrationsungenauigkeiten potenzieren. Zudem findet sich im Serum eine Vielzahl an weiteren Zytokinen, die ebenfalls mit den L929-Zellen interagieren könnten.

Dass sich hier auch nach einmaliger Behandlung mit TNF80 eine messbare Erniedrigung von TNF zeigte, aber zwei Behandlungen notwendig waren, um eine Veränderung von Milzgewicht, -zellzahl und Zellverteilung herbeizuführen, lässt vermuten, dass eine einmalige Behandlung nur zu einer vorübergehenden Besserung der Entzündungssituation führt. Die einmalige Behandlung scheint eine temporäre Reduktion proinflammatorischer Zytokine zu bewirken, die nicht ausreicht, um sich auch auf zellulärer Ebene niederzuschlagen.

Die TNF80-Toleranz zeichnete sich neben der Erniedrigung von TNF im Serum auch durch die Erniedrigung der IL-10 Konzentration im Serum nach TNF80-Behandlung aus. Diese zunächst widersprüchlich erscheinende Reduktion des immunsuppressiven IL-10 im Zuge der Toleranzentwicklung wurde bereits von *Radow et al.* [81] *in vitro* beobachtet. Nach einmaliger Stimulierung mit LPS kam es hierbei zunächst zu einem Anstieg sowohl der TNF- als auch der IL-10 Konzentration. Die wiederholte LPS-Exposition führte zu einer Erniedrigung beider

Zytokine. Nichtsdestotrotz scheint IL-10 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der LPS-Toleranz zu spielen. Die Applikation von anti-IL-10 mAb verhinderten die Entstehung einer LPS-Toleranz. So schien besonders der Anstieg von IL-10 nach der ersten LPS-Stimulierung für die Toleranzentwicklung von Bedeutung zu sein [81]. Eine Bestimmung der IL-10-Konzentration im Serum naiver Mäuse und nach alleiniger Behandlung mit TNF80 bzw. die Applikation von anti-IL-10 mAb könnte diese These stützen.

Da eine Kontamination des TNF80 mit LPS in diesem Assay nicht sicher auszuschließen war, sollten die eben genannten Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden. Die tendenzielle Erniedrigung der TNF-Serumlevel durch die TNF80-Behandlung der Mäuse, die akut bzw. chronisch entzündet waren, passt jedoch gut zu den übrigen Effekten und könnte somit durchaus reelle Effekte des TNF80 abbilden. Ein genauerer Assay und die Bestimmung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-1 β und IL-6 mittels ELISA könnten in weiteren Studien durchgeführt werden, um diese Annahme zu bestärken.

4.5 Wirkung von TNF80 auf die Suppressivität der Treg

Es ist bekannt, dass die Aktivierung des TNFR2 von zentraler Bedeutung für die Suppressivität von Treg ist [7, 9, 10]. Wir untersuchten die Wirkung einer direkten Stimulierung des TNFR2 *in vivo* auf die Suppressivität der Treg *in vitro*.

Die einmalige Vorbehandlung mit TNF80 führte in chronisch entzündeten BCG-Mäusen zu einer Steigerung der Treg-Suppressivität im Vergleich zu unbehandelten BCG-Mäusen mit einer signifikant verminderten Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Die Suppressivität scheint sogar diejenige der Treg aus naiven Mäusen zu übersteigen. Allerdings fiel die Suppression der Proliferation CD4⁺ T-Lymphozyten bei steigender Treg-Ratio schwächer aus. Auf CD8⁺ T-Zellen erhöhte sich die Suppressivität in Abhängigkeit der Treg-Anzahl. Dieser widersprüchliche Titrationseffekt ist schwer zu erklären. Die hier durchgeführte Kostimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 könnte zu einer überschießenden Proliferation der CD4⁺ T-Zellen führen und die Suppression durch Treg erschweren.

Parallel fanden sich erhöhte Mengen an IL-10 im Überstand der Zellkultur nach einmaliger TNF80-Behandlung. Dies widerspricht der Erkenntnis, dass eine TNF80-Behandlung zu einer Toleranz auf folgende Entzündungsstimuli und konsekutiv zu erniedrigten IL-10-Konzentrationen im Serum führt. Dennoch scheint die Produktion von IL-10 hier einen Mechanismus der Treg-Suppressivität darzustellen.

Interessanterweise fanden sich in den Überständen der Treg aus unbehandelten und behandelten chronisch entzündeten Mäusen signifikant erhöhte IFN- γ -Konzentrationen im Vergleich zu naiven Mäusen. *Ehrenstein et al.* beobachteten, dass CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus Patienten mit aktiver rheumatoider Arthritis zwar die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ T-Lymphozyten hemmen konnten, jedoch nicht in der Lage waren, die Produktion proinflammatorischer Zytokine zu hemmen. Die Therapie mit einem anti-TNF-Therapeutikum stellte diese Fähigkeit wieder her [82]. In unserem Assay zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied in der IFN- γ -Konzentration nach Behandlung mit TNF80. Auch dies steht im Widerspruch zur Beobachtung, dass die Therapie mit TNF80 zu einer Erniedrigung des ebenfalls eher proinflammatorischen Zytokins TNF führt. Allerdings führten erhöhte Treg-Zahlen zu niedrigeren IFN- γ -Konzentrationen, sodass es durchaus zu einer Suppression der Zytokinproduktion durch die Treg zu kommen scheint. Insgesamt ist aber die Veränderung der Zytokinspiegel *in vivo* sicherlich aussagekräftiger, da *in vitro* immer nur die isolierte Betrachtung einzelner Komponenten des Immunsystems möglich ist.

Eine zweimalige TNF80-Vorbehandlung der BCG-Mäuse minderte meist die Suppressivität der Treg im Vergleich zu unbehandelten BCG-Mäusen. Bei Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 zeigten die Treg mit TNF80 behandelte Mäuse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zwar eine tendenziell etwas stärkere Suppressivität auf CD4⁺ T-Zellen. Jedoch überstieg auch hier die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen diejenige der stimulierten Kontrolle ohne Treg. Auch hier fiel auf, dass bei höherer Treg-Konzentration die Proliferation der CD4⁺ Effektorzellen weniger stark gehemmt wurde. Bei schwächerer Stimulation nur mit anti-CD3 fand sich eine signifikant verminderte Suppressivität der Treg mit TNF80 behandelte BCG-Mäuse im Vergleich zu Treg nicht behandelte BCG-Mäuse. Der beschriebene widersprüchliche Effekt der Treg-Titration auf die Proliferation CD4⁺ T-Lymphozyten konnte nun nicht mehr beobachtet werden, was die These der überschießenden Proliferation nach anti-CD3/anti-CD28-Kostimulation stützt. Womöglich führt die wiederholte Behandlung mit TNF80 zur Toleranzentwicklung gegenüber ebendieser Behandlung, ähnlich der bereits beschriebenen Toleranz gegenüber Entzündungsstimuli (*Challenges*).

Parallel zur schwächeren Suppression der T-Zell-Proliferation nach zweimaliger TNF80-Behandlung fanden sich kaum messbares IL-10 und deutlich erhöhte IFN- γ -Konzentrationen in den Überständen.

Es scheint, dass eine zweimalige Behandlung mit TNF80 zwar zu einer Expansion von Treg in chronischer Entzündung führt, diese Treg jedoch weniger suppressiv sind als die unbehandelten chronisch entzündeter Mäuse. Bei einmaliger Behandlung ließ sich keine Expansion von Treg in der Milz beobachten, allerdings zeigte sich *in vitro* eine stärkere Suppressivität. Schmid *et al.* [57] konnten zeigen, dass die sechsmalige Behandlung naiver Mäuse mit TNF80 *in vivo* zu einer verminderten Proliferation adoptiv transferierter T-Lymphozyten führt. Ob eine derartige Steigerung der Suppressivität durch die TNF80-Behandlung auch in chronisch entzündeten Tieren zu erwarten ist, lässt sich aus den *in vitro* Ergebnissen nicht sicher ableiten. Über die Bedeutung einer Behandlung und der Behandlungshäufigkeit mit TNF80 in einem chronisch-entzündlichen Milieu für die Suppressivität der Treg auf T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion könnte ein *in vivo* Suppressionsassay weiteren Aufschluss geben. Auf diesem Weg würde man weitere, eventuell ebenfalls in ihrer Funktion beeinflusste Zellen und andere Faktoren wie eine anhaltende Entzündungsreaktion nicht ausklammern und erhielte ein vollständigeres Bild.

Es scheint von Bedeutung zu sein, dass die TNF80-Behandlung erfolgt, während das entzündliche Geschehen aktiv ist. Behandelten wir nach der letzten BCG-Injektion, so zeigte sich kein Unterschied in der Suppressivität der Treg mit TNF80 behandelten und nicht behandelten BCG-Mäuse. Allerdings fand sich bei zweimaliger Nachbehandlung ein signifikant erhöhter Anteil CD62L⁺, also aktivierter, Treg in der Milz.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Effekte einer Behandlung mit dem TNFR2-selektiven Agonisten TNF80 in unterschiedlichen Entzündungszuständen. Zur Induktion einer chronischen Entzündung diente das BCG-Mausmodell von *Sade-Feldman et al.* [14]. Um eine akute Entzündungsreaktion auszulösen, verabreichten wir BCG bzw. LPS einmalig als *Challenge*. Als Messgrößen dienten Gewicht, Zellzahl und Zellverteilung in der Milz bzw. im Knochenmark, die *in vitro*-T-Zell-Suppressivität sowie die Konzentration verschiedener Zytokine in Serum und Zellkulturüberständen.

Die wiederholte Injektion von BCG führte zu einer Notfallmyelopoese mit Expansion myeloider Zellen im Knochenmark und in der Milz. Gleichzeitig kam es zu einer Reduktion der B- und T-Zellen. Diese Entzündungsreaktion war weitestgehend unabhängig von der TNFR2-Expression der einzelnen Zellen. Ob die Verminderung der Lymphozyten auf Verdrängung, direkter Suppression durch MDSCs oder Migration in die Peripherie beruht, könnte Gegenstand weiterer Studien sein.

Eine zweimalige Behandlung naiver Mäuse mit TNF80 führte ähnlich einer alleinigen BCG-*Challenge* zu einer akuten Entzündungsreaktion mit Zunahme von Milzgewicht und -zellzahl. Diese Behandlung führte zu einer Toleranz gegenüber weiteren Entzündungsstimuli durch eine BCG-*Challenge*. Im chronischen Entzündungsmodell führte die TNF80-Behandlung zu einer relativen Expansion der Treg-Fraktion, ohne Einfluss auf Milzgewicht und -zellzahl zu nehmen. Da in einer anderen Studie mehrfache Applikationen von TNF80 nötig waren, um Treg zu vermehren [57], ist anzunehmen, dass die entzündliche Umgebung die Treg empfänglicher gegenüber einer TNFR2-Aktivierung macht.

Wir zeigten außerdem, dass eine ein- oder zweimalige Behandlung mit TNF80 in akut oder chronisch entzündeten Mäusen zu einer Reduktion der Serum-TNF-Spiegel führt. Diese Toleranz gegenüber einem akuten Entzündungsstimulus, in diesem Fall gegenüber einer LPS-Injektion, bezeichneten wir als TNF80-Toleranz. Gleichzeitig kam es durch die Behandlung zu einer Reduktion des immunsuppressiven IL-10 im Serum. Ob IL-10 dennoch an der Toleranzentwicklung beteiligt ist, ließe sich beispielsweise durch die zusätzliche Applikation von anti-IL-10 mAb untersuchen.

Die *in vitro*-Suppressivität der Treg wurde im chronischen Entzündungsmodell durch eine einmalige Behandlung mit TNF80 gesteigert. Eine zweimalige Behandlung führte zwar zur Expansion von Treg, diese zeigten sich jedoch weniger suppressiv als die nicht behandelten

Mäuse. Die im Vergleich zu naiven Mäusen erhöhten IFN- γ -Konzentrationen in den Überständen der Treg chronisch entzündeter Mäuse konnten auch durch die einmalige TNF80-Behandlung nicht gesenkt werden. Allerdings führte die einmalige Behandlung hier zu einer deutlichen Steigerung der IL-10-Produktion im Überstand.

Die *in vivo*- Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der Zytokinbestimmung in Serum steht teilweise im Widerspruch mit den *in vitro*-Ergebnissen. Um eine genauere Aussage bezüglich der Wirkung von TNF80 auf die Treg-Suppressivität sowie die Zytokinspiegel im Serum treffen zu können, wäre eine Untersuchung im *in vivo*-Suppressionsassay sinnvoll.

Zusammenfassend stellt die Behandlung von Pathologien mit chronischer Entzündung durch TNF80 einen interessanten Ansatz dar. Aufgrund der komplexen Wirkung in Abhängigkeit von der Applikationsfrequenz sowie des Entzündungszustandes sind jedoch ausführliche weitere Studien notwendig, um die Effekte einer Behandlung ausreichend abschätzen zu können.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ACK-Puffer	Ammonium-Chlorid-Kalium-Puffer
AK / Ab	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ARG1	Arginase 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
cFLIP	<i>cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-Inhibitory Protein</i>
cIAP 1/2	<i>cellular Inhibitor of Apoptosis 1/2</i>
CpG	5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4</i>
CV	<i>Column Volume / Säulenvolumen</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DMARD	<i>Disease Modifying Anti Rheumatic Drug</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Scanning</i>
FADD	<i>Fas Associated protein with Death Domain</i>
FCS	fetales Kälberserum
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>
Gr-1	granulozytärer Marker

HRP	<i>Horseradish Peroxidase / Meerrettichperoxidase</i>
IFN	Interferon
IFA	Inkomplettes Freund-Adjuvans
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible NO Synthase</i>
IPEX	<i>Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked</i>
JNK	Januskinase
kDA	Kilodalton
LB-Medium	lysogeny broth Medium
LD50	„halbmaximaler Kill“
LPS	Lipopolysaccharid
m	Maus-
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MDSC	myeloide Suppressorzelle
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MTT	Diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFκB	<i>Nuclear Factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NTC	<i>No Template Control</i>
p	Signifikanzwert
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pei	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PI3-Kinase	Phosphatidyl Inositol-3-Kinase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>

s	<i>soluble</i>
sc	<i>single chain</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate / Natriumdodecylsulfat</i>
ssRNA	<i>single strand</i> Ribonukleinsäure
TACE	<i>TNF-α-converting enzyme</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIM	<i>TRAF-interacting motif</i>
TLR	<i>Toll-Like-Rezeptor</i>
tm	<i>transmembrane</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNC	Tenascin C
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	TNF-Rezeptor Typ 1
TNFR2	TNF-Rezeptor Typ 2
TNFSF	TNF Superfamilie
TRADD	<i>TNF-Receptor Associated Death Domain</i>
TRAF2	<i>TNF-Receptor Associated Factor 2</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Aufbaus des TNCscTNF80	11
Abbildung 2 Agarosegel einer exemplarischen Genotypisierung TNFR2 ^{fl/fl} -Mäuse.....	25
Abbildung 3 Agarosegel einer exemplarischen Genotypisierung CD4 ^{cre} TNFR2 ^{fl/fl} -Mäuse bezüglich der Expression von CD4 ^{cre}	25
Abbildung 4 Agarosegel einer exemplarischen Genotypisierung LysM ^{cre} TNFR2 ^{fl/fl} -Mäuse bezüglich der Expression von LysM ^{cre}	26
Abbildung 5 Agarosegel einer exemplarischen Genotypisierung LysM ^{cre} TNFR2 ^{fl/fl} -Mäuse bezüglich der Expression des wt LysM ^{cre}	26
Abbildung 6 Peroxidase-Reaktion.....	35
Abbildung 7 BCG-Modell.....	38
Abbildung 8 Milzgewicht und Gesamtzellzahl der Milz	39
Abbildung 9 Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen an der Gesamtzellzahl in der Milz .	40
Abbildung 10 Prozentualer Anteil der T- und B-Zellen an der Gesamtzellzahl in der Milz .	41
Abbildung 11 Prozentualer Anteil CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg an CD4 ⁺ T-Lymphozyten in der Milz	41
Abbildung 12 Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und B-Lymphozyten im Knochenmark	42
Abbildung 13 Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und B-Zellen in Milz und Knochenmark sowie der T-Zellen in der Milz von TNFR2 ^{fl/fl} Mäusen	44
Abbildung 14 Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und B-Zellen in Milz und Knochenmark sowie der T-Zellen in der Milz von TNFR2 ^{-/-} Mäusen.....	45
Abbildung 15 Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und B-Zellen in Milz und Knochenmark sowie der T-Zellen in der Milz von LysM ^{cre} TNFR2 ^{fl/fl} Mäusen	46
Abbildung 16 Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und B-Zellen in Milz und Knochenmark sowie der T-Zellen in der Milz von CD4 ^{cre} TNFR2 ^{fl/fl} Mäusen.....	47
Abbildung 17 Behandlungsschema naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse	48

Abbildung 18 Milzgewicht und Gesamtzellzahl in der Milz von naiven Mäusen, Mäusen mit BCG-Challenge und BCG-Mäusen.....	49
Abbildung 19 Behandlungsschema naiver Mäuse	50
Abbildung 20 Milzgewicht und Gesamtzellzahl in der Milz naiver Mäuse.....	51
Abbildung 21 Prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und der T- und B-Zellen an der Gesamtzellzahl in der Milz; prozentualer Anteil der Treg an CD4 ⁺ T-Zellen naiver Mäuse, prozentualer Anteil FoxP3 ⁺ Zellen an CD4 ⁺ T-Zellen naiver Mäuse	52
Abbildung 22 Behandlungsschema akut entzündeter Mäuse	53
Abbildung 23 Milzgewicht und Gesamtzellzahl in der Milz von Mäusen nach BCG-Challenge	54
Abbildung 24 Behandlungsschema chronisch entzündeter BCG-Mäuse.....	55
Abbildung 25 Milzgewicht und Gesamtzellzahl in der Milz; prozentualer Anteil der myeloiden Zellen und der T- und B-Zellen an der Gesamtzellzahl in der Milz der BCG-Mäuse	56
Abbildung 26 Prozentualer Anteil der Treg an CD4 ⁺ Zellen und an der Gesamtzellzahl in der Milz der BCG-Mäuse	57
Abbildung 27 Behandlungsschema naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse	59
Abbildung 28 Mittels Standardkurve ermittelte TNF-Serumkonzentrationen naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse	60
Abbildung 29 Mittels LD50 ermittelte TNF-Serumkonzentrationen naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse.....	61
Abbildung 30 Behandlungsschema akut und chronisch entzündeter Mäuse	62
Abbildung 31 Mittels LD50 errechnete TNF-Serumkonzentrationen akut und chronisch entzündeter Mäuse.....	64
Abbildung 32 Mittels Standardkurve errechnete TNF-Serumkonzentrationen akut und chronisch entzündeter Mäuse	63
Abbildung 33 IL-10 Serumkonzentration naiver, akut und chronisch entzündeter Mäuse mit und ohne TNF80-Behandlung.....	65
Abbildung 34 Mittels Standardkurve bzw. LD50 errechnete TNF-Serumkonzentration akut entzündeter Mäuse nach PBS bzw. TNF80 bzw. hitzeinaktiviertem TNF80	67

Abbildung 35 Behandlungsmodell chronisch entzündeter BCG-Mäuse.....	68
Abbildung 36 Relative Proliferation CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen. Stimulation mit 0,5µg/ml anti-CD3 und 0,25 µg/ml anti-CD28.....	70
Abbildung 37 Interleukin-10 und Interferon-γ Konzentration in den Überständen der Kulturen des T-Zell-Suppressionsassays.....	72
Abbildung 38 Behandlungsmodell chronisch entzündeter BCG-Mäuse.....	73
Abbildung 39 Relative Proliferation CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen. Stimulation mit 0,5µg/ml anti-CD3 und 0,25 µg/ml anti-CD28.....	74
Abbildung 40 Relative Proliferation CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen. Stimulation mit 0,5µg/ml anti-CD3	75
Abbildung 41 Interleukin-10 und Interferon-γ Konzentration in den Überständen der Kulturen des T-Zell-Suppressionsassays.....	76
Abbildung 42 Nachbehandlungsschema chronisch entzündeter Mäuse	77
Abbildung 43 Relative Proliferation CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen. Stimulation mit 0,5µg/ml anti-CD3	78
Abbildung 44 Prozentualer Anteil unreifer bzw. reifer Treg an CD4 ⁺ Zellen	79

7 Literaturverzeichnis

- [1] SADE-FELDMAN, Moshe ; KANTERMAN, Julia ; ISH-SHALOM, Eliran ; ELNEKAVE, Mazal ; HORWITZ, Elad ; BANIYASH, Michal: *Tumor necrosis factor-alpha blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation*. In: *Immunity* 38 (2013), Nr. 3, S. 541–554
- [2] SCHMID, Tobias ; FALTER, Lena ; WEBER, Sabine ; MÜLLER, Nils ; MOLITOR, Konstantin ; ZELLER, David ; WEBER-STEFFENS, Dorothea ; HEHLGANS, Thomas ; WAJANT, Harald ; MOSTBÖCK, Sven ; MÄNNEL, Daniela N.: *Chronic Inflammation Increases the Sensitivity of Mouse Treg for TNFR2 Costimulation*. In: *Frontiers in immunology* 8 (2017), S. 1471
- [3] RASSOW, Joachim ; HAUSER, Karin ; NETZKER, Roland ; DEUTZMANN, Rainer: *Duale Reihe Biochemie*. 2. Aufl., 2008
- [4] MARTIN, Michael ; RESCH, Klaus: *Immunologie* : Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 2009
- [5] MURPHY, Kenneth ; TRAVERS, Paul ; WALPORT, Mark: *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. : Spektrum Akademischer Verlag, 2009
- [6] RINK, Lothar ; KRUSE, Andrea ; HAASE, Hajo: *Immunologie für Einsteiger* : Spektrum Akademischer Verlag, 2012
- [7] HOEPPLI, Romy E. ; WU, Dan ; COOK, Laura ; LEVINGS, Megan K.: *The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome*. In: *Frontiers in immunology* 6 (2015), S. 61
- [8] ALUNNO, Alessia ; CARUBBI, Francesco ; BISTONI, Onelia ; CATERBI, Sara ; BARTOLONI, Elena ; MIRABELLI, Giulia ; CANNARILE, Francesca ; CIPRIANI, Paola ; GIACOMELLI, Roberto ; GERLI, Roberto: *T Regulatory and T Helper 17 Cells in Primary Sjogren's Syndrome: Facts and Perspectives*. In: *Mediators of inflammation* 2015 (2015), S. 243723
- [9] CHEN, Xin ; OPPENHEIM, Joost J.: *TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells*. In: *Current directions in autoimmunity* 11 (2010), S. 119–134
- [10] BYNG-MADDICK, Rachel ; EHRENSTEIN, Michael R.: *The impact of biological therapy on regulatory T cells in rheumatoid arthritis*. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 54 (2015), Nr. 5, S. 768–775

- [11] CHEN, Xin ; WU, Xueqiang ; ZHOU, Qiong ; HOWARD, O. M. Zack ; NETEA, Mihai G. ; OPPENHEIM, Joost J.: *TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (2013), Nr. 3, S. 1076–1084
- [12] CHEN, Xin ; SUBLESKI, Jeffrey J. ; HAMANO, Ryoko ; HOWARD, O. M. Zack ; WILTROUT, Robert H. ; OPPENHEIM, Joost J.: *Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood*. In: *European journal of immunology* 40 (2010), Nr. 4, S. 1099–1106
- [13] CAO, Chao ; MA, Tao ; CHAI, Yan-Fen ; SHOU, Song-Tao: *The role of regulatory T cells in immune dysfunction during sepsis*. In: *World journal of emergency medicine* 6 (2015), Nr. 1, S. 5–9
- [14] ZHANG, Xinhai ; KELARIA, Sonia ; KERSTETTER, Justin ; WANG, Jun: *The functional and prognostic implications of regulatory T cells in colorectal carcinoma*. In: *Journal of gastrointestinal oncology* 6 (2015), Nr. 3, S. 307–313
- [15] BOER, Mardi C. ; JOOSTEN, Simone A. ; OTTENHOFF, Tom H. M.: *Regulatory T-Cells at the Interface between Human Host and Pathogens in Infectious Diseases and Vaccination*. In: *Frontiers in immunology* 6 (2015), S. 217
- [16] GABRILOVICH, Dmitry I. ; NAGARAJ, Srinivas: *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (2009), Nr. 3, S. 162–174
- [17] OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne ; SINHA, Pratima: *Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (2009), Nr. 8, S. 4499–4506
- [18] KANTERMAN, Julia ; SADE-FELDMAN, Moshe ; BANİYASH, Michal: *New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression*. In: *Seminars in cancer biology* 22 (2012), Nr. 4, S. 307–318
- [19] NAGARAJ, Srinivas ; GABRILOVICH, Dmitry I.: *Regulation of suppressive function of myeloid-derived suppressor cells by CD4+ T cells*. In: *Seminars in cancer biology* 22 (2012), Nr. 4, S. 282–288
- [20] WANG, Ling ; ZHAO, Juan ; REN, Jun P. ; WU, Xiao Y. ; MORRISON, Zheng D. ; EL GAZZAR, Mohamed ; NING, Shun B. ; MOORMAN, Jonathan P. ; YAO, Zhi Q.: *Expansion*

- of myeloid-derived suppressor cells promotes differentiation of regulatory T cells in HIV-1+ individuals*. In: *AIDS (London, England)* 30 (2016), Nr. 10, S. 1521–1531
- [21] LUAN, Y. ; MOSHEIR, E. ; MENON, M. C. ; WILSON, D. ; WOYTOVICH, C. ; OCHANDO, J. ; MURPHY, B.: *Monocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in renal transplant patients and mediate CD4(+) Foxp3(+) Treg expansion*. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13 (2013), Nr. 12, S. 3123–3131
- [22] GABRILOVICH, Dmitry I. ; OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne ; BRONTE, Vincenzo: *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (2012), Nr. 4, S. 253–268
- [23] GABRILOVICH, Dmitry I. ; COLLAZO, Michelle ; NAGARAJ, Srinivas ; YOUN, Je-In: *Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearing Mice* (2008)
- [24] LINDAU, Dennis ; GIELEN, Paul ; KROESEN, Michiel ; WESSELING, Pieter ; ADEMA, Gosse J.: *The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells*. In: *Immunology* 138 (2013), Nr. 2, S. 105–115
- [25] WEED, Donald T. ; VELLA, Jennifer L. ; REIS, Isildinha M. ; LA FUENTE, Adriana C. de ; GOMEZ, Carmen ; SARGI, Zoukaa ; NAZARIAN, Ronen ; CALIFANO, Joseph ; BORRELLO, Ivan ; SERAFINI, Paolo: *Tadalafil reduces myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells and promotes tumor immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (2015), Nr. 1, S. 39–48
- [26] HOLMGAARD, Rikke B. ; ZAMARIN, Dmitriy ; LI, Yanyun ; GASMI, Billel ; MUNN, David H. ; ALLISON, James P. ; MERGHOUB, Taha ; WOLCHOK, Jedd D.: *Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner*. In: *Cell reports* 13 (2015), Nr. 2, S. 412–424
- [27] CABAL-HIERRO, Lucia ; LAZO, Pedro S.: *Signal transduction by tumor necrosis factor receptors*. In: *Cellular signalling* 24 (2012), Nr. 6, S. 1297–1305
- [28] MICHEAU, Olivier ; TSCHOPP, Jürg: *Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes*. In: *Cell* 114 (2003), Nr. 2, S. 181–190

- [29] SONAR, Sandip ; LAL, Girdhari: *Role of Tumor Necrosis Factor Superfamily in Neuroinflammation and Autoimmunity*. In: *Frontiers in immunology* 6 (2015), S. 364
- [30] PAPADAKIS, Konstantinos A. ; TARGAN, Stephan R.: *Tumor necrosis factor : Biology and therapeutic inhibitors*. In: *Gastroenterology* 119 (2000), Nr. 4, S. 1148–1157
- [31] PROBERT, L.: *TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects*. In: *Neuroscience* 302 (2015), S. 2–22
- [32] FISCHER, Roman ; MAIER, Olaf: *Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF*. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015 (2015), S. 610813
- [33] MATHIEU, Patrick ; BOUCHAREB, Rihab ; BOULANGER, Marie-Chloe: *Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease*. In: *Journal of immunology research* 2015 (2015), S. 851945
- [34] WAJANT, H. ; PFIZENMAIER, K. ; SCHEURICH, P.: *Tumor necrosis factor signaling*. In: *Cell death and differentiation* 10 (2003), Nr. 1, S. 45–65
- [35] HU, Xin ; LI, Baihua ; LI, Xiaoyan ; ZHAO, Xianxian ; WAN, Lin ; LIN, Guohong ; YU, Min ; WANG, Jing ; JIANG, Xiaodan ; FENG, Wei ; QIN, Zhihai ; YIN, Bingjiao ; LI, Zhuoya: *Transmembrane TNF- α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (2014), Nr. 3, S. 1320–1331
- [36] WANG, Jun ; AL-LAMKI, Rafia S.: *Tumor necrosis factor receptor 2: its contribution to acute cellular rejection and clear cell renal carcinoma*. In: *BioMed research international* 2013 (2013), S. 821310
- [37] PUNIT, Shivesh ; DUBE, Philip E. ; LIU, Cambrian Y. ; GIRISH, Nandini ; WASHINGTON, M. Kay ; POLK, D. Brent: *Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Restricts the Pathogenicity of CD8(+) T Cells in Mice With Colitis*. In: *Gastroenterology* 149 (2015), Nr. 4, 993-1005.e2
- [38] WAJANT, H.: *Principles of antibody-mediated TNF receptor activation*. In: *Cell death and differentiation* 22 (2015), Nr. 11, S. 1727–1741
- [39] WICOVSKY, A. ; HENKLER, F. ; SALZMANN, S. ; SCHEURICH, P. ; KNEITZ, C. ; WAJANT, H.: *Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF*

- receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation*. In: *Oncogene* 28 (2009), Nr. 15, S. 1769–1781
- [40] BAKER, Stacey J. ; REDDY, E. Premkumar: *Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily*. In: *Oncogene* 17 (1998), Nr. 25, S. 3261–3270
- [41] AGGARWAL, Bharat B.: *Tumor necrosis factor receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB* (2000)
- [42] KARL, I. ; JOSSBERGER-WERNER, M. ; SCHMIDT, N. ; HORN, S. ; GOEBELER, M. ; LEVERKUS, M. ; WAJANT, H. ; GINER, T.: *TRAF2 inhibits TRAIL- and CD95L-induced apoptosis and necroptosis*. In: *Cell death & disease* 5 (2014), e1444
- [43] CHEN, Xin ; BÄUMEL, Monika ; MÄNNEL, Daniela N. ; HOWARD, O. M. Zack ; OPPENHEIM, Joost J.: *Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+CD25+ T Regulatory Cells*, 2007
- [44] CORDERO-COMA, Miguel ; SOBRIN, Lucia: *Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in uveitis*. In: *Survey of ophthalmology* 60 (2015), Nr. 6, S. 575–589
- [45] NGUYEN, Douglas L. ; FLORES, Sarah ; SASSI, Kareem ; BECHTOLD, Matthew L. ; NGUYEN, Emily T. ; PAREKH, Nimisha K.: *Optimizing the use of anti-tumor necrosis factor in the management of patients with Crohn's disease*. In: *Therapeutic advances in chronic disease* 6 (2015), Nr. 3, S. 147–154
- [46] CAMPA, Molly ; RYAN, Caitriona ; MENTER, Alan: *An overview of developing TNF-alpha targeted therapy for the treatment of psoriasis*. In: *Expert opinion on investigational drugs* 24 (2015), Nr. 10, S. 1343–1354
- [47] JINESH, S.: *Pharmaceutical aspects of anti-inflammatory TNF-blocking drugs*. In: *Inflammopharmacology* (2015)
- [48] KEMANETZOGLOU, Elissavet ; ANDREADOU, Elisabeth: *CNS Demyelination with TNF- α Blockers*. In: *Current neurology and neuroscience reports* 17 (2017), Nr. 4, S. 36
- [49] MERCER, Louise K. ; LUNT, Mark ; LOW, Audrey L. S. ; DIXON, William G. ; WATSON, Kath D. ; SYMMONS, Deborah P. M. ; HYRICH, Kimme L.: *Risk of solid cancer in patients exposed to anti-tumour necrosis factor therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis*. In: *Annals of the rheumatic diseases* 74 (2015), Nr. 6, S. 1087–1093

- [50] FDA: *REMICADE (infliximab) prescribing information*. In: available from:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/103772s5359lbl.pdf (last
 accessed 2018-02-12)
- [51] FDA: *Humira (adalimumab) prescribing information*. In: available from:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/125057s0110lbl.pdf (last
 accessed 2018-02-12)
- [52] FDA: *Enbrel (etanercept) prescribing information*. In: available from:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/103795s5503lbl.pdf (last
 accessed 2018-02-12)
- [53] KEMPEN, John H. ; GANGAPUTRA, Sapna ; DANIEL, Ebenezer ; LEVY-CLARKE, Grace A. ;
 NUSSENBLATT, Robert B. ; ROSENBAUM, James T. ; SUHLER, Eric B. ; THORNE, Jennifer
 E. ; FOSTER, C. Stephen ; JABS, Douglas A. ; HELZLSouer, Kathy J.: *Long-term risk of
 malignancy among patients treated with immunosuppressive agents for ocular
 inflammation: a critical assessment of the evidence*. In: *American journal of
 ophthalmology* 146 (2008), Nr. 6, 802-12.e1
- [54] BAN, Liqin ; KUHTREIBER, Willem ; BUTTERWORTH, John ; OKUBO, Yoshiaki ;
 VANAMEE, Eva S. ; FAUSTMAN, Denise L.: *Strategic internal covalent cross-linking of
 TNF produces a stable TNF trimer with improved TNFR2 signaling*. In: *Molecular and
 cellular therapies* 3 (2015), S. 7
- [55] AMMER, Tobias: *Expression, Reinigung und funktioneller Test von rekombinantem
 TNFR2-spezifischem TNF* (2014)
- [56] RAUERT, Hilka ; WICOVSKY, Andreas ; MÜLLER, Nicole ; SIEGMUND, Daniela ;
 SPINDLER, Volker ; WASCHKE, Jens ; KNEITZ, Christian ; WAJANT, Harald: *Membrane
 tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2)*. In:
The Journal of biological chemistry 285 (2010), Nr. 10, S. 7394–7404
- [57] BANIYASH, Michal: *Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights
 and outlook*. In: *Seminars in cancer biology* 16 (2006), Nr. 1, S. 80–88
- [58] VAN DUYNE, Gregory D.: *Cre Recombinase*. In: *Microbiology Spectrum* (2015), 3 (1)
- [59] LORENZ, Todd C.: *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and
 optimization strategies*. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (2012), Nr. 63,
 e3998

- [60] PICOT, Julien ; GUERIN, Coralie L. ; VAN KIM, Caroline ; BOULANGER, Chantal M.: *Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation*. In: *Cytotechnology* 64 (2012), Nr. 2, S. 109–130
- [61] MILTENYI, Stefan ; MULLER, Werner ; WEICHEL, Walter ; RADBRUCH, Andreas: *High gradient magnetic cell separation with MACS*. In: *Cytometry* (1990), Nr. 11, 231–238
- [62] PARISII, C. R.: *Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies*. In: *Immunology and cell biology* 77 (1999), Nr. 6, S. 499–508
- [63] Sigma Aldrich Katalogeintrag für 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine. URL https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t0440?lang=de®ion=DE&gclid=EAIaIQobChMIInLPboOfs3QIVQ9iyCh1vvA5MEAAYASAAEgIRafD_BwE – Überprüfungdatum 2018-11-11
- [64] VAN TONDER, Alet ; JOUBERT, Annie M. ; CROMARTY, A. Duncan: *Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays*. In: *BMC research notes* 8 (2015), S. 47
- [65] DALPKE, Alexander H. ; LEHNER, Martin D. ; HARTUNG, Thomas ; HEEG, Klaus: *Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance*. In: *Immunology* 116 (2005), Nr. 2, S. 203–212
- [66] ERMANN, Joerg ; HOFFMANN, Petra ; EDINGER, Matthias ; DUTT, Suparna ; BLANKENBERG, Francis G. ; HIGGINS, John P. ; NEGRIN, Robert S. ; FATHMAN, C. Garrison ; STROBER, Samuel: *Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD*. In: *Blood* 105 (2005), Nr. 5, S. 2220–2226
- [67] CHEN, Xin ; OPPENHEIM, Joost J.: *The phenotypic and functional consequences of tumour necrosis factor receptor type 2 expression on CD4(+) FoxP3(+) regulatory T cells*. In: *Immunology* 133 (2011), Nr. 4, S. 426–433
- [68] SU, Haibo ; ZHU, Shengling ; ZHU, Lin ; KONG, Cong ; HUANG, Qi ; ZHANG, Zhi ; WANG, Honghai ; XU, Ying: *Mycobacterium tuberculosis Latent Antigen Rv2029c from the Multistage DNA Vaccine A39 Drives TH1 Responses via TLR-mediated Macrophage Activation*. In: *Frontiers in Microbiology* 8 (2017), S. 189

- [69] RYDBERG MILLRUD, Camilla ; BERGENFELZ, Caroline ; LEANDERSSON, Karin: *On the origin of myeloid-derived suppressor cells*. In: *Oncotarget* (2016)
- [70] VAKNIN, Ilan ; BLINDER, Liora ; WANG, Lynn ; GAZIT, Roi ; SHAPIRA, Elena ; GENINA, Olga ; PINES, Mark ; PIKARSKY, Eli ; BANIYASH, Michal: *A common pathway mediated through Toll-like receptors leads to T- and natural killer-cell immunosuppression*. In: *Blood* 111 (2008), Nr. 3, S. 1437–1447
- [71] FISCHER, Roman ; MAIER, Olaf ; SIEGEMUND, Martin ; WAJANT, Harald ; SCHEURICH, Peter ; PFIZENMAIER, Klaus: *A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death*. In: *PloS one* 6 (2011), Nr. 11, e27621
- [72] PEDRON, Thierry ; GIRARD, Robert ; CHABY, Richard: *TLR4-dependent lipopolysaccharide-induced shedding of tumor necrosis factor receptors in mouse bone marrow granulocytes*. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (2003), Nr. 23, S. 20555–20564
- [73] BRONSTEIN-SITTON, Noemí ; COHEN-DANIEL, Leonor ; VAKNIN, Ilan ; EZERNITCHI, Analía V. ; LESHEM, Benny ; HALABI, Amal ; HOURI-HADAD, Yael ; GREENBAUM, Eugenia ; ZAKAY-RONES, Zichria ; SHAPIRA, Lior ; BANIYASH, Michal: *Sustained exposure to bacterial antigen induces interferon-gamma-dependent T cell receptor zeta down-regulation and impaired T cell function*. In: *Nature immunology* 4 (2003), Nr. 10, S. 957–964
- [74] KATSCHINSKI, Thomas ; GALANOS, Chris ; COUMBOS, Alexandra ; FREUDENBERG, Marina A.: *Gamma Interferon Mediates Propionibacterium acnes-Induced Hypersensitivity to Lipopolysaccharide in Mice*. In: *Infection and Immunity* (1992), Nr. 5
- [75] LAMONTAIN, Vanessa ; SCHMID, Tobias ; WEBER-STEFFENS, Dorothea ; ZELLER, David ; JENEI-LANZL, Zsuzsa ; WAJANT, Harald ; STRAUB, Rainer H. ; MÄNNEL, Daniela N.: *Stimulation of TNF receptor type 2 expands regulatory T cells and ameliorates established collagen-induced arthritis in mice*. In: *Cellular & molecular immunology* (2018)
- [76] HEUER, J. G. ; ZHANG, T. ; ZHAO, J. ; DING, C. ; CRAMER, M. ; JUSTEN, K. L. ; VONDERFECHT, S. L. ; NA, S.: *Adoptive Transfer of In Vitro-Stimulated CD4+CD25+ Regulatory T Cells Increases Bacterial Clearance and Improves Survival in Polymicrobial Sepsis*. In: *The Journal of Immunology* 174 (2005), Nr. 11, S. 7141–7146

- [77] HEIN, François ; MASSIN, Frédéric ; CRAVOISY-POPOVIC, Aurélie ; BARRAUD, Damien ; LEVY, Bruno ; BOLLAERT, Pierre-Edouard ; GIBOT, Sébastien: *The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states*. In: *Critical care (London, England)* 14 (2010), Nr. 1, R19
- [78] STIEGLITZ, David ; SCHMID, Tobias ; CHHABRA, Nirav F. ; ECHTENACHER, Bernd ; MÄNNEL, Daniela N. ; MOSTBÖCK, Sven: *TNF and regulatory T cells are critical for sepsis-induced suppression of T cells*. In: *Immunity, inflammation and disease* 3 (2015), Nr. 4, S. 374–385
- [79] POLZ, Johannes ; REMKE, Annika ; WEBER, Sabine ; SCHMIDT, Dominic ; WEBER-STEFFENS, Dorothea ; PIETRYGA-KRIEGER, Anne ; MÜLLER, Nils ; RITTER, Uwe ; MOSTBÖCK, Sven ; MÄNNEL, Daniela N.: *Myeloid suppressor cells require membrane TNFR2 expression for suppressive activity*. In: *Immunity, inflammation and disease* 2 (2014), Nr. 2, S. 121–130
- [80] CHAVEZ-GALAN, Leslie ; VESIN, Dominique ; UYSAL, Husnu ; BLASER, Guillaume ; BENKHOUCHE, Mahdia ; RYFFEL, Bernhard ; QUESNIAUX, Valérie F. J. ; GARCIA, Irene: *Transmembrane Tumor Necrosis Factor Controls Myeloid-Derived Suppressor Cell Activity via TNF Receptor 2 and Protects from Excessive Inflammation during BCG-Induced Pleurisy*. In: *Frontiers in immunology* 8 (2017), S. 999
- [81] RANDOW, Felix ; SYRBE, Uta ; MEISEL, Christian ; KRAUSCH, Dietmar ; ZUCKERMANN, Heidrun ; PLATZER, Cornelia ; VOLK, Hans-Dieter: *Mechanism of Endotoxin Desensitization: Involvement of Interleukin 10 and Transforming Growth Factor beta*. In: *J. Exp. Med.* (1995), Nr. 181
- [82] EHRENSTEIN, Michael R. ; EVANS, Jamie G. ; SINGH, Animesh ; MOORE, Samantha ; WARNES, Gary ; ISENBERG, David A. ; MAURI, Claudia: *Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy*. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (2004), Nr. 3, S. 277–285

8 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Daniela Männel und Herrn Tobias Schmid für die freundliche Überlassung des Themas und die jederzeit hervorragende Betreuung.

Ein sehr herzlicher Dank geht an Frau Dorothea Weber-Steffens für die tatkräftige Unterstützung und die kollegiale Zusammenarbeit sowie an das gesamte Forschungsteam des Instituts für Immunologie. Die kompetente und immer ausgesprochen freundliche Hilfe ermöglichte die reibungslose Durchführung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die dauerhafte Unterstützung danken.