

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Die Entwicklung des Homingrezeptorprofils isolierter regulatorischer T-Zellen
unter *in vitro* Stimulation

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johanna Franziska Kerschbaum

2020

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Die Entwicklung des Homingrezeptorprofils isolierter regulatorischer T-Zellen
unter *in vitro* Stimulation

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johanna Franziska Kerschbaum

2020

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Edinger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hinrich Abken

Tag der mündlichen Prüfung

29.05.2020

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ag	Antigen
ANOVA	One-Way Analysis of Variance
APC	Allophycocyanin
APCs	Antigenpräsentierende Zellen
ATRA	All-trans-Retinsäure (<i>all-trans-retinoic acid</i>)
bzw	beziehungsweise
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLA	kutanes Lymphozyten Antigen " <i>cutaneous lymphocyte Ag</i> "
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dendritische Zellen
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
DLI	Donor Lymphozyten Infusion
exp	polyklonal expandierte Zellen
exv	<i>ex vivo</i> isolierte Zellen
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FOXP3	<i>Forkhead Box Protein P3</i>
FSC	Vorwärts-Streulicht (<i>forward scatter</i>)
GCS-F	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor (<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>)
GMP	Gute Herstellungsbedingungen (<i>good manufacturing practice</i>)
GVL	Graft-versus-Leukämie
GVHD	Graft-versus-Host-Erkrankung (<i>graft-versus-host-disease</i>)
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation

ICOS	Induzierbarer Kostimulator
IDO	Indoleamine-2,3-dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL2	Rekombinantes humanes Interleukin 2
ITAMs	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
IPEX	<i>immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked</i>
KG	Körpergewicht
KLF2	Kruppel-ähnlicher Faktor 2 (<i>Kruppel-like factor 2</i>)
LK	Lymphknoten
MACS	Magnetische Zellseparation
MFI	Mittlere Intensität der Fluoreszenz (<i>mean-fluorescence-intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mLK	Mesenteriale Lymphknoten (<i>mesenterial lymph nodes</i>)
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MW	Mittelwert
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
n.s.	Nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PerCP	Peridininchlorophyll
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonuclein acid</i>)
SEM	<i>Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)</i>
SLO	Sekundäre lymphatische Organe
SSC	„Seitwärts-Streulicht“ (<i>sidewards scatter</i>)
TCR	T-Zellrezeptor
Tkonv	Konventionelle CD4 ⁺ T-Zelle

Treg	Regulatorische T-Zelle
tTreg	im Thymus gereifte regulatorische T-Zelle
iTreg	<i>in vitro</i> gereifte regulatorische T-Zelle
pTreg	in der Peripherie gereifte regulatorische T-Zelle
TSDR	Treg spezifische, demethylierte Region
z.B.	Zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	6
1.1 Die T-Zell vermittelte Immunantwort	6
1.2 Regulatorische T-Zellen.....	10
1.2.1 Der Transkriptionsfaktor FOXP3.....	13
1.2.2 Phänotypische Differenzierung.....	14
1.2.3 Funktionelle Eigenschaften	16
1.2.4 Subgruppen regulatorischer T-Zellen	17
1.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation	18
1.3.1 Die Graft-versus-Host-Erkrankung	20
1.3.2 GVHD und regulatorische T-Zellen.....	24
1.4 Die Migration von T-Zellen.....	28
1.4.1 Molekulare Bestandteile der Migration.....	29
1.4.2 Die zelluläre Extravasation	33
1.4.3 Das Migrationsverhalten regulatorischer T-Zellen.....	34
1.4.4 Induktion von gewebespezifischem Homing bei Aktivierung.....	35
2 Zielsetzung.....	37
3 Material und Methoden.....	38
3.1 Material.....	38
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	38
3.1.2 Medien, Puffer, Lösungen	39
3.1.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	39
3.1.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)	40
3.1.5 Magnetische Beads.....	41
3.1.6 Geräte	41
3.1.7 Software und Programme.....	42
3.2 Methoden	42
3.2.1 Bestimmung der Zellzahl	42
3.2.2 Isolation der verwendeten Zellpopulationen.....	43
3.2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation	43
3.2.2.2 Auftauen von Zellen.....	43
3.2.2.3 Magnetische Separation	44

3.2.3	Antikörperbasierte Zellfärbung zur durchflusszytometrischen Analyse	44
3.2.3.1	Oberflächenfärbung	44
3.2.3.2	Intranukleäre Foxp3 Färbung.....	45
3.2.3.3	CFSE Färbung.....	46
3.2.4	Isolation und Sortierung humaner T-Zellen.....	47
3.2.4.1	Magnetbasierte Anreicherung	47
3.2.4.2	Fluoreszenzbasiertes Sorting.....	47
3.2.5	<i>In vitro</i> Methoden.....	48
3.2.5.1	Polyklonale Expansion von Treg- und Tkonv-Populationen	48
3.2.5.2	Gemischte Lymphozyten Reaktion	49
3.2.5.3	Migrationsassay.....	50
3.2.6	Statistik	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Homingrezeptorprofile <i>ex vivo</i> isolierter CD4 ⁺ T-Zellen	51
4.2	Analyse des Homingrezeptorprofils CD4 ⁺ T-Zellen im Rahmen der polyklonalen Expansion.....	55
4.2.1	Isolation und Expansion der Zielpopulationen	55
4.2.2	Homingrezeptorexpression expandierter CD4 ⁺ T-Zellen.....	59
4.2.3	Vergleich des Homingrezeptorprofils CD4 ⁺ T-Zellen vor und nach polyklonaler Expansion	61
4.2.4	Analyse der Homingrezeptoren und der FOXP3-Expression von CD4 ⁺ T-Zellen nach polyklonaler Expansion mit ATRA.....	66
4.2.4.1	Homingrezeptorprofil CD4 ⁺ T-Zellen bei Kultivierung mit ATRA	66
4.2.4.2	Stabilisierung und Steigerung der FOXP3 Expression bei Kultivierung mit ATRA.....	70
4.3	Homingrezeptorprofil von CD4 ⁺ T-Zellen nach allogener <i>in vitro</i> Stimulation.....	71
5	Diskussion	75
5.1	Homingrezeptorprofile <i>ex vivo</i> isolierter CD4 ⁺ T-Zellen	76
5.2	Homingrezeptorprofile von CD4 ⁺ T-Zellen nach polyklonaler Expansion und Vergleich zu <i>ex vivo</i> isolierten Zellen.....	83
5.2.1	Homingrezeptorprofile CD4 ⁺ T-Zellen nach polyklonaler Expansion mit ATRA	95

5.3	Homingrezeptorprofile CD4 ⁺ T-Zellen nach allogener <i>in vitro</i> Stimulation	100
6	Zusammenfassung	102
7	Anhang	104
7.1	Tabellenverzeichnis	104
7.2	Abbildungsverzeichnis	104
8	Literaturverzeichnis	105
9	Danksagung	129

1 Einleitung

1.1 Die T-Zell vermittelte Immunantwort

Alle zellulären Bestandteile des Blutes entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen. Da diese Zellen das Potential besitzen sich in nahezu jede Zelle zu differenzieren, werden sie als pluripotent bezeichnet. Unter dem Einfluss von Zytokinen im Knochenmark gehen aus ihnen die gemeinsame Lymphozytenvorläuferzelle und die gemeinsame myeloide Vorläuferzelle hervor, die bereits in ihrer Entwicklung auf bestimmte Zelllinien restringiert sind und somit multipotent sind. Die gemeinsame Lymphozytenvorläuferzelle differenziert sich in T-, B- oder natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen). NK- und B-Zellen reifen im Knochenmark weiter, während die Ausdifferenzierung von T-Zellen vorrangig im Thymus erfolgt. Aus der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle reifen verschiedene Typen der Granulozyten sowie Monozyten, Erythrozyten, Blutplättchen und unreife dendritische Zellen (DC) heran. Granulozyten zirkulieren im Blut, bis sie zu einer Entzündung (neutrophile Granulozyten) oder einer allergischen Reaktion (eosinophile und basophile Granulozyten) rekrutiert werden. DC wandern in das periphere Gewebe ein und nehmen dort Antigene auf, um sie in lymphatischen Geweben antigenspezifischen T-Lymphozyten zu präsentieren. Monozyten differenzieren ebenfalls im peripheren Gewebe zu Makrophagen aus und nehmen als phagozytierende Population eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem ein. Zu diesem System gehören außerdem physikalische und epitheliale Barrieren, verschiedene Proteine aus dem Blut und Zytokine. Es reagiert unspezifisch auf Pathogene oder auf Moleküle bei Zelluntergang und vermittelt die frühe Reaktion im Falle einer Aktivierung des Immunsystems. Im Gegensatz dazu besitzt das erworbene (adaptive) Immunsystem die Fähigkeit nicht nur auf zahlreiche Mikroben und Moleküle zu reagieren, sondern auch zwischen ihnen zu differenzieren, spezifisch darauf zu antworten und sich an bereits abgelaufenen Infektionen zu „erinnern“, was sich in einer schnelleren Immunreaktion bei Zweitinfektion äußert. Es wird vorrangig von Lymphozyten und von ihnen sezernierten Proteinen gebildet und besteht aus einer humoralen und einer zellulären Komponente. Alle Moleküle, die an spezifischen Rezeptoren der Lymphozyten binden können, werden unter dem Begriff der „Antigene“ zusammengefasst. Die Komponenten der adaptiven Abwehr sind untereinander als auch mit den Bestandteilen des angeborenen Immunsystems eng vernetzt. Die

humorale Antwort wird von B-Lymphozyten geleistet, die nach Antigenkontakt zu Plasmazellen ausdifferenzieren und durch sezernierte Antikörper extrazelluläre Antigene neutralisieren oder zu ihrer Eliminierung beitragen. Die zellvermittelte Antwort wird von T-Lymphozyten (T-Zellen) ausgeführt, die intrazelluläre Pathogene und verschiedene Bakterien beseitigen [1]. T-Zellen interagieren im Gegensatz zu B-Lymphozyten weder direkt mit Mikroben noch produzieren sie Antikörper, sind aber mit einem T-Zellrezeptor (TCR) ausgestattet. Dieser ähnelt Antikörpern strukturell und kann spezifisch an ein Antigen binden, wenn das Peptid auf der Oberfläche einer anderen Zelle an ein spezielles Glykoprotein, das MHC-Molekül gebunden vorliegt. MHC steht für „Haupthistokompatibilitätskomplex“. Dieser Begriff subsumiert eine große Gruppe von Genen, die unter anderem für diese Glykoproteine kodieren. Vor allem DC bieten darüber als antigenpräsentierende Zellen (APCs) naiven T-Zellen Antigene dar, die sie peripher aufnehmen, in sekundäre lymphatische Organe (SLOs) transportieren und als prozessiertes Peptid über ein MHC-Molekül präsentieren. Es werden die beiden homologen, aber strukturell verschiedenen MHC-Moleküle der Klasse I und II unterschieden. Über Klasse-I-MHC-Moleküle werden präferentiell CD8⁺T-Zellen Antigene dargeboten, über MHC-Klasse-II Moleküle werden CD4⁺T-Zellen stimuliert. Die Selektivität für den CD4- und CD8-positiven Corezeptor wird von einer nicht-polymorphen Immunglobulin-ähnlichen Kette im extrazellulären Anteil des MHC Moleküls vermittelt. Außerdem besteht dieser aus einer polymorphen Domäne, welche die Bindungsfurche für das Peptidfragment bildet. Durch die große Varianz der Aminosäuren in dieser Region können verschiedene Antigene gebunden werden. Der TCR erkennt bei der Bindung nicht nur das Peptid, sondern interagiert auch mit dem polymorphen Anteil des MHC-Moleküls, weshalb seine Spezifität neben dem Antigen auch vom MHC-Molekül abhängt. Dies bezeichnet man als „MHC-Restriktion“. Alle Zellen, die mit einem Zellkern ausgestattet sind, tragen MHC-I-Moleküle, während das Protein der MHC-II-Klasse hauptsächlich von DC, B-Lymphozyten und Makrophagen exprimiert wird. Die genetische Struktur des MHC ermöglicht eine enorme Vielfalt an MHC-Molekülen. Zum einen gibt es mehrere Gene, die für MHC-Moleküle kodieren (Polygenie) und zum anderen weisen diese Gene den höchsten bisher bekannten Polymorphismus im menschlichen Genom auf. Darüber hinaus ist die Expression der varianten Allele codominant [2]. Führt die Interaktion zwischen Zelle und dem MHC/Peptid Komplex zu einer vollständigen Aktivierung des TCR, kommt es zu

zahlreichen intrazellulären Signalen, die letztendlich in eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren münden, die wiederum an Steuerelemente der DNA binden und dadurch die Gentranskription beeinflussen. Hieraus resultieren Proliferation, Effektorfunktion und Differenzierung der Zelle. Der TCR ist ein Multiproteinkomplex der im Falle einer $\alpha\beta$ T-Zelle als Heterodimer aus einer TCR α - und einer TCR β -Kette vorliegt. Dies sind klonal variable Ketten, die das Antigen binden und die Spezifität der Zelle ausmachen. Zusammen mit unveränderlichen, invarianten Proteinen, die von jeder $\alpha\beta$ T-Zelle gleich exprimiert werden, bildet er den TCR-Komplex mit folgendem Aufbau: Über eine nicht kovalente Verbindung ist das spezifische $\alpha\beta$ -Heterodimer des TCR mit CD3 verbunden. Mit CD3 wird ein Komplex aus vier Signalketten bezeichnet, die sich jeweils aus zwei Heterodimeren zusammenlagern: CD3 γ CD3 ϵ und CD3 δ CD3 ϵ . Den letzten Teil des TCR-Komplexes bildet ein Homodimer aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen ζ -Proteinen. Die Colokalisation dieser drei Anteile wird in den Transmembrandomänen über die Interaktion von positiv geladenen Seitenketten des $\alpha\beta$ -Heterodimers und negativ geladenen Seitenketten von CD3 und dem ζ -Homodimer gewährleistet [3]. Den einzelnen Bestandteilen des TCR-Komplexes kommen verschiedenen Aufgaben bei der T-Zell Aktivierung zu. Der TCR selbst ist für die Antigenerkennung zuständig, allerdings sind seine zytoplasmatischen Anteile der α und β Ketten zu kurz, um ein intrazelluläres Signal auszulösen. CD3 und das ζ -Homodimer dagegen sind nicht am Antigenerkennungsprozess beteiligt - weshalb sie auch auf jeder T-Zelle unabhängig ihrer Antigen-Spezifität exprimiert werden - übertragen aber das Signal der Aktivierung des TCR nach intrazellulär. Mit Hilfe von bestimmten Aminosäuresequenzen - den ITAMs (Tyrosinaktivierungssequenzen von Immunrezeptoren, immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) - erfolgt die Signalweiterleitung und eine Aktivierung intrazellulärer Proteinkinasen [4]. Außerdem sorgt das CD3 Protein zusätzlich für die Expression eines funktionell vollständigen TCR-Komplexes. Mit Beads, die an CD3 und CD28 binden, kann die Antigenerkennung über den TCR simuliert werden.

Neben dem Mechanismus der Antigenerkennung sind auch kostimulatorische Signale und Zytokine an der Aktivierung einer T-Zelle beteiligt, die über Oberflächenmoleküle durch die APCs vermittelt wird. Ohne eine Kostimulation wird die T-Zelle in einen hyporesponsiven Zustand versetzt [5, 6]. Aktivierende Kostimulatoren sind beispielsweise CD28, das mit den Molekülen B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) interagiert

[7] oder ICOS (induzierbarer Kostimulator, CD278), das auf aktivierten T-Zellen mit seinem Liganden CD275 auf DC interagiert. Die naiven T-Zellen proliferieren durch die Aktivierung und entwickeln sich zu Effektorzellen. CD8⁺T-Zellen können sich nur zu zytotoxischen Zellen, CD4⁺T-Zellen dagegen in verschiedene Subtypen differenzieren. Zytotoxische Zellen erkennen infizierte Zellen an einem über MHC-I präsentierten Peptid und töten diese direkt durch Zytotoxine und Zytokine ab. Die Differenzierung der CD4⁺T-Zellen in die funktionellen Subtypen hängt von dem auslösenden Pathogen sowie dem Einfluss von Zytokinen ab, da durch sie linienspezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Viren oder intrazelluläre Bakterien beispielsweise induzieren Th1-Zellen, die IFN- γ und TNF- α produzieren. Extrazelluläre Bakterien, Pilze oder Würmer induzieren die Differenzierung zu Th2-Zellen, die IL-4, 5 und 13 produzieren, sowie Th17-Zellen, die IL-17 und IL-22 produzieren. Hauptsächlich über diese Zytokine, die an spezifische Rezeptoren der Zielzellen binden, vermitteln die CD4⁺T-Zellen ihre Effektormechanismen wie beispielsweise bei Th1-Zellen eine Aktivierung von Makrophagen, was diese zur effektiven Zerstörung von intrazellulären Mikroorganismen befähigt. TH2-Zellen sind auf die Aktivierung von B-Zellen spezialisiert und stimulieren sie zur Proliferation und Antikörperproduktion, was eine potente humorale Antwort ermöglicht (siehe 1.1). Eine unverzichtbare Fähigkeit des erworbenen Immunsystems ist hierbei die Differenzierung zwischen Selbst- und Fremdartigenen, um effektive Immunantworten nur gegen Pathogene und nicht gegen körpereigenes Gewebe zu richten. Da bei der T-Zell Entwicklung die Spezifitäten der TCR nach Rekombination zufällig sind und nicht davon beeinflusst werden, welche Antigene für jedes Individuum „fremd“ oder „selbst“ sind, enthält das gesamte Repertoire natürlicherweise Rezeptoren, die für körpereigene Moleküle von diesem Individuum spezifisch sind. Deshalb muss während der Reifung in den zentralen lymphatischen Organen die Selbsttoleranz der T-Zellen durch klonale Deletion sichergestellt werden [8]. CD4⁻CD8⁻ (doppelt-negative) Vorläuferzellen aus dem Knochenmark differenzieren sich im Thymus zu CD4⁺CD8⁺ (doppelt-positiven) Thymozyten und werden im Kortex mit Selbst-MHC/Peptid Komplexen auf Epithelzellen konfrontiert. Fünf Prozent der Thymozyten erkennen diesen Komplex, erhalten dadurch ein Überlebenssignal und werden somit MHC-restriktiv positiv selektiert, während die restlichen 95% absterben. Da in diesem Schritt die Erkennung eines Selbstantigens das Selektionsmerkmal ist, enthält die überlebende Population

auch potentiell schädliche, autoaggressive Zellen, die im folgenden Schritt, der „negativ-Selektion“, identifiziert und deletiert werden müssen: Je nach erkanntem MHC-Molekül differenziert sich der doppelt-positive Thymozyt in eine CD4⁺CD8⁻ (MHC-II-restringiert) oder eine CD4⁺CD8⁺ Zelle (MHC-I-restringiert), migriert in die Medulla des Thymus und stößt dort auf Selbst-MHC/Peptidkomplexe, die auf APCs aus dem Knochenmark exprimiert werden. Reagiert die T-Zelle mit ihrem TCR besonders stark auf den Komplex, wird sie deletiert. Durch diese Mechanismen resultiert letztendlich eine Population, die MHC-Moleküle zwar erkennt, allerdings nicht so stark, dass sie durch Selbstantigene zu einer aggressiven Immunreaktion aktiviert wird.

1.2 Regulatorische T-Zellen

Trotz der unter 1.1 beschriebenen Lymphozytenselektion kommt es immer wieder zu Autoimmunerkrankungen durch T-Zell Aktivität, womit sich die zentralen Mechanismen zur Toleranzsicherung als lückenhaft erweisen. Es werden T-Zellen in die Peripherie entlassen, die trotz Autoaggression der zentralen Selektion entgangen sind, weil sie z.B. auf Antigene reagieren, die nicht im Thymus dargeboten wurden. Um die mangelhafte Selektion im Thymus zu kompensieren, gibt es im humanen Organismus verschiedene periphere Toleranzmechanismen. Einen wesentlichen Beitrag leisten hierbei natürliche regulatorische T-Zellen (Treg). Diese Untergruppe der CD4⁺T-Zellen reguliert durch dominante Suppression autoaggressive T-Zellen und überschießende Immunreaktionen gegen Pathogene. Im Jahre 1970 fanden Gershon und Kondo erstmalig Hinweise auf eine Bedeutung im Thymus gereifter T-Zellen bei der peripheren Sicherung der Selbsttoleranz [9, 9]. Penhale beobachtete wenig später eine akute Thyreoiditis bei Ratten nach selektiver T-Zell Depletion durch Thymektomie und Bestrahlung und deutete diese Erkrankung bereits als Konsequenz des Verlustes einer Subpopulation, die autoallergische Reaktivität supprimiert [10, 11]. Durch Substitution lymphoider Zellen konnte er die Krankheit verhindern [12], wobei Sakaguchi letztendlich im Jahre 1995 die CD25 tragenden CD4⁺ T-Zellen als die supprimierende Subpopulation identifizierte [13, 14]. In seinem Modell zeigte er, dass CD4⁺T-Zellen mit konstitutiver Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) durch Regulation der Immunantwort auf Fremd- und Autoantigene zur Sicherung der peripheren Toleranz beitragen. So entwickelten immundefiziente Nacktmäuse nach Applikation CD25-depletierter T-Zellen massive Autoimmunerkrankungen, deren

Ausbruch durch zeitnahen Transfer von CD4⁺CD25⁺ Zellen verhindert werden konnte. Durch Applikation von CD4⁺CD25⁻ Zellen induzierte allogene Immunreaktionen normalisierten sich nach Substitution von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, womit Sakaguchi bereits ihr Potential zur Unterdrückung von Alloreaktionen zeigte. Treg stammen aus dem Thymus. Sie werden von dort allerdings verzögert freigesetzt, so dass sie bei Mäusen erst drei Tage nach der Geburt in der Peripherie nachweisbar sind. Bei geburtsnaher Thymektomie entwickelten Mäuse massive Autoimmunerkrankungen, die wiederum durch Applikation adulter CD4⁺CD25⁺ T-Zellen kurz nach Thymektomie verhindert werden konnten [15]. Basierend auf diesen Daten wurden auch im humanen Blut CD4⁺CD25^{high} T-Zellen identifiziert, die sowohl Proliferation als auch Zytokinproduktion kokultivierter T-Zellen supprimieren können [16–19]. Der Großteil der natürlichen Treg reift im Thymus heran und wird als „natürliche“ oder tTreg bezeichnet. Dort entstehen aus doppelt-negativen Vorläuferzellen CD4⁺CD25⁺ einfach-positive Thymozyten, die ca. fünf Prozent aller CD4⁺ Thymozyten ausmachen. Nach einer MHC-II-restringierten Selektion [20] kommt es nur dann zur Entwicklung eines regulatorischen Phänotyps, wenn der TCR des CD4⁺ Thymozyten eine sehr hohe Affinität zum im Thymus dargebotenen Autoantigen besitzt [21]. Dabei muss die Avidität allerdings gering genug sein, um die unter 1.1 beschriebene Negativselektion zu umgehen. Die Dauer des TCR Signals scheint für die Induktion einer Treg spezifischen epigenetischen Modifikation von Bedeutung zu sein [22]. An der Entstehung der tTreg sind außerdem weitere Faktoren, wie IL-2, TGF- β und kostimulatorische Signale über CD28 beteiligt [23, 24]. Die Zellen haben als CD4⁺ Zelle vor Austritt in die Peripherie ihren Treg-Phänotyp und ihre suppressive Funktion bereits vollständig erworben [21, 25].

Den natürlichen regulatorischen T-Zellen konnte kein eindeutiger Immunphänotyp zugeordnet werden und eine zuverlässige Identifikation gestaltete sich schwierig. Weder das von Treg konstitutiv intrazellulär exprimierte Antigen CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), noch das in hohem Maße exprimierte GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene) [26, 27] noch das für die Modulation dendritischer Zellen bedeutsame Transmembranprotein LAG-3 [28, 29] erwiesen sich als exklusive spezifische Marker [30]. Um Treg von aktivierten CD4⁺ konventionellen T-Zellen (T_{konv}) abzugrenzen, untersuchte man die α -Kette des Interleukin-7 Rezeptors (CD127), deren Expression im Gegensatz zu

Tkonv auf Treg vermindert oder nicht vorhanden ist und invers mit der suppressiven Fähigkeit der Zelle korreliert. Hierbei zeigte sich jedoch, dass auch konventionelle CD4⁺T-Zellen, vor allem in Patienten mit systemischen entzündlichen Erkrankungen, CD127 vermindert exprimieren ohne dabei suppressive Eigenschaften zu entwickeln [31, 32].

Der Schritt zur aktuell zuverlässigsten Identifizierung der Treg gelang durch eine Untersuchung des Gendefektes der sogenannten „*scurfy*“ Mäuse. Dieser Mausstamm trägt eine x-chromosomal rezessive Mutation, die durch eine autoimmune, inflammatorische Hyperaktivität von CD4⁺T-Zellen in hemizygoten Männchen innerhalb des ersten Lebensmonats zum Tod führt [33]. Man identifizierte das mutierte Gen, bezeichnete es als *foxp3*-Gen [34] und konnte kurz darauf dem entsprechenden Defekt im orthologen humanen *foxp3*-Gen eine Erkrankung zuordnen: Das IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) [35–37]. Dieses X-chromosomale Syndrom, das bereits seit 1982 bekannt ist, geht mit massiven Autoimmunerkrankungen in verschiedenen endokrinen Organen einher und endet ohne allogene Stammzelltransplantation meist nach wenigen Lebensjahren letal [38]. Heterozygote, weibliche Trägerinnen der *foxp3*-Genmutation bleiben gesund, da durch die zufällige Inaktivierung des X-Chromosoms einige T-Zellen ein intaktes *foxp3*-Allel exprimieren und funktionelle Treg die pathogenen T-Zellen supprimieren können [39]. Neben IPEX scheinen Mutationen im *foxp3*-Gen durch mangelhafte Treg Entwicklung auch an der Entstehung anderer Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel Typ1 Diabetes beteiligt zu sein [40]. FOXP3 wird in murinen CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen und CD4⁺CD25⁺CD8⁻ Thymozyten stark exprimiert, in anderen Thymozyten, T- und B-Zellen dagegen nicht [41]. *foxp3*-defizienten Mäusen fehlen CD4⁺CD25⁺ Treg, während dagegen eine Überexpression des *foxp3*-Gens mit einer erhöhten Zahl regulatorischer T-Zellen einhergeht [42]. Im Menschen wird FOXP3 in supprimierenden CD4⁺CD25⁺ T-Zellen stark exprimiert [43], wobei die Treg, wie auch in der Maus, vor allem in der CD25^{high} Population anreichern [16, 44]. Über dieses Gen gelang die Entdeckung eines linienspezifischen, intranukleären Transkriptionsfaktors als Schlüsselement in der Steuerung der Treg-Entwicklung, -Differenzierung und -Funktion.

1.2.1 Der Transkriptionsfaktor FOXP3

Forkhead box protein P3 (FOXP3) ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der *forkhead-winged-helix* Proteine, der direkt durch Bindung an bis zu 2800 Stellen im Genom und indirekt durch eine Interaktion mit zahlreichen Kofaktoren die transkriptionale Aktivität vieler Gene positiv oder negativ kontrolliert. Das 431 Aminosäuren große Protein enthält neben der N-terminalen Domäne und einer zentralen Zinkfinger- und Leuzin-Zipper-Domäne auch eine funktionell bedeutende Domäne am C-terminalen Ende, die an die DNA bindet [45]. Der Nachweis der funktionellen Bedeutung für Treg gelang, indem man zeigte, dass durch einen retroviralen Transfer oder bei transgener Expression des *foxp3*-Gens in naiven CD4⁺CD25⁺T-Zellen, diese sowohl phänotypische als auch funktionelle Eigenschaften von Treg entwickelten: Als transkriptionaler Aktivator induzierte FOXP3 die Expression funktioneller Moleküle (CTLA-4, GITR) und vermittelte gleichzeitig als Repressor eine verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-17, IFN- γ und TNF- α . Durch eine Interaktion mit FOXP3 wurden in aktivierten T-Zellen die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und NFAT, die für die Zytokin-Gen-Expression von essenzieller Bedeutung sind, daran gehindert ihre Zielgene zu induzieren. Die Zellen waren funktionell, supprimierten andere konventionelle T-Zellen *in vitro* und verhinderten die Entstehung von Autoimmunerkrankungen *in vivo* [41, 46–49]. Das Level der FOXP3 Expression ist für Treg entscheidend, denn ein vermindertes FOXP3 Vorkommen beeinträchtigt ihre suppressive Funktion [47]. Die Bedeutung von FOXP3 in der Differenzierung der Treg wurde durch Rudensky et al. nachgewiesen, indem sie T-Zell-defizienten Mäusen eine Mischung aus Knochenmarkzellen gesunder und FOXP3-defizienter Mäuse transplantierten. Die transplantierten Mäuse entwickelten keine lymphoproliferative Erkrankung. Da alle gebildeten CD25⁺ Treg von den Zell-Vorläufern mit intaktem *foxp3*-Gen abstammten, wurde bewiesen, dass die *foxp3*-Genexpression eine Voraussetzung für die Treg Differenzierung im Thymus darstellt [50]. Die initiale FOXP3 Expression wird durch die Interaktion des TCR mit einem MHC-II/Selbst-Antigen-Komplex, sowie durch IL-2, TGF- β oder Bestandteile intestinaler Mikroben getriggert [51]. Eine kontinuierliche FOXP3 Expression ist Voraussetzung für den Erhalt des transkriptionalen Programms und damit einer stabilen Treg Zelllinie. Eine Ablation des konditionalen *foxp3*-Allels in reifen Treg führt zu einem Verlust ihrer suppressiven Funktion *in vivo* und zu einer Produktion

proinflammatorischer Zytokine [52]. Das *foxp3*-Gen ist auf dem p-Arm des X-Chromosoms lokalisiert und enthält 11 Exons. Seine Initiierung und Aufrechterhaltung wird wesentlich von drei konservierten, nicht-kodierenden Sequenzen (CNS1-3) innerhalb des *foxp3*-Lokus bestimmt, die unterschiedliche Hypomethylierungsmuster aufweisen können. Während CNS3 über eine epigenetische Modifikation des Genpromotors vor allem die Initiierung der FOXP3 Expression bei der Entwicklung im Thymus vermittelt, stabilisiert CNS2 die Expression nach Verlassen des Thymus beispielsweise während der Proliferation oder in einem inflammatorischen Umfeld. Diese Funktion ist nur möglich, wenn die enthaltenen CpG (Cytosin und Guanin) Dinukleotide vollständig demethyliert vorliegen, weshalb diese Sequenz auch als Treg spezifische, demethylierte Region (TSDR) bezeichnet wird. Eine Hypomethylierung wird beispielweise durch den Einfluss von IL-2 gesichert [53]. CNS1 ist über den TGF- β Signalweg ein Schlüsselement für die Initiierung einer Expression von FOXP3 außerhalb des Thymus und für die Entstehung von iTreg und pTreg (siehe 1.2.4) von Bedeutung. In Tkonv wurde insbesondere bei Aktivierung eine Expression von FOXP3 beschrieben, ohne den Erwerb regulatorischer Fähigkeiten. Da es dabei nicht zu den Treg-spezifischen Modifikationen des epigenetischen Methylierungsprofils kam und beispielsweise die TSDR methyliert blieb [54], war diese Expression nur transient und signifikant geringer als in tTreg [31].

1.2.2 Phänotypische Differenzierung

In Abhängigkeit davon, ob bereits Kontakt zum spezifischen Antigen stattgefunden hat oder nicht, unterscheidet man verschiedene Phänotypen von T-Zellen. Anhand der reziproken Expression von Isoformen des Transmembranproteins CD45 ist eine Differenzierung zwischen naiven und kürzlich aktivierten T-Zellen oder Gedächtnis-T-zellen möglich [55, 56]. CD45 besitzt als Phosphatase enzymatische Eigenschaften und reguliert überwiegend positiv die Signaltransduktion im Falle einer TCR-Aktivierung. Naive T-Zellen exprimieren die größte Isoform des Enzyms, CD45RA (RA), welche ein spezifisches Segment enthält, das in einem als „A“ bezeichneten Exon kodiert ist und nur von Antikörpern gebunden werden kann, die selbst für dieses Segment spezifisch sind („RA“ = „restricted A“). Durch die TCR-Aktivierung werden bestimmte Splicingfaktoren exprimiert, welche die Exklusion der drei Exons A, B und C aus der mRNA des Moleküls vermitteln. Aus dem Ausschluss dieser variablen Exons und damit der von ihnen kodierten Proteinsequenzen, resultiert die Expression der

kleinsten Isoform CD45RO [57]. Auf Proteinebene findet direkt nach Aktivierung zuerst eine verstärkte Expression von RA statt, die daraufhin langsam abnimmt und über drei Tage hinweg durch RO ersetzt wird. Dieser Wechsel der Proteinexpression spiegelt verzögert die Vorgänge auf Ebene der mRNA wider. Die RAmRNA steigt nach Aktivierung für einige Stunden an, sinkt dann rasch ab und ist nach 24h nicht mehr nachweisbar, während die ROmRNA zwischenzeitlich akkumuliert [58]. Dieser Prozess wurde initial für T-Zellen beschrieben. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Treg im Thymus die RO Isoform exprimieren, bei Egress den RA+ Phänotypen erlangen [58] und nach Antigenkontakt erneut den Isotypenwechsel zu RO vollziehen [59]. Eine Änderung der exprimierten CD45-Isoform tritt auch bei *in vitro* Stimulation mittels CD3/CD28 Expander Beads ein [55, 60–63]. Im peripheren Blut eines Erwachsenen finden sich sowohl Treg des naiven Phänotyps (RA+) und als auch des antigenerfahrenen (RA-) [60, 62, 64], wobei diese Subpopulationen spezifische Eigenschaften haben und sich in mehrfacher Hinsicht voneinander unterscheiden. Die RA+ Gruppe subsumiert sowohl naive Zellen, die peripher keinen Antigenkontakt hatten als auch Zellen, die trotz Antigenkontakt nicht aktiviert wurden. Hinweisend dafür ist unter anderem ihre Expression von NUR77, ein Genlocus, dessen Aktivierung von einer TCR-Stimulation abhängt [65, 66]. Hierauf gehen die verschiedenen Bezeichnungen für die RA+ Gruppe, als „naive“, „zentrale“ oder „ruhende“ Zellen zurück. tTreg haben bei ihrer Reifung im Thymus bereits alle ein Signal über ihren Antigenrezeptor erfahren, allerdings wird dieses Signal durch genetische und epigenetische Mechanismen unter Einfluss von CTLA-4 und FOXP3 vermutlich so abgeschwächt, dass sich trotzdem in der Peripherie ein naiver Phänotyp findet. Es wird vermutet, dass durch diese das TCR-Signal abschwächenden Mechanismen auch peripher das Bestehen einer ruhenden Subpopulation gesichert wird [67]. Bei RA+Treg handelt es sich vermutlich ausschließlich um tTreg [59, 63, 65, 68], denn sie exprimieren im Gegensatz zu RA-Treg zu einem Großteil den Oberflächenmarker CD31, der aus dem Thymus emigrierte Zellen kennzeichnet [69]. Weiterhin proliferieren sie stark bei Kontakt mit autologen APCs, was der Spezifität für Selbstantigene von tTreg entspricht [60]. Ihr Vorkommen im peripheren Blut korreliert invers mit dem Alter des Spenders [60, 64]: In Nabelschnurblut machen sie den größten Teil der Treg aus [59, 63], bei jungen Erwachsenen nur noch circa 42% [62], was vermutlich auf den Rückgang ihrer Produktion im Thymus durch dessen Atrophie

im Alter zu erklären ist. Für ein frühes Differenzierungsstadium spricht außerdem die Höhe ihrer *T-cell-Rezeptor rearrangement excision circle* Levels, sowie die Länge ihrer Telomere. In beiden Parametern liegen sie höher als RA-Treg und ähneln stark RA+Tkonv [60]. RA+Treg exprimieren den Proliferationsmarker Ki 67 nicht und befinden sich *in vivo* in einem ruhenden Zustand, wobei sie bei Antigenkontakt proliferieren [59]. Sie halten sich überwiegend in SLOs auf und rezirkulieren durch Lymphe und Blut. Für dieses Homingverhalten exprimieren RA+Treg die entsprechenden Homingrezeptoren CCR7 und CD62L [70, 71], die ihnen Zugang zu SLOs ermöglichen und damit auch zu parakriner IL-2 Zufuhr durch andere dort ansässige T-Zell-Populationen. IL-2 ist für das Überleben der RA+ Zellen entscheidend [55, 65], während eine kontinuierliche Stimulation ihres TCR für ihren Erhalt nicht bedeutsam ist [66, 72]. Anders als die entsprechende naive Zellreihe im murinen System, zeigen sie *in vitro* suppressive Eigenschaften [59, 64].

Die antigenerfahrene Gruppe, die RA-Treg, verhalten sich bei Aktivierung hyporesponsiv, sind apoptotisch und benötigen eine anhaltende Stimulation ihres Rezeptors für ihre suppressive Funktion [16, 18, 19, 73]. Auch *in vivo* ist eine anhaltende Stimulation ihres TCR und von ICOS für ihr funktionelles Bestehen bedeutend [66, 72]. Im immunologischen Gleichgewichtszustand halten sie sich sowohl in peripheren Geweben als auch in Lymphknoten (LK) auf [65, 74]. Das Homingrezeptorprofil RA+ und RA-Treg unterscheidet sich stark, worauf in Kapitel 1.4.4 genauer eingegangen wird.

1.2.3 Funktionelle Eigenschaften

Regulatorische T-Zellen produzieren keine proinflammatorischen Zytokine und exprimieren konstitutiv die α -Kette des IL-2 Rezeptors, CD25. Um *in vitro* und *in vivo* zu überleben, sind sie auf eine exogene IL-2 Zufuhr angewiesen, da sie zum Remodelling des Chromatins an der entsprechenden Genregion nicht in der Lage sind [23, 75]. IL-2 erhält die Funktion und das Überleben der Zellen, indem es die Expression der FOXP3 mRNA induziert und stabilisiert sowie anti-apoptotische Proteine hochreguliert [45]. Während Treg *in vivo* kontinuierlich proliferieren, verhalten sie sich *in vitro* anerg [76], was durch die Bereitstellung großer Mengen IL-2 und kostimulatorischer Signale überwunden werden kann. Die Suppression von Treg richtet sich mit vielen unterschiedlichen Mechanismen auf zahlreiche verschiedene Zellgruppen, wie beispielsweise CD4⁺ und CD8⁺Effektor-T-Zellen, Makrophagen oder

DC [77]. Treg exprimieren konstitutiv intrazellulär das zytotoxische T-Lymphozyten assoziierte Protein 4 (CTLA-4), verlagern es nach Aktivierung auf die Zelloberfläche und binden damit hoch affin an CD80 und CD86 auf der APC. Damit halten sie einerseits kostimulatorische Bindungsstellen für konventionelle T-Zellen besetzt und regen andererseits die APC zur Expression des Enzyms Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) an, das durch den Verbrauch von Tryptophan und die Produktion proapoptotischer Moleküle immunmodulatorisch wirkt [78]. Weitere, funktionell bedeutende Transmembranproteine sind die beiden Ektoenzyme CD39 und CD73, die extrazelluläres ATP in Adenosin umsetzen, welches die Proliferation von Effektor-T-Zellen hemmt und DC supprimiert [79]. Das CD4-homologe Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (LAG3) wird von Treg stark exprimiert und hemmt nach Bindung an ein MHC-II Molekül die Reifung der APC und ihre kostimulatorische Kompetenz [29]. Über ihre TIGIT-Expression (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) induzieren Treg in DC die Produktion immunmodulatorischer Proteine, wie IL-10 und TGF- β [80]. Auch von Treg selbst werden immunmodulatorische Proteine produziert, wie IL-10, IL-35 [81], IL-9, und TGF- β . Durch Granzym-B können Treg Tkonv oder APCs direkt abtöten. Außerdem können sie durch die hohe Expression von CD25 parakrin produziertes, anti-apoptotisches IL-2 konsumieren und es so den konventionellen T-Zellen entziehen [82].

1.2.4 Subgruppen regulatorischer T-Zellen

Neben den im Thymus entstandenen tTreg können weitere regulatorische FOXP3⁺ Subgruppen differenziert werden. Als pTreg bezeichnet man FOXP3⁺ Zellen, die nicht im Thymus sondern in der Peripherie aus Tkonv entstehen [83]. Dazu kommt es in einem bestimmten Zytokinmilieu [84], bei einer antigenspezifischen Aktivierung in Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine [85], im Gastrointestinaltrakt durch den Einfluss von Darmbakterien [86] oder durch spezielle DC in Abhängigkeit von Retinsäure [87]. pTreg sind tTreg hinsichtlich ihrer Genexpression, suppressiven Funktion und Stabilität ähnlich, ihre Entwicklung hängt ebenso von TGF- β und einer Stimulation ihres TCR ab. Ein wesentlicher Unterschied ist ihre Antigenpezifität, da pTreg vorrangig Fremd-, tTreg dagegen Selbstantigene erkennen. Weiterhin exprimieren fast alle tTreg im peripheren Blut den Marker „Helios“ aus der Familie der Ikaros Transkriptionsfaktoren [88] sowie das Oberflächenmolekül Neuropilin 1 [89], weshalb diese Marker zur Differenzierung zwischen den beiden Subgruppen benutzt

wurden. Die Wertigkeit dieser Marker zur Differenzierung der Treg-Subpopulationen ist allerdings zunehmend umstritten [90, 91]. Bei einer weiteren Subgruppe, den sogenannten iTreg, wird *in vitro* durch eine TCR-Stimulation in Anwesenheit von TGF- β in FOXP3-negativen Zellen eine Expression von FOXP3 induziert. [92]. iTreg haben zwar *in vitro* mit tTreg vergleichbare suppressive Eigenschaften, zeigen jedoch keine stabile Expression von FOXP3 und keinen protektiven Effekt im Rahmen einer Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD) [93]. Die Unterschiede in Stabilität und Höhe der FOXP3 Expression der drei Subgruppen, lassen sich auf epigenetischer Ebene durch unterschiedliche Methylierungsmuster des *foxp3*-Locus erklären. tTreg zeigen eine spezifische DNA Hypomethylierung in der *foxp3* CNS2 Region, die eine stabile FOXP3 Expression trotz Proliferation oder extrazellulärer Einflüsse gewährleistet (siehe 1.2.1). Bei iTreg wird durch den Einfluss von TGF- β der Status der Histonmodifikation der *foxp3* CNS1 Region, die von zahlreichen Transkriptionsfaktoren angesteuert wird, verändert. Dies löst eine Expression von FOXP3 aus, solange der Stimulus anhält [94]. Eine Hypomethylierung tritt aber weder in der *foxp3* CNS1 noch der *foxp3* CNS2 Region ein, weshalb die FOXP3 Expression instabil und nur vorübergehend ist. pTreg dagegen erfahren durch Zytokine eine Modifikation ihrer *foxp3* CNS1 Region und durch eine Stimulation ihres TCR - zu einem gewissen Grad - eine *foxp3* CNS2 Demethylierung, weshalb sie FOXP3 stabil exprimieren können [22]. Weitere T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften, wie zum Beispiel IL-10 sezernierende Tr1 Zellen oder TGF- β -sezernierende TH3 Zellen sind bekannt. Sie entwickeln ihre suppressive Fähigkeit ebenfalls erst unter bestimmten Bedingungen und werden nicht wie die tTreg bereits im Thymus in ihrer Entwicklung festgelegt [95].

1.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) wird das hämatopoetische System eines an einer malignen oder benignen Erkrankung des Blutes leidenden Patienten eradiziert und durch Stammzellen eines gesunden Spenders ersetzt. Indikationen bei malignen Grunderkrankungen sind verschiedene Formen der akuten Leukämien, der myelodysplastischen Syndrome und der reifen und unreifen B- und T-Zellneoplasien. Bei benignen Erkrankungen, die mit einer hämatopoetischen Insuffizienz einhergehen, sind es beispielsweise die schwere aplastische Anämie oder die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie. Neben der Biologie der Grunderkrankung wird die Indikationsstellung von Alter, Komorbiditäten

des Empfängers und der Spenderkompatibilität determiniert [96]. Vor der Transplantation erfolgt eine Konditionierung, wobei mit einer Chemo- und/oder Ganzkörperstrahlentherapie folgende Ziele erreicht werden sollen: Eine Elimination maligner Zellen, eine Immunsuppression des Empfängers zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion sowie eine Myeloablation zur Erzeugung von Zellnischen für die neuen Stammzellen. Da die Konditionierung stark auf die Entwicklung des „Graft-versus-Leukämie-Effekts“ (GVL-Effekt) und der „Graft-versus-host-Erkrankung“ (GVHD, siehe unten) Einfluss nimmt, kann je nach Patient ihre Intensität variieren oder sogar ganz darauf verzichtet werden [97–100]. Die Spenderauswahl erfolgt neben der HLA Typisierung auch durch Kriterien wie Alter, Geschlecht oder CMV Status der beteiligten Personen. Es wird zwischen einem HLA-identen familiären, einem HLA-kompatiblen unverwandten, einem HLA-differenten unverwandten oder einem familiär-allogen haploidenten Spender sowie einer Spende mittels allogenen Nabelschnurblut unterschieden. Eine maximale HLA-Kompatibilität (bezeichnet als 10/10-kompatibel) liegt vor, wenn in der molekularen Typisierung 10 Allele in den fünf HLA-Genorten HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1 übereinstimmen und ist bei jeder Erkrankung die angestrebte Ausgangssituation [96]. Bei Spendermangel ist auch die Transplantation von haploidentem Knochenmark möglich, das nach myeloablativer oder dosisreduzierter Konditionierung ohne Immunsuppression appliziert wird. Die entstehende Alloreaktion kann durch Cyclophosphamid gebremst werden [101]. Die Entnahme der hämatopoetischen Stammzellen erfolgt entweder durch eine Aspiration aus dem Knochenmark, aus dem Nabelschnurblut oder mit einer Apherese nach Mobilisation der Stammzellen mittels G-CSF (Granulozyten-stimulierender Faktor) aus dem peripheren Blut des Donors. In einem dafür qualifizierten Zentrum erfolgt die Transplantation durch intravenöse Applikation [102]. Um die Hämatopoese nach Transplantation zu analysieren und eine drohende Abstoßungsreaktion zu erkennen, werden in regelmäßigen Abständen Chimärismusanalysen durchgeführt. Ein Rezidiv kann möglicherweise durch Analysen der „minimalen Resterkrankung“ (MRD) erkannt werden.

Eine wesentliche Funktion der transplantierten Stammzellen ist der Ersatz des erkrankten und durch die myeloablativ Strahlen- und/oder Chemotherapie eradizierten hämatopoetischen Systems. Gleichzeitig wird dem Rezipienten durch kotransplantierte T-Zellen eine gewisse Immunkompetenz gegenüber Viren und

Infektionen übertragen, die insbesondere bei älteren Patienten durch ausdifferenzierte Stammzellen zu spät geleistet werden würde. Zweitens werden jene Zellen bekämpft, die trotz myeloablativer Therapie im Organismus des Rezipienten verblieben sind und bei Patienten mit malignen Erkrankungen, die sich beispielsweise im Moment der Transplantation noch nicht in Remission befanden, ein Rezidiv auslösen könnten. Dieser protektive Effekt tritt ein, da besonders das hämatopoetische System eine Alloreaktion auslöst und die T-Zellen des Donors sogenannte Nebenhistokompatibilitätsantigene auf den MHC-Molekülen des Empfängers als fremd erkennen [103, 104], da eine Selektion auf Toleranz gegenüber diesen Proteinen während ihrer Entwicklung im Spenderthymus nicht stattgefunden hat [105]. Dieser „Graft-versus-Hämatopoese-Effekt“ vermittelt durch eine Deletion verbliebener maligner Zellen den gewünschten „Graft-versus-Leukämie-Effekt“ (GVL-Effekt) [106, 107]. Da bei einer HLA-identen Transplantation die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen reduziert und damit auch der GVL-Effekt geringer ist, können bei diesen Patienten mit hohem Rezidivrisiko nach Transplantation sogenannte „Donor-Lymphozyten-Infusionen“ (DLI) angeschlossen werden, welche die antitumorale Wirkung des Transplantats selektiv unterstützen. Neben dem gewünschten GVL-Effekt kann sich die allogene Immunreaktion aber auch gegen solide Organe richten, was die lebensbedrohliche, mit hoher Morbidität und Mortalität verbundene Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD) auslöst. Durch eine Depletion reifer T-Zellen im Transplantat reduzierte man die Inzidenz der GVHD [108, 109], erzeugte aber gleichzeitig eine höhere Rezidivrate [110]. Patienten mit GVHD erleiden dagegen seltener ein Rezidiv ihrer Tumorerkrankung [107, 111, 112]. Weiterhin kam es vermehrt zu opportunistischen Infektionen [113], weshalb in vielen Zentren auf eine T-Zell-Depletion inzwischen gänzlich verzichtet wird.

1.3.1 Die Graft-versus-Host-Erkrankung

Die Graft-versus-Host-Erkrankung (GVHD) ist eine bei allogener HSZT auftretende, lebensbedrohliche Erkrankung, bei der reife T-Zellen des Spenders das Gewebe des Empfängers als fremd erkennen und schwere Organschäden hervorrufen. Sie ist die bedeutendste Komplikation der allogenen Knochenmark-/ und Stammzelltransplantation, kann selten aber auch nach Bluttransfusion (bei immunsupprimierten Patienten) oder nach Transplantation solider Organe auftreten. Eine Einteilung der GVHD in akut (aGVHD) und chronisch (cGVHD) erfolgt anhand der Symptomatik: Eine cGVHD wird

durch eine fibrosierende Entzündung klinisch apparent und kann beinahe jedes Organ betreffen [114]. Die vorwiegenden klinischen Symptome der aGVHD entsprechen einer Entzündung in den drei Hauptzielorganen der Erkrankung: Haut, Darm und Leber. Neben einer maculopapulären Rötung der Haut treten Übelkeit, Erbrechen, wässrige oder blutige Durchfälle, schmerzhafte Bauchkrämpfe und Anorexie auf. Bei hepatischer Manifestation kommt es zu Ikterus mit erhöhten Bilirubinwerten [115]. Auch die Hämatopoese kann von der GVHD betroffen sein [116]. Klinische Symptomatik, Laborwerte sowie histologische Analysen führen zur Diagnose der aGVHD, die nach einem festgelegten Schema eingeteilt wird: Das am schwersten betroffene Organ ergibt durch entsprechende Parameter - wie das Ausmaß der Hautbeteiligung, die Höhe des Bilirubins oder der gastrointestinalen Symptomatik - ein Krankheitsstadium anhand dessen wiederum eine Einteilung in vier Schweregrade - namentlich mild, moderat, schwer und lebensbedrohlich - erfolgt [117]. Lebensbedrohlich wird die Erkrankung vor allem durch den hohen Flüssigkeitsverlust bei Durchfällen oder durch ein septisches Geschehen auf Grund einer Translokation intestinaler Bakterien. Die Inzidenz liegt unter allen Patienten, die eine HSZT durchlaufen, bei 30-60%, wobei 14% eine schwere GVHD (Grad 3-4) entwickeln. Diese Erkrankung trägt zu 15-30% aller Todesfälle allogenen transplantierten Patienten bei. Risikofaktoren für eine GVHD sind unter anderem eine geringe Übereinstimmung der HLA-Identität, ein geschlechtsdifferenter oder nicht verwandter Donor, peripher gewonnene Stammzellen, ein hohes Alter der beteiligten Personen sowie eine hohe Intensität der Konditionierung vor Transplantation [118]. Das Risiko einer GVHD kann zwar durch eine HLA-kompatible Transplantation mit 10 von 10 passenden Gewebemerkmale reduziert werden, es bleibt allerdings zu beachten, dass auch maligne Zellen „nicht-passende“ Antigene präsentieren können und somit ein geringgradiger Mismatch für den unter 1.3 beschriebenen GVL-Effekt entscheidend ist [105, 115].

Die Entstehung der GVHD lässt sich in drei Phasen beschreiben [119] und beginnt mit der vor Transplantation durchgeführten myelo- und immunsuppressiven Konditionierung des Patienten. In Form einer Chemo- und/oder Bestrahlungstherapie werden Empfängerstamm- und Immunzellen dezimiert. Hierdurch wird zwar einerseits ein Engraftment der Spenderzellen ohne Transplantatabstoßung ermöglicht, andererseits entstehen aber durch die hohe Toxizität der Therapie massive

Gewebeschäden in Darm und Haut des Patienten. Eine Intensivierung der Chemo- und Strahlentherapie korreliert mit dem systemischen Level an inflammatorischen Zytokinen und dem Schweregrad der GVHD [120, 121]. Antiinflammatorische Prozesse im Darm werden geschwächt [122], was zusammen mit der Gewebeschädigung zwei für die Pathogenese der GVHD wesentliche Konsequenzen hat: Erstens wird im Empfänger eine massive Entzündungsreaktion ausgelöst. Durch den Zelluntergang nach Bestrahlung werden sogenannte endogene Gefahren-Signale freigesetzt, wie ATP, Harnsäurekristalle oder Doppelstrang DNA Moleküle, die von Empfänger und Spender-APCs über sogenannte Nod-like Rezeptoren erkannt werden und zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine führen [123–125]. Die aktivierten APCs steigern die Expression von MHC-, Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche, was eine Erkennung von Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigene (MHC und miHA) durch reife T-Zellen des Donors fördert [119, 123]. Durch die Bestrahlung selbst werden außerdem Makrophagen zu einer Produktion von TNF α angeregt [120]. Als zweite Konsequenz wird die Integrität der intestinalen Schleimhaut gestört und es kommt zu einer Invasion der kommensalen, gastrointestinalen Bakterien in das peri-intestinale Gewebe, was die generalisierte Entzündung aggraviert: Durch die Mikroben und den Anstieg bakterieller Strukturproteine in der systemischen Zirkulation werden neutrophile Granulozyten und APCs über ihren Toll-like-Rezeptor (TLR) aktiviert und erneut zu einer Produktion proinflammatorischer Zytokine angeregt [126]. Eine Studie zeigte, dass eine Blockade der Signale über verschiedene TLR das Risiko einer GVHD reduzieren konnte [127]. Der lokale Gewebeschaden wird von den aktivierten Zellen durch die Produktion reaktiver Sauerstoff Spezies weiter vorangetrieben [128]. Es wandern Monozyten [129] und Makrophagen ein, wobei diese Zellinvasion vermutlich durch eine früh einsetzende Neoangiogenese in den Zielorganen erleichtert wird [130]. Auch sie werden durch bakterielle Strukturproteine zur einer weiteren TNF α Produktion stimuliert [131]. Diese Prozesse der inflammatorischen ersten Phase sind zusammengefasst die antigenunspezifische Komponente der GVHD, an die sich die antigenspezifische Aktivierung von reifen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als zweite Phase anschließt. Eine Aktivierung der alloreaktiven T-Zellen findet sowohl direkt in SLOs durch Empfänger-APCs statt, als auch im peripheren Gewebe durch Myofibroblasten und plasmazytoiden Zellen des Empfängers [132], als auch indirekt durch DC des

Spenders im Colon [133]. Der TCR wird entweder durch nicht übereinstimmende Haupt- oder durch Nebenhistokompatibilitätsantigene (MHC und miHA) aktiviert [103, 104]. miHA sind polymorphe Proteine, die inner- oder außerhalb der HLA-Allele kodiert werden und deren Peptide nach intrazellulärer Prozessierung über den MHC-Komplex präsentiert werden [104, 134]. Eine Aktivierung alloreaktiver T-Zellen findet nur bei ausreichend starker Bindung des TCR [135] und Kostimulation [136] statt. Es kommt zur Proliferation und Produktion proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-1, IL-6, IL-12, IL-21, TNF und NO [126, 131], die mit einem „Zytokinsturm“ wiederum eine Aktivierung von NK-, B-, antigenpräsentierenden und weiteren T-Zellen auslösen [122]. Durch ein entsprechendes Homingrezeptorprofil auf den aktivierten Zellen und durch verstärkte chemotaktische und endogene Signale der untergegangenen Zellen in den durch die Konditionierung bereits entzündeten Zielgeweben [123, 137, 138], kommt es zur Migration von T-Zellen in die Peripherie [139], womit die dritte Phase eintritt. Die eingewanderten Effektor-T-Zellen steigern durch Zytokine sowie die Perforin/Granzym B- und Fas/FasL Signalwege den Gewebeschaden [140, 141] und locken dadurch NK-Zellen und Neutrophile Granulozyten mit weiterer zytotoxischer Aktivität an [128, 137]. Sie produzieren außerdem IFN- γ , was die Permeabilität der Darmmucosa noch erhöht [142]. APCs, die sich aus den applizierten Stammzellen entwickeln, migrieren ebenfalls in den Darm und halten dort die Entzündung durch Präsentation von Empfänger-Antigenen weiter aufrecht [122]. Die Mechanismen verstärken sich kontinuierlich gegenseitig und es entsteht ein therapeutisch schwer kontrollierbarer „Teufelskreis“.

Man versucht einem Ausbruch der Erkrankung durch medikamentöse Prophylaxe mit Calcineurininhibitoren, Methotrexat oder Mycophenolat Mofetil vorzubeugen. Gelingt dies nicht, kommt die Erstlinientherapie je nach Schweregrad der GVHD zum Einsatz. Sie beinhaltet neben supportiven Maßnahmen wie Flüssigkeitssubstitution oder parenteraler Zusatzernährung ab Grad 2 eine systemische Immunsuppression mit Prednisolon. Bleibt eine Verbesserung aus, stehen im Rahmen der Zweitlinientherapie verschiedene Antikörper, Immunsuppressiva oder eine extrakorporale Photopherese zur Verfügung [118, 143]. Trotz dieser Therapien ist die Mortalität hoch, was die intensive Suche nach alternativen therapeutischen Ansätzen begründet, die bei einer immunologischen Regulation gleichzeitig die gewünschten Effekte der HSZT nicht beeinträchtigen.

1.3.2 GVHD und regulatorische T-Zellen

Die Entdeckung einer anergen, suppressiven CD4⁺CD25⁺ T-Zell-Population, die Autoimmunität verhindert, war für diesen Therapieansatz ausschlaggebend [14]. Durch die Entdeckung von FOXP3, als entscheidender Transkriptionsfaktor für Entwicklung und Funktion der Zellen [50], konnte diese Population als eigene T-Zelllinie identifiziert werden. Es stellte sich heraus, dass diese Zelllinie zahlreiche Eigenschaften aufweist, die sie für einen Einsatz bei GVHD nach Stammzelltransplantation qualifiziert: Erstens können Treg in einem der Hauptzielorgane der GVHD, dem Darm, besonders effizient suppressiv wirken [144]. *In vitro* gelang der entscheidende Nachweis, dass Treg nicht nur auto- sondern auch alloreaktive CD4⁺CD25⁻ und CD8⁺ T-Zellen supprimieren. Versuche mit gemischten Lymphozytenreaktionen ergaben, dass Treg, im Gegensatz zu Tkonv, bei allogener Stimulation nicht expandieren, aber die Proliferation der alloreaktiven Tkonv bei Kokultivierung unterdrücken [145, 146]. *In vivo* Untersuchungen zeigten daraufhin, dass Treg Mäuse vor GVHD schützen können. Um eine GVHD auszulösen, reichten geringe Mengen CD4⁺CD25⁻ oder CD8⁺ Spender T-Zellen, die man gemeinsam mit T-Zell-depletiertem Knochenmark in MHC-differente, letal bestrahlte Mäuse transplantierte. Wurde an Stelle der T-Zellen eine deutlich größere Menge Treg des Donors kotransplantiert, entstand keine GVHD [147]. Wurden Tkonv und CD4⁺CD25⁺ Treg in einem Verhältnis von 1:1 oder 2:1 kotransplantiert, waren die Mäuse vor einer letalen GVHD geschützt. Einen protektiven Effekt, der von der Abmilderung der Symptome bis hin zum vollständigen Schutz vor Ausbruch der Krankheit reichte, konnten zahlreiche Arbeitsgruppen sowohl mit frisch isolierten als auch mit *in vitro* aktivierten und expandierten Treg der Spendermaus zeigen [145, 147–151]. Wurden die Treg ein oder zwei Tage vor den GVHD-induzierenden Zellen verabreicht, waren zur Prävention deutlich geringere Zellmengen nötig, da sie vor Transplantation der Tkonv *in vivo* bereits expandiert und aktiviert worden waren [152]. Erste Hinweise auf eine therapeutische Wirksamkeit der Treg bei aGVHD stammten aus Mausexperimenten, in denen eine Treg-Applikation 10 Tage nach GVHD-Induktion einen letalen Krankheitsausgang verhinderte [149]. Zwei weitere Gruppen zeigten ein verlängertes Überleben bei an aGVHD erkrankten Mäusen nach therapeutischer Applikation von Donor-Treg [152, 153]. Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe (Riegel et al,

unveröffentlichtes Manuskript) zeigten die therapeutische Effizienz von Treg in unterschiedlichen Modellen der letalen GVHD.

Eine in diesem Setting wesentliche Eigenschaft von natürlichen Treg ist ihre stabile Expression des linienspezifischen Markers FOXP3 [50]. Solche Zellen besitzen keine eigene pro-inflammatorische Aktivität [154] und behalten ihre suppressiven Eigenschaften auch im stark inflammatorischen Milieu einer ablaufenden GVHD [93, 155]. Ein Verlust der suppressiven Funktion hätte bei adoptivem Transfer eine fatale Aggravierung der Erkrankung zur Folge, weshalb sich *in vitro* induzierte iTreg als ungeeignet erwiesen hatten (siehe 1.2.4) [93]. Ein weiterer wesentlicher Anspruch an eine Therapie der GVHD ist es, die gewünschten Effekte der HSZT nicht zu beeinträchtigen. Dazu gehört neben dem Engraftment der Stammzellen mit Rekonstitution der Rezipientenhämatopoese eine rasche Erholung der lymphatischen Funktion und die Eradizierung verbliebener Tumorzellen durch transplantierte T-Zellen bei maligner hämatopoetischer Grunderkrankung [107, 107]. Es konnte gezeigt werden, dass kotransplantierte Treg das Engraftment sogar förderten [156] und der GVL-Effekt von ihrer suppressiven Wirkung nicht beeinträchtigt wurde. Stattdessen wurde durch den Kotransfer der Treg der Einsatz noch größerer Mengen allogener Tkonv möglich [147, 149, 157, 158]. Treg verhindern bei Kotransfer vor allem in den ersten Tagen der GVHD die frühe Expansion der Tkonv ohne diese dabei funktionell zu inaktivieren oder zu eliminieren [147, 152, 159]. Der GVL-Effekt bleibt somit erhalten, weil er nicht von der frühen Expansion der Tkonv abhängt, sondern durch die Reaktion der verbliebenen Effektorzellen auf das für Alloreaktionen hochsensible hämatopoetische System langfristig vermittelt wird. Außerdem schützen Treg lymphatische Organe vor einer Zerstörung durch die aGVHD [158, 160].

Ihre protektive Wirkung bei GVHD entfalten Treg sowohl in den SLOs als auch in der Peripherie. Die massive Proliferation der alloreaktiven T-Zellen zu Beginn der GVHD findet in den SLOs statt und ist entscheidend für den Progress einer Alloreaktion zu einer klinisch apparenten GVHD [152, 161–165], weshalb einerseits nur frisch isolierte oder expandierte Treg mit der Fähigkeit zur Migration in SLOs bei Kotransfer vor einer letalen GVHD schützen [159, 166]. Neben einer Kolokalisation zu ihrer Zielgruppe erhalten sie dort Zugang zu den APCs des Empfängers, von denen sie durch ein über MHC-II präsentierte Alloantigen aktiviert werden können [167]. Mit Sekretion von IL-10 sorgen sie für eine verminderte Expression von MHC – und kostimulatorischen

Molekülen auf der APC und stimulieren sie wiederum zu einer Sekretion von immunsuppressivem TGF- β [145]. Sie unterbrechen mittels IL-10 die Interaktion zwischen Empfänger-APC und transplantierten T-Zellen, wie mittels intravitaler Bildgebung gezeigt wurde [168]. Mit weiteren Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismen wird so die Expansion und der Export alloreaktiver Effektor-T-Zellen reduziert [169]. Andererseits scheint die Rekrutierung der Treg in periphere Gewebe insbesondere bei einer therapeutischen Applikation bei GVHD für ihre Funktion entscheidend zu sein [170]. Auch peripher vermitteln Treg ihre suppressive Funktion über eine Produktion von IL-10 und TGF- β [171]. Treg supprimieren Tkonv peripher indem sie freie Bindungsstellen auf restimulierenden APCs besetzen, denn der Zugang zu einer APC ist für Treg und Tkonv, die für das gleiche Antigen spezifisch sind, kompetitiv [172]. Es gibt Hinweise, dass Treg auch als „Bystander“ immunregulierend auf T-Zell-Antworten wirken, weil sie z.B. mittels CD39 auf ihrer Zellmembran freigesetztes ATP neutralisieren [173] und T-Zellen unterdrücken, die durch ein anderes Antigen aktiviert wurden als sie selbst [174].

Auf Grund dieser zahlreichen Hinweise wurde 2011 erste klinische Versuch mit Treg zur Prävention einer GVHD nach Stammzelltransplantation an Patienten mit fortgeschrittener, hämatopoetischer Krebserkrankung veröffentlicht. *In vitro* expandierte Treg wurden den 23 Studienteilnehmern zeitgleich mit Nabelschnurblutstammzellen verabreicht. Dabei konnte zwar der protektive Effekt der Treg bei GVHD nicht bewiesen werden, da den Patienten auch die gängige GVHD Prophylaxe verabreicht wurde, aber dennoch lieferte die Studie wichtige Hinweise: Weder wirkten die Treg akut toxisch, noch traten vermehrt opportunistische Infektionen auf. Des Weiteren schienen die applizierten Treg im Empfänger zu überleben, da sie nach Zellgabe bis zu 7 Tage im peripheren Blut nachweisbar waren [175]. Edinger et al. transfundierten in einer kleinen Projektstudie Leukämiepatienten mit hohem Rezidivrisiko frisch isolierte Spender-Treg nach Absetzen der pharmakologischen GVHD Prophylaxe. Um den GVL-Effekt der HSCT zu fördern, wurden nach 8 Wochen zusätzlich Tkonv gegeben. Das Experiment bestätigte die sichere Durchführbarkeit dieses Therapieansatzes, denn weder kam es zu einer GVHD, noch traten opportunistische Infektionen oder andere negative Effekte nach der Treg Transfusion auf [176]. In einer weiteren klinischen Studie stellten die Treg bei 28 Patienten mit

hochmalignen hämatopoetischen Krebserkrankungen nach haploidenter Transplantation die einzige immunsuppressive Therapie dar. Vier Tage vor Infusion der hämatopoetischen Stammzellen des haploidenten Spenders wurden Treg mit einer durchschnittlichen FOXP3 Expression von 69% appliziert. Mit diesem zeitlichen Vorsprung waren in Mausexperimenten durch *in vivo* Aktivierung und Expansion weniger Treg für den suppressiven Effekt nötig gewesen [152]. Zusätzlich zu den Stammzellen erhielten die Patienten zur Förderung der Immunabwehr und des GVL-Effekts konventionelle T-Zellen in einer Menge, die ohne Treg potenziell eine schwere und sogar tödliche GVHD verursachen könnte. Abgesehen von zwei Studienteilnehmern entwickelte trotz Verzicht auf pharmakologische Immunsuppression kein Studienteilnehmer eine klinisch relevante GVHD. Dies machte erstmals den hohen klinischen Nutzen präventiv applizierter Treg deutlich [177]. Im Jahr 2014 wurden die Studiendaten aktualisiert und von 43 Patienten mit akuter Leukämie berichtet, denen vor HLA-haploidenter HSZT frisch isolierte Donor-Treg verabreicht wurden. Obwohl die eingesetzte Menge an Tkonv eine GVHD hätte auslösen müssen, erkrankten nur ca. 10% und die Rezidiv-Rate war unter den behandelten Patienten signifikant geringer im Vergleich zu historischen Daten [178]. Edinger *et al.* applizierten therapeutisch in Heilversuchen therapieresistenten GVHD-Patienten *in vitro* expandierte Treg mit >95% FOXP3 Expression und konnten eine Verbesserung der akuten gastrointestinalen GVHD, sowie ein Überleben der Zellen *in vivo* beobachten [176]. Eine kleine Studie, die den adoptiven Transfer von Treg mit/ohne niedrig-dosiertem IL-2 in Patienten mit cGVHD untersuchte, ergab für alle Patienten eine Stabilisierung oder Verbesserung der Erkrankung [179]. Das Universitätsklinikum Regensburg untersucht seit 2014 im Rahmen der prospektiven Phase-II „Treg 002-Studie“ (EudraCT 2012-002685-12) einen therapeutischen, adoptiven Transfer *in vitro* expandierter Spender-Treg bei steroidrefraktärer, akuter gastrointestinaler GVHD von Grad II-IV [180]. Zahlreiche weitere Phase I/II Studien werden derzeit durchgeführt [181]. Präklinisch werden außerdem alternative Ansätze untersucht, die statt polyklonal expandierter Treg einen Transfer von Treg mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR-Treg) untersuchen [182].

Die größte Schwierigkeit einer routinemäßigen Anwendung von Donor-Treg zur Suppression ungewollter Alloreaktionen *in vivo* ist die niedrige Zellzahl von tTreg im peripheren humanen Blut. Unsere Arbeitsgruppe entwickelte ein Protokoll zur

zellspezifischen Isolation und effektiven *in vitro* Expansion. Die Identifikation erfolgt mittels Zellsorting der CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD45RA⁺ Population. Zwar wird CD25 von Treg in hohem Maße konstitutiv exprimiert [14], allerdings steigern auch aktivierte Tkonv ihre CD25 Expression. Da dies mit einer Koexpression von CD127 einhergeht, werden Tkonv durch eine Selektion der CD127^{low} Population ausgeschlossen. Außerdem wird nur die CD45RA⁺ Population selektiert, da bei Einschluss der CD45RA⁻ Zellen unter repetitiver Stimulation ein Verlust der FOXP3 Expression, eine zunehmende Methylierung der TSD-Region [183, 184] sowie eine Produktion proinflammatorischer Zytokine eintritt [62, 185, 186]. Um für die Behandlung von GVHD eine reine Treg Populationen zu erhalten, eignet sich somit nur die Expansion des CD45RA⁺ Phänotyp [62], der auch nach repetitiver Stimulation seine Funktion und FOXP3 Expression beibehält und auch nach dreiwöchiger Kultivierung keine proinflammatorischen Zytokine produziert [59, 183]. Dieses Vorgehen trägt außerdem zu einem Ausschluss aktivierter Tkonv bei, da diese Zellen kein CD45RA mehr exprimieren. Eine Analyse der epigenetischen Signatur der RA⁺ Population zeigte außerdem eine demethylierte TSDR innerhalb des FOXP3-locus [183] was eine Voraussetzung für eine stabile FOXP3 Expression ist [187]. Nach diesen Sortierparametern selektierte Zellen exprimierten in der vorliegenden Arbeit zu 98,18±0,17% (MW±SEM, n= 8) den zellspezifischen Transkriptionsfaktor FOXP3. Durch eine Aktivierung mit CD3/CD28 Expander Beads (siehe 3.1.5) als polyklonale Stimulatoren unter Zusatz hoher Mengen IL-2 wird eine starke Proliferation erreicht. In nur zwei bis drei Wochen kann mit diesem Protokoll unter GMP Bedingungen die zur therapeutischen Applikation bei aGVHD nötige Menge von ca. 5-10x10⁶ Treg/Kg Körpergewicht produziert werden.

1.4 Die Migration von T-Zellen

Unter dem Begriff der zellulären Migration fasst man sämtliche Vorgänge einer aktiven Fortbewegung von Zellen im menschlichen Organismus zusammen. Bei T-Zellen werden hierbei je nach Situation verschiedene Migrationsverhalten unterschieden: Zellen, die noch keinen externen Stimuli ausgesetzt waren, zirkulieren kontinuierlich zwischen Blutstrom und den lymphatischen Organen, was als „Rezirkulation“ bezeichnet wird. Kommt es zu einer Entzündung oder zu einem Gewebedefekt, werden die Endothelzellen der postkapillären Venolen in dieser Region durch das angeborene Immunsystem aktiviert. Naive T-Zellen werden in sekundär lymphatischen

Organen aktiviert und anschließend durch das aktivierte Endothel zum Ort der Entzündung geleitet, was man „Rekrutierung“ nennt.

1.4.1 Molekulare Bestandteile der Migration

Reguliert wird die Migration der T-Zellen von drei wesentlichen molekularen Komponenten: Selektine, Integrine und Chemokinrezeptoren, die in dieser Arbeit zusammenfassend als Homingrezeptoren bezeichnet werden. Auf Endothelzellen einerseits und Leukozyten andererseits, steuert ihre Expression und die ihrer Liganden in einem komplexen Zusammenspiel die Verteilung der Immunzellen im Körper. Die Oberflächenmoleküle Selektin und Selektin-Liganden werden sowohl von Endothel als auch von Leukozyten exprimiert. Endothelzellen exprimieren P- und E-Selektin, Leukozyten dagegen L-Selektin. Die passenden Liganden werden von der jeweils anderen Gruppe exprimiert. Die Endothelzellen steigern ihre Expression von E/P Selektin, wie auch der L-Selektin Liganden als Reaktion auf Interleukine, TNF oder auf mikrobielle Komponenten. Während Selektine nur aus einer molekularen Komponente bestehen, sind Integrine Oberflächenmoleküle aus zwei nicht kovalent verbundenen Polypeptidketten. Dabei sind Kombinationsmöglichkeiten von 15 α -Ketten mit 7 β -Ketten möglich, wie beispielsweise das very-late-antigen 4 (VLA-4), das sich aus $\alpha 4\beta 1$ (CD49d und CD29) zusammensetzt. Eine weitere Kombinationsmöglichkeit ist $\alpha 4\beta 7$ (CD49d und ITGB7). Integrin-Liganden werden von Endothelzellen und verschiedenen Leukozyten exprimiert, was in einem zytokinreichen Milieu verstärkt geschieht. Integrine vermitteln neben dem Kontakt zum Endothel oder zu extrazellulärer Matrix auch eine Haftung von Leukozyten aneinander und interagieren intrazellulär mit dem Zytoskelett. Sie besitzen die besondere Fähigkeit, die Intensität ihrer Bindung in Abhängigkeit von intrazellulären Signalen, die durch andere Rezeptoren auf der Zelloberfläche initiiert wurden, zu variieren (inside-out-signalling): Startet in der Zelle eine Signalkaskade, weil ein Antigen an den TCR der Zelle bindet oder sie über einen Chemokinrezeptor einen Stimulus erfährt, verstärkt das Integrin durch eine Konformationsänderung die Affinität zu seinem Ligand und damit die Stabilität der Bindung.

Die dritte Komponente sind Chemokinrezeptoren, die der Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (Guanosin Triphosphat-Bindungsprotein-gekoppelte Rezeptoren) angehören. Bei Bindung des Rezeptors wird das intrazellulär gebundene GDP (Guanosindiphosphat) durch GTP (Guanosintriphosphat) ersetzt und zahlreiche

intrazelluläre Signale ausgelöst, die einen zellulären Calciumanstieg und durch Interaktion mit dem Zytoskelett eine größere Beweglichkeit der Zelle bewirken. Integrine (siehe oben) werden dadurch zu einer stabileren Bindung mit ihren Liganden gebracht. Alle Leukozyten exprimieren Chemokinrezeptoren, wobei aus über 17 Rezeptoren verschiedene, individuelle Oberflächenprofile kombiniert werden können. Aus diesem Profil resultiert schließlich ein zellspezifisches Migrationsverhalten. Mit überlappender Spezifität binden diese Rezeptoren, von denen vor allem T-Zellen viele mit hoher Diversität exprimieren, an über 50 verschiedene Chemokine. Diese Polypeptide werden von Leukozyten, Fibroblasten, Endo- und Epithelzellen produziert. Ihre Sekretion wird von Zellen des angeborenen Immunsystems bei Kontakt zu Mikroben, von T-Zellen, wenn sie ihr Antigen erkennen oder allgemein durch den Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie Il-1 oder TNF gesteigert. Sie werden anhand ihrer Aminosäuresequenz in weitere Subgruppen unterteilt, wobei die größte Untergruppe sogenannte CC-Chemokine sind. Rezeptoren, die diese Moleküle als Liganden erkennen, werden entsprechend als CC-Rezeptoren bezeichnet. Chemokine erfüllen im Organismus mehrere Funktionen: Sie sind einerseits essentiell für einen Ausstieg zirkulierender Leukozyten in das extravasale Gewebe und regulieren dort die zelluläre Migration zum Entzündungsherd, andererseits erfolgt durch sie die Organisation verschiedener Zellzonen in lymphatischen Organen und sie sind essentiell für das dortige Zusammentreffen von DC mit naiven T-Zellen.

Die Expression von Homingmolekülen auf den Endothelzellen wird durch ihre Lokalisation im Körper, durch eine Entzündung oder einen Gewebeschaden beeinflusst. Das Oberflächenprofil der T-Zellen wiederum hängt von ihrer funktionellen Differenzierung ab. Durch das Zusammenspiel dieser beiden Komponenten wird erreicht, dass die funktionellen Untergruppen der T-Zellen in verschiedene Gewebe gesteuert werden, was als „Homing“ bezeichnet wird. Inzwischen ist für zahlreiche Selektine, Integrine, Chemokinrezeptoren und entsprechende Liganden bekannt, in welcher Situation oder Lokalisation sie priorisiert exprimiert werden. Von vielen Studien wurde die entscheidende Rolle der drei Homingrezeptoren CLA, CCR10 und CCR4 bei einer Migration von Treg in die Haut belegt. Das kutane Lymphozyten Antigen (CLA) ist eine posttranslationale Carbohydratmodifikation durch Glycosylierung des P-Selektin-Glykoproteinliganden-1 (PSGL-1). Es bindet als spezifisches Epitop auf humanen T-Zellen an P- und E-

Selektin, die vorrangig vom Endothel dermalen Gefäße konstitutiv und bei einer Entzündung in gesteigerter Form exprimiert werden [188, 189]. Wie unter 1.4.2 beschrieben, wird durch diese Bindung das Rollen am Endothel der dermalen Gefäße vermittelt. Die Bildung funktionsfähiger Selektin-Liganden ist abhängig von der Fucosyltransferase VII (FucTVII), worüber die funktionelle Bedeutung von CLA bei Homöostase und bei einer Entzündung gezeigt werden konnte: Die Analyse der Treg Rekonstitution in Treg defizienten *scurfy*-Mäusen zeigte, dass unveränderte Treg 4 Wochen nach Transfer circa 25% der CD4⁺T-Zellen der Haut ausmachen und eine Autoimmunerkrankung verhindern, während bei Transfer von Treg aus FucTVII-defizienten Mäusen schwere kutane Entzündungen auftraten und die Treg-Migration in kutane Gebiete erschwert war [190]. FucTVII-defiziente Treg sind nicht in der Lage eine induzierte, kutane Autoimmunreaktion zu supprimieren [191]. Treg tragen mehr CLA als Tkonv [192, 193] und Zellen, die bereits Antigenkontakt hatten, exprimieren es in höherem Maße [61, 194]. Der Chemokinrezeptor CCR4 bindet an die Liganden CCL17, das vom Endothel dermalen Gefäße und bronchialen Epithelzellen exprimiert wird [195, 196] sowie an CCL22 [197]. Beide Chemokine werden von reifen, dendritischen Zellen im LK, von aktivierten B-Zellen oder Makrophagen produziert [198]. CCR4 wird von antigenerfahrenen Treg stärker exprimiert als von naiven und in höherem Maße als von Tkonv, bei denen es vor allem auf Th2 Zellen vorkommt [193, 199]. Die funktionelle Rolle von CCR4 für die Migration von Treg Zellen in die Haut wurde in Experimenten mit Knochenmarkchimären aus CCR4^{-/-} und CCR4⁺ Knochenmark gezeigt. CCR4-negative Treg migrierten in geringerem Maße in die Haut als CCR4⁺ Zellen. Bei einem Doppeltransfer von CCR4-negativem und *scurfy*-Knochenmark in Rag^{-/-} Mäuse entwickelte sich eine Dermatitis, die bei einem Chimärismus aus *scurfy*- und Wildtyp-Knochenmark nicht auftritt. Abgesehen von der Bedeutung für eine Migration in die Haut, spielt CCR4 auch bei der Migration in LK eine Rolle und wird sowohl in peripheren als auch in mesenterialen Lymphknoten (MLN) von Treg exprimiert [200]. Ein Experiment mit Treg-Transfer nach Induktion einer Kolitis durch Tkonv-Transfer zeigte, dass vor allem die frühe Migration in die MLN für Treg ohne CCR4 erschwert ist [196, 201]. Der Chemokinrezeptor CCR10 bindet an CCL28, was von Zylinderepithel in Darm, Lunge, Brust- und Speicheldrüsen sezerniert wird und damit eine Migration in Schleimhäute ermöglicht. Der zweite Bindungspartner CCL27 wird unter physiologischen Bedingungen selektiv und konstitutiv von

Keratinozyten der basalen Epidermis produziert und auf der Oberfläche dermalen Endothelzellen präsentiert. Bei Entzündung steigt die Expression auch in suprabasalen Schichten an und es kommt verstärkt zu einer Expression von CCL27 auf der luminalen Seite der dermalen Endothelzellen. So wird eine Rekrutierung von CCR10 exprimierenden Zellen in die Haut vermittelt [202]. *In vivo* konnte die Rekrutierung von epidermalen Lymphozyten durch eine Blockade der CCL27-CCR10 Interaktion deutlich reduziert und damit eine allergische Entzündung supprimiert werden [203]. Drei weitere, gut untersuchte Homingrezeptoren, sind CD103, CCR9 und Cd49d. Das αE Integrin CD103 bindet gepaart mit der Integrin-Kette $\beta 7$ an E-Cadherin, das unter anderem von intestinalen Epithelzellen und Langerhanszellen exprimiert wird [204, 205], weshalb $\alpha E\beta 7$ eher eine Rolle für die Retention der Zellen in epithelalem Gewebe statt für deren Rekrutierung zukommt [206]. Es gibt allerdings auch Hinweise, dass αE Integrin einen weiteren, bisher nicht identifizierten endothelialen Liganden besitzt [207]. Im murinen Organismus fand man eine CD103-exprimierende Treg Subpopulation mit starken suppressiven Eigenschaften, die eine durch Leishmanien induzierte dermale Entzündung im Gegensatz zu CD103^{-/-} tTreg kontrollieren konnte, da sich letztere im infizierten Gewebe nur unzureichend aufhielten [208]. Initial wurde CD103 als Marker für intestinale T-Zellen identifiziert, die Bedeutung des Rezeptors auf Treg für eine effektive Suppression einer Entzündung im Darm ist allerdings umstritten. CD103^{-/-} nTreg wirkten beispielsweise bei T-Zell induzierter Kolitis in Mäusen genauso effektiv wie Wildtyp-Treg [209]. Der Chemokinrezeptor CCR9 bindet an seinen Liganden CCL25 [197], der vorrangig von intestinalen Epithelzellen des proximalen Dünndarms exprimiert wird sowie von Endothelzellen der intestinalen Lamina propria [210]. Bei einer intestinalen Entzündung ist sowohl die Expression von CCL25 als auch die Rekrutierung von CCR9⁺ T-Zellen gesteigert. Dies konnte in Patienten mit Morbus Crohn sowie bei künstlich erzeugter Kolitis im murinen Organismus gezeigt werden [211–213]. CCR9 reguliert außerdem während der Treg Entwicklung ihre Lokalisation innerhalb des Thymus, wobei CCL25 dort von Epithel- und dendritischen Zellen exprimiert wird [214]. Bei CD49d handelt es sich um die $\alpha 4$ -Kette eines Integrins ($\alpha 4$), die als Heterodimer mit $\beta 1$ und $\beta 7$ vorzufinden ist. Das Integrin leitet durch das „rollen“ und einer „Adhäsion“ an der Wand der Venole die Extravasation ein (siehe 1.4.2) [215, 216]. $\alpha 4\beta 7$ ist mit Darm-Homing assoziiert [217] und bindet an mucosal addressin cell adhesion

molecule-1 (MAdCAM-1), das unter anderem in intestinalen Venolen exprimiert wird. Mit monoklonalen Antikörpern, die $\alpha 4\beta 7$ oder MadCAM-1 binden, wird eine Migration von T-Zellen in Peyers Patches und die intestinale Lamina propria verhindert [217]. Der Ligand von $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) ist das vascular-cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) auf Endothelzellen in Gehirn und Rückenmark sowie Fibronectin und Osteopontin im zentralen Nervensystem. Klinisch wird der selektive $\alpha 4$ -Antagonist Natalizumab beispielsweise in der Behandlung von Multipler Sklerose [218] und der selektive $\alpha 4\beta 7$ Antikörper Vedolizumab in der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [219] mit Erfolg eingesetzt.

1.4.2 Die zelluläre Extravasation

Die Extravasation einer T-Zelle aus dem Blut in das periphere oder lymphatische Gewebe erfolgt in drei Schritten: Zuerst wird die Zelle im Blutfluss abgebremst, danach haftet sie am Endothel der Venolen und bewegt sich schließlich durch Endothel und Basalmembran in das extravaskuläre Gewebe. In der Peripherie transmigriert die Zelle durch das Endothel der postkapillären Venolen, das lymphatische Gewebe erreicht sie über sogenannte hochendotheliale Venolen (HEV). Zwischen den Endothelzellen dieser Gefäße und den zirkulierenden T-Zellen findet über Selektine und den entsprechenden Liganden (siehe 1.4.1) eine erste Interaktion statt. Dabei handelt es sich um eine lockere Bindung mit niedriger Affinität. Im Falle einer Entzündung wird durch eine Vasodilatation dieser Schritt erleichtert, da einerseits der Blutfluss nahe am Endothel verlangsamt wird und andererseits die Endothelzellen der postkapillären Venolen die Expression von Selektin-Liganden steigern. Obwohl diese Bindung durch die anhaltenden Scherkräfte des Blutstroms immer wieder unterbrochen wird, sorgt sie für den wesentlichen ersten Schritt beim Weg der Zelle ins extravasale Gewebe: Eine Verlangsamung der zirkulierenden T-Zellen am Ort des Geschehens, was auch als „rollen“ bezeichnet wird. Erst dadurch ist es möglich, dass die Zelle als nächsten Schritt eine Aktivierung durch das lokale Chemokinmilieu erfährt. Dieses spezifische intravasale Milieu entsteht durch die im lymphatischen oder peripheren Gewebe produzierten Chemokine, denn diese werden auf die luminale Seite der Endothelzellen transportiert und dort, an Glykosaminoglykane gebunden, in hoher Konzentration exponiert. Die abgebremste Zelle kann jetzt über ihre Chemokinrezeptoren (CCR) die Chemokine binden und damit eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen, die eine Konformationsänderung der exprimierten Integrine bewirkt. Diese entwickeln eine

hohe Affinität zu ihren Liganden, die ebenfalls von HEV oder einem Endothel in entzündetem Gebiet verstärkt exprimiert werden. Durch die Integrine kommt es damit erstens zu einer stabilen Haftung der Zelle am Endothel, was als „Adhäsion“ bezeichnet wird. Zweitens vermitteln sie gleichzeitig eine reversible Trennung jener Proteinkomplexe, die den endothelialen Zellzusammenhalt gewährleisten. Die Leukozyten können zwischen den Endothelzellen das Gefäß verlassen und in das perivasale Gewebe transmigrieren. Nach diesem Prozess der „Extravasation“ werden die Zellen chemotaktisch durch das Gewebe zum Ort der Entzündung oder ihre entsprechende Zone im LK geleitet [220, 221]

1.4.3 Das Migrationsverhalten regulatorischer T-Zellen

Im Rahmen der Rezirkulation pendeln naive Treg-Zellen zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen (SLOs), wozu LK, die Milz und Mukosa-assoziiertes Lymphgewebe zählt. Sie verlassen das arterielle System über HEV, die spezifische Bindungsproteine für die zirkulierenden naiven T-Zellen exprimieren. Mit dem oben beschriebenen Prozess der Extravasation wird durch das Zusammenspiel von Molekülen auf dem Endothel und Oberflächenproteinen der Zellen das selektive Homing naiver Zellen gewährleistet. Seitens der Endothelzellen sind vor allem der Selektin-Ligand „peripheral node Adressin“, die Integrinliganden ICAM-1 und 2, und die Chemokine CCL21 und CCL19 von Bedeutung. Naive Treg zeigen bei Verlassen des Thymus die Expression der entsprechenden Bindungspartner CD62L (L-Selektin), LFA-1 und CCR7 [222] und erhalten somit Zugang zu den SLOs, wo sie tausenden verschiedenen Antigenen pro Tag begegnen. Findet keine Aktivierung statt, kehrt die Zelle in den arteriellen Kreislauf zurück [223]. Wird dagegen ein TCR-Komplex durch Kontakt mit einem agonistischen Peptid vollständig aktiviert, führt dies zu einer Veränderung der Genexpression der Zelle woraus Proliferation, Effektorfunktion und Differenzierung resultieren. Es kommt zur Expression von Rezeptoren und Integrinen, die der Zelle erlauben, nach der tagelangen Reifung in den SLOs, als Effektorzelle die Rezirkulation zu verlassen und in die peripheren Gewebe zum Ort der Entzündung zu migrieren [196]. Treg sind für die Kontrolle von Entzündungsreaktionen und Autoimmunität von der Fähigkeit zur Migration in periphere Gewebe abhängig [191], wofür Huehn et al. einen entscheidenden Hinweis lieferten. Sie definierten im murinen Organismus eine αE exprimierende Subgruppe, die Marker eines antigenerfahrenen Phänotyps exprimierte ($CD45RB^{low} CD69^{+} ICOS^{+}$), starke suppressive Eigenschaften

in vitro und *in vivo* und vor allem verschiedene CCR für eine Migration in die Peripherie aufwies [206]. Ein Mangel bestimmter CCR hat außerdem massive Auswirkungen auf die suppressive Funktion von Treg in der Peripherie [196, 224]. Einige Veränderungen des Homingrezeptorprofils bei Aktivierung laufen unspezifisch auf allen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gleich ab. Dazu gehören beispielsweise der Verlust einer CCR7-Expression und eine Reexpression von S1PR1, was der Zelle den Austritt aus dem lymphatischen Gewebe ermöglicht. Auch die Expression von L-Selektin wird generell reduziert [61, 70, 71]. Gesteigert wird dagegen die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VLA-4 oder LFA-1 [225]. Zahlreiche Oberflächenmoleküle werden aber bei Aktivierung der Treg Zelle nur unter bestimmten Einflüssen induziert, weshalb das Homingrezeptorprofil von aktivierten, RA-Treg sehr heterogen ist. Hieraus resultiert schließlich die gewebespezifische Migration aktivierter Treg [226].

1.4.4 Induktion von gewebespezifischem Homing bei Aktivierung

Einen wesentlichen Einfluss auf die induzierten Homingrezeptoren hat der Ort der T-Zellaktivierung. Erste Hinweise dafür bot eine Studie in der naive T-Zellen mit transgenem, monospezifischem TCR nach Aktivierung in MLN vorrangig Rezeptoren für intestinales Homing trugen, nach Aktivierung in hautdrainierenden LK dagegen ein Homingrezeptorprofil für eine Migration in kutane Regionen [227]. DC, die aus Peyers Patches oder MLN isoliert wurden, induzierten in Treg einen intestinalen Tropismus, während dies bei DC aus Milz oder peripheren LK nicht der Fall war [226]. Im Darm wurde schließlich eine spezielle CD103 exprimierende Population dendritischer Zellen identifiziert, die selektiv in hohem Maße das Enzym RALDH exprimiert, welches das über die Nahrung aufgenommene Vitamin A in seinen aktiven Metaboliten „Retinsäure“ umwandeln kann [87, 228]. Die Signalkaskade, die durch den Retinsäurerezeptor auf der T-Zelle ausgelöst wird, steigert die Expression der Rezeptoren $\alpha 4\beta 7$ und CCR9 [229]. Ebenso kann Kontakt mit dendritischen Zellen aus der Haut in T-Zellen die Expression der Fucosyltransferase VII induzieren, durch welche die Expression von CLA gesteigert wird [230]. T-Zellen exprimieren bei Aktivierung in LK der Haut vorrangig CCR10 und CCR4 [231]. Wie unter 1.4.1 beschrieben vermitteln diese Rezeptoren eine Migration in die Haut. Das in der Haut gebildete Vitamin D induziert außerdem CCR10 und supprimiert Darmhoming-Rezeptoren [232]. Zusätzlich zu den generalisierten und gewebespezifischen Veränderungen des Homingrezeptorprofils von Treg, wird es auch von dem immunologischen Umfeld bei Aktivierung beeinflusst.

Eine naive CD4⁺T-Zelle differenziert sich vorrangig durch den Einfluss linienspezifischer Zytokine bei Aktivierung entweder in eine TH1, Th2, Tfh, TH17 oder eine Th9 Zelle. Unter dem Zytokineinfluss kommt es zur Expression linienspezifischer Transkriptionsfaktoren, die jeder Subgruppe eine spezifische Gensignatur verleihen [233]. Die Subgruppen zeigen nicht nur große funktionelle Unterschiede sondern weichen auch durch unterschiedliche Expressionsmuster ihres Homingrezeptorprofils in ihrem Migrationsverhalten voneinander ab [225]. Th2 Zellen tragen beispielsweise mehr CCR4 als Th1 Zellen [234]. Es konnte gezeigt werden, dass sich das linienspezifische Muster der Transkriptionsfaktoren von Tkonv auch in aktivierten Treg widerspiegelt [233] und durch die gleichen linienspezifischen Zytokine induziert wird [235]. FOXP3 interagiert mit den Transkriptionsfaktoren und die Treg behalten ihre regulierende Funktion. Treg, denen der Th1-linienspezifische Faktor T-bet fehlt, zeigen eine verringerte Suppression von Th1-, nicht jedoch von Th2- oder Th17- vermittelten Immunantworten [236]. Schaltet man in Treg den Th17 spezifischen Transkriptionsfaktor Stat3 aus, exprimieren sie weniger CCR6 – ein CCR, der für die Migration in Gebiete mit einer Th17-Entzündung von Bedeutung ist. Es kommt zu einer Dysregulation von Th17 Antworten, da unter anderem die Migration der Treg zum Ort der Th17-vermittelten Entzündung erschwert ist [237]. Somit wird über die Differenzierung der Treg-Zelle ihr Homingrezeptorprofil vom immunologischen Umfeld beeinflusst, was den Zellen ermöglicht, ihre suppressive Tätigkeit an den vorherrschenden Entzündungstyp zu adaptieren.

2 Zielsetzung

Die allogene HSZT ist eine potenziell kurative Therapie für zahlreiche hämatologische Erkrankungen. Durch die schwerwiegende Komplikation einer GVHD ist der Einsatz der HSZT derzeit auf lebensbedrohliche Erkrankungen beschränkt. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg-Zellen des Spenders können GVHD-auslösende T-Zellen regulieren und werden in ersten Studien zur Prophylaxe oder Therapie einer GVHD eingesetzt. Da Treg im peripheren Blut des Spenders nur in geringer Zahl vorkommen, ist als Zwischenschritt vor adoptivem Transfer eine Expansion der Zellen *in vitro* nötig. Von unserer Arbeitsgruppe wurde ein Protokoll zur Isolation und polyklonalen Expansion etabliert, mit dem unter GMP-Bedingungen in großer Menge Treg mit stabilen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften zum klinischen Einsatz generiert werden können. In der vorliegenden Arbeit soll unter Anwendung dieses Protokolls die Auswirkung einer polyklonalen Expansion auf das Homingrezeptorprofil der Treg untersucht werden. Zu diesem Zweck soll die Expression von sechs verschiedenen Rezeptoren analysiert werden, die besonders für die Zellmigration in Haut und Darm von Bedeutung sind. Diese Organe sind von einer GVHD am häufigsten betroffen. Der Schwerpunkt der Analyse liegt auf der von unserer Arbeitsgruppe eingesetzten CD45RA⁺ Population, wobei CD45RA⁻Treg und konventionelle CD4⁺T-Zellen zum Vergleich dienen. Das Homingrezeptorprofil soll nach circa zweiwöchiger polyklonaler Stimulation analysiert und auf Differenzen zu frisch isolierten Zellen untersucht werden. Es soll geprüft werden, inwiefern ein Zusatz von all-trans Retinsäure während polyklonaler Expansion die Zellen in der Expression ihrer Homingrezeptoren beeinflusst. Da regulatorische T-Zellen nach Transfer im Rahmen einer GVHD einer allogenen Aktivierung ausgesetzt sind, soll außerdem die Entwicklung der Homingrezeptoren unter allogener Stimulation *in vitro* überprüft werden. Hierfür sollen frisch isolierte Zellen mit MHC-differenten APCs konfrontiert werden. Alloreaktive Zellen sollen durch einen Proliferationsfarbstoff detektiert und ihr Homingrezeptorprofil mit dem von nicht-proliferierten verglichen werden. Abschließend erfolgt ein Vergleich der intravitalen, polyklonalen und allogenen Stimulation hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das Homingrezeptorprofil. In Summe sollen diese Untersuchungen Treg hinsichtlich ihres Homingrezeptorprofils unter verschiedenen Stimulationsbedingungen genauer charakterisieren und Hinweise für ihr Migrationsverhalten nach adoptivem Transfer liefern.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller
AB-Serum human	Zentrum für klinische Transfusionsmedizin Tübingen
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACSClean	BD, Heidelberg
FACSFlow	BD, Heidelberg
FACSRinse	BD, Heidelberg
Fixation/Perm Diluent	eBioscience, Frankfurt
Fixation/Permeabilization Konzentrat	eBioscience, Frankfurt
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Lymphozytenseparationslösung Biocoll	Biochrom, Berlin
Penicillin 10000 U/mL	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Permeabilisierungspuffer (10x)	eBioscience, Frankfurt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rattenserum	AbD Serotec, Düsseldorf
Rekombinantes humanes CCL25 (TECK)	BioLegend, San Diego
Rekombinantes humanes IL2 Proleukin®	Novartis, Nürnberg
Streptomycin 10000 µg/mL	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zombie UV™ Viability kit	BioLegend, San Diego

Tabelle 3.1: Chemikalien und Reagenzien

3.1.2 Medien, Puffer, Lösungen

Medium/Lösung	Hersteller/Herstellung
0,16%iges Trypanblau	0,4% Trypanblau Lösung PBS
Cell Genix GMP Stemm Cell Growth Medium (SCGM)	CellGro SCGM, 5% AB-Serum 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
CFSE Gebrauchslösung (4µM)	(1) 30 µl Stocklösung (5mM) + 4970 µl DPBS (30 µM) Verdünnung: 1ml aus (1) + 6,5ml PBS = 4µM
CFSE Stocklösung	25 mg CFSE-Pulver in 8,96 ml DMSO gelöst (5 mM)
DPBS 10%	DPBS 10% FCS
EDTA-Lösung, pH 8,0 (0,5M)	AppliChem, Darmstadt
Einfriermedium	FCS 10% DMSO
FACS-Puffer/ Isolations-Puffer für CD2 Depletion	DPBS 2% FCS
IL-2 Stocklösung	18 x 10 ⁶ IE PROLEUKIN S in 17.5 mL DPBS gelöst
MACS-Puffer (entgast)	DPBS 2mM EDTA 1% FCS
Propidium Iodid Lösung	DPBS 10% PI
RPMI 10%	RPMI 1640 10% FCS
RPMI 1640 Zellmedium, Bio Whittaker	Lonza, Verviers (Belgien)
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt

Tabelle 3.2: Medien, Puffer, Lösungen

3.1.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24-Loch Transwellplatte mit Polycarbonatmembran-Einsatz (5,0µm Poren)	Corning, New York
Deckgläser (20 x 24 mm)	Menzel GmbH, Braunschweig
MACS Preseparation Filter (30 µm)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MACS-Separations-Säulen (LS)	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen

Pipettenspitzen	Eppendorff, Hamburg
Polypropylenröhrchen (15ml, 50ml)	BD Falcon™, Heidelberg
Polystyren Rundbodentube (5ml)	BD Falcon™, Heidelberg
Stripette (5, 10, 25, 50ml)	Costar, New York
Zellkulturflaschen (75cm ²)	Corning, New York
Zellkulturplatten Flachboden (6, 24 Vertiefungen)	BD Falcon™, Heidelberg
Zellkulturplatten Flachboden (96 Vertiefungen)	Corning, New York

Tabelle 3.3: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

3.1.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)

Spezifität	Konjugat	Hersteller	Klon	Herkunft	Isotyp
CCR10	PE	Miltenyi	REA326	Human	Ig1 REAControl
CCR10	APC	Miltenyi	REA326	Maus	IgG1, κ
CD103	APC	eBioscience	β-Ly7	Maus	IgG1, κ
CD103	FITC	Miltenyi	Ber-ACT8	Maus	IgG1, κ
CD127	PE	BD	hIL-7R-M21	Maus	IgG1, κ
CD14	PE	BD	MΦP9	Maus	IgG2b, κ
CD14	PerCP	Miltenyi	TÜK4	Maus	IgG2a
CD19	FITC	BD	4G7	Maus	IgG1, κ
CD19	PerCP	BD	SJ25C1	Maus	IgG1, κ
CD194 (CCR4)	APC	Miltenyi	REA279	Recomb. human	IgG1
CD199 (CCR9)	PE	ebioscience	BBC3M4	Maus	IgG1, κ
CD199 (CCR9)	eF660	eBioscience	BBC3M4	Maus	IgG
CD25	PE-Cy7	BD	2A3	Maus	IgG1, κ
CD25	APC	BD	2A3	Maus	IgG1, κ
CD4	PerCP	BD	SK3	Maus	IgG1, κ
CD4	PerCP	BD	L200	Maus	IgG1, κ
CD4	VioBlue	Milteny	VIT4	Maus	IgG2a

CD45RA	FITC	BD	L48	Maus	IgG1, κ
CD45RA	APC	BD	HI100	Maus	IgG2b, κ
CD49d	APC	BD	9F10	Maus	IgG1, κ
CD56	APC	BD	NCAM162	Maus	IgG1, κ
CLA	FITC	Miltenyi	HECA-452	Ratte	IgM
CLA	APC	Miltenyi	HECA-452	Ratte	IgM
FOXP3	APC	eBioscience	PCH101	Ratte	IgG2b, κ
FOXP3	PE	ebioscience	PCH101	Ratte	IgG2a, κ
FOXP3	eF450	eBioscience	PCH101	Ratte	IgG2a, κ

Tabelle 3.4: Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)

3.1.5 Magnetische Beads

Name	Hersteller
Anti-APC Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-human-CD2PanT-Dynabeads®	Invitrogen/Dynal, Oslo
anti-human-CD4-beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS GMP ExpAct Treg Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Tabelle 3.5: Magnetische Beads

3.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
BD™ LSR II Durchflußzytometer	BD, Heidelberg
BDFACSAria™ IIU Hochgeschwindigkeitszellsorter	BD, Heidelberg
Bestrahlungsgerät (IBL437C)	CISbio International, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
Inkubator Heracell 240	Heraeus, Hanau
MACS® Multistand	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
MACSiMAG™ Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
MACSmix Tube Rotator	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Manuelle Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Mikroskop Axiovert	ZEISS, Oberkochen
Permanentmagnet Midi-MACS™	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Pipettboy IBS	Integra-Bioscience, Biebertal
Sterilbank Clean Air	Clean Air Techniek, Woerden, Niederlande
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Vortex Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge Megafuge 3.0 R®	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Sigma 6K15	SIGMA Zentrifugen, Osterode a. Harz

Tabelle 3.6: Geräte

3.1.7 Software und Programme

Name	Hersteller
BD FACS DIVA (LSRII) Software	BD, Heidelberg
FlowJo Software Version 9	Tree Star Inc., Ashland (OR)
GraphPad Prism Version 6	GraphPad Software Inc., CA USA
Microsoft Office 2016	Microsoft Deutschland GmbH, München

Tabelle 3.7: Software und Programme

3.2 Methoden

3.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellviabilität wurden erythrozytenfreie Zellsuspensionen mit 0,16% Trypanblaulösung (Tabelle 3.2) verdünnt, Zellsuspensionen, die Erythrozyten enthalten, stattdessen mit Türks-Lösung (Tabelle 3.1) lysiert. Unter einem Mikroskop (Tabelle 3.6) erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer die Auszählung. Blau gefärbte Zellen wurden als tot angesehen, da beide Farbstoffe Zellen mit fehlerhafter Membranintegrität anfärben. Es erfolgte eine Auszählung der nicht gefärbten Zellen und die Berechnung der Anzahl mit folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor } 10000 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

3.2.2 Isolation der verwendeten Zellpopulationen

Als Ausgangsmaterial für die Isolation der Primärzellen dienten sowohl eingefrorene PBMCs gesunder Spender als auch frisches peripheres Blut. Dieses entstammte entweder einer peripheren Blutentnahme, die durch geschultes Personal an freiwilligen, gesunden Spendern durchgeführt wurde, oder einem Leukapheresat, das in der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg nach behördlich genehmigtem Protokoll gewonnen wurde. Ein Blutzellseparator generierte hierfür ein erythrozytenarmes Leukapheresat indem er das Blut ausschließlich gesunder Spender in zwei Fraktionen aufteilte. Der erythrozytenreiche Anteil wurde den Spendern zurückgegeben.

3.2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation

Diente ein Leukapheresat oder eine periphere Blutprobe als Ausgangsmaterial, wurden die mononukleären Zellen durch eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierfür wurde die Zellsuspension 1:1 mit sterilem DPBS (Tabelle 3.1) verdünnt, vorsichtig auf die Lymphozyten-Separations-Lösung (Tabelle 3.1) geschichtet und zentrifugiert (1200×g, 20 min ohne Bremse, bei 20°C). Da sich durch dieses Vorgehen die Zellen nach ihrem Gewicht separierten, setzten sich Erythrozyten und Granulozyten in Form eines Pellets ganz unten ab, vorwiegend Thrombozyten und Plasma bildeten einen Überstand. Die weißliche Interphase enthielt mit einer Anreicherung von 70-100% die gewünschten mononukleären Zellen und wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen. Mit sterilem PBS erfolgte eine zweimalige Waschung (erst 400×g dann 300×g jeweils für 10 min bei 20°C) ehe der Zellertrag in FACS-Puffer resuspendiert und nach oben beschriebenem Vorgehen mit Türks-Lösung ausgezählt wurde.

3.2.2.2 Auftauen von Zellen

Bereits mittels Dichtegradientenzentrifugation präparierte Zellen lagen eingefroren bei -80°C in Einfriermedium aus DMSO und FCS (Tabelle 3.2) vor. Sie wurden im Wasserbad angetaut, stark mit RPMI 10%FCS (Tabelle 3.2) verdünnt und anschließend gewaschen (10 min, 300×g, 4°C). Nach Resuspension mit *CellGro* Zellmedium (Tabelle 3.2) wurden die Zellen weiterverarbeitet oder in den Brutschrank überführt.

3.2.2.3 Magnetische Separation

Bei der magnetischen Zellseparation binden mit Magnetpartikeln beladene Antikörper an ein entsprechendes Zielantigen auf der Oberfläche der Zelle. Nach Inkubation mit den als Beads bezeichneten Reagenzien (Tabelle 3.5) wurden die suspendierten Zellen über eine mit MACS-Puffer äquilibrierte Säule (Tabelle 3.3) gegeben. Diese war in einen Magneten eingespannt, generierte ein starkes Magnetfeld und hielt die markierten Zellen zurück, während das depletierte Eluat abfloss. Es konnte je nach Bedarf mit der positiv selektierten Population in der Säule weitergearbeitet werden oder mit dem Eluat als depletierte Selektion. In dieser Arbeit wurde für magnetische Separation auf Geräte der Firma Miltenyi Biotec zurückgegriffen (Tabelle 3.6). Zur Präparation wurden die Zellen in FACS-Puffer (Tabelle 3.2) gewaschen, in FACS-Puffer resuspendiert und mit den gewünschten Beads (Tabelle 3.5) dem Herstellerprotokoll entsprechend inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit MACS-Puffer (Tabelle 3.2) aufgefüllt und abzentrifugiert. Nach Resuspension von maximal 1×10^8 Zellen in $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer wurden die Zellen über eine LS Säule (Tabelle 3.3) gegeben, die zuvor mit 3 ml MACS-Puffer equilibriert und in den Permanentmagneten MidiMACS (Tabelle 3.6) eingespannt worden war. Es erfolgt ein dreimaliges Nachspülen mit jeweils 3 ml MACS-Puffer wobei das gesamte Eluat mit der negativ selektierten Zellpopulation aufgefangen wurde. Die Säule wurde aus dem Magneten entfernt und über einem neuen Sammelbehälter 5 ml MACS-Puffer zügig mit dem passenden Stempel durch die Säule gespült, um bei Bedarf die Population der positiv selektierten Zellen zu erhalten. Zentrifugiert wurde stets für 10 min mit $300 \times g$ bei 4°C .

3.2.3 Antikörperbasierte Zellfärbung zur durchflusszytometrischen Analyse

3.2.3.1 Oberflächenfärbung

Die Oberflächenfärbung beruht auf einer Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper an gewünschte Oberflächenmoleküle, die daraufhin durchflusszytometrisch detektiert und quantifiziert werden können. Nach Auszählung der zu färbenden Zellen wurden in benötigter Anzahl Aliquots mit jeweils 1×10^6 Zellen gebildet und in FACS-Puffer (Tabelle 3.2) gewaschen. War eine intrazelluläre Färbung vorgesehen, erfolgte zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes nun eine Resuspension in $100 \mu\text{l}$ DPBS (Tabelle 3.1) und die Zugabe des

Farbstoffes Zombie UV™ (Tabelle 3.1). Dieser lag zuvor bei -20°C gefroren vor, wurde auf Raumtemperatur angewärmt und mit 100µl DMSO (Tabelle 3.1) gelöst. 1×10^6 Zellen wurden mit 1 µl der Lösung gefärbt und die übrige Suspension lichtgeschützt bei -20°C für weitere Versuche aufbewahrt. Dieser aminoreaktive Farbstoff färbt auf lebenden Zellen ausschließlich Oberflächenproteine an, während er in toten Zellen akkumulieren kann und sie in der späteren Messung durch zahlreiche intrazelluläre Proteinbindungen mit einem signifikant höheren Fluoreszenzsignal demaskiert. Die Zellen inkubierten 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit und wurden mit 2ml FACS-Puffer erneut gewaschen. War ausschließlich eine Oberflächenfärbung vorgesehen, wurde zur Lebend/Tot-Diskriminierung kurz vor der Messung pro 100µl Zellsuspension 10µl des Vitalitätsfarbstoffs DAPI zugegeben (10µl Gebrauchslösung (10µg/ml) und anstatt des soeben beschriebenen Färbeschritts direkt mit der folgenden Oberflächenfärbung begonnen: Nach Resuspension in 100µl FACS-Puffer erfolgte die Zugabe aller Antikörper gegen die zu untersuchenden Oberflächenantigene, wobei sich die eingesetzte Menge aus eigenen Titrationen oder den Herstellerangaben ergab (Tabelle 3.4). Wurden mehrere Ansätze mit gleicher Antikörperkonstellation gefärbt, wurde für eine Optimierung der Vergleichbarkeit im Vorfeld die Gesamtmenge der Antikörper separat vermischt und aus dieser Suspension auf die einzelnen Ansätze verteilt. Nach der Inkubation (20 min, 4°C, bei Dunkelheit) wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Nach Resuspension in 250µl FACS Puffer wurden sie am LSR II (Tabelle 3.6) durchflusszytometrisch analysiert und die Daten im Anschluss über das Analyseprogramm FlowJo (Tabelle 3.7) ausgewertet. Bei allen Waschvorgängen wurden die Zellen 5 min mit 300xg bei 4°C zentrifugiert.

3.2.3.2 Intranukleäre Foxp3 Färbung

Zur intranukleären Färbung des Transkriptionsfaktors FOXP3 wurde ausschließlich auf Produkte und Protokolle der Firma eBioscience zurückgegriffen. Die Fixierungs- und Permeabilisierungslösung wurde aus Fix/Perm Konzentrat und Fix/Perm Diluent im Verhältnis 3:1 gemischt. Zur weiteren Vorbereitung wurde der Permeabilisierungspuffer im Verhältnis 1:9 mit destilliertem Wasser (alle Substanzen siehe Tabelle 3.1) verdünnt. Wie auch bei der Oberflächenfärbung wurden 1×10^6 Zellen pro Ansatz verwendet, weshalb bei vorheriger Färbung nach dem letzten Waschgang direkt mit der intrazellulären Markierung fortgefahren werden konnte. Nach Abnahme des

Überstandes wurde die Probe zur vollständigen Dissoziation des Pellet pulsweise gevortext. Noch während des Resuspensionsvorgangs wurde tröpfchenweise 1 ml der frisch hergestellten Fix/Perm Lösung zugegeben, um eine möglichst homogene Verteilung zu gewährleisten. Die Zellen wurden nun fixiert (30min, °4C, bei Dunkelheit) und es erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit je 2 ml 1xPermeabilisierungspuffer. Nach Resuspension in 100 µl 1xPermeabilisierungspuffer wurden unspezifische Bindungsstellen des anti-FOXP3-Antikörpers (Tabelle 3.4) durch Zugabe von 2µl Rattenserum (Tabelle 3.1) pro Probe blockiert (15 min, °4C, bei Dunkelheit). Ohne weiteren Waschvorgang wurde der vorgesehene anti-FOXP3 Antikörper (Tabelle 3.4) in titrierter Menge zur Zellsuspension pipettiert und nach Inkubation (30min, °4C, bei Dunkelheit) zweimal mit jeweils 2 ml 1xPermeabilisierungspuffer gewaschen. Nach einem dritten Waschschrift mit FACS-Puffer (Tabelle 3.2) wurde die Zellesuspension in 250µl FACS-Puffer gekühlt zur durchflusszytometrischen Analyse überführt. Zentrifugiert wurde stets für 5 min mit 300×g bei 4°C.

3.2.3.3 CFSE Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester, Tabelle 3.1) wurde für Proliferationsanalysen im Rahmen der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) eingesetzt, wobei seine Funktion auf zwei chemischen Eigenschaften basiert. Einerseits ist er durch zwei Acetatgruppen in der Lage die Plasmamembran von Zellen zu passieren. Durch die Abspaltung dieser Acetatgruppen durch intrazelluläre Acetasen verringert sich die Fähigkeit des Esthers zur transmembranen Diffusion, was eine intrazelluläre Akkumulation ermöglicht. Zweitens ist der Farbstoff über eine aminoreaktive Seitenkette in der Lage kovalent an zahlreiche intrazelluläre Proteine zu binden, was eine stabile Markierung der Mutterzellen gewährleistet. Da bei jeder Teilung der Farbstoff gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben wird, ist die Teilung der Zelle durch kontinuierliche Abnahme der Farbtintensität durchflusszytometrisch visualisierbar. [238]. Die CFSE Lösung (Tabelle 3.2) lag gemischt aus 25mg der Farbsubstanz und 8,96ml DMSO (Tabelle 3.1) in einer Konzentration von 5mM in 50µl Aliquots bei -20°C eingefroren vor. Zur Färbung wurden unter der Sterilbank ohne Licht 1×10^7 Zellen in einem 15 ml Tube 2x in 10ml PBS gewaschen, in 500µl DPBS resuspendiert, mit 500 µl der CFSE-Färbelösung in einer Konzentration von 4µM (Tabelle 3.2) versehen und inkubiert (4 min, °4C, bei Dunkelheit). Nach einem Waschgang mit DPBS10% (Tabelle 3.2) sowie

einem zweiten mit *CellGro* Zellmedium (Tabelle 3.2) wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen in gleichem Medium eingestellt. Nach Auszählung der Zellen wurden sie für *in vitro* Proliferationsanalysen eingesetzt. Zentrifugiert wurde stets für 5 min mit $300 \times g$ bei 4°C .

3.2.4 Isolation und Sortierung humaner T-Zellen

Alle kultivierten T-Zellen stammten aus Leukapheresaten, die nach oben beschriebenem Procedere ausgewählt und aufgearbeitet wurden. Die Isolation der CD4^+ Treg und Tkonv Zellen erfolgte mittels magnetischer und anschließender durchflusszytometrischer Zellseparation.

3.2.4.1 Magnetbasierte Anreicherung

Die magnetbasierte Separation wird zur Anreicherung der CD25^+ positiven und negativen CD4^+ T-Zellen angewandt. Zunächst wurden $3 \mu\text{l}$ APC-markierter anti- CD25 Antikörper (Tabelle 3.4) pro 25×10^7 Zellen in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer (Tabelle 3.2) gegeben. Nach Inkubation (20 min, 4°C , bei Dunkelheit) wurden die Zellen mit FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert, in $80 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert und mit $20 \mu\text{l}$ anti-APC Beads (Tabelle 3.5) pro 10×10^7 Zellen versehen. Nach der Inkubation (15 min, 4°C , bei Dunkelheit) wurde die Suspension mit MACS-Puffer aufgefüllt, erneut abzentrifugiert und in 3ml MACS-Puffer resuspendiert. Der Säulenlauf nach oben beschriebenem Procedere (Kapitel 3.2.4.1) führte zur Separation der CD25^+ positiven und -negativen Fraktionen. Zur Auszählung wurde für die Positivfraktion verdünntes Trypanblau (Tabelle 3.2), für die Negativfraktion Türks-Lösung verwendet (Tabelle 3.1). Für die hochreine Zellsortierung wurden die Zellen mit $10 \mu\text{l}$ anti- CD4 -PerCP, $10 \mu\text{l}$ anti- CD45RA -FITC und $5 \mu\text{l}$ anti- CD127 PE (Tabelle 3.4) pro 4×10^6 Zellen in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer gefärbt, inkubiert (20min, 4°C , bei Dunkelheit), mit FACS-Puffer gewaschen, über ein $30 \mu\text{m}$ Zellsieb filtriert (Tabelle 3.3), schließlich mit einer Zielkonzentration von $10\text{-}20 \times 10^6$ Zellen/ml in FACS-Puffer resuspendiert und zur fluoreszenzbasierten Sortierung überführt. Zentrifugiert wurde stets für 10 min bei $300 \times g$ und 4°C .

3.2.4.2 Fluoreszenzbasiertes Sorting

Mit dieser Methode können Zellen auf Grund ihrer Fluoreszenzeigenschaften voneinander separiert werden. Die für die Separation entscheidenden Antigene werden mit Fluorochrom markiert. Der Zellsorter FACS ARIA IIu (Tabelle 3.6) erzeugt aus der

Zellsuspension derart kleine Tropfen, dass die Zellen einzeln aufgereiht verschiedene Laser passieren und ihre individuelle Lichtemission in ein elektronisches Signal verwandelt wird. Eine Ablenkung der Zelle wird durch einen elektrischen Impuls erreicht, wodurch die Zellen in verschiedene Ausgabegefäße geleitet und somit separiert werden. Weiterhin liefern die Streulichtparameter *Forward Scatter* sowie der *Side Scatter* Informationen über Größe und Granularität der Zellen. *Sortgates*, welche die zu separierende Zielgruppe definierten, wurden jeweils im Vorfeld durch eine durchflusszytometrische Analyse der PBMCs sowie der angereicherten Subpopulationen für den Sortiervorgang festgelegt. In der vorliegenden Arbeit wurden sie so gewählt, dass nur die CD4⁺ Zellen eingeschlossen wurden, deren CD25-Expression einerseits über der der CD4⁺CD25⁺ Population lag und die andererseits eine geringe CD127 Expression zeigten. Die stringenten Gates zur Definition der CD45RA⁺ und CD45RA⁻ Zellen wurden nach bereits etablierter Methode gesetzt [239]. Die CD25-Positivfraktion wurde mit dieser Methode in die Subpopulationen CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD45RA⁺ Treg bzw. CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}CD45RA⁻ Treg und die CD25-Negativfraktion ebenso in CD4⁺CD25⁻ CD45RA⁺ und CD4⁺CD25⁻ CD45RA⁻ Tkonv sortiert. Es erfolgte eine Ausgabe der Zellen in 5ml oder 15ml Tubes, in die 200µl oder 500µl FCS vorgelegt waren. Die gesorteten Zellen wurden bei 350×g für 10 min zentrifugiert und konnten zur polyklonalen Expansion eingesetzt werden.

3.2.5 *In vitro* Methoden

3.2.5.1 *Polyklonale Expansion von Treg- und Tkonv-Populationen*

Von den sortierten Populationen wurden pro Well 1×10^4 Zellen in 100µl *CellGro* SCGM Medium (Tabelle 3.2) in 96-Loch-Platten (Tabelle 3.3) ausgesät, mit 300U/ml IL-2 (Tabelle 3.1) und 4 MACS GMP ExpAct Treg Beads (Tabelle 3.5) pro Zelle versehen. Nach 4 Tagen wurden alle Kulturen mit 100µl Medium mit 300U/ml IL-2 gefüttert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet, mit verdünntem Trypanblau (Tabelle 3.2) ausgezählt, zentrifugiert und nach Resuspension die Beads mit Hilfe des MACSiMAGTM Separator (Tabelle 3.6) von den Zellen separiert. Die magnetischen Partikel lagerten sich dabei an den Wänden des eingespannten Gefäßes ab und ermöglichten das Abnehmen der Beat-freien Zellsuspension. In einem reduzierten Verhältnis von einem Beat pro Zellen wurde die Stimulation erneuert und 50×10^5 Treg sowie 25×10^5 Tkonv pro Vertiefung auf 24-Loch Platten ausgesät. Das Proleukin lag

in einer Konzentration von 1×10^6 IE/ ml in 500 μ l Aliquots bei -20°C eingefroren vor. Erfolgte eine Expansion unter dem Einfluss von ATRA wurden bei der initialen Aussaat sowie an d3, d6, d9 und d12 jeweils 100nM ATRA zugefügt.

3.2.5.2 Gemischte Lymphozyten Reaktion

In diesem Assay wurden CD4^+ Responder T-Zellen mit dem Proliferationsfarbstoff CFSE gefärbt, mit allogenen PBMCs kokultiviert und ihr Oberflächenprofil in verschiedenen Proliferationsstadien analysiert. Als Ausgangsmaterial für die Responderzellen dienten PBMCs, die nach Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kapitel 3.2.2.1) zur magnetischen Separation in MACS-Puffer (Tabelle 3.2) mit 80 μ l pro 10^7 Zellen resuspendiert wurden. Pro 1×10^7 Zellen wurden 20 μ l der anti- CD4 Microbeads (Tabelle 3.5: Magnetische Beads) hinzugefügt und die Suspension inkubiert (15 min, 4°C , bei Dunkelheit). Nach dem Säulenlauf mit oben beschriebenem Procedere (siehe Kapitel 3.2.4.1) lag die positiv selektierte CD4^+ Fraktion vor. Um später die Proliferation der Zellen detektieren zu können, erfolgte nun die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE nach bereits beschriebenem Protokoll (siehe Kapitel 3.2.3.3). Die vorwiegend antigenpräsentierenden Zellen zur allogenen Stimulation wurden aus kryokonservierte PBMCs mittels Depletion der CD2 exprimierenden Lymphozyten hergestellt. Um die CD2 Beads zur Vorbereitung zu waschen, wurde die Herstellerlösung vorsichtig resuspendiert, die benötigte Menge Beads (50 μ l pro 12×10^6 Zellen) zu gleichen Teilen mit FACS-Puffer (Tabelle 3.2) gemischt und für eine Minute im MACSiMAG™ Separator (Tabelle 3.6) platziert. Nach Abnahme des beadfreien Überstandes wurden die gewaschenen Beads wieder im Ausgangsvolumen mit FACS-Puffer resuspendiert. Die PBMCs wurden mit einer Konzentration von 12×10^6 Zellen/ml in FACS-Puffer aufgenommen, mit der entsprechenden Menge Beads versehen und inkubiert. (20 min, 4°C , bei leichter Rotation). Nach zweiminütiger Separation im Magneten wurde der depletierte Überstand abgenommen und das Procedere zweimal mit 1ml FACS-Puffer wiederholt. Die generierte Negativselektion wurde mit 0,14% Trypanblau ausgezählt und mit 30Gy bestrahlt (Tabelle 3.6), um eine Proliferation der Zellen im Assay zu verhindern. Es erfolgte eine Aussaat in 96-Loch-Flachbodenplatte (Tabelle 3.3), wobei eine Vertiefung 1×10^5 CD4^+ T-Zellen und 2×10^5 APCs in 200 μ l Medium enthielt. Die durchflusszytometrische Analyse des Assays erfolgte an Tag 4 und 5.

3.2.5.3 Migrationsassay

In diesem Assay wurde die durch ein Chemokin induzierte Transmigration von kultivierten Treg über eine zellpermeable Membran untersucht. Als Ausgangsmaterial dienten kultivierte RA+Treg Zellen, die einmal mit und einmal ohne den Einfluss von ATRA über 12 bis 15 Tage polyklonal nach oben beschriebener Methode expandiert worden waren und auf eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen eingestellt wurden. Die Transwellplatten (Tabelle 3.3) wurden mit 600 μ l Medium pro Loch befüllt und mit rekombinantem CCL25 (Tabelle 3.1) – dem Liganden für CCR9 - in verschiedenen Mengen (1ng, 10ng, 100ng) versehen, wobei mindestens drei Vertiefungen die gleiche Konzentration enthielten. Ebenso wurden mindestens drei Löcher zur Kontrolle ohne Chemokin belassen. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Einsätze, deren Boden aus einer zellpermeablen Membran bestand, auf die befüllten Vertiefungen gelegt. Dabei war der Höhenunterschied so bemessen, dass die zellpermeable Membran unterhalb des vorgelegten Mediumspiegels liegt, um den kultivierten Zellen Zugang zu dem Chemokin zu ermöglichen. 100 μ l der Zellsuspension wurden in den Einsatz pipettiert und die Platten bei 37°C für 5h inkubiert. Im Anschluss erfolgten nach Entfernung der Einsätze eine Resuspension der transmigrierten Zellen und eine Überführung in ein FACS-Röhrchen. Nach einer Färbung eines Aliquots mittels Trypanblau wurde die Zellzahl nach oben beschriebener Methode bestimmt und der prozentuale Anteil migrierter Zellen an der eingesetzten Zellmenge berechnet.

3.2.6 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes, „*Standard error of the Mean*“) angegeben. Mittelwerte und SEM wurden mit Microsoft Excel 2016 berechnet. Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism“ (GraphPad Software Inc., CA USA), wobei bei parametrischen Tests eine Normalverteilung vorausgesetzt wurde. Bei Vergleich zweier Werte zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der zweiseitige, gepaarte t-Test durchgeführt. Bei mehr als zwei Vergleichsgruppen wurde die ein- oder zweifaktorielle „Analysis of Variance“ (ANOVA)-Testung mit Post-hoc Testung nach Tukey verwendet. Als signifikant werden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) < 0,05 eingestuft und folgendermaßen markiert: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

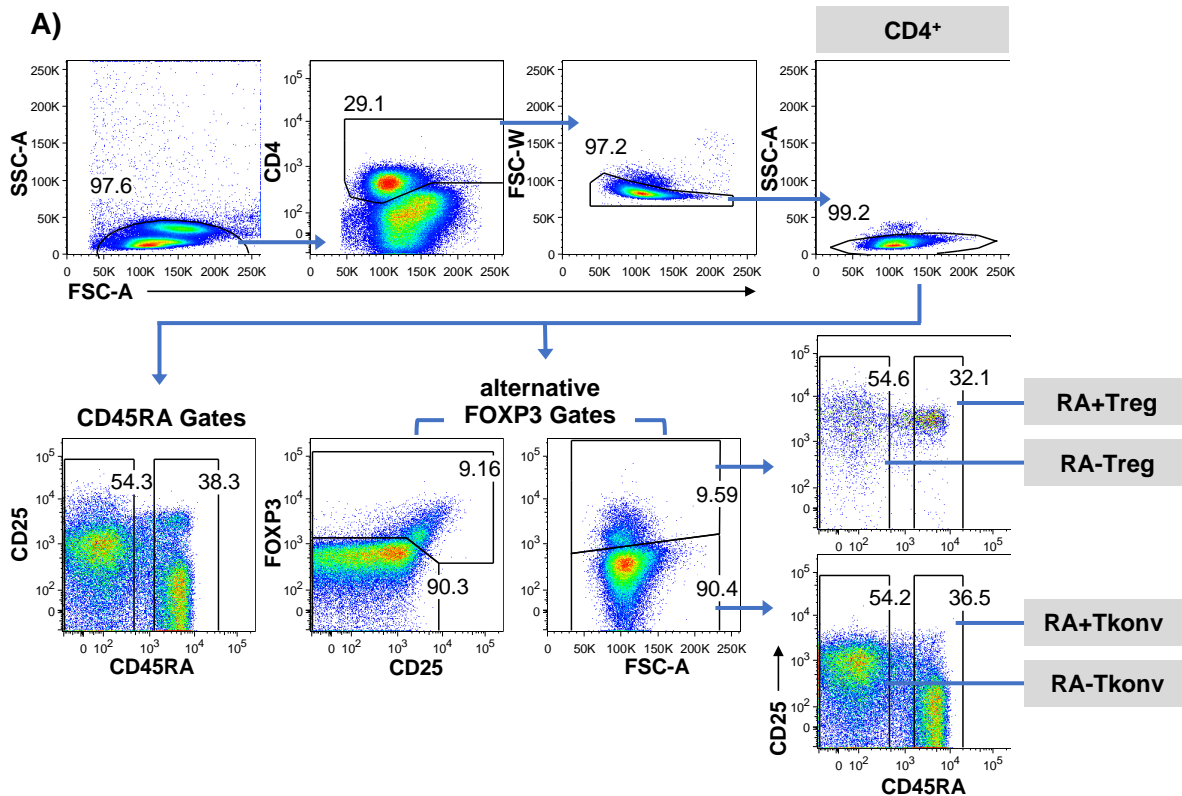
4 Ergebnisse

4.1 Homingrezeptorprofile *ex vivo* isolierter CD4⁺T-Zellen

In diesem Versuch wurde das Homingrezeptorprofil humaner CD4⁺T-Zellen aus Leukapheresaten direkt nach *ex vivo* Isolation analysiert. Die CD4⁺T-Zellen wurden in regulatorische und konventionelle Populationen untergliedert und jeweils deren antigenereifere und naive Subgruppe analysiert. Untersucht wurden sechs verschiedene Homingrezeptoren die entweder mit einer Migration in den Darm (CD103, CCR9, CD49d) oder in die Haut (CLA, CCR10, CCR4) assoziiert sind - die wesentlichen Zielorgane der GVHD. Dieser Versuch wurde durchgeführt um das Homingrezeptorprofil der verschiedenen CD4⁺ Subgruppen nach frischer Isolation phänotypspezifisch vergleichen zu können. Die Daten dienen zudem dem Vergleich des Homingrezeptorprofils vor und nach polyklonaler oder allogener Stimulation, als auch ermöglichen sie einen Vergleich der verschiedenen Stimulationsmethoden (*in vivo*, *ex vivo* polyklonal, *ex vivo* allogen) untereinander.

Neun Leukapheresen wurden nach Aufklärung und Einwilligung der gesunden Spender in der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg nach einem behördlich genehmigten Protokoll gewonnen (in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki und mit positivem Ethikvotum). Um daraus die gewünschten Subpopulationen zu isolieren, wurden zunächst über DGZ die MNC isoliert (siehe 3.2.2.1.) Um unter ihnen CD4⁺T-Zellen zu identifizieren erfolgte eine Färbung mit anti-CD4 Antikörpern, und zur Unterscheidung von regulatorischen und konventionellen T-Zellen eine intranukleäre FOXP3 Markierung. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der neben seiner essentiellen Bedeutung für die suppressive Funktion regulatorischer T-Zellen diese Zelllinie auch definiert [41]. Zur Unterscheidung der CD4⁺T-Zell-Phänotypen erfolgte eine Färbung mit CD45RA, da wie unter 1.2.2 beschrieben, anhand der reziproken Expression von verschiedenen Isoformen des Transmembranproteins CD45 eine Differenzierung zwischen naiven und kürzlich aktivierten T-Zellen oder Gedächtnis-T-Zellen möglich ist [55, 56]. Die rezeptorpositiven Subpopulationen wurden durch Oberflächenfärbung mit Antikörpern gegen die untersuchten Rezeptoren detektiert. Die Signale aller Antikörper wurden mittels Durchflusszytometrie erfasst, sowie FCS und SSC ermittelt. Durch diese beiden Parameter war es in der späteren Auswertung möglich, Zellen mit stark differenter Granularität und Größe sowie Doubletten auszuschließen. Dies geschah - neben einer

Selektion der CD4⁺ Zellen - durch ein FSC-A/SSC-A und ein FSC-A/SSC-W Gate in den ersten vier Schritten der gezeigten Gatingstrategie in Abb. 1. An der resultierend CD4⁺ Population wurden stringente CD45RA Gates ausgerichtet und auf den vollumfänglichen Einschluss der mittig liegenden Zellen verzichtet. Nur Zellen mit einer hoher CD45RA Expression exprimieren auch homogen die mit einem naiven Phänotyp assoziierten Marker CCR7 und CD62L, und sind wegen ihrem stabilen Phänotyp für die polyklonale *in vitro* Expansion im klinischen Rahmen geeignet [62]. Weiterhin erstreckt sich der Wechsel der Splicingvarianten von CD45 über mehrere Tage, weshalb eine Koexpression prinzipiell möglich ist. Das gewählte Gating ermöglicht somit eine weitgehend sichere Trennung der Phänotypen. Weiterhin wurden die CD4⁺T-Zellen anhand ihrer FOXP3 Expression in Treg und Tkonv aufgeteilt, wobei man je nach Konstellation der Antikörper zwei verschiedene Gates setzte. Die CD45RA-Gates wurden auf die Treg und Tkonv übertragen, woraus vier Subpopulationen resultierten, die in der vorliegenden Arbeit stets mit den in grau hinterlegten Namen bezeichnet werden. Die ebenfalls an der CD4⁺ Gesamtpopulation ausgerichteten Rezeptorgates wurden daraufhin auf die vier Subgruppen übertragen und die prozentualen Anteile rezeptorpositiver Zellen erfasst.



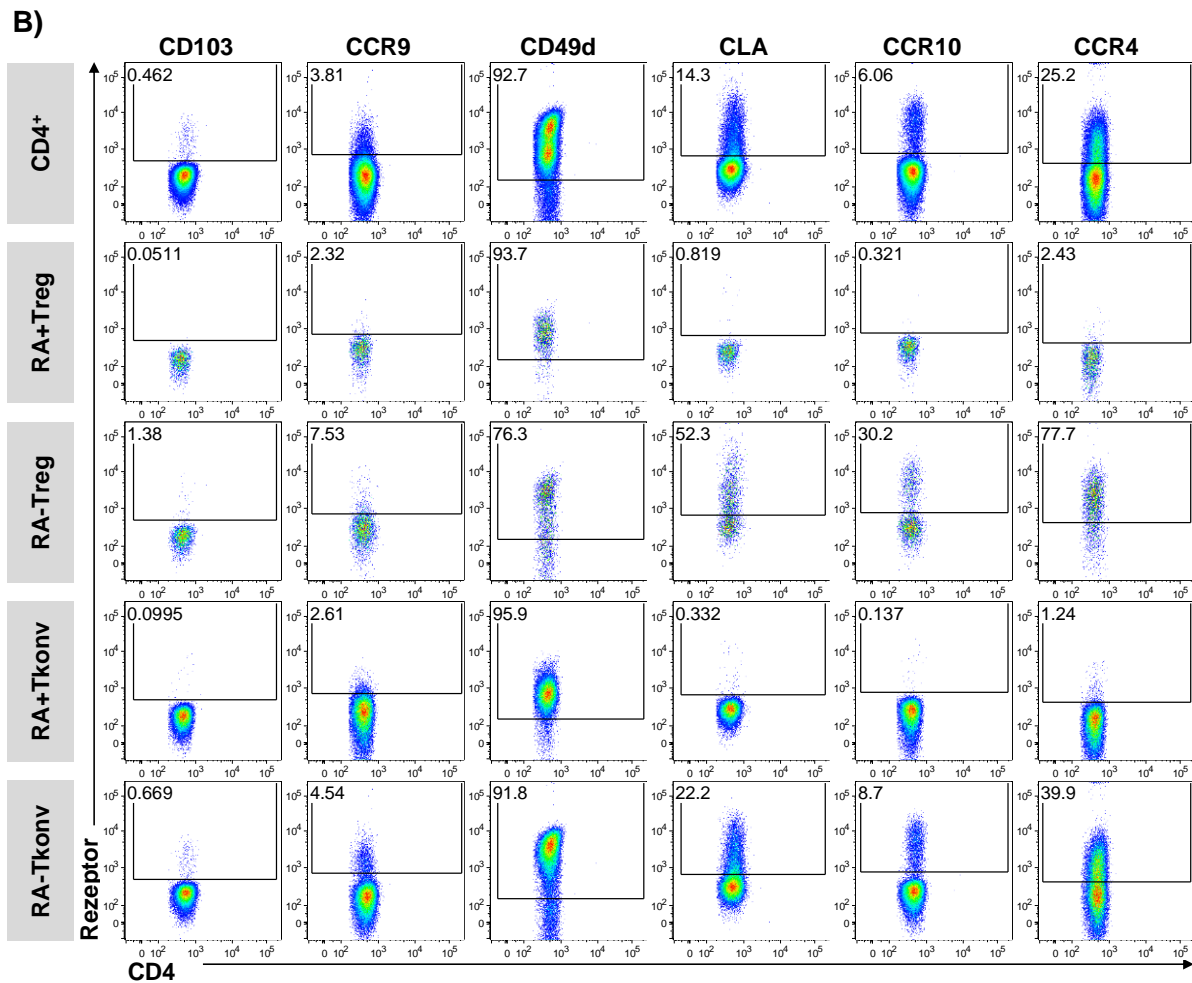


Abb. 1: Gatingstrategie der FACS-basierten Analyse des Homingrezeptorprofils ex vivo isolierter CD4⁺T-Zellen

MNCs wurden aus Leukapheresaten gesunder Spender mittels DGZ isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dargestellter Gatingstrategie, wobei mit blauen Pfeilen der Fortgang des Gatingpfades verdeutlicht wird. **(A)** zeigt den Weg zu den vier grau hinterlegten Subpopulationen. Die ersten vier Schritte führten unter Ausschluss der Doubletten zu CD4⁺ Lymphozyten („CD4⁺“), woran die stringenten Gates der CD45RA⁺ und CD45RA⁻ Populationen ausgerichtet, und auf die mit zwei alternativen Gates ermittelten FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Populationen übertragen wurden. **(B)** zeigt das Gating der Rezeptoren auf den ermittelten Subpopulationen (RA+/RA-Treg/Tkonv). In der ersten Reihe wurden die Gates an der unter (A) dargestellten CD4⁺ Gesamtpopulation ausgerichtet und in den Reihen darunter auf die Subpopulationen angewendet. Dargestellt sind repräsentative Plots aus n=9 Leukapheresaten unterschiedlicher Spender, die jeweils auf gleiche Weise untersucht wurden.

Es zeigte sich, dass RA+Treg von den untersuchten Darm-spezifischen Rezeptoren vor allem CD49d exprimierten sowie in geringem Maße auch CCR9, ohne eine Expression von CD103. Von den untersuchten Haut-spezifischen Rezeptoren zeigten sie eine geringe Expression von CCR4 und CLA. Dagegen konnten kaum CCR10 exprimierende Zellen nachgewiesen werden. RA-Treg zeigten hinsichtlich der Darm-spezifischen Rezeptoren ebenso eine starke Expression von CD49d sowie eine

geringe Expression von CCR9 und CD103. Sie exprimierten alle Haut-spezifischen Rezeptoren, mit besonders starker CCR4 Expression. RA+ Tkonv trugen ausschließlich CD49d und CCR9. Unter den RA-Tkonv exprimierten ebenfalls zahlreiche Zellen CD49d, wenige CCR9 und keine CD103. Sie exprimieren alle Haut-spezifischen Rezeptoren.

Bei einem Vergleich der RA+ und RA- Subpopulationen der Treg ergab sich eine signifikant höhere Expression unter den RA- Treg der Haut-spezifischen Rezeptoren CLA, CCR10 und CCR4, sowie auf sehr geringem Niveau des Darm-spezifischen Rezeptors CD103. Im Gegensatz dazu wurde CD49d von den RA+Treg stärker exprimiert, während die Gruppen hinsichtlich der Expression von CCR9 keinen Unterschied aufzeigten. Außerdem ergaben sich signifikante Unterschiede in Abgrenzung zu den Subpopulationen der konventionellen CD4⁺T-Zellen. Die RA+Treg exprimierten signifikant weniger CD49d als RA+Tkonv, während sie tendenziell mehr CCR4 trugen. RA-Treg zeigten bei allen Haut-spezifischen Rezeptoren eine signifikant höhere Expression als RA-Tkonv. Auch die - insgesamt gesehen - geringe Expression von CD103 war höher. Im Gegensatz dazu trugen RA-Treg signifikant weniger CD49d als die RA-Tkonv.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass RA+Treg vor allem CD49d und CCR4 trugen, RA-Treg zusätzlich CLA und CCR10. Im Vergleich unter den Treg lag die Expression der Hautrezeptoren auf den RA- signifikant höher als die der RA+. Bei CD49d verhielt sich die Expression gegensätzlich: RA+Treg exprimierten signifikant mehr als RA-Treg. Bei allen Rezeptoren bildete sich unter den RA+ und RA- Subpopulationen der Tkonv eine ähnliche Verteilung ab. Im Vergleich zwischen Treg und Tkonv zeigte sich bei den Haut-spezifischen Rezeptoren unter den Treg ein höheres Expressionsniveau als unter den Tkonv, bei CD49d war dagegen das Expressionsniveau insgesamt unter den Tkonv höher als unter den Treg. CCR9 wurde von allen Gruppen gleichmäßig gering und CD103 unbedeutend exprimiert.

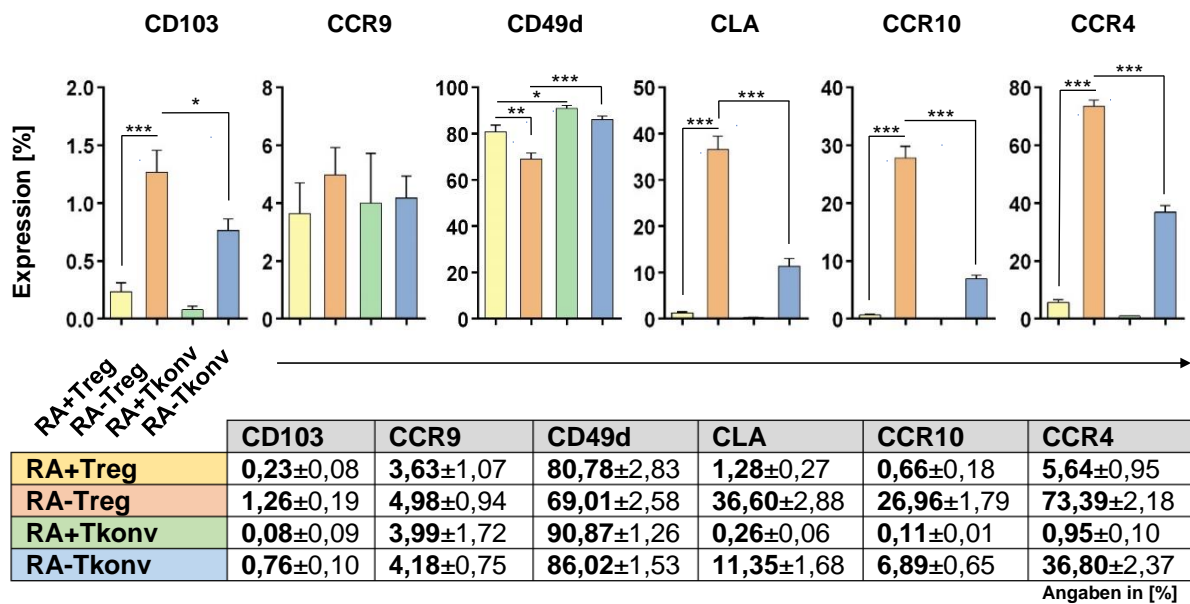


Abb. 2: Zusammengefasste Daten zur Expression von Homingrezeptoren auf ex vivo isolierten CD4⁺T-Zellen

MNCs wurden aus Leukapheresaten gesunder Spender mittels DGZ isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Identifikation der einzelnen CD4⁺T-Zellpopulationen erfolgte nach der in Abb. 1 beschriebenen Gatingstrategie. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Rezeptor-exprimierender Zellen unter den jeweiligen Subpopulationen, die durch einzelne Säulen repräsentiert sind, sowie die einzelnen Prozentwerte in tabellarischer Übersicht. (MW ± SEM; n=9 Leukapheresate unterschiedlicher Donoren). Zur statistischen Analyse erfolgte ein ANOVA one-way Test mit post-hoc Testung nach Tukey. (***) = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$)

4.2 Analyse des Homingrezeptorprofils CD4⁺T-Zellen im Rahmen der polyklonalen Expansion

4.2.1 Isolation und Expansion der Zielpopulationen

Aufgrund ihrer geringen Frequenz im humanen peripheren Blut müssen regulatorische T-Zellen für einen potenziellen zelltherapeutischen Einsatz *in vitro* expandiert werden. Da die *in vitro* Stimulation den Phänotypen der CD4⁺T-Zellen beeinflusst, sollte das Homingrezeptorprofil der Zellen nach Expansion untersucht werden, um Hinweise auf ihre Migrationsfähigkeit nach adoptivem Transfer zu bekommen. Die Expansion erfolgte analog der Kulturbedingungen, die zur Herstellung klinischer Prüfpräparate für die Treg-Behandlung von GVHD-Patienten im Rahmen klinischer Studien am Universitätsklinikum Regensburg (EudraCT 2012-002685-12) etabliert wurden. Vergleichend wurden neben RA+ und RA-Treg auch die entsprechenden Subpopulationen konventioneller CD4⁺T-Zellen untersucht. Um die genannten Zellpopulationen möglichst rein zu isolieren wurden zunächst Leukapheresate gesunder Spender mit MACS anhand der zellulären CD25-Expression in eine Positiv-

und Negativfraktion aufgeteilt und die Zellen beider Gruppen mit Fluorochrom-markierten anti-CD4-, anti-CD127- und anti-CD45RA Antikörpern auf ihrer Oberfläche gefärbt. Die CD25-Positivfraktion wurde am FACS Aria II in $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^+Treg$ (RA+Treg) bzw. $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^-Treg$ (RA-Treg) und die CD25-Negativfraktion in $CD4^+CD25^-CD45RA^+Tkonv$ (RA+Tkonv) und $CD4^+CD25^-CD45RA^-Tkonv$ (RA-Tkonv) sortiert. Nach der FACS-Sortierung ergaben sich für die Sortierparameter eine Reinheit von $>96\%$. RA+Treg exprimierten nach Sortierung mittels dieser Kriterien zu $98,18 \pm 0,18\%$, RA-Treg zu $98,0 \pm 0,08\%$ FOXP3 (MW \pm SEM, n=8).

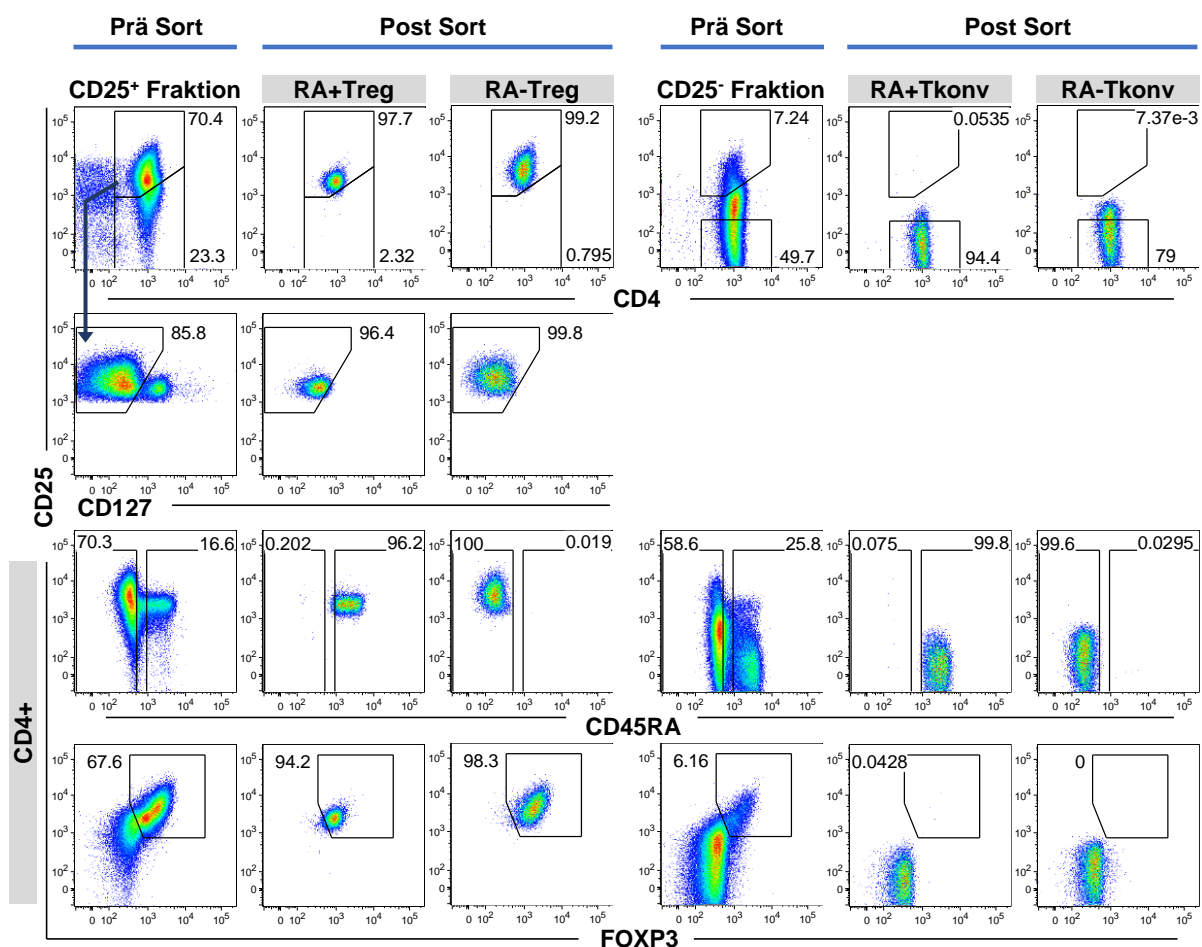


Abb. 3: FACS-basierte Sortierung von CD45RA⁺ und CD45RA⁻ Treg und Tkonv

MNCs aus Leukapheresaten gesunder Spender wurden mit MACS in eine CD25-positive und eine CD25-negative Fraktion aufgeteilt. Beide Zellgruppen wurden mit anti-CD4-, anti-CD127- und anti-CD45RA Antikörpern gefärbt. Die CD25-Positivfraktion wurde am FACS Aria II in $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^+Treg$ (RA+Treg) bzw. $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^-Treg$ (RA-Treg) und die CD25-Negativfraktion in $CD4^+CD25^-CD45RA^+Tkonv$ (RA+Tkonv) und $CD4^+CD25^-CD45RA^-Tkonv$ (RA-Tkonv) sortiert. Gezeigt ist eine Analyse hinsichtlich der Sortierparameter und FOXP3 der angereicherten Zellen vor Sortierung sowie eine Reanalyse im Anschluss. In der ersten Reihe sind Plots nach Ausschluss von Doubletten dargestellt, in der zweiten zusätzlich unter Berücksichtigung von CD25. Die dritte und vierte Reihe zeigt Gates unter CD4⁺T-Zellen. Es handelt sich um ein repräsentatives Beispiel aus n=9 Sortgängen, die alle auf gezeigte Weise durchgeführt wurden.

Diese vier sortierten Subpopulationen wurden, wie unter 3.2.5.1 in Material und Methoden beschrieben, *in vitro* kultiviert und polyklonal expandiert. Zunächst erfolgte dafür eine Aussaat in 96-Loch-Rundbodenplatten, in denen die Zellen zur polyklonalen Stimulation mit vier anti-CD3/CD28-gekoppelten Magnetbeads pro Zelle und 300 U/ml IL-2 versehen wurden. Nach vier Tagen erhielten die Zellen 100µl frisches Medium mit IL-2, und wurden nach sechs bis sieben Tagen geerntet und gezählt. Es erfolgte eine erneute Aussaat in 24-Loch-Platten unter Restimulation mit einem Bead pro Zelle. Bei Bedarf wurden die Zellen im weiteren Kulturverlauf mit frischem Medium und IL-2 versehen sowie bei besonders starkem Wachstum in zusätzliche Ansätze aufgesplittet. Nach 12 bis 15 Tagen wurden die Zellen schließlich geerntet, gezählt und durchflusszytometrisch analysiert. Auf diese Weise „expandierte“ Zellen werden in Abgrenzung zu *ex vivo* isolierten Zellen im Folgenden mit dem Präfix „e“ versehen. RA+Treg expandierten unter den beschriebenen Bedingungen nach einer Woche 35,2±1,9-fach und nach 12 bis 15 Tagen 206,9±16,2-fach. Im Gegensatz dazu expandierten RA-Treg nach einer Woche mit 17,8±1,4-facher und mit 89,5±19,2-facher Expansionsrate deutlich schwächer. Konventionelle CD4⁺T-Zellen expandierten nach einer Woche ähnlich stark wie Treg (RA+: 32,0±3,5-fach; RA-: 19,3±0,9-fach) und nach 12 bis 15 Tagen in der jeweiligen Subpopulation deutlich stärker (RA+: 406,3±58,2-fach; RA-: 282,3±23,5-fach). Die Auswertung der FACS-Messung erfolgte mit der in Abb. 4 gezeigten Gatingstrategie, die unter Ausschluss von Doubletten und toten Zellen den Weg zur CD4⁺ Gesamtpopulation sowie die FOXP3 Expression der eTreg aufzeigt. Wie aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits bekannt, zeigen RA-Treg nach polyklonaler *in vitro* Expansion eine weniger stabile FOXP3 Expression als die RA+ Subgruppe [62]. Die Entwicklung einer FOXP3-negativen Population unter den RA-eTreg konnte bei sechs der neun untersuchten Kulturen beobachtet werden und machte in diesen Fällen durchschnittlich 18,78±1,58% der Zellen aus. Um diese Zellen genauer zu untersuchen, wurden die FOXP3[±] Untergruppen der RA-eTreg (RA-F+/RA-F-) auf gezeigte Weise in der Auswertung separiert und im Folgenden als eigenständige Population analysiert. Für den Rezeptor CCR4 konnte nach Expansion keine klare Positiv- oder Negativpopulation mehr abgegrenzt werden, weshalb hierfür die MFI herangezogen wurde. Bei der vergleichenden Betrachtung zu *ex vivo* isolierten CD4⁺T-Zellen, unter

denen sich bei diesem Rezeptor zwei Populationen darstellten, wurde hier die MFI der CCR4-positiven Population erhoben.

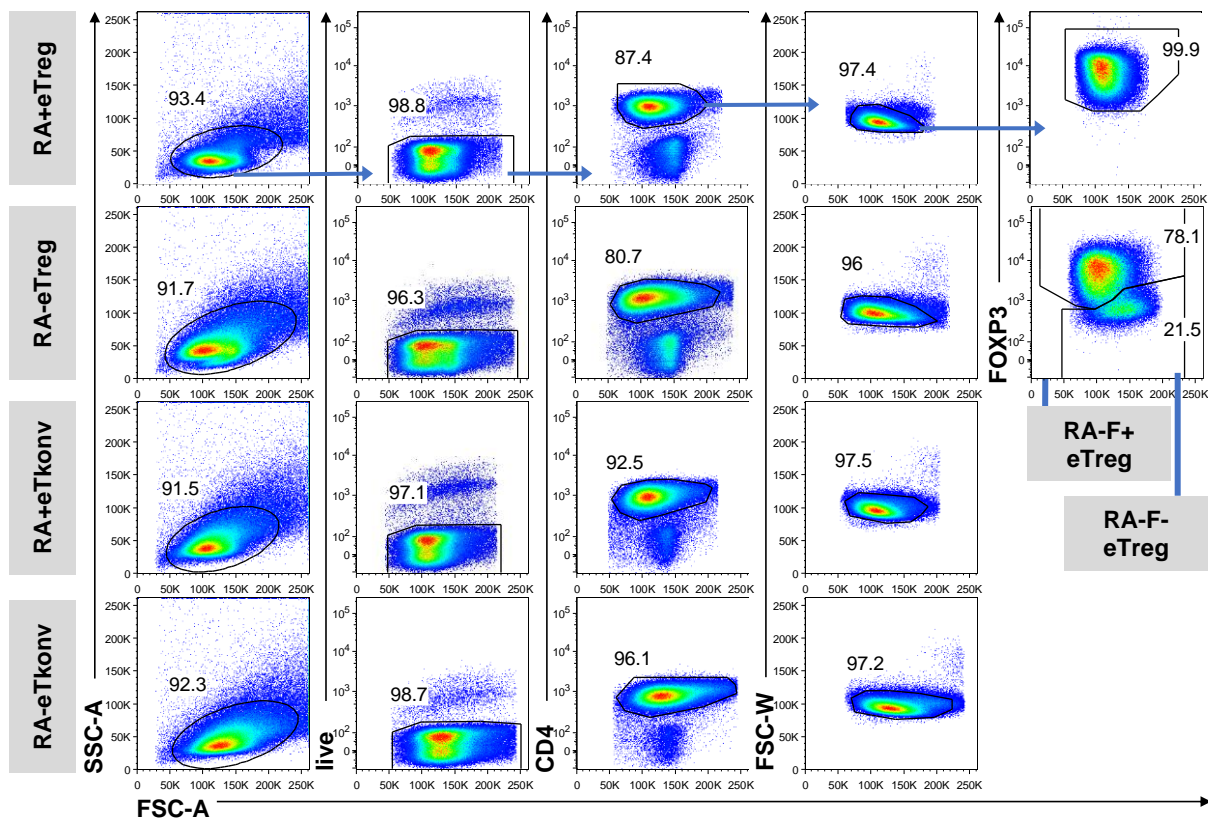


Abb. 4: Gatingstrategie der CD4⁺ Gesamtpopulation im Rahmen der FACS-basierten Analyse des Homingrezeptorprofils nach polyklonaler Expansion

MNCs wurden aus Leukapheresaten gesunder Spender mittels DGZ isoliert. Die vier untersuchten CD4⁺T-Zellpopulationen (RA+/RA- Treg/Tkonv) wurden mittels FACS sortiert (siehe Abb.3), für 12 bis 15 Tage *in vitro* expandiert wie unter 3.2.5.1 in Material und Methoden beschrieben und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist für jede expandierte Subpopulation die Gatingstrategie. Gezeigt ist unter Ausschluss von Doubletten und toten Zellen der Weg zur CD4⁺ Gesamtpopulation sowie die FOXP3 Expression der eTreg. Die FOXP3⁺/⁻ Untergruppen der eRA-Treg (RA-F+/RA-F-) werden auf gezeigte Weise separiert und im Folgenden als eigenständige Populationen analysiert. Mit blauen Pfeilen ist der Fortgang des Gatingpfades verdeutlicht.

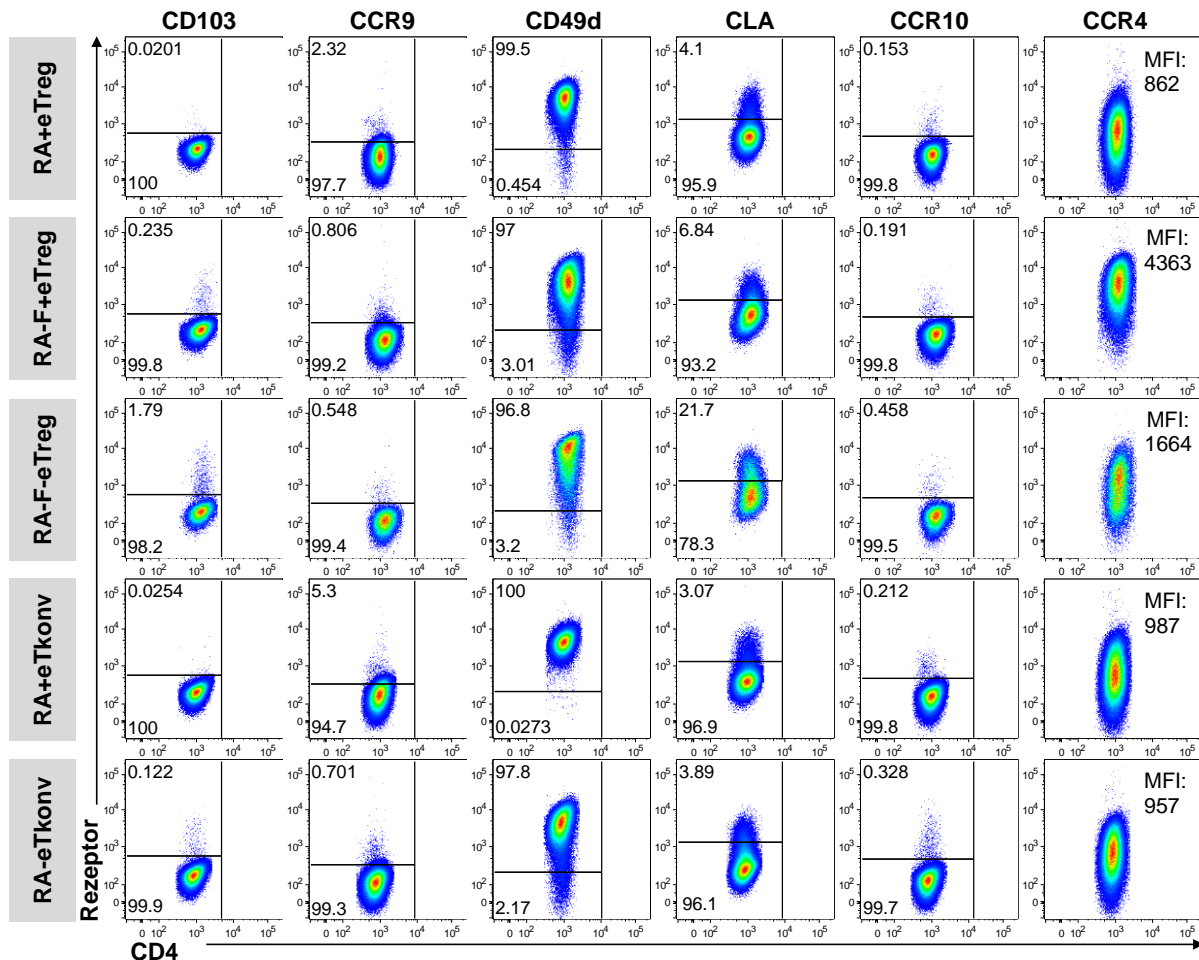


Abb. 5: Gatingstrategie der Homingrezeptoren auf CD4⁺T-Zellen im Rahmen der FACS-basierten Analyse nach polyklonaler Expansion

MNCs wurden aus Leukapheresaten gesunder Spender mittels DGZ isoliert. Die vier untersuchten CD4⁺T-Zellpopulationen (RA+/RA- Treg/Tkonv) wurden mittels FACS sortiert (siehe Abb.3), für 12 bis 15 Tage *in vitro* expandiert wie unter 3.2.5.1 in Material und Methoden beschrieben und durchflusszytometrisch analysiert. Für jede expandierte Subpopulation ist von der CD4⁺ Gesamtpopulation ausgehend (siehe Abb. 4) das Gating und die Expression der einzelnen Rezeptoren sowie in der letzten Spalte die MFI von CCR4 gezeigt. Dargestellt sind repräsentative Plots von n=9 Leukapheresaten unterschiedlicher Spender, die alle auf gleiche Weise untersucht wurden.

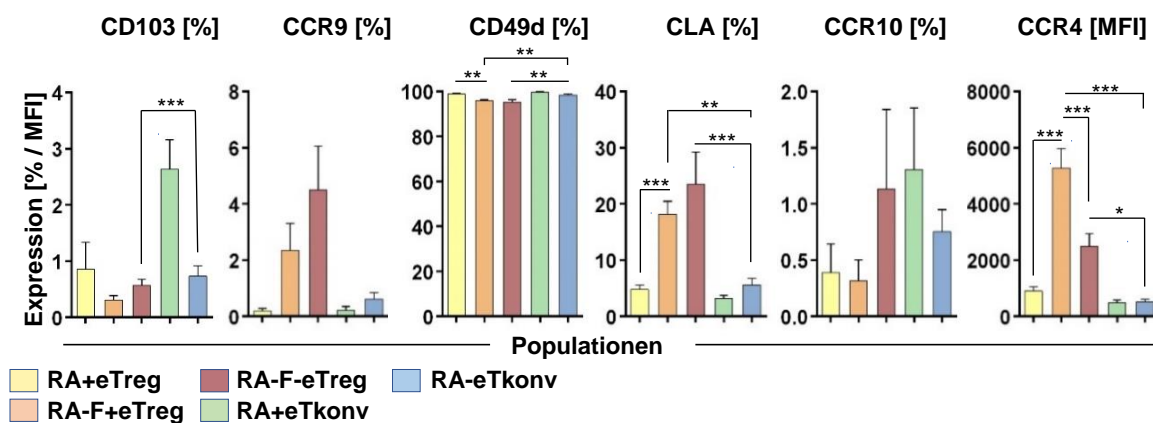
4.2.2 Homingrezeptorexpression expandierter CD4⁺T-Zellen

Expandierte RA+Treg trugen von den Darm-spezifischen Rezeptoren viel CD49d und kaum CCR9 oder CD103. Von den Haut-spezifische Rezeptoren trugen sie in geringem Maße CLA, kein CCR10 und zeigten für CCR4 eine MFI von durchschnittlich 900. Auch expandierte RA-Treg exprimierten nach *in vitro* Expansion sowohl unter den FOXP3-positiven als auch unter den FOXP3-negativen Zellen fast alle CD49d als einzigen Darm-spezifischen Rezeptor. Sie trugen kaum CD103 und kein CCR9. Von den Haut-spezifischen Rezeptoren exprimierten die RA-Treg sowohl unter den FOXP3-positiven als auch unter den FOXP3-negativen Zellen CLA, und kein CCR10.

Die MFI von CCR4 unter den RA-F+eTreg lag bei ca. 5000, bei den RA-F-eTreg bei ca. 2500. Bei vergleichender Betrachtung der RA+eTreg mit den Zellen unter den RA-eTreg, die nach Expansion noch FOXP3 exprimierten, fand sich CD49d prozentual auf den RA+ Zellen signifikant häufiger. Die prozentualen Anteile CLA-positiver Zellen, sowie die MFI von CCR4 waren dagegen unter den RA-F+eTreg größer als unter den RA+eTreg. Bei CCR10 war nach Expansion auf keiner der Populationen eine Expression nachweisbar. Ein Vergleich zwischen Treg und Tkonv zeigte eine höhere Expression von CLA und CCR4 unter den RA-F+eTreg als unter den RA-eTkonv. CCR10 dagegen war auf keiner Population sichtbar. Bei CD49d zeigte sich im Gegensatz dazu eine prozentual höhere Expression auf den RA-eTkonv als auf den RA-F+eTreg. Während auf frisch isolierten Zellen unter den RA+Tkonv noch mehr Zellen CD49d trugen als unter RA+Treg, war dieser Unterschied nach Expansion nicht mehr erkennbar.

Zusammenfassend zeigte sich, dass expandierte RA+Treg vor allem CD49d und CCR4 exprimieren, RA-F+eTreg zusätzlich CLA. Im Vergleich zwischen den beiden Phänotypen liegt die gleiche Verteilung vor, wie vor der Expansion: RA+eTreg tragen mehr CD49d und weniger CLA und CCR4 als die RA-F+eTreg. Anders verhielt es sich bei CCR10. Dieser Rezeptor wurde von keiner der expandierten Zellen exprimiert. Auch im Vergleich zwischen RA-F+eTreg und RA-eTkonv findet sich eine ähnliche Verteilung wie vor Expansion: RA-F+eTreg tragen mehr CLA und CCR4 als RA-eTkonv. CD49d wird von den RA-Tkonv stärker exprimiert als von den RA-F+eTreg. Bei sechs der neun untersuchten Kulturen konnte nach Expansion unter den RA-eTreg eine FOXP3-negative Population abgegrenzt werden. Dies ist bereits aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bekannt [62] und gibt immer noch Anlass zur Diskussion, ob es sich dabei um eine Kontamination der Ausgangspopulation mit konventionellen CD4⁺T-Zellen handelt, die zu einer abgrenzbaren Population expandieren oder ob die FOXP3-negativen Zellen Ausdruck der Plastizität der phänotypisch instabilen RA-Treg ist. Die letztere These geht somit davon aus, dass sich die FOXP3-negative Population aus den ursprünglich FOXP3-positiven RA-Treg entwickelt, was einen Vergleich zwischen der FOXP3-positiven und der FOXP3-negativen Subgruppe der expandierten RA-Treg hinsichtlich ihres Homingrezeptorprofils sinnvoll erscheinen lässt. Es zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede bei der Expression der Rezeptoren, außer bei CCR4: Die MFI dieses Rezeptors war unter den Zellen, die nach Expansion FOXP3

trugen, signifikant höher. Im Falle einer Kontamination mit RA-Tkonv in der Ausgangspopulation, beständen die FOXP3-negativen Zellen unter den RA-eTreg aus expandierten RA-Tkonv, weshalb expandierte RA-Tkonv und RA-F-eTreg hinsichtlich ihres Homingrezeptorprofils verglichen wurden. Unter den Darm-spezifischen Rezeptoren zeigte sich in geringem Maße bei CD103 auf den RA-F-eTreg eine signifikant höhere Expression, während für CCR9 kein Unterschied vorlag. CD49d wurde von beiden Gruppen in hohem Maße exprimiert, unter den RA-Tkonv allerdings noch signifikant häufiger als unter RA-F-eTreg. Im Gegensatz dazu exprimierten die RA-F-eTreg signifikant mehr CLA und CCR4 als RA-Tkonv. CCR10 war auf keiner der Gruppen vorhanden.



	CD103 [%]	CCR9 [%]	CD49d [%]	CLA [%]	CCR10 [%]	CCR4 [MFI]
RA+eTreg	0,20±0,08	0,86±0,47	98,74±0,30	4,77±0,75	0,39±0,26	898,67±155,32
RA-F+eTreg	2,35±0,95	0,31±0,08	95,82±0,62	18,14±2,29	0,32±0,18	5267,00±693,12
RA-F-eTreg	4,50±1,56	0,57±0,11	95,32±2,41	23,50±5,70	1,13±0,71	2492,17±447,72
RA+eTkonv	0,22±0,13	2,63±0,52	99,64±0,20	3,15±0,59	1,31±0,54	485,89±96,18
RA-eTkonv	0,62±0,22	0,73±0,18	98,37±0,46	5,61±1,19	0,75±0,20	525,67±87,80

Abb. 6: Expression von Homingrezeptoren auf Subpopulationen CD4⁺T-Zellen nach polyklonaler Expansion

MNCs wurden aus Leukapheresaten gesunder Spender mittels DGZ isoliert. Daraus wurden vier CD4⁺T-Zellpopulationen (RA+/RA- Treg/Tkonv) mittels FACS sortiert (siehe Abb.3) für 12 bis 15 Tage *in vitro* expandiert wie unter 3.2.5.1 in Material und Methoden beschrieben und durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte nach der in Abb.4 gezeigten Strategie und jede der resultierenden Subpopulationen ist hier durch eine Säule repräsentiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil rezeptorpositiver Zellen nach polyklonaler Expansion bzw. für CCR4 die MFI. (MW ± SEM; n=6-9 Leukapheresate unterschiedlicher Donoren). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA one-way Test mit post-hoc Testung nach Tukey. (**=p < 0,01, ***=p < 0,001, * = p < 0,05).

4.2.3 Vergleich des Homingrezeptorprofils CD4⁺T-Zellen vor und nach polyklonaler Expansion

Um zu beurteilen, wie sich die RA+Treg während der polyklonalen Expansion hinsichtlich ihres Homingrezeptorprofils verändern, wurde der Anteil rezeptorpositiver Zellen nach Expansion mit den *ex vivo* isolierten Zellen vor Expansion verglichen. Es

zeigte sich, dass die hohe Expression von CD49d auf frisch isolierten RA+Treg durch die Expansion noch signifikant gesteigert wurde, während CD103 weiterhin kaum nachweisbar war. Die Expression von CCR9 sank tendenziell ab, ohne dass sich ein signifikanter Unterschied ergab. Der Anteil an CLA tragenden Zellen dagegen war vor Expansion sehr gering und stieg als einziger Haut-spezifischer Rezeptor über die Kultivierung signifikant an. Eine Expression von CCR10 war weder vor noch nach der Kultivierung nachweisbar, ebenso zeigte sich kein Unterschied in der CCR4-MFI kultivierter oder frisch isolierter Zellen. Während auf RA+Treg nur die beiden Rezeptoren CD49d und CLA mit einem signifikanten Anstieg ihre Expression veränderten, unterschied sich das Homingrezeptorprofil der RA-Treg nach Expansion stark von den Ausgangszellen und nur CD103 veränderte sich nicht. Die kleine Zellgruppe von CCR9 exprimierender Zellen unter frisch isolierten MNCs war nach Expansion nicht mehr nachweisbar, während dagegen die Expression von CD49d nach Expansion signifikant höher lag und fast alle Zellen CD49d positiv waren. Die Expression der Haut-spezifischen Rezeptoren CLA und CCR10 war nach Expansion signifikant niedriger. Dennoch war eine Expression von CLA nach Kultivierung noch deutlich sichtbar, während CCR10 dagegen auf den expandierten Zellen nicht mehr nachweisbar war. Die MFI von CCR4 war nach Kultivierung signifikant höher als auf frisch isolierten Zellen. Somit stiegen auf RA-Treg CD49d und CCR4 signifikant an, während CCR10, CCR9 und CLA absanken. Unter den konventionellen CD4⁺T-Zellen entwickelten sich die Rezeptoren durch Expansion tendenziell ähnlich wie unter den RA+Treg. Bei der RA- Gruppe unter Treg und Tkonv zeigte sich diese Parallele für alle Rezeptoren außer für CCR4: Während sich unter den RA-F+Treg nach Expansion eine signifikant höhere MFI zeigt, war diese bei den RA-Tkonv nach Kultivierung signifikant geringer als zuvor.

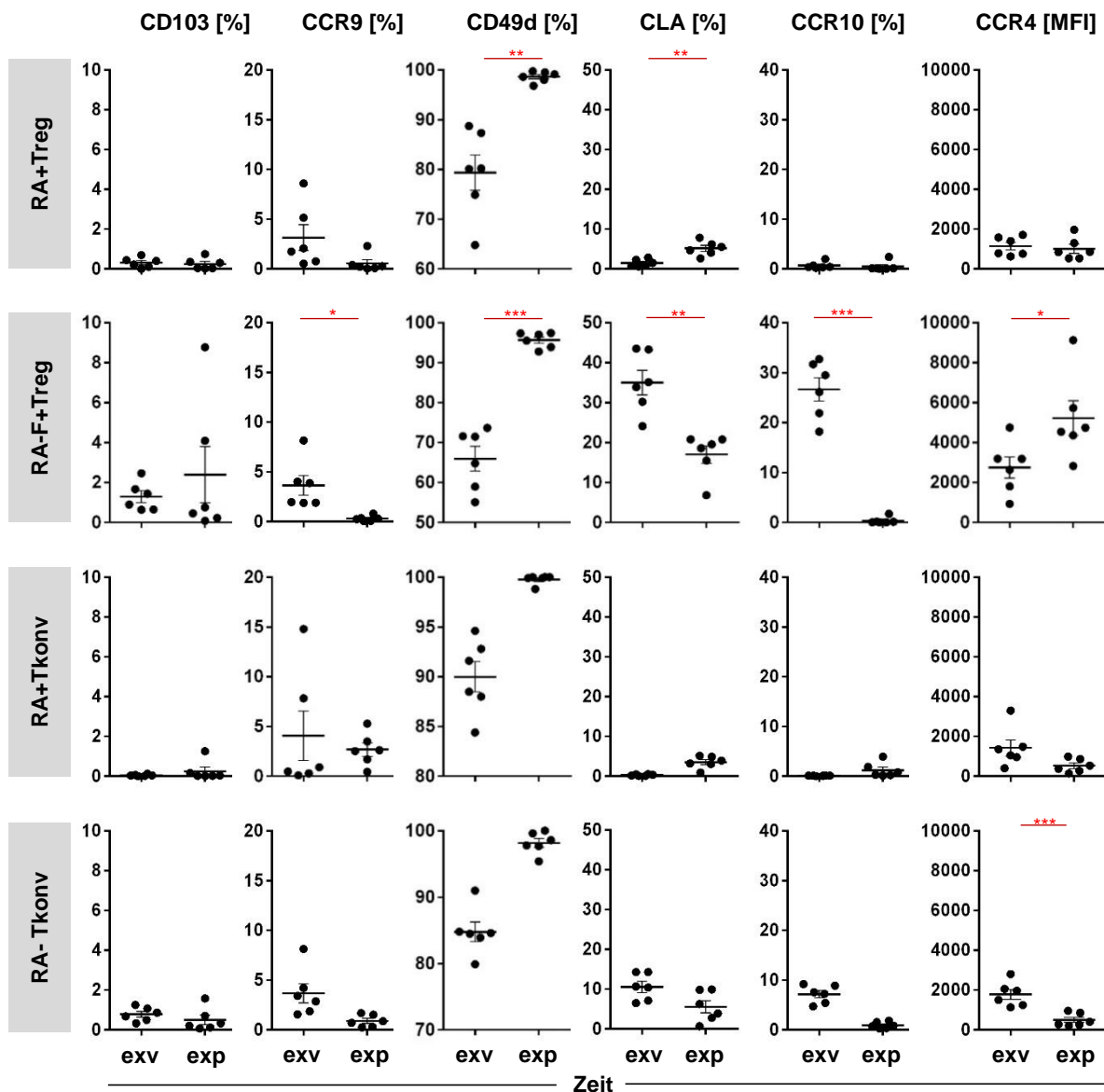


Abb. 7: Vergleich der Homingrezeptorexpression vor und nach polyklonaler Expansion von CD4⁺ T-Zellen

MNCs wurden *ex vivo* aus Leukapheresaten gesunder Spender mittels DGZ isoliert, durchflusszytometrisch analysiert und nach der unter Abb. 1 gezeigten Strategie ausgewertet („*exv*“). Es wurden vier CD4⁺T-Zellpopulationen (RA+/RA- Treg/Tkonv) mittels FACS sortiert (siehe Abb.3), für 12 bis 15 Tage *in vitro* expandiert wie unter 3.2.5.1 in Material und Methoden beschrieben und durchflusszytometrisch analysiert. Das Gating der einzelnen CD4⁺T-Zellsubpopulationen erfolgte nach der in Abb.4 gezeigten Strategie („*exp*“). Dargestellt ist der prozentuale Anteil rezeptorpositiver Zellen vor („*exv*“) und nach („*exp*“) polyklonaler Expansion bzw. für CCR4 die MFI. (MW±SEM; n=6 Leukapheresate unterschiedlicher Donoren). Die statistische Berechnung erfolgte mittels gepaartem, zweiseitigem t-Test (***= p<0,001, **=p < 0,01, *= p<0,05)

Bei der Analyse des Rezeptors CD49d zeigte sich innerhalb der rezeptorpositiven Zellen eine unterschiedliche Höhe der Expression des Rezeptors. Wie in Abb.7 gezeigt, exprimieren rezeptorpositive RA- Zellen CD49d auf einem höheren

Expressionsniveau als RA+ Zellen und bildeten gleichzeitig eine Negativpopulation aus. Die MFI der CD49d⁺ Zellen der RA- Zellen war unter Treg und Tkonv signifikant höher als die der RA+ Subgruppen, was im Gegensatz zu der oben beschriebenen prozentualen Aufteilung stand. Nach polyklonaler Expansion war die MFI in allen 4 Populationen signifikant höher und zwischen RA+ und RA- Subgruppen kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar, während sich wie oben beschrieben die Phänotypen der Treg weiterhin prozentual unterschieden. In die vergleichende Analyse zwischen den expandierten Treg wurden nur RA-Treg Zellen mit persistierender FOXP3 Expression einbezogen (RA-F+eTreg).

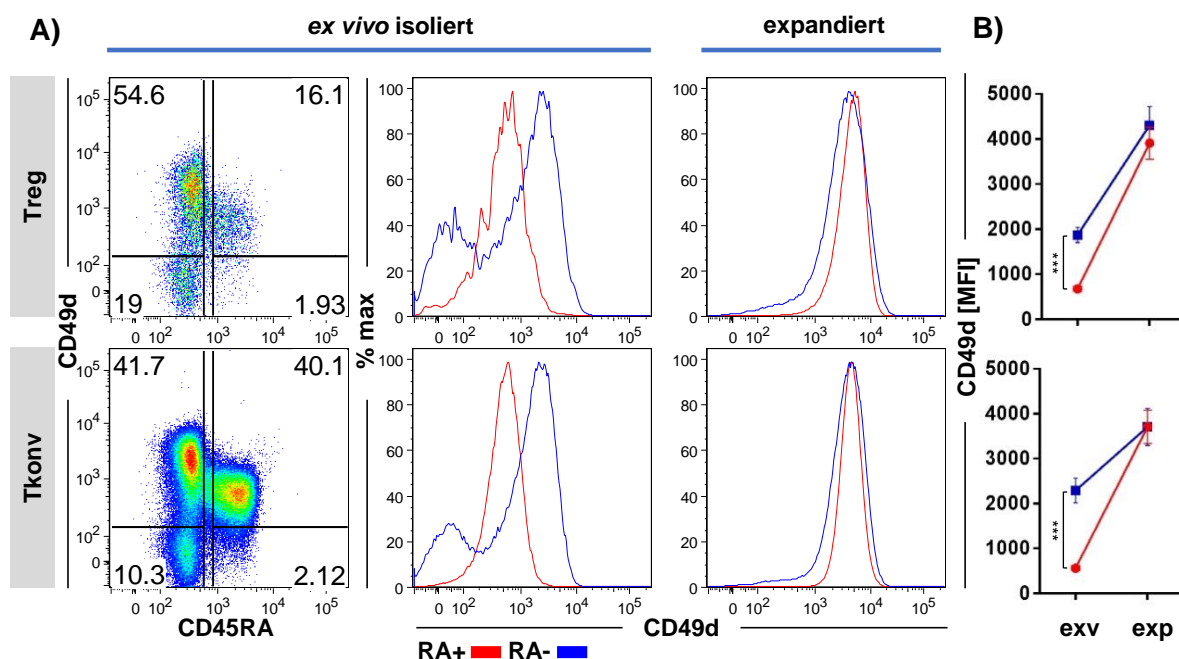


Abb. 8: Analyse der MFI von CD49d von CD4⁺T-Zellen vor und nach polyklonaler Expansion

Leukapheresate gesunder Spender, die mittels DGZ isoliert und durchflusszytometrisch analysiert wurden, sind unter „ex vivo isoliert“ gezeigt. Die Subpopulationen „Treg“ und „Tkonv“ sowie die RA+ und RA- Subgruppen wurden hier über die in Abb. 1 dargestellte Strategie ermittelt. Unter „expandiert“ sind RA+/RA-F+eTreg/eTkonv dargestellt, die nach ex vivo Isolation mittels FACS sortiert (siehe Abb. 3) für 12 bis 15d in vitro expandiert (siehe 3.2.5. 1), durchflusszytometrisch analysiert und nach der in Abb. 4 gezeigten Strategie ausgewertet worden sind. RA+ Zellen sind rot, RA- Zellen blau markiert. **(A)** Zeigt in der ersten Spalte repräsentative Plots unter Ausschluss von Doubletten und Berücksichtigung von CD4. Die Histogramme der zweiten und dritten Spalte zeigen die Expression von CD49d unter der RA+ und RA- CD4⁺ Population. **(B)** zeigt die MFI CD49d⁺ Zellen auf frisch isolierten („exv“) und expandierten („exp“) RA+/RA-Treg und Tkonv Zellen (MW ± SEM; n=9 Leukapheresate unterschiedlicher Donoren). Die statistische Analyse erfolgte mit einem ANOVA one-way Test und post-hoc Test nach Tukey (***)=p<0,001).

Zusammenfassend lässt sich für Treg feststellen, dass eine Expression von CD103, CCR9 und CCR10 nach Expansion auf beiden Phänotypen nicht mehr nachweisbar

war. Bei CLA und CCR4 entwickelten sich die Expressionsmuster unterschiedlich: Während die RA+Treg ihre CLA Expression steigerten, sank sie auf RA-Treg ab. Obwohl sich die beiden Populationen während der Expansion annähernten, blieb die Expression unter den RA-Treg auch nach Expansion signifikant höher als unter den RA+Treg. CCR4 wurde dagegen nur auf den RA-Treg hochreguliert, während CCR4 sich auf den RA+Treg nach Kultivierung nicht von frisch isolierten Zellen unterschied. Die Tkonv zeigten bei den genannten Rezeptoren weitgehend eine parallele Entwicklung zu den Treg, verhielten sich aber in der RA- Population hinsichtlich ihrer CCR4 Expression gegensätzlich: Die RA-Treg stiegen stark an, die RA-Tkonv sanken ab. Bereits in der Ausgangspopulation lag das Grundniveau unter den RA-Treg höher als unter den RA-Tkonv, was folglich durch die Expansion verstärkt wurde. Das betraf sowohl die RA-Treg, die nach Expansion FOXP3 trugen, als auch die, die FOXP3 negativ waren: Beide Gruppen exprimierten mehr CCR4 als expandierte RA-Tkonv. Unter den RA+ Zellgruppen zeichnete sich diese Verteilung tendenziell ebenfalls ab. Während die RA+Treg ihre CCR4 Expression durch die Expansion nicht signifikant veränderten, nahm sie unter den RA+Tkonv tendenziell ab. Eine statistische Signifikanz konnte hier allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Expression von CD49d wurde während der polyklonalen Expansion unter allen Populationen gesteigert. Ein Vergleich der MFI zwischen den Phänotypen zeigte, dass die MFI der rezeptorpositiven Zellen vor Expansion unter den RA- Zellen höher lag. Nach Expansion jedoch unterschied sich auf höherem Grundniveau die MFI der RA+ und RA- Gruppen nicht mehr. Prozentual hatte sich vor Expansion wie oben beschrieben eine gegensätzliche Verteilung gezeigt: Die RA+ Zellen lagen signifikant höher als die RA-. Dieser Unterschied blieb im Gegensatz zur MFI unter den Treg auch nach Expansion bestehen: RA+eTreg exprimierten prozentual signifikant mehr CD49d als RA-eTreg. Die konventionellen CD4⁺T-Zellen zeigten diesen prozentualen Unterschied ebenfalls vor Expansion, waren nach Expansion aber gänzlich rezeptorpositiv. Ein Vergleich zwischen Treg und Tkonv zeigte: Obwohl die Treg ihre Expression während der Kultivierung steigerten, lagen RA-Treg wie auch vor der Kultivierung prozentual signifikant niedriger als die RA-Tkonv. Bei den RA+ Subgruppen zeigte sich dieser Unterschied zwischen Treg und Tkonv nach Expansion nicht mehr.

4.2.4 Analyse der Homingrezeptoren und der FOXP3-Expression von CD4⁺T-Zellen nach polyklonaler Expansion mit ATRA

Wie bereits in der Literatur beschrieben, kann durch eine Kultivierung unter dem Einfluss des aktiven Metaboliten von Vitamin A, all-trans-Retinsäure (ATRA), auf Tkonv und Treg die Expression der Rezeptoren $\alpha 4\beta 7$ und CCR9 gesteigert werden [226, 229]. Diese beiden Rezeptoren vermitteln vorrangig eine Migration der Zellen in intestinales Gewebe, das eines der Hauptzielorgane der GVHD ist. Durch eine Induktion solcher Rezeptoren während der Expansion könnte möglicherweise die Migration zum Gastrointestinaltrakt nach adoptivem Transfer gesteigert werden, weshalb die Expression der Homingrezeptoren nach Expansion unter Zusatz von ATRA untersucht wurde. Ebenso wurde die FOXP3 Expression analysiert, da auch diese bekanntermaßen von ATRA über verschiedene Mechanismen verändert werden kann. Es erfolgte die Isolation von MNCs aus Leukapheresaten gesunder Spender mittels DGZ und eine Sortierung in die CD4⁺T-Zellsubpopulationen wie unter Abb.3 gezeigt. Die Kulturen wurden 12 bis 15 Tage expandiert (gekennzeichnet durch das Präfix „e“) wie unter 3.2.5.1 beschrieben, wobei den behandelten Reihen an d0, d3, d6, d9 und d12 100nM ATRA zugesetzt worden war. Nach einer Oberflächenfärbung mittels fluorochromkonjugierten Antikörpern und intranukleärer FOXP3 Markierung, erfolgte eine durchflusszytometrische Messung, die nach oben gezeigter Strategie (Abb.4) ausgewertet wurde. Die Zellen aller Subpopulationen aus behandelten Kulturen nach Expansion wurden mit unbehandelten Kontrollen der gleichen Subpopulationen verglichen.

4.2.4.1 Homingrezeptorprofil CD4⁺T-Zellen bei Kultivierung mit ATRA

Es zeigte sich unter den RA+eTreg eine deutliche Tendenz zur Zunahme der CCR9-exprimierenden Zellen in der behandelten Kultur ($30,69 \pm 8,13\%$) gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($1,18 \pm 0,69\%$). Unter den RA-F+eTreg exprimierten die unter dem Einfluss von ATRA expandierten Zellen signifikant mehr CCR9 ($47,48 \pm 10,71\%$) als die RA-F+eTreg der unbehandelten Kontrolle ($0,35 \pm 0,11\%$). Auch unter den anderen Populationen zeigte sich diese Entwicklung: Die RA-F-eTreg exprimierten mit $63,87 \pm 5,88\%$ signifikant mehr CCR9 als ohne ATRA ($0,61 \pm 0,05\%$). Die RA+eTkonv lagen ebenfalls mit $39,27 \pm 12,36\%$ in der behandelten Kultur signifikant höher als in der Kontrolle ($2,95 \pm 0,72\%$) und auch die RA-eTkonv enthielten in der behandelten Kultur mit $40,94 \pm 13,30\%$ signifikant mehr rezeptorpositive Zellen als unter den ohne

ATRA expandierten ($0,91 \pm 0,24\%$). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Subpopulationen im Ausmaß der Reaktion auf das Agens. Da die Expression von CD49d durch die Expansion ohne Agens bereits stark anstieg, wurde der Effekt von ATRA durch eine Messung der MFI untersucht. Dabei zeigte sich unter allen behandelten Populationen ein signifikanter Anstieg gegenüber der Kontrolle. Behandelte eTreg lagen mit $9081 \pm 830,9$ unter RA+ Zellen und $12122 \pm 1020,8$ unter den RA-F+ Zellen signifikant höher als die unbehandelte Kultur (RA+: $3757,5 \pm 453,9$; RA-F+: $4111,5 \pm 427,2$). Die RA-F-eTreg exprimierten mit $16660,0 \pm 1926,6$ CD49d signifikant höher als ohne ATRA ($5786 \pm 1417,4$). Konventionelle CD4+T-Zellen zeigten diesen Anstieg auf behandelten gegenüber den Kontrollkulturen ebenfalls (RA+: $8066,3 \pm 311,24$ vs. $3499,7 \pm 496,27$; RA-: $10736,3 \pm 801,4$ vs. $3690,2 \pm 586,2$). Im Gegensatz dazu konnte auf allen RA-Populationen unter ATRA Einfluss eine signifikant niedrigere Expression von CLA beobachtet werden. Herkömmlich expandierte RA-eTreg zeigten auf der expandierten RA-F+ Population eine Expression von $15,61 \pm 2,16\%$, die in der behandelten Kultur nur bei $1,26 \pm 0,3\%$ lag. Diese Entwicklung zeigten auch RA-F-eTreg ($23,7 \pm 1,2\%$ vs. $0,75 \pm 0,1\%$) und RA-eTkonv ($5,39 \pm 1,45$ vs. $0,1 \pm 0,03\%$). Die CCR10 und CCR4 Expression wurde durch ATRA nicht signifikant beeinflusst, allerdings zeigten behandelte RA-F+eTreg und RA-F-eTreg im Gegensatz zu den unbehandelten Kulturen keinen signifikanten Unterschied mehr in der MFI von CCR4.

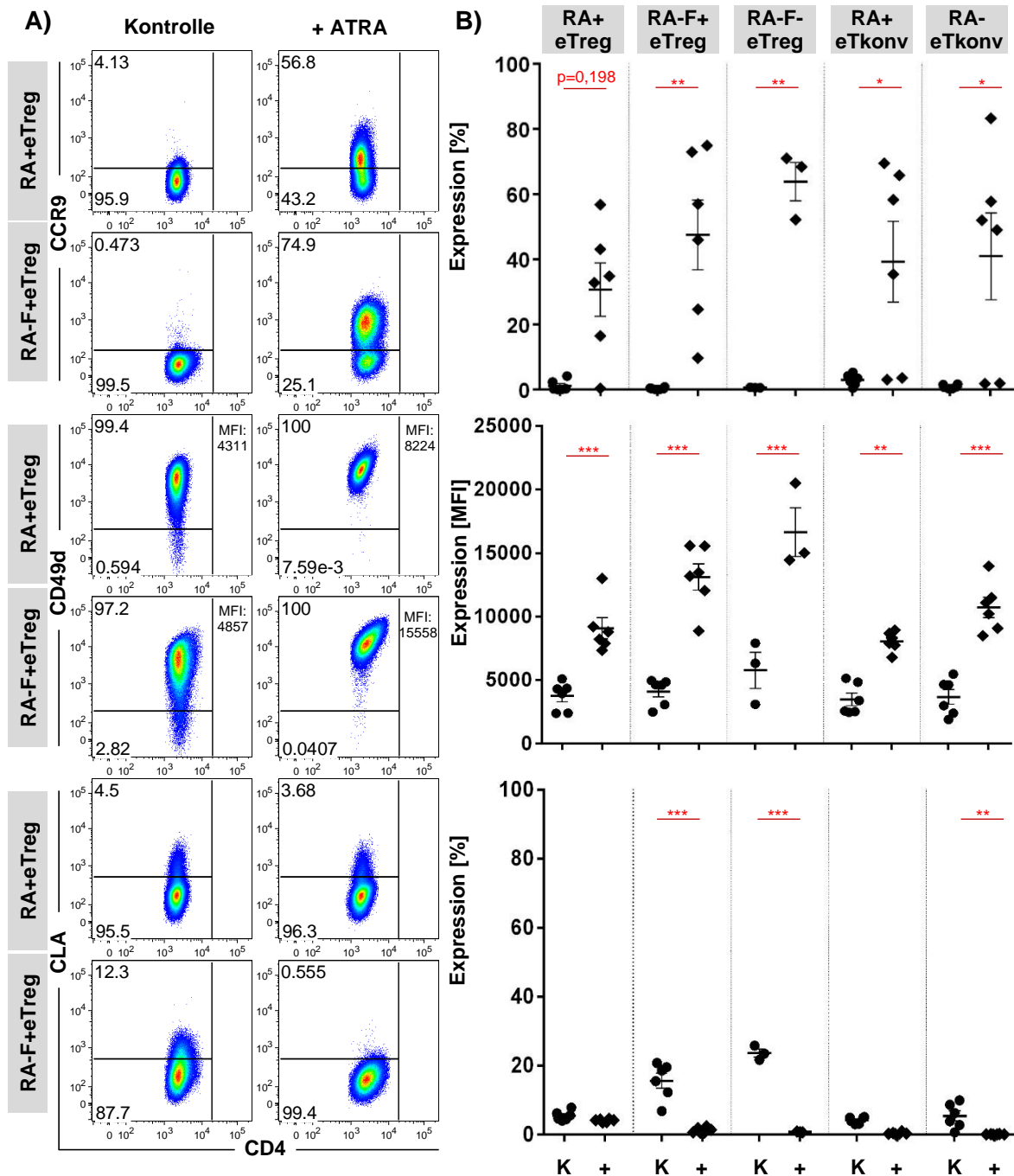


Abb. 9: Homingrezeptorprofil CD4⁺T-Zellen nach Expansion mit ATRA

MNCs wurden aus Leukapheresaten mittels DGZ isoliert, in vier CD4⁺T-Zellpopulationen (RA+/RA-Treg/Tkonv) mittels FACS sortiert (siehe Abb.3) und *in vitro* für 12 bis 15d unter dem Zusatz von 100nM ATRA (siehe 3.2.5.1) neben unbehandelten Kontrollen kultiviert. (Auswertung der FACS Analyse siehe Abb.4) **(A)** Repräsentative Plots zeigen die Homingrezeptorexpression auf expandierten Treg („RA+eTreg“, „RA-F+eTreg“) aus unbehandelten („Kontrolle“) sowie aus mit ATRA versehenen Kulturen („+ATRA“). **(B)** Prozentualer Anteil rezeptorpositiver Zellen bzw. für CD49d die MFI aller Subpopulationen nach Kultivierung mit („+“) oder ohne („K“) ATRA (MW ± SEM; n=3-6 Leukapheresate unterschiedlicher Donoren). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA two-way Test mit post-hoc Testung nach Tukey (***) = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$).

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem induzierten CCR9 um funktionelle Rezeptoren handelte, wurden unter Einfluss von ATRA expandierte RA+eTreg sowie eine entsprechende, unbehandelte Kontrollgruppe im Rahmen eines Migrationsassays dem Chemokin CCL25 als Ligand für CCR9 ausgesetzt und ihr Migrationsverhalten untersucht. Hierfür wurden 5×10^5 Zellen, die mit oder ohne ATRA-Zusatz wie unter 3.2.5.1 in Material und Methoden beschrieben 12 bis 15 Tage polyklonal expandiert worden waren, in Transwellplatten durch eine zellpermeable Membran von CCL25 getrennt. Neben einer Chemokin-freien Kontrolle wurden drei verschiedene Konzentrationen eingesetzt (1ng, 10ng, 100ng). Nach 5h wurden die transmigrierten Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil migrierter Zellen an der initial eingesetzten Zellmenge bestimmt. Es zeigte sich eine deutlich stärkere Migration zum bereit gestellten Chemokin von den Zellen, die unter ATRA kultiviert worden waren, als von herkömmlich expandierten. Diese Reaktion korrelierte mit der Konzentration des Chemokins.

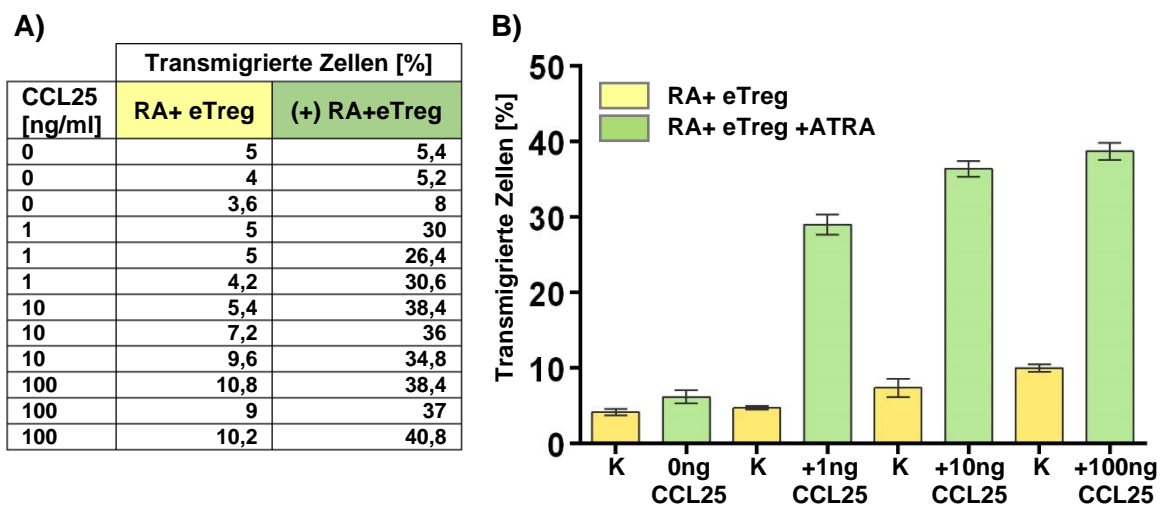


Abb. 10: Migrationsassay mit RA+Treg nach Expansion unter ATRA-Zusatz

MNCs wurden aus Leukapheresaten mittels DGZ isoliert, RA+Treg mittels FACS sortiert (Abb.3) und *in vitro* für 12 bis 15 Tage unter dem Zusatz von 100nM ATRA (siehe 3.2.5.1) neben unbehandelten Kontrollen kultiviert. 5×10^5 Ausgangszellen wurden in einem Migrationsassay wie unter 3.2.5.3 beschrieben in jeweils drei Ansätzen mit verschiedenen Konzentrationen von CCL25 konfrontiert. **(A)** zeigt den prozentualen Anteil der transmigrierten, herkömmlich („RA+eTreg“) oder unter ATRA expandierten (+)RA+eTreg Zellen an den eingesetzten 5×10^5 Ausgangszellen. **(B)** zeigt eine Zusammenfassung der Daten eines Migrationsassays aus einer Kultur mit jeweils drei Ansätzen pro getesteter CCL25 Konzentration (MW \pm SEM; n=3).

4.2.4.2 Stabilisierung und Steigerung der FOXP3 Expression bei Kultivierung mit ATRA

Da bereits in der Literatur mehrfach ein Einfluss von ATRA auf die Expression von FOXP3 beschrieben wurde, wurden die einzelnen Subpopulationen aus der mit ATRA behandelten Reihe mit der unbehandelten Kontrolle hinsichtlich ihrer FOXP3 Expression verglichen. Tendenziell bildete sich unter den RA-Treg in der mit ATRA versehenen Reihe eine weniger deutlich ausgeprägte FOXP3-negative Population aus als unter den unbehandelten Zellen. Unter den konventionellen CD4⁺T-Zellen wurde durch den Zusatz von ATRA die FOXP3 Expression tendenziell gesteigert.

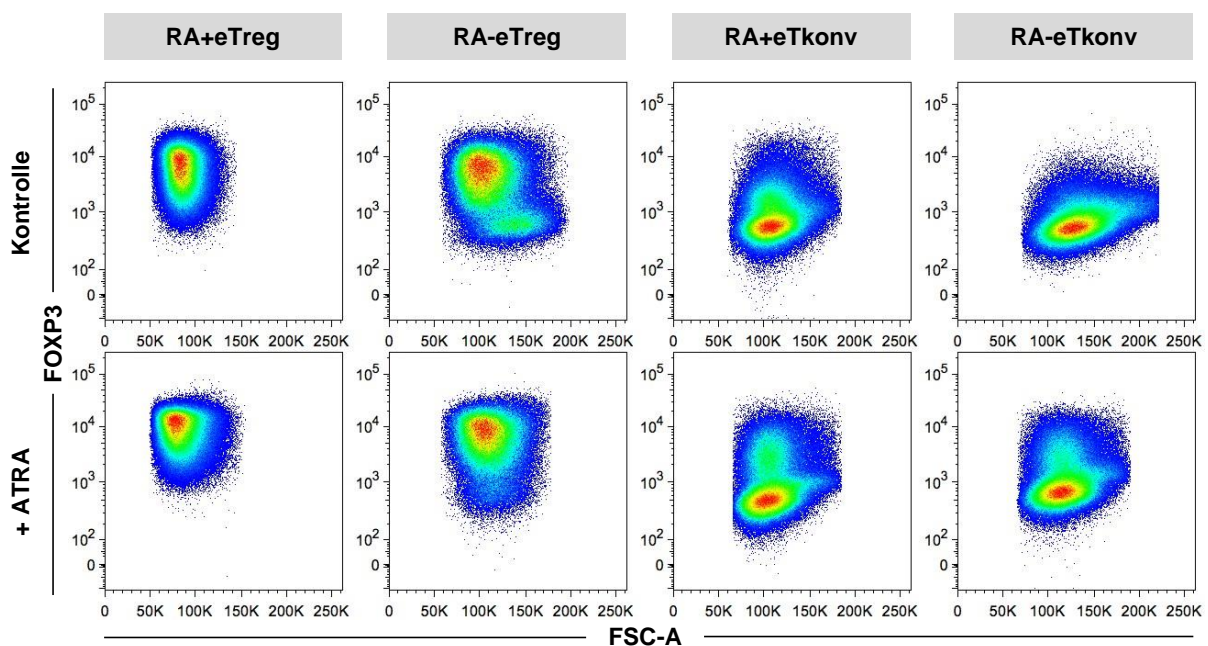


Abb. 11: FOXP3 Expression bei polyklonaler Expansion CD4⁺T-Zellen mit ATRA

MNCs wurden aus Leukapheresaten mittels DGZ isoliert, in vier CD4⁺T-Zellpopulationen (RA+/RA-Treg/Tkonv) mittels FACS sortiert (Abb.3) und *in vitro* für 12 bis 15 Tage unter dem Zusatz von 100nM ATRA („+ATRA“) neben unbehandelten Kontrollen kultiviert („Kontrolle“) wie unter 3.2.5.1 beschrieben. Die Auswertung der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse erfolgte mit der in Abb.4 gezeigten Strategie. Die Tendenz zur höheren FOXP3 Expression in den behandelten Kulturen wird anhand repräsentativer Plots gezeigt und wurde bei den anderen Kulturen (n=3) ähnlich beobachtet.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Expression von CCR9 und CD49d unter dem Einfluss von ATRA unter allen untersuchten Populationen zunahm. RA-Subgruppen der Treg und Tkonv exprimierten nach Kultivierung unter Zusatz von ATRA signifikant weniger CLA als nach Expansion unter herkömmlichen Bedingungen. Weiterhin entwickelten sich unter den RA-Treg in der behandelten Kultur tendenziell

weniger FOXP3-negative Zellen. Konventionelle CD4⁺T-Zellen zeigten bei Kultivierung mit dem Agens tendenziell eine Steigerung ihrer FOXP3 Expression.

4.3 Homingrezeptorprofil von CD4⁺T-Zellen nach allogener *in vitro* Stimulation

Bei Applikation regulatorischer T-Zellen zur Therapie einer GVHD, werden diese im Rahmen einer allogenen Immunreaktion *in vivo* reaktiviert. Um diese Situation *in vitro* zu simulieren wurde eine gemischte Leukozyten-Reaktion (*mixed leucocyte reaction*, MLR) durchgeführt, bei der CD4⁺T-Zellen eines Probanden von antigenpräsentierenden Zellen eines zufällig ausgewählten Spender allogenen stimuliert wurden. Dadurch konnte das Homingrezeptorprofil der regulatorischen T-Zellen - und vergleichend der Tkonv - in dieser immunologischen Situation analysiert werden.

Um spezifisch Aussagen über die Zellen treffen zu können, die durch den allogenen Stimulus aktiviert werden, wurden proliferierte und nicht-proliferierte Zellen separat untersucht. Das Homingrezeptorprofil konventioneller proliferierter und nicht-proliferierter CD4⁺T-Zellen wurde zum Vergleich herangezogen. Als Responderzellen dienten frische PBMCs gesunder Spender, die mittels MACS CD4-angereichert und wie unter 3.2.3.3 in Material und Methoden beschrieben mit dem fluoreszierenden Proliferationsfarbstoff CFSE markiert wurden. Für die allogene Stimulation wurden je 100 000 dieser Zellen mit 200 000 antigenpräsentierenden Zellen kokultiviert. Diese APCs entstammten kryokonservierten PBMCs und wurden zuvor zur Abreicherung von NK- und T-Zellen CD2-depletiert und anschließend mit 30 Gy bestrahlt, um ihre eigene Proliferation zu vermeiden. Eine durchflusszytometrische Analyse erfolgte an d0, d4 und d5. Eine Auswertung der Messung an Tag 0 erfolgte nach der oben unter Abb. 1 gezeigten Gatingstrategie, die an Tag 4 und 5 analysierten Zellen wurden mit unten gezeigter Methode ausgewertet (Abb. 12). Hierbei wurde unter Ausschluss der toten Zellen, der Doubletten sowie der CD19 und CD14 exprimierenden APCs, B-Lymphozyten und Monozyten letztendlich die CD4⁺ Gesamtpopulation („CD4⁺“) ermittelt. Unter der CD4⁺ Population konnten die Zellen identifiziert werden, die mindestens drei Teilungen durchlaufen hatten, da die stufenweise abnehmende CFSE-Expression der Zellen die einzelnen Teilungszyklen visualisierte. Alle Zellen mit mindestens drei Teilungen wurden mit einem Gate zusammengefasst und als „proliferiert“ bezeichnet. Die CFSE-positiven Zellen, die ihren CFSE-Gehalt nicht reduziert hatten, wurden ebenfalls im Gating separiert und als „nicht-proliferiert“ bezeichnet. Somit ergaben sich anhand der CFSE-Expression zwei verschiedene

Gruppen, die wiederum anhand der Expression des Treg spezifischen Markers FOXP3 jeweils in regulatorische („Treg“) und konventionelle T-Zellen („Tkonv“) differenziert wurden. Die resultierenden vier Subpopulationen wurden mit den in grau hinterlegten Namen bezeichnet. Die Gates zur Analyse der Homingrezeptoren wurden an der CD4⁺ Gesamtpopulation („CD4⁺“) ausgerichtet und jeweils auf diese vier Subpopulationen übertragen.

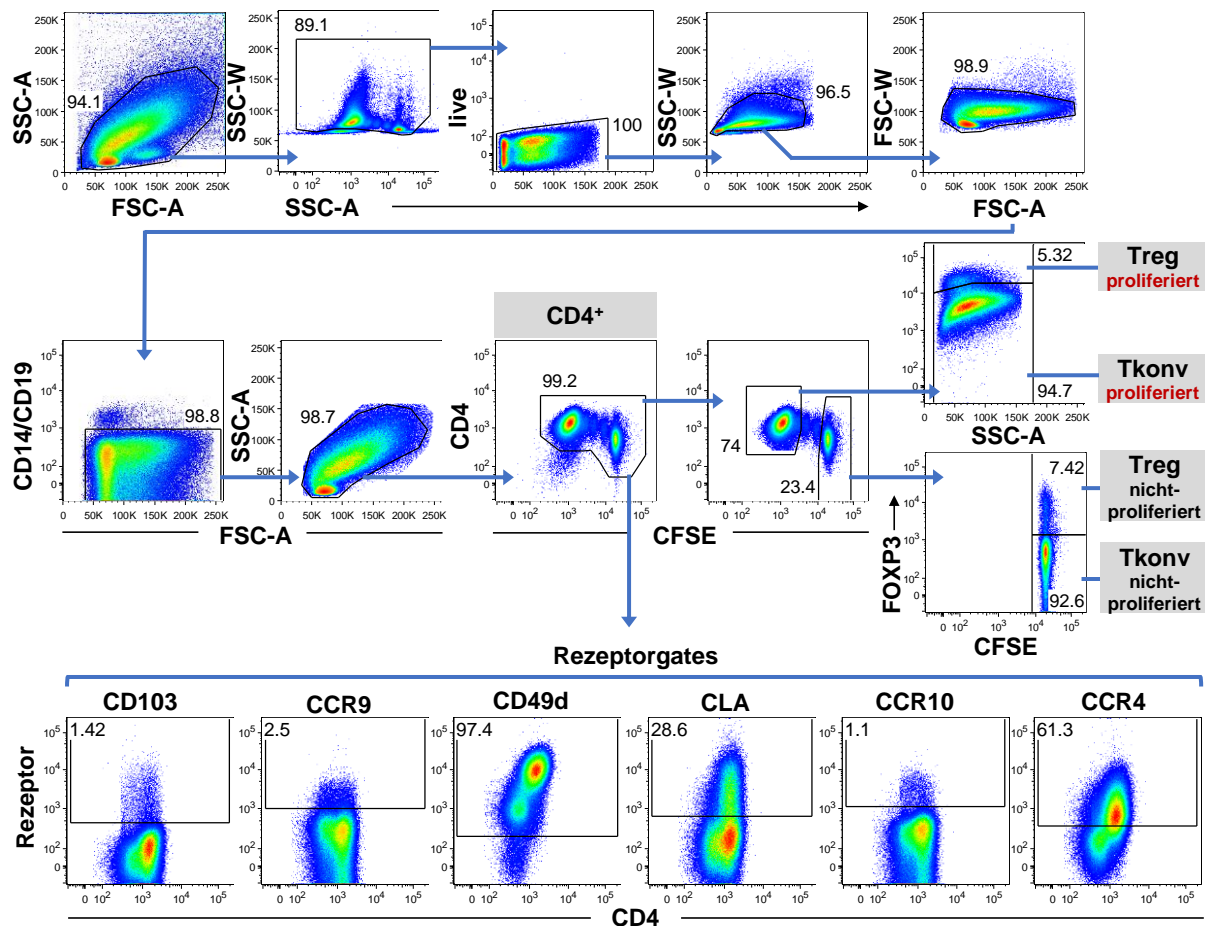


Abb. 12: Gatingstrategie der FACS-basierten Analyse des Homingrezeptorprofils CD4⁺T-Zellen nach allogener in vitro Stimulation

CD4⁺T-Zellen aus frisch isolierten PBMCs gesunder Spender wurden mit dem Proliferationsfarbstoff CFSE markiert und je 100 000 dieser Zellen zur allogenen Stimulation mit 200 000 bestrahlten (30 Gy), CD2-depletierten Zellen aus kryokonservierten PBMCs kokultiviert. Eine durchflusszytometrische Analyse erfolgte an d0, d4 und d5. Dargestellt ist die an d4 und d5 angewandte Gatingstrategie, wobei mit blauen Pfeilen der Fortgang des Gatingpfades verdeutlicht ist. Es handelt sich um repräsentative Plots einer Messung von Tag 5 aus n=3 MLRs, die alle auf gleiche Weise untersucht wurden

Um den Einfluss der allogenen Stimulation auf die Homingrezeptorexpression regulatorischer T-Zellen zu detektieren, wurden die prozentualen Anteile rezeptorpositiver Zellen unter den proliferierten und den nicht proliferierten Zellen an d5 ermittelt. Bei dem Darm-spezifischen Rezeptor CD103 war die Expression unter den nicht-proliferierten Zellen mit $0,9\pm 0,29\%$ und den proliferierten mit $1,10\pm 0,48\%$ insgesamt sehr gering; ebenso zeigten bei CCR9 sowohl die nicht-proliferierten mit $1,82\pm 0,90\%$ als auch die proliferierten mit $2\pm 0,77\%$ eine sehr geringe Expression, die sich bei beiden Rezeptoren zwischen den proliferierten und nicht-proliferierten Zellgruppen nicht unterschied. CD49d dagegen wurde von den proliferierten Treg mit $99,80\pm 0,17\%$ signifikant höher exprimiert als von den nicht-proliferierten ($91,67\pm 0,31\%$). Auch bei CLA und CCR4 von den Haut-spezifischen Rezeptoren war der prozentuale Anteil rezeptorpositiver Zellen unter den proliferierten Zellen mit $42,50\pm 1,14\%$ bei CLA und $78,07\pm 6,49\%$ bei CCR4 signifikant höher als unter den nicht-proliferierten (CLA: $17,49\pm 6,48\%$, CCR4: $32,57\pm 8,37\%$). Eine Expression von CCR10 war bei beiden Gruppen mit $3,88\pm 2,02\%$ unter den nicht-proliferierten und $4,50\pm 1,82\%$ unter den Proliferierten nur sehr gering und ohne signifikanten Unterschied zwischen den Populationen. Die konventionellen CD4⁺T-Zellen zeigten bei allen Rezeptoren und Subpopulationen die gleiche Tendenz. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den proliferierten Subgruppen der Treg und der Tkonv ausgemacht werden.

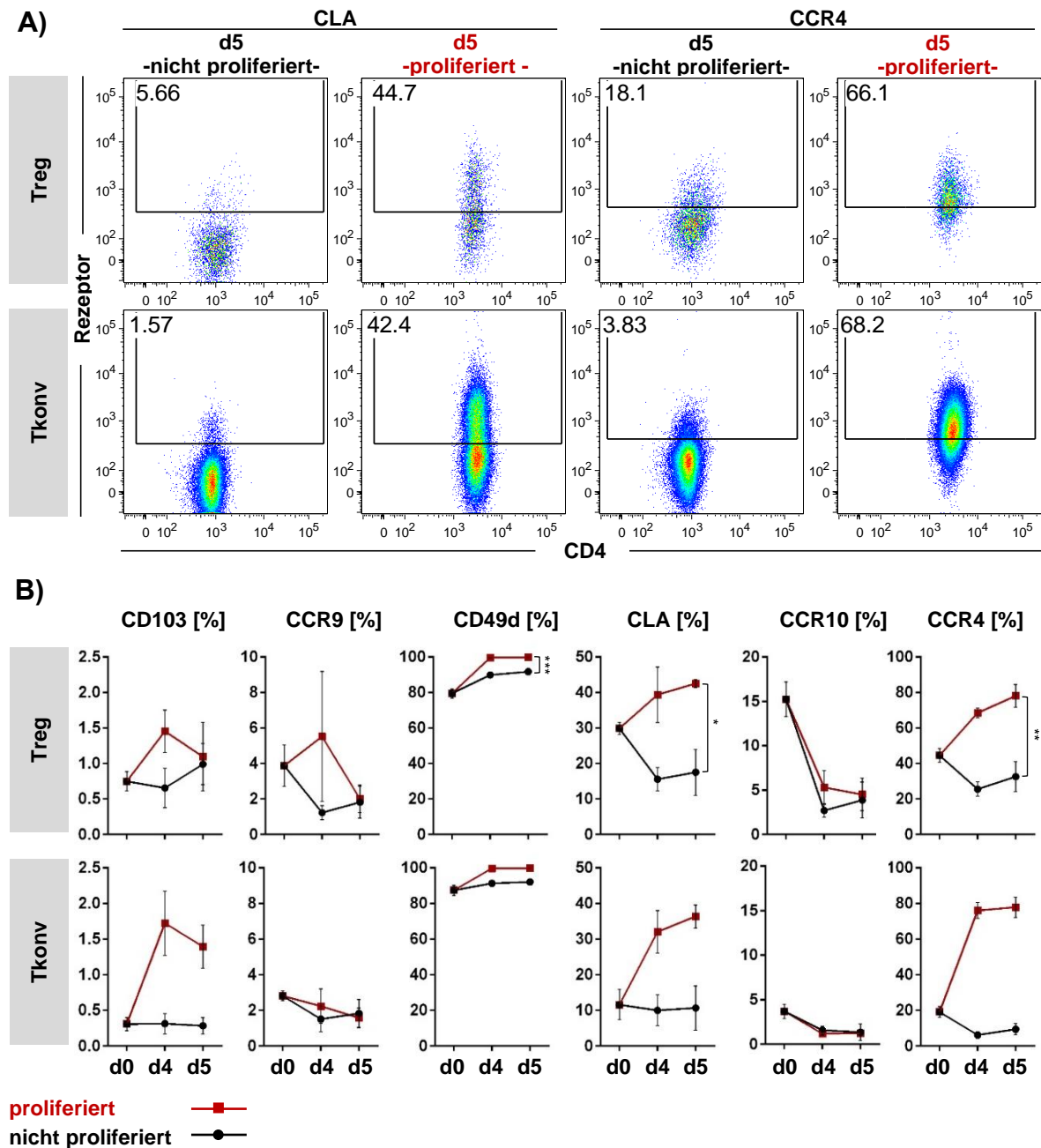


Abb. 13: Homingrezeptorprofil CD4⁺T-Zellen nach allogener *in vitro* Stimulation

Zur Durchführung einer MLR wurden CD4⁺T-Zellen aus frisch isolierten PBMCs durchflusszytometrisch analysiert (Auswertung „d0“ siehe Abb. 1), mit CFSE markiert und je 100 000 dieser Zellen zur allogenen Stimulation mit 200 000 bestrahlten (30 Gy), CD2-depletierten Zellen aus kryokonservierten PBMCs kokultiviert. Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen an d4/d5 siehe Abb. 12, wobei anhand der CFSE Expression eine Unterteilung in „proliferierte“ (rot) und „nicht proliferierte“ Zellen (schwarz) erfolgte. (A) Repräsentative Plots stellen die Expression von CLA und CCR4 an d5 auf Treg/Tkonv, die auf allogenen Stimulus „proliferiert“ sind, den im gleichen Setting „nicht-proliferierten“ gegenüber. (B) Prozentualer Anteil rezeptorpositiver Treg/Tkonv der „proliferierten“ (rote Linie) und „nicht-proliferierten“ (schwarze Linie) Gruppe an d0, d4 und d5 (MW ± SEM; n=3). Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA one-way Test mit post-hoc Testung nach Tukey. (**= p < 0,001, **= p < 0,01, *= p < 0,05).

Zusammenfassend wurde hauptsächlich gezeigt, dass regulatorische und konventionelle CD4⁺T-Zellen, die durch einen allogenen Stimulus über fünf Tage zur Proliferation angeregt worden waren, CLA und CCR4 signifikant höher exprimierten, als Zellen, die anerg auf den allogenen Stimulus reagierten. Zwischen proliferierten Treg und proliferierten Tkonv konnte kein Unterschied in der Höhe der Expression festgestellt werden.

5 Diskussion

Die HSZT ist eine potenziell kurative Therapie von zahlreichen benignen und malignen Erkrankungen des Blutes. Das erkrankte hämatopoetische System eines Patienten wird durch myeloablative Bestrahlung und/oder Chemotherapie eradiziert und durch Stammzellen eines gesunden Spenders ersetzt. Im Rahmen einer allogenen Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen kann es allerdings zu einer schweren Komplikation, der sogenannten GVHD kommen, die wesentlich zu der hohen Morbidität und Mortalität der allogenen HSZT beiträgt und ihren Einsatz limitiert. Reife T-Zellen des Spenders erkennen dabei das Gewebe des Empfängers als fremd, werden aktiviert und eine allogene Immunreaktion führt zu schweren Gewebeschäden. Während im Körper des Empfängers aus den Stammzellen herangewachsene T-Zellen bei ihrer Reifung im Thymus durch Positiv- und Negativselektion tolerant gegenüber den Empfängerantigenen werden, können im Spender gereifte T-Zellen auf allogene Antigene reagieren. Eine prophylaktische Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat erwies sich als ein weitgehend ungeeigneter Ansatz, da die Inzidenz der GVHD zwar vermindert wurde, allerdings vermehrt Rezidive der Grunderkrankung auftraten, wenn die HSZT wegen einer malignen Erkrankung durchgeführt worden war. Dies ist durch den sogenannten Graft-versus-Hämatopoese Effekt zu erklären, durch den von Spender-T-Zellen im Körper verbliebene maligne hämatopoetische Zellen eradiziert werden. Weiterhin vermitteln die kotransplantierten T-Zellen einen gewissen immunologischen Schutz in der Frühphase nach Transplantation, so dass die Reaktivierungsrate für Viren wie EBV und CMV vermindert wird. Unter den CD4⁺T-Zellen wurde eine anerge und gleichzeitig suppressive Gruppe entdeckt, die *in vitro* allogene aktivierte Tkonv-Zellen regulieren konnte. In Mausmodellen wurde daraufhin untersucht, ob diese Zellpopulation auch zur Verhinderung der GVHD *in vivo* eingesetzt werden kann. M. Edinger und P.

Hoffmann gelang im Mausmodell der Nachweis einer suppressiven Wirkung regulatorischer Spender-T-Zellen bei GVHD: Wurden Treg und GVHD-auslösende Tkonv in gleicher Menge kotransplantiert, waren die Tiere trotz MHC-differentem Setting langfristig vor einer letalen GVHD geschützt [145]. Sie konnten auch nachweisen, dass es dabei nicht zu einer Inaktivierung der alloreaktiven T-Zellen kam und diese trotz Suppression die gewünschte Graft-versus-Leukämie-Reaktion leisten konnten [147]. Den protektiven Effekt zeigten nur natürliche und nicht induzierte Treg, sofern sie in der Lage waren nach adoptivem Transfer in SLOs zu migrieren [93, 159]. In einigen wenigen Studien wurde auch eine therapeutische Applikation von Treg bei bereits bestehender akuter oder chronischer GVHD untersucht. Bei dieser Anwendung ist die Reinheit der transplantierten Treg von besonderer Bedeutung, denn eine Kontamination mit konventionellen T-Zellen würde die potenziell lebensbedrohliche GVHD aggravieren. Auf Grund des geringen Vorkommens der Treg im humanen peripheren Blut ist eine Expansion vor Transfer notwendig. Um ein reines Zellprodukt in ausreichender Größe zu erhalten, wurde von unserer Arbeitsgruppe ein Expansionsprotokoll entwickelt, das neben der Identifikation der geeigneten Ausgangszellen auch Stimulationsbedingungen etablierte, die in einem klinischen Rahmen unter GMP Bedingungen anwendbar sind [62, 239]. Dabei werden die Ausgangszellen aus Leukapheresaten gewonnen, wodurch dem Spender zielgerichtet weiße Blutkörperchen entnommen werden können.

5.1 Homingrezeptorprofile *ex vivo* isolierter CD4⁺T-Zellen

In dieser Arbeit wurde nun das Homingrezeptorprofil der im Rahmen einer GVHD eingesetzten Treg vor ihrer Expansion näher analysiert, um die Zellen einerseits genauer zu charakterisieren und andererseits Veränderungen während der Expansion detektieren zu können. Antigenerfahrene RA-Treg sowie beide Phänotypen der konventionellen CD4⁺T-Zellen wurden vergleichend analysiert. Es wurde vielfach beschrieben, dass die Wirkung von Treg im Rahmen der GVHD sowohl bei prophylaktischem als auch bei therapeutischem Einsatz von ihrem Migrationsverhalten nach Applikation abhängt. Die Zusammensetzung des Homingrezeptorprofils einer Zelle liefert wesentliche Hinweise zu ihrem Migrationsverhalten, da inzwischen zahlreiche Rezeptoren mit einer Migration in verschiedene Organe und Gewebe assoziiert werden konnten. Nachdem bereits Studien zur Expression von lymphatischen Homingrezeptoren durchgeführt wurden [62], wurden hier

Homingrezeptoren für die GVHD-Zielorgane Haut und Darm untersucht. Während CD103, CCR9 und CD49d ($\alpha 4$) vorrangig mit einer Migration in intestinales Gewebe assoziiert sind, vermitteln CLA, CCR10 und CCR4 eine Migration in die Haut.

Ex vivo isolierte MNCs aus Leukapheresaten gesunder Spender wurden intranukleär für den Transkriptionsfaktor FOXP3 angefärbt, sowie auf ihrer Oberfläche für CD4, CD45RA und verschiedene Homingrezeptoren. Anhand von CD45RA und FOXP3 wurden CD4⁺T-Zellen in die vier Subpopulationen RA⁺/RA-Treg und RA⁺/RA-Tkonv differenziert und ihr Homingrezeptorprofil analysiert. FOXP3 eignet sich als zelllinienspezifischer Transkriptionsfaktor von Treg zu einer Abgrenzung von CD4⁺ konventionellen T-Zellen. Eine Expression des Proteins wurde zwar auch in aktivierten Tkonv beobachtet, ohne der Zelle regulatorische Eigenschaften zu verleihen [240], allerdings blieben dann epigenetische Modifikationen aus, die eine konstitutive FOXP3 Expression gewährleisten würden, weshalb die Expression niedriger und nur transient war [54]. CD45RA wird zur Differenzierung zwischen naiven und antigenerfahrenen Treg eingesetzt, da T-Zellen durch alternatives Splicing der Exons 4, 5, und 6 je nach Aktivierungsstatus verschiedene Isoformen des CD45 Moleküls generieren. Naive T-Zellen exprimieren die das Exon A enthaltende, hochmolekulare Isoform von CD45 und ersetzen sie bei Aktivierung durch die kleine Isoform CD45RO. In dieser Arbeit wurden durch ein stringentes Gating nach durchflusszytometrischer Analyse nur Zellen mit einer hohen CD45RA Expression als CD45RA⁺ Zellen bezeichnet, da nur diese Zellen zu über 96% CCR7 und CD62L koexprimieren [62] und naiv sind. Durch dieses Gating werden auch Zellen aus dem naiven Kompartiment ausgeschlossen, die kürzlich aktiviert wurden, deren Isotypenwechsel aber noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Da sich dieser über 3 Tage erstrecken kann, exprimieren kürzlich aktivierte T-Zellen noch zu einem geringen Anteil CD45RA. Für eine möglichst reine Differenzierung zwischen naiven und antigenerfahrenen Populationen wurden Zellen mittlerer CD45RA Expression ausgeschlossen. Im humanen T-Zell Kompartiment ist eine Reexpression von CD45RA *in vivo* und *in vitro* nach Antigenkontakt prinzipiell möglich, weshalb der Marker CD45RA auf T-Zellen möglicherweise nicht absolut spezifisch für einen naiven Phänotyp ist. Ob diese reexprimierenden T-Zellen Homingmoleküle für SLOs, wie beispielsweise CCR7 oder CD62L tragen, ist umstritten [241]. Bluestone et al. fanden Hinweise, dass RA⁺Treg, die *in vitro* expandiert worden waren, nach Transfer von einem RA⁻ Phänotypen zu RA⁺ zurück wechselten und

dabei CCR7 exprimierten [242]. Da diese Zellen ihren RA- Phänotypen *in vitro* erlangten statt durch eine antigenspezifische Aktivierung *in vivo* und ferner nicht bekannt ist, mit welcher Frequenz dieses Phänomen auftritt, wird CD45RA dennoch unter Anwendung der beschriebenen Gatingstrategie zur Differenzierung zwischen naiven und antigenerfahrenen CD4⁺T-Zellen herangezogen.

Die Untersuchung von neun Leukapheresaten gesunder Spender ergab zusammenfassend, dass *ex vivo* isolierte RA+Treg zu einem geringen Anteil CCR9 und CCR4 exprimierten und in hohem Maße CD49d. RA-Treg sind mit einem umfangreicheren Homingrezeptorprofil ausgestattet. Wie auch RA+Treg exprimieren sie nur wenig CCR9 und viel CD49d. Zusätzlich tragen sie aber die Hautomingrezeptoren CLA, CCR10 und insbesondere CCR4 in hohem Maße. Tkonv ähneln den Treg in ihrem Homingrezeptorprofil grundsätzlich, ein deutlicher Unterschied zeigt sich aber bei CCR4: dies kam auf RA+Tkonv im Gegensatz zu RA+Treg nicht vor.

Bei Betrachtung der RA+Treg-Population zeigt sich, dass die Expression der Homingrezeptoren CCR9, CD49d und CCR4, sowie ein Fehlen von CLA mit Studien an Zellen aus humanem, adultem peripherem Blut vereinbar ist. Ebenso ist übereinstimmend beschrieben, dass RA+Tkonv von den analysierten Homingrezeptoren nur CCR9 und CD49d exprimieren, während im Gegensatz zu RA+Treg keine Expression von CCR4 vorliegt [71]. Der Trend einer unterschiedlichen Expression von CCR4 auf RA+Treg und RA+Tkonv wird auch durch tierexperimentelle Daten von murinen T-Zellen aus peripheren LK bestätigt, die CD62L zur Differenzierung zwischen naiven und antigenerfahrenen Phänotypen heranzogen. Sie zeigen, dass CD62L⁺Treg (naiv) signifikant mehr CCR4 exprimieren als die entsprechende FOXP3-negative Population, wobei dieser Unterschied in MLN nicht vorliegt. Die fehlende Expression des Haut-Homingrezeptors CCR10 unter den RA+Treg und RA+Tkonv wurde bereits für murine CD62L⁺ Zellen aus MLN beschrieben. Man weiß jedoch auch, dass CD62L⁺Treg aus peripheren LK CCR10 durchaus in nachweisbarem und FOXP-negative T-Zellen übersteigendem Maße exprimieren [200]. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, dass in der vorliegenden Arbeit die analysierten Zellen aber nicht aus LK, sondern aus Leukapheresaten des peripheren Blutes isoliert worden waren. Es ist erwiesen, dass das immunologische Umfeld die Expression von Homingrezeptoren beeinflussen

kann. Daten aus dem Humanbereich, die auf Treg generell keine CCR9 Expression zeigen, konnten nicht bestätigt werden [243], was unter anderem auf eine in dieser Studie stark abweichende Methode zur Treg-Identifikation zurückzuführen ist.

Bei Betrachtung der RA-Treg-Population zeigt sich, dass diese Zellen mit einem heterogenen und umfangreicheren Homingrezeptorprofil ausgestattet sind als naive Treg und ein Vergleich der Phänotypen innerhalb der Treg ergab für die RA-Population eine höhere Expression von CD103 und der Haut-Homingrezeptoren CLA, CCR10 und CCR4. Dieser Unterschied deckt sich mit bereits bestehenden Analysen dieser Rezeptoren auf Treg [61, 194, 244] und ist vermutlich Folge ihres Primings *in vivo* vor Isolation. Wie unter 1.2.2 in der Einleitung beschrieben, kann mit CD45RA zwischen T-Zellen vor und nach vollständiger TCR-Aktivierung differenziert werden [59], wobei diese Abgrenzung im murinen Organismus mit CD62L vorgenommen werden kann [245]. Die in dieser Arbeit gezeigte Verteilung der Rezeptoren auf den verschiedenen phänotypischen Subgruppen der Treg steht in Einklang mit bereits bestehendem Wissen über das Migrationsverhalten dieser Zellen: Naive Treg-Zellen halten sich vorrangig in SLOs auf, rezirkulieren durch Lymphe und Blut und tragen die charakteristischen Oberflächenmoleküle, die ihnen dieses Homingverhalten ermöglichen, wie beispielsweise CD62L oder CCR7. Als Reaktion auf eine Antigenstimulation ändert eine regulatorische T-Zelle die Transkription zahlreicher Gene, wodurch sie unter anderem Zytokine produziert, proliferiert und insbesondere durch einen Wechsel der Homingrezeptoren ein neues Migrationsverhalten erwirbt. Eine aktivierte Treg-Zelle durchläuft dabei einen Wechsel von den Homingrezeptoren, die sie in SLOs leiten, zu Oberflächenmolekülen, die eine Migration in periphere Gewebe ermöglichen, um dort zu einer effektiven Suppression beitragen zu können. Diese Fähigkeit ist für den Erhalt einer immunologischen Selbsttoleranz entscheidend, wie man beispielsweise bei Versuchen mit CCR4 zeigen konnte. Schaltet man im murinen Organismus diesen Rezeptor auf Treg aus, können sie zwar in SLOs eine Immunhomöostase aufrechterhalten, in Haut und Lunge dagegen kommt es zu schweren Autoimmunentzündungen [196]. Studien zeigen auf humanen Treg bei Aktivierung einen Verlust der Expression der LK-Homingrezeptoren CCR7 und CXCR4 und die Expression eines heterogenen Musters aus verschiedensten Homingrezeptoren für periphere Gewebe [61, 200]. Auch die Tendenz zu einer stärkeren Expression von Haut-Homingmolekülen auf aktivierten Treg ist bereits

bekannt [192] und ermöglicht ihnen die Sicherung der Immunhomöostase an äußeren Körperoberflächen. Der Rezeptor CCR9 wurde dagegen von beiden phänotypischen Subgruppen gleichermaßen exprimiert. Dieser Rezeptor ist vor allem an der Migration in den proximalen Gastrointestinaltrakt beteiligt und seine Expression wäre somit präferentiell auf der antigenerfahrenen RA- Population zu erwarten. In Nabelschnurblut konnte allerdings bereits auf RA+Treg eine höhere Expression als auf RA- Zellen nachgewiesen werden [71] und *in vitro* wird CCR9 auf murinen Treg nach mehreren Teilungen herunterreguliert [70].

Im Gegensatz zu den Hauthomingmolekülen wird CD49d ($\alpha 4$) von RA+Treg stärker exprimiert als von antigenerfahrenen Treg, was indirekt eine Studie an humanen Zellen bestätigt, die bei Untersuchung des Heterodimers $\alpha 4\beta 7$ das gleiche Ergebnis erzielt [71]. In den MLN der Maus dagegen zeigt sich eine höhere $\alpha 4\beta 7$ Expression unter den CD62L⁻Treg, was vermutlich auf den direkten Einfluss durch lokale dendritische Zellen zurückzuführen ist [228], die beispielsweise durch ATRA diesen Rezeptor induzieren können. In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch die Differenzierung in CD45RA⁺ und CD45RA⁻ Subgruppen gezeigt werden, dass sich unter Treg und Tkonv nach Antigenkontakt neben einer CD49d⁺ auch eine klar abgrenzbare CD49d-negative Population ausbildete, an der folglich im Gating die Grenze für eine effektive CD49d-Expression ausgerichtet wurde. RA+ Zellen lagen zum Großteil deutlich über dieser Grenze, in der Höhe ihrer Expression aber niedriger als die RA-CD49d⁺ Population. Da unter RA+ T-Zellen keine CD49d-negative Population ausgebildet wurde, war trotz ihres geringeren Expressionslevels der prozentuale Anteil rezeptorpositiver Zellen größer als in der antigenerfahrenen Subgruppe. Diese Beobachtungen werfen die Frage nach der Ausbildung verschiedener Subgruppen nach Antigenkontakt auf: Man weiß aus zahlreichen Studien, dass sich naive CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen nach Antigenkontakt sowohl in Effektor- als auch in Gedächtniszellen differenzieren können. Diese Zellen reagieren bei Reinfektion rascher und stärker als bei einer Primärantwort und teilen sich in verschiedene Subgruppen mit spezifischem Migrationsverhalten auf. Sie persistieren als zentrale Gedächtniszellen in SLOs, pendeln zwischen peripherem Gewebe und SLOs als zirkulierende Effektorgedächtniszellen oder verweilen am Ort einer abgelaufenen Entzündung als gewebeständige Gedächtniszellen. Außerdem besitzen diese Zellen eine längere Lebensdauer als Effektor-T-Zellen. Auch wenn sich der Nachweis einer langlebigen Gedächtniszellpopulation der Treg unter anderem

mangels eines passenden Markers schwierig gestaltete, wurde ihre Existenz inzwischen von zahlreichen Studien belegt [246]. In einem Mausmodell mit akuter Lungenentzündung durch Influenzaviren wurde zum Beispiel die Persistenz einer kleinen, virusspezifischen CD62L^{low} Treg-Population über 50 Tage nach primärem Krankheitsausbruch nachgewiesen. Bei einer gewebespezifischen Reinfektion supprimiert diese Gruppe signifikant die T-Zellantwort und mildert den lokalen Gewebeschaden ab, was auf das Potential von Gedächtnis-Treg zur Migration in periphere Gewebe hindeutet [247]. Auch die Existenz einer gewebeständigen Treg-Gedächtniszellpopulation konnte gezeigt werden [248] und möglicherweise auch die einer in den lymphatischen Organen verweilenden Subpopulation [246]. Die Tatsache, dass antigenerfahrene Treg zu über 50% eine Koexpression der LK-Homingrezeptoren CCR7 und CD62L zeigen [62] unterstützt diese These. Die sich hinsichtlich der CD49d-Expression ausgebildeten Subgruppen unter RA-Treg könnten somit spiegelbildlich zu CD4⁺T-Zellen auf eine Differenzierung in eine zentrale und eine Effektorgedächtnispopulation zurückzuführen sein. Durch eine Analyse von CD62L und CCR7 auf CD49d-negativen RA-Treg oder von CD27 und BCL-2 - deren Expression mit T-Gedächtniszellen assoziiert ist [249] - könnte diese These weiter verfolgt werden. Hierbei ist allerdings auch zu untersuchen, ob zentrale Gedächtnis-Treg nicht möglicherweise in einen RA⁺ Phänotypen zurückwechseln [242]. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte hohe CD49d Expression auf Treg insgesamt steht im Gegensatz zu einer Studie, die eine Negativ-Selektion bezüglich CD49d als Option der Treg Isolierung postuliert [250]. Zwar konnten in der vorliegenden Arbeit prozentual höhere Werte von CD49d unter Tkonv bestätigt werden, allerdings ist der Anteil rezeptorpositiver Zellen unter den Treg in der hiesigen Studie allgemein deutlich größer und die von Kleinwiefeld *et al.* beschriebene fehlende CD49d Expression auf Treg war nicht nachweisbar. Eine Erklärung für die stark abweichenden Werte könnte eine unterschiedliche Gatingstrategie sein, bei der den rezeptorpositiven Zellen der zitierten Studie nur die CD49d⁺ Zellen mit hoher Expression unter den RA-Treg der vorliegenden Arbeit entsprechen. Dieser Ansatz ist als Weg zur Isolation reiner Treg Zellen insgesamt kritisch zu betrachten, da in der zitierten Studie zwischen 20 und 50% der Zellen die Expression des zelllinienspezifischen Markers FOXP3 nach 33 Tagen polyklonaler Expansion verlieren [250]. Bei polyklonaler Stimulation der von

unserer Arbeitsgruppe zur Expansion präferierten CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁺Zellen liegt dieser Anteil der FOXP3-negativen Zellen nach 22 Tagen nur bei circa 6% [62].

Ein Vergleich von Treg und Tkonv ergab tendenziell eine ähnlich geringe Homingrezeptorausstattung der RA⁺ Zellen und eine insgesamt stärkere Expression auf den RA⁻ Zellen der Populationen. Dies könnte auf ein ähnliches Homingverhalten und eine Kolo-kalisation der beiden Subgruppen hinweisen, was immunfluoreszenzmikroskopische Analysen humaner Tonsillen bestätigen [71].

Obwohl sich die Verteilung der Homingrezeptoren zwischen Tkonv und Treg tendenziell ähnelte, zeigten sich Unterschiede in der Höhe der Expression. Alle Hauthomingrezeptoren - CLA, CCR10 und CCR4 - wurden von *ex vivo* isolierten RA-Treg stärker exprimiert als von RA-Tkonv. Für CLA und CCR4 ist dies bereits bekannt [70, 192]. Murine Daten aber, die für CCR10 auf CD62L-Treg und Tkonv in peripheren und MLN eine ähnliche Expression beschreiben, konnten nicht bestätigt werden [200].

Da die Zellen wiederum aus unterschiedlichen Kompartimenten isoliert wurden, ist ein direkter Vergleich der Daten aber nur eingeschränkt möglich. Ein Unterschied zwischen Treg und Tkonv zeigte sich im naiven Kompartiment nur für einen Rezeptor: CCR4 wurde von RA⁺Treg in geringem Maße exprimiert, während er auf RA⁺Tkonv gar nicht nachweisbar war. Auf transkriptioneller Ebene wurde für CCR4 eine Differenz der mRNA Level zwischen CD4⁺CD25⁺Treg und CD4⁺CD25⁻ Zellen bereits gezeigt [251].

Es stellt sich die Frage nach der Ursache für die unterschiedliche Expression von Homingrezeptoren auf Treg und Tkonv. Untersuchungen von Treg und Tkonv gleicher Ag-Spezifität zeigten, dass die Unterschiede im Homingrezeptorprofil wohl nicht auf die suppressive Wirkung der Treg auf die Tkonv zurückzuführen ist [200], sondern dass Treg vermutlich eine intrinsisch höhere Kapazität zur Expression von Homingrezeptoren für periphere Gewebe besitzen. Zwar ist noch unklar, wie der Transkriptionsfaktor FOXP3 nach TCR-Stimulation die Expression der Rezeptoren beeinflusst, aber es konnte gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁺Treg den Transkriptionsfaktor Kruppel-like Faktor 2 (KLF2) nur halb so stark exprimieren wie CD4⁺T-Zellen. Dieser Faktor induziert die Expression von Homingrezeptoren für SLOs und wirkt einer Expression von peripheren Homingrezeptoren, wie beispielsweise CCR4, entgegen. KLF2 wird von FOXO-1 positiv reguliert, das bei Aktivierung des TCR wiederum supprimiert wird [74]. Da Treg viel geringere Mengen KLF2 exprimieren, lässt dessen hemmender Einfluss auf die Expression peripherer

Rezeptoren vermutlich schneller nach und es liegt nahe, dass Treg bei TCR-Stimulation stärker mit einer Expression der peripheren Rezeptoren reagieren als Tkonv [251]. Die Konsequenz dieser Verteilung zeigen beispielsweise murine Modelle, in denen nach Antigenstimulation eine signifikant stärkere Migration von Treg als von Tkonv in nicht-lymphatische Gewebe gezeigt wurde [200]. *In vitro* ist eine stärkere Reaktion von Treg auf CCR4 Liganden beschrieben als von Tkonv [192]. Da reife, dendritische Zellen die CCR4 Liganden CCL17 und 22 produzieren [198], werden Treg unter allen CD4⁺T-Zellen am stärksten von ihnen angezogen [199], was nach adoptivem Treg-Transfer in der GVHD zu einer ähnlichen Rezirkulation der Treg zwischen entzündetem Gewebe und SLOs beitragen könnte wie im CCR5 Modell [170]. Bei der Konkurrenz von T-Zellen um den Zugang zu APCs in LK [172], haben Treg durch ihre hohe CCR4 Expression unter Umständen einen Wettbewerbsvorteil und können APCs besser supprimieren. Auch aktivierte T-Zellen und Monozyten produzieren CCL22, wodurch eine Rekrutierung von Treg in entzündete Gewebe und eine Kolo-kalisation mit den Zielzellen ihrer Suppression gewährleistet wird. Dieser Mechanismus wäre bei therapeutischer Applikation von Treg in der akuten GVHD ggf. von Bedeutung. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeiten das Homingrezeptorprofil unterschiedlicher Phänotypen frisch isolierter Treg in Abgrenzung zu Tkonv charakterisiert werden, um es anschließend mit dem polyklonal expandierter CD4⁺T-Zellen vergleichen zu können.

5.2 Homingrezeptorprofile von CD4⁺T-Zellen nach polyklonaler Expansion und Vergleich zu *ex vivo* isolierten Zellen

Um für einen adoptiven Transfer von Treg im Rahmen einer GVHD ausreichend Zellen zu erhalten, ist wegen ihres geringen Vorkommens im humanen Blut eine *in vitro* Expansion erforderlich. Dafür werden Treg aus Leukapheresaten nach den Parametern CD4⁺CD25^{high}, CD127^{low}, CD45RA⁺ gesortet. CD45RA⁺Treg behalten bei polyklonaler Expansion ihre funktionellen und phänotypischen Eigenschaften stabil bei und sind die ideale Ausgangspopulation zur Expansion reiner Treg. Dieser Phänotyp wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit vorrangig analysiert und von antigenerfahrenen Treg abgegrenzt. Durch diesen Versuch kann der Effekt einer polyklonalen *in vitro* Stimulation auf das Homingrezeptorprofil sowohl von naiven als auch von bereits *in vivo* aktivierten Zellen untersucht werden. Die verschiedenen Aktivierungswege können so verglichen werden. Da auch bereits *in vivo* aktivierte

Zellen isoliert und *in vitro* polyklonal weiter stimuliert wurden, liefert der Versuch Erkenntnisse über die Bedeutung des Umfelds nach Aktivierung. Konventionelle CD4⁺T-Zellen wurden ebenfalls expandiert und zum Vergleich herangezogen. Wie bei frisch isolierten Treg wurden die oben beschriebenen sechs Homingrezeptoren untersucht. Die Analyse der Homingrezeptoren der Treg nach Expansion erfolgt genau zum Zeitpunkt ihrer potenziellen klinischen Applikation bei GVHD. Das ist von Bedeutung, weil das Migrationsverhalten von Treg nach klinischer Applikation bei GVHD vermutlich relevant für ihre therapeutische und prophylaktische Wirksamkeit ist. Bis auf die GMP Bedingungen wurde das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte und bereits in ersten klinischen Studien angewandte Protokoll zur Treg Expansion eingesetzt. Hierbei erfolgte eine Aktivierung mit CD3/CD28 Expander Beads (siehe 3.1.5) als polyklonale Stimulatoren unter Zusatz hoher Mengen IL-2, was sich als die geeignetste Methode zur Expansion von Treg herausgestellt hatte [239]. Durch den Einsatz der Beads konnte die Verwendung einer weiteren Zellpopulation - wie der FcγRII-exprimierenden L-Zellen - als Stimulatoren vermieden werden, was den klinischen Einsatz expandierter Zellen erleichtert. Die Antikörper, die sich gegen bestimmte Epitope des CD3 und CD28 Proteins richten, werden dabei auf Beads immobilisiert, wobei es sich um Partikel in der Größe einer Immunzelle mit magnetischen Eigenschaften handelt. Da die Antikörper kovalent mit den Trägerpartikeln verbunden sind, kann die gesamte artifizielle Konstruktion nach erfolgreicher Expansion vor adoptivem Transfer durch ein magnetisches Feld wieder von den T-Zellen entfernt werden. Die Fixierung der Antikörper auf den Beads ist aber nicht nur für die magnetische Entfernung der Beads nach Expansion von Bedeutung, sondern gewährleistet auch eine adäquate, quervernetzende Bindung des Antikörpers an die Domänen des CD3-Rezeptors der T-Zelle: Freie Antikörper bewirken dies nur unzureichend [252]. Über den CD3 Antikörper erhalten die T-Zellen ein initiales Aktivierungs-Signal wie bei einer TCR-Aktivierung [253, 254] und werden zusammen mit kostimulatorischen Signalen über das CD28 Molekül zur Proliferation angeregt [5]. Die kostimulatorischen Signale über CD28 spielen sowohl für Treg als auch für konventionelle T-Zellen im Aktivierungsprozess eine wesentliche Rolle bei der Zellteilung, der Zytokinproduktion, dem Überleben und der Differenzierung der Zelle [255]. Weiterhin ist der Grad der Stimulation zum Teil vom quantitativen Verhältnis zwischen Beads und Zellen abhängig [256]: Ein Verhältnis von vier Beads pro Zelle zu

Beginn der Kultivierung, mit einer Reduktion auf ein Beat pro Zelle ab der zweiten Woche, erwies sich als die beste Kombination [239]. Die Treg erfahren bei dieser Methode nur eine Stimulation der kostimulatorischen Moleküle CD3 und CD28, ohne dass ihr TCR selbst aktiviert wird. Sie expandieren deshalb antigenunabhängig und somit polyklonal, was unsere Arbeitsgruppe über eine TCR-V β Analyse verifizierte [239]. Eine Population mit polyklonaler Spezifität erscheint für den Einsatz in der GVHD vorteilhaft, da Spezifitäten gegen potenzielle Alloantigene während der Expansionsphase nicht verloren gehen. *In vitro* expandierte Treg, die durch Empfänger PBMCs geprimed würden, würden vermutlich vorrangig hämatopoetische Alloantigene erkennen und damit unter Umständen präferentiell Donor-T-Zellen supprimieren, die den gewünschten Graft-versus-Hämatopoese Effekts vermitteln [159]. Treg reagieren auf eine Stimulation ihres TCR bekanntermaßen hyporesponsiv, wobei ihr aneurer Zustand durch die Kombination von TCR- und CD28-Stimulation mit exogenem Zusatz von IL-2 überwunden werden kann [18, 19, 27]. IL-2 ist ein wichtiger Wachstums-, Differenzierungs- und Überlebensfaktor für T-Zellen und bindet an CD25. Bei einem Zusatz von hohen Dosen IL-2 mit 300U/ml *in vitro* zeigten sich die höchsten Proliferationsraten und CD4⁺CD25^{hi}CD45RA⁺ Zellen konnten nach diesem Protokoll bis zu 100fach unter Erhalt ihre suppressiven, funktionellen und phänotypischen Eigenschaften expandiert werden [62].

Expandierte Populationen werden im Folgenden durch das Präfix „e“ gekennzeichnet. Um auf die eingesetzten Primärzellen Bezug zu nehmen, werden RA⁺ *ex vivo* isolierte Zellen auch nach Expansion als RA⁺eT-Zellen bezeichnet, obwohl eine RA-Expression nach *in vitro* Stimulation nicht mehr vorliegt [60]. In einigen Kulturen zeigte ein Teil der RA-eTreg Zellen – trotz hoher FOXP3 Expression zu Kulturbeginn von ca. 98% - keine FOXP3-Expression mehr. Diese Populationen wurden nach Expansion entsprechend ihrer FOXP3 Expression als RA-F-eTreg und RA-F⁺eTreg bezeichnet und das Homingrezeptorprofil der Subgruppen separat analysiert. Da unter expandierten Zellen keine klar definierte Positivpopulation für CCR4 identifiziert werden konnte, wurde bei diesem Rezeptor die MFI eingesetzt und zwischen frisch isolierten und expandierten Zellen verglichen.

Die FACS-Analyse expandierter T-Zellen ergab zusammenfassend für alle Populationen eine hohe CD49d Expression. RA⁺eTreg trugen außerdem in geringem Maße CLA und CCR4. Auch RA-F-eTreg und RA-F⁺eTreg trugen CLA und CCR4

sowie gering CD103. Keine Treg-Population exprimierte nach Expansion CCR9 und CCR10. RA+eTkonv trugen dagegen CCR9 – wenn auch nur zu einem sehr geringen Anteil - und wenig CLA und CCR4. Auch RA-eTkonv exprimierten auf wenigen Zellen CLA und CCR4 aber - wie auch die Treg - kein CCR9. CD103 und CCR10 konnte auf keiner der konventionellen Subgruppen nachgewiesen werden.

Um die Einflüsse der Expansion auf die Treg zu analysieren, wurde das Hominrezeptorprofil der Populationen vor und nach Proliferation verglichen. Als Vergleichspopulation an d0 dienten Treg, die aus Leukapheresaten durch CD4, CD45RA und intrazelluläre FOXP3 Färbung identifiziert worden waren. Da FOXP3 als intrazellulärer Marker nicht zur Identifikation lebender Zellen herangezogen werden konnte, erfolgte die Selektion der zu expandierenden Zellen durch ein FACS-Sorting nach den Kriterien CD4⁺, CD25^{high}, CD45RA^{+/-} und CD127^{low}. Somit entstand eine Heterogenität in den verglichenen Populationen, da Treg unterschiedlich identifiziert wurden und frisch isolierte Zellen mit einer niedrigen CD25 Expression nicht ausgeschlossen worden waren. Analysen der FOXP3 Expression der RA+Treg bei der hier angewandten Sorting- und Kulturmethode zeigten nach circa zwei Wochen polyklonaler Expansion allerdings eine Positivfraktion von circa. 99,51±0,09% (n=9, MW±SEM). Ein Ausschluss der CD25^{low} Zellen an Tag 0 hätte weiterhin einen Ausschluss funktioneller Treg bedeutet und damit die Aussagekraft der Analyse vor Expansion eingeschränkt. Zudem war der Anteil der CD25^{low}FOXP3⁺ Zellen unter den *ex vivo* isolierten Treg nur sehr gering. Somit ist zusammenfassend trotz der unterschiedlichen Identifikation eine Vergleichbarkeit der *ex vivo* isolierten FOXP3⁺Treg und der expandierten Treg gegeben.

RA+eTreg exprimierten als einzige Diskrepanz nach Expansion mehr CLA und CD49d ($\alpha 4$) als RA+Treg. Dies bestätigt indirekt murine Daten, die bei spezifischer TCR Stimulation über fünf Tage eine Steigerung des Heterodimers $\alpha 4\beta 7$ auf FOXP3⁺ Zellen zeigen [70]. Im Gegensatz dazu zeigt allerdings eine weitere Studie bei dreitägiger Stimulation von CD45RA⁺CD4⁺ Zellen mit Phytohämagglutinin und anschließendem ebenso langem Resting eine geringere Expression von $\alpha 4\beta 7$ auf stimulierten FOXP3⁺RO⁺ Zellen als auf den CD45RA⁺FOXP3⁺ unstimulierten Zellen. In Einklang mit der vorliegenden Arbeit ist allerdings, dass die CLA Expression in diesem Setting steigt [71]. Diese heterogenen Ergebnisse hinsichtlich der CD49d Expression treten jedoch bei einer insgesamt geringen Vergleichbarkeit der Studien nicht unerwartet auf.

Einerseits erfolgt mit einem Mitogen und einer TCR-spezifischen Aktivierung ein anderer Stimulus als in der vorliegenden Arbeit, andererseits unterscheiden sich sowohl Dauer der Stimulation als auch eingesetzte Zellpopulationen. Zusätzlich wurde in den zitierten Studien das Heterodimer $\alpha 4\beta 7$ und nicht die α -Kette CD49d analysiert, weshalb dort eine Expression von $\alpha 4$ in Kombination mit $\beta 1$ nicht erfasst wird. Bedeutsam ist, dass der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Anstieg von CD49d auf RA+Treg durch die Expansion aber vermutlich die expandierten Zellen für ihren Einsatz bei GVHD qualifiziert. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression von $\alpha 4\beta 7$ auf T-Zellen und intestinaler GVHD konnte in einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie gezeigt werden: Patienten mit einer intestinalen GVHD zeigen auf naiven und vor allem auf Gedächtnis-T-Zellen eine gesteigerte Expression von $\alpha 4\beta 7$ [257]. Eine kleinere Studie zeigt, dass Patienten mit einem größeren Anteil $\alpha 4\beta 7$ exprimierender Treg weniger schwer an Darm-GVHD erkranken [258, 259]. Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit nur die alpha-Kette des Heterodimers erfasst, es gibt aber Hinweise, dass CD49d auch in Kombination mit seinem alternativen Bindungspartner $\beta 1$ im Rahmen einer intestinalen Entzündung zum Homing in den Darm beiträgt [260].

Publizierte Daten, die eine signifikante Reduktion der CCR4 Expression auf expandierten CD4⁺CD25⁺ Treg Zellen beschreiben [243], konnten nicht bestätigt werden, da dies weder auf RA+Treg noch RA-Treg eintrat. Die Methoden dieser Studie weichen allerdings ebenfalls von hier angewendeten Protokollen ab, was die Vergleichbarkeit einschränkt. Treg werden dort durch magnetische Zellseparation positiv für CD4 und CD25 selektiert und nicht gesortet. Die selektierte Population exprimierte vor Kultivierung weniger FOXP3 als die RA+ und RA-Treg der vorliegenden Arbeit [62] und enthielt folglich einen geringeren Anteil an Treg. Da konventionelle T-Zellen - wie in dieser Arbeit gezeigt - eine CCR4 Expression bei Expansion im Gegensatz zu Treg reduzierten, könnte dies die differenten Ergebnisse erklären. Außerdem werden die Zellen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen mit unterschiedlichen IL-2 Dosen expandiert, was ihren Aktivierungsstatus und damit auch ihr Homingrezeptorprofil beeinflusst.

Die signifikanten Unterschiede in der Rezeptorexpression der RA+Treg vor und nach Expansion sind vermutlich insgesamt auf die Stimulationsbedingungen zurückzuführen. Es ist unwahrscheinlich, dass den Unterschieden eine differentielle

Biologie der Zellen zu Grunde liegt, da keine Zytokine außer IL-2 auf die Zellen einwirkten. Eine Analyse bestimmter linienspezifischer Transkriptionsfaktoren würde diese These vermutlich untermauern. Es ist bekannt, dass durch die gewählte Expansionsmethode *in vitro* aber ein Phänotypenwechsel auf Treg induziert wird und dass dieser *in vivo* und *in vitro* mit einer Veränderung im Homingrezeptorprofil der Zelle einhergeht. Durch die polyklonale Stimulation mit CD3/CD28 Beads wird, wie oben beschrieben, eine TCR-Stimulation simuliert und die CD45RA-Isoform durch das CD45RO Molekül ausgetauscht. Zwar wurde in dieser Arbeit CD45RA nach Kultivierung der RA+Treg nicht erneut analysiert, aber für einen Verlust der CD45RA Expression nach Bead-Stimulation besteht klare Evidenz [60, 62]. *In vivo* resultiert aus der TCR-Aktivierung von Treg teilweise ein Verlust der lymphatischen Homingrezeptoren und eine stärkere Expression von nicht-lymphatischen Homingrezeptoren, wie in dieser Arbeit und von anderen gezeigt [70, 71, 192]. *In vitro* verlieren RA+Treg - wenn auch nur in geringem Maße - bei dreiwöchiger Expansion mit CD3/CD28 Beads passend dazu die lymphatischen Homingrezeptoren CCR7 und CD62L [62]. Der signifikante Anstieg von CLA und CD49d, als Moleküle, die *in vivo* für eine Migration in periphere Gewebe von Bedeutung sind, beruhte somit vermutlich auf einer Stimulation des TCR während Kultivierung. Vergleicht man die *in vitro* aktivierten RA+eTreg jedoch mit *in vivo* aktivierten RA-Treg, treten einige Widersprüche auf: Die CLA Expression unter RA+eTreg ist trotz Anstieg deutlich geringer war als auf frisch isolierten RA-Treg und eine Expression von CCR10 und von CCR4, die ebenfalls von RA-Treg exprimiert wurden (siehe oben), blieb gänzlich aus. Die Expression von CCR9 ist auf RA+eTreg tendenziell gesunken und unterschied sich damit ebenfalls von frisch isolierten RA-Treg. CD49d entwickelte sich durch einen Anstieg bei Expansion auf RA+Treg in entgegengesetzte Richtung als auf RA-Treg, da RA-Treg signifikant weniger CD49d exprimierten als RA+Treg. Ein Angleichen der Homingrezeptorprofile der RA+eTreg an *ex vivo* isolierte RA-Treg konnte somit zusammenfassend nicht gezeigt werden - trotz hinsichtlich CD45RA übereinstimmendem Phänotyp der Populationen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass ein Angleichen der Profile erst später eintritt und durch den zeitlich begrenzten Beobachtungszeitraum von 12 bis 15 Tagen noch nicht detektiert werden konnte. *In vivo* ziehen sich Aktivierung, Proliferation und vollständige Differenzierung einer T-Zelle bei Kontakt zu ihrem passenden Ag im LK über mehrere Tage hin. Insbesondere Treg zeigen einen

gegenüber Tkonv verzögerten Verlust ihrer CCR7 Expression, was auf eine längere Verweildauer im LK hindeutet. Allerdings wurde in einer Studie an Treg aus humanen Tonsillen gezeigt, dass beispielsweise CCR4 *in vivo* auf Treg bei Ag-Stimulation noch vor CLA ansteigt [71]. Da ein Anstieg von CLA in den vorliegenden Daten bereits eingetreten war, ist eine vermehrte Expression von CCR4 bei längerer Kultivierung nicht zu erwarten. Am ehesten ist somit das differente Homingrezeptorprofil von RA+eTreg und RA-Treg auf die Bedingungen ihrer Aktivierung zurückzuführen, denn eine physiologisch aktivierte Treg Zelle erlangte den CD45RA- Phänotyp unter dem Einfluss zahlreicher *in vivo* Faktoren, denen eine Zelle bei Aktivierung in Kultur nicht ausgesetzt war. Eine Bead-Stimulation zielt in erster Linie auf eine Expansion ab und nicht auf eine Imitation der Umgebungsbedingungen *in vivo*. *In vivo* erfahren die Treg indessen ihre Aktivierung in der Regel durch eine reife DC, die mit ihrem MHC-II Molekül und dem passenden Antigen mit dem gesamten TCR-Komplex der Treg Zelle interagiert. Die artifiziellen APCs bei Expansion stimulieren nicht direkt das Heterodimer mit den $\alpha\beta$ -Ketten des TCR, sondern interagieren mit dem TCR-Komplex nur über die vier CD3 Ketten (siehe 1.1). An einer vollständigen Aktivierung und einer Differenzierung einer T-Zelle sind *in vivo* außerdem zahlreiche kostimulatorische (und - inhibitorische) Moleküle beteiligt, für die eine reife APC der T-Zelle die Liganden präsentiert. Dies wird *in vitro* nur über den CD28-Antikörper simuliert, da hiermit insbesondere ein Signalweg aktiviert wird, der für die Proliferation der Treg von Bedeutung ist. *In vivo* vermitteln APCs über die beiden Bindungspartner CD80 und CD86 dieses Signal, wobei gezeigt werden konnte, dass Treg *in vivo* nach einer anti-CD80/86 Blockade vermindert proliferieren [261]. Weitere *in vivo* beteiligte Kostimulatoren sind beispielsweise CD40, OX40 oder GITR (glucocorticoid-induced-tumor-necrosis-factor-receptor), deren Liganden ebenfalls von APCs dargeboten werden und *in vitro* fehlen. Eine wichtige kostimulatorische Funktion kommt ICOS (Induzierbarer Kostimulator) zu, der von Treg exprimiert wird [68]. Seine Expression steigt bei Aktivierung durch TCR- und CD28-Stimulation [262] und er ist ein potenter Aktivator des PI3K/AKT Signalwegs, der einerseits das Überleben der Zelle fördert, andererseits aber auch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO1 steigert. FOXO1 wird dadurch aus dem Zellkern ausgeleitet und seine Zielgene *Klf2* und *Ccr7* werden herunterreguliert. Diese Inaktivierung von FOXO1 sorgt maßgeblich für eine Veränderung des Homingrezeptorprofils bei Aktivierung der Treg Zelle im

Sinne einer verminderten Expression lymphatischer Homingrezeptoren und einer gesteigerten Expression von Rezeptoren für periphere Gewebe. Im murinen Setting wurde gezeigt, dass Treg von Tieren mit verändertem FOXO1 Protein, das vom AKT-Signalweg nicht mehr beeinflusst werden konnte, nur vermindert in nicht-lymphatische Gewebe migrieren. Dies führt zum dortigen Ausbruch von Autoimmunerkrankungen [74]. ICOS bindet trotz Zugehörigkeit zur CD28-Familie nicht an den CD28-Antikörper der CD3/CD28 Beads, sondern ausschließlich an seinen von reifen APCs präsentierten Liganden ICOSL (B7RP-1) [263]. Da einer RA+eTreg Zelle *in vitro* kein ICOS-Ligand zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte eine geringere Inaktivierung von FOXO1 als bei einer *in vivo* Aktivierung, was die geringfügige Expression von peripheren Homingmolekülen zum Teil erklären könnte. Besonderen Einfluss auf das Homingrezeptorprofil hat auch der Ort im menschlichen Körper, an dem die Zelle aktiviert wird, denn DC Zellen produzieren gewebespezifisch aktive Metaboliten von Vitaminen, die das Homingrezeptorprofil von T-Zellen verändern können [87, 228, 229]. Die RA+Treg unterlagen in dieser Arbeit *in vitro* diesen Metaboliten der DC ebenso wenig wie den Einflüssen von linienspezifischen Zytokinen, die bei einer *in vivo* Aktivierung auf T-Zellen einwirken. Durch Zytokine wird die Differenzierung von verschiedenen Treg-Subgruppen induziert, die ihre funktionellen Eigenschaften und insbesondere ihr Homingverhalten an koaktivierte Tkonv adaptieren. Naive Treg können sich auch in folliculäre Treg entwickeln, die im Keimzentrum des LK verweilen oder durch epigenetische Modifikationen in sogenannte Gewebe-Treg. Dies ist eine heterogene Gruppe, deren Epigenetik sich wiederum je nach Aufenthaltsort unterscheidet [264], was sich vermutlich auch auf das Homingrezeptorprofil auswirkt. Bei transientser Antigenexposition kann eine langlebige Gedächtnis-Treg entstehen, die je nach Ort ihrer Aktivierung ebenfalls ein individuelles Homingrezeptorprofil aufweist [246]. Das von Zytokinen erzeugte immunologische Milieu im Moment der Aktivierung ist folglich von entscheidender Bedeutung für eine Differenzierung der T-Zellen *in vivo*. RA+Treg waren in dieser Arbeit während ihrer Expansion nur einem Einfluss von IL-2 und einer antigenunspezifischen Stimulation ihres TCR und damit deutlich weniger Einflüssen auf ihr Homingrezeptorprofil als *in vivo* aktivierte RA-Treg ausgesetzt. Zusammenfassend sind die Veränderungen der RA+Treg demzufolge vermutlich auf eine allgemeine Aktivierung zurückzuführen, die in der Zelle nicht die

Differenzierung zu einem spezifischen Subtyp induzierte und viel weniger Einfluss auf das Homingrezeptorprofil nahm als eine Aktivierung *in vivo*.

Bei Betrachtung der RA-Treg, die ihre FOXP3 Expression während der Expansion beibehalten hatten, zeigt sich nach Kultivierung mehr CD49d und CCR4-Expression als zuvor. CLA reduzierten sie im Gegensatz dazu und regulierten die ehemals deutliche CCR10 Expression komplett herunter. Der geringe Anteil CCR9-positiver Zellen von d0 war nach Expansion ebenfalls nicht mehr nachweisbar. In Einklang damit, kann eine Reduktion der CCR9 Expression auf murinen FOXP3⁺ Zellen bei antigenspezifischer Stimulation über fünf Tage beobachtet werden [70]. Wie oben beschrieben, war ein Anstieg von CD49d auch auf RA+Treg zu beobachten und bemerkenswerterweise auch auf beiden konventionellen Zellreihen. Die MFI der CD49d-Positivfraktion war in der naiven Subgruppe, sowohl unter Treg als auch unter Tkonv, vor Expansion geringer als in den antigenerfahrenen Subgruppen, wobei dieser Unterschied durch einen generalisierten Anstieg aller Zellen nach Expansion nicht mehr nachweisbar war. Somit liegt nahe, dass CD49d generalisiert auf einen TCR-Stimulus oder hohe IL-2 Dosen gesteigert wird. In Einklang damit war die unter RA-Treg noch klar abgrenzbare Negativpopulation unter RA-F+eTreg nicht mehr vorzufinden und fast alle RA-F+eTreg exprimierten CD49d nach Expansion einheitlich hoch.

Besonders zu beachten ist die Entwicklung der CCR4 Expression, da im Kompartiment der Treg die Expression entweder konstant hoch blieb (RA+ Population) oder sogar eine Steigerung der Expression (RA- Population) eintrat. Die Treg verhalten sich damit gegensätzlich zu den konventionellen T-Zellen, die ihre CCR4 Expression während Expansion tendenziell reduzierten. Diese diverse Entwicklung zwischen Treg und Tkonv trat sonst bei keinem der untersuchten Rezeptoren auf und deutet auf einen Zusammenhang zwischen FOXP3 und einer CCR4 Expression hin. Bekräftigt wird das durch die Beobachtung, dass ehemals FOXP3-positive RA-Treg, die während der Expansion ihr FOXP3 verloren haben, noch immer signifikant höhere CCR4 Werte exprimierten, als RA-eTkonv, allerdings signifikant niedrigere als RA-F+eTreg. In Einklang damit stehen auch die oben präsentierten Leukapherese-Daten mit einer signifikant höheren CCR4 Expression im RA- Kompartiment auf Treg gegenüber Tkonv. Für TH17 Zellen ist bereits bekannt, dass ein Aktivierungs-bedingter FOXP3 Anstieg auch mit einer Steigerung von CCR4 einhergeht [265].

Zusätzlich zu diesen diskutierten Entwicklungen zeigten RA-Treg- wie auch die entsprechende Population unter den Tkonv - eine Abnahme der Rezeptoren CLA und CCR10. In Summe sind all diese Veränderungen im Homingrezeptorprofil der RA-Treg während der polyklonalen Expansion unerwartet, da erfahrungsgemäß durch kontinuierliche TCR-Stimulation das transkriptionelle Programm antigenerfahrener Treg Zellen aufrechterhalten werden sollte [66]. Außerdem führt eine TCR-Stimulation *in vitro*, wie in dieser Arbeit auf RA+Treg gezeigt, tendenziell zu einer gesteigerten Expression peripherer Homingrezeptoren. Die hier beobachtete starke Reduktion von CLA und insbesondere von CCR10, die vor Kultur auf antigenerfahrenen Zellen hoch exprimiert waren, trat unter kontinuierlicher TCR-Stimulation und hoher Zufuhr von IL-2 ein. Dies deutet darauf hin, dass aktivierte Treg periphere Homingrezeptoren *in vivo* nur transient exprimieren oder die Expression nur unter bestimmten Bedingungen aufrechterhalten, welche bei der hier durchgeführten *in vitro* Expansion nicht vorlagen. Es ist bekannt, dass RA-Treg nicht nur bei Entzündung in periphere Gewebe migrieren, sondern dort mit einem gewebespezifischen Homingrezeptorprofil konstitutiv vorgefunden werden [226]. Sie stellen dort die Selbsttoleranz und die immunologische Homöostase sicher. Insbesondere in Haut und Darm, die auf Grund ihrer großen Kontaktfläche zur Umwelt zahlreichen potenziell immunogenen Molekülen ausgesetzt sind, ist die kontinuierliche immunmodulatorische Funktion der Treg von großer Bedeutung. Um diese Verteilung zu regulieren, erfahren RA-Treg hinsichtlich ihres Homingrezeptorprofils *in vivo* zahlreiche Einflüsse. Eine Stimulation des Rezeptors ICOS beispielsweise stabilisiert generell den Erhalt von Treg in der Peripherie, wie an ICOS defizienten Mäusen gezeigt werden konnte [266]. Es muss hierbei auch bedacht werden, dass unter RA-Treg eine sehr heterogene Gruppe von Zellen zusammengefasst wird. Hinsichtlich der Expression von ICOS und HLA-DR können unter RA-Treg weitere funktionell differente Subgruppen abgegrenzt werden, die sich sowohl im Ziel ihrer Suppression [68] als auch in ihren suppressiven Eigenschaften unterscheiden [267]. Da außerdem sowohl kürzlich aktivierte Effektor-Treg als auch Gedächtnis-Treg RA- sind, kann nicht unterschieden werden, ob das aktivierende Antigen der Zelle im Körper im Moment der Isolation noch vorlag oder nicht und ob durch die *in vitro* Expansion eine bestehende Stimulation fortgesetzt oder dagegen erneuert wurde. Im Organismus wirken speziell auf Gedächtnis-Treg Zellen verschiedene Faktoren ein, die ihren Erhalt in der Peripherie und damit auch die

Expression ihrer Homingrezeptoren stabilisieren, wie beispielsweise IL-7 [268]. Da in der Kultur bloß IL-2 bereitgestellt wurde, das nachgewiesenermaßen für den Erhalt regulatorischer Gedächtniszellen in der Peripherie weniger bedeutsam ist, fehlte den Zellen möglicherweise der entscheidende Stimulus, um ihre Rezeptorexpression aufrecht zu erhalten. Die bisherigen Ergebnisse zu Gedächtnis-Treg weisen allerdings darauf hin, dass diese eher gewebeständig sind und weniger im Blut zirkulieren, weshalb ihr Anteil unter den hier aus Leukapheresaten isolierten RA-Treg fraglich ist. Eine Analyse von Gedächtniszell-spezifischen Markern wie BCL-2 oder CD27 wäre zielführend, um die Gruppe der RA-Treg genauer zu charakterisieren. Außerdem wurde innerhalb der RA-Treg nicht untersucht, ob die Population peripher induzierte Treg enthielt, da eine weitere Differenzierung der Zelllinien, beispielsweise durch epigenetische Analysen, nicht vorgenommen wurde. Insbesondere pTreg werden peripher durch lokale Einflüsse stark in ihrem Homingrezeptorprofil beeinflusst. Kurzkettige Fettsäuren beispielsweise, wie sie von der kommensalen Bakterienflora produziert werden, beeinflussen über Bindung an den Rezeptor GPCR43 die Migrationsrezeptoren intestinaler regulatorischer T-Zellen [86, 269], wobei allerdings kein Einfluss auf CCR9 gezeigt werden konnte. Ein solcher Einfluss durch lokale Mechanismen entfällt bei Isolation aus dem Organismus. Eine negative Selektion nach dem Marker CD45RA erlaubt weiterhin keine Aussage darüber, von welchen Zytokinen die Transkriptionsfaktoren der Zelle vor Isolation beeinflusst worden waren. Wie oben bereits beschrieben, migrieren Treg über das Blut spiegelbildlich zu ihren koaktivierten T-Zellen in bestimmte Regionen. Dort supprimieren sie Subgruppen-spezifisch in dem immunologischen Milieu, das ihre Transkriptionsfaktoren induziert hat und auch weiter stabilisiert. Aus dem peripheren Blut isolierte Treg werden möglicherweise auf dem Weg in ihr Zielgebiet daran gehindert, den nötigen Stimulus für den Erhalt ihrer genetischen Signatur zu erhalten und verlieren in Kultur bei unspezifischer Aktivierung unter IL-2 ihre Rezeptoren. Unter den RA-Treg sind auch Zellen, die nach Migration in die Peripherie, wo sie restimuliert wurden oder proliferierten, aus dem Gewebe über das afferente Lymphgefäß wieder emigriert und erneut in die Rezirkulation eingetreten sind [74]. Eine sequentielle Migration von Treg zwischen entzündetem Gewebe und drainierendem LK wurde im murinen Organismus gezeigt [270]. Passend dazu trägt ein Teil der RA-Treg im humanen peripheren Blut CCR7 [71]. Diese Zellen exprimieren ihre peripheren Homingrezeptoren möglicherweise nur transient, was den Verlust der

Expression bei Expansion *in vitro* erklären könnte. Seit kurzem weiß man, dass Treg prinzipiell von einem aktivierten Phänotypen in einen zentral-migrierenden zurückwechseln [271] und sogar wieder einen RA+ Phänotypen erlangen können [242], was ein weiterer Ausdruck der Heterogenität und phänotypischen Plastizität dieser Population ist. Zusammenfassend zeigt der Vergleich der RA- und RA-eTreg, dass eine *in vitro* Aktivierung unter polyklonaler Stimulation und IL-2 nicht zum Erhalt des heterogenen Homingrezeptorprofils einer *in vivo* aktivierten Treg-Zelle führt, da sie vermutlich durch die Isolation aus dem Organismus zahlreichen das Profil stabilisierenden oder induzierenden Einflüssen entzogen wird.

Es ist bekannt, dass unter CD4⁺CD25⁺RA-Treg im Verlauf einer polyklonalen Langzeitexpansion die FOXP3 Expression um bis zu 50% abnimmt und ein Anstieg von IL-2 und IFN- γ produzierenden Zellen eintritt [62]. Ob diese Tatsache auf eine Kontamination mit Tkonv in der Ausgangspopulation, die konsekutiv *in vitro* expandieren oder auf eine phänotypische und funktionelle Plastizität innerhalb der Treg-Zelllinie bei Stimulation zurückzuführen ist, ist Gegenstand aktueller Diskussion. Mit CD127 wurde ein Marker entdeckt, der annähernd einen Ausschluss aktivierter Tkonv erlaubt, da Tkonv diesen Marker im Gegensatz zu Treg mit CD25 coexprimieren. Durch eine Analyse des Demethylierungsprofils von CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Zellen sowie durch eine Untersuchung von RA+Treg Klonen nach Einzelzell-basiertem Sorting, konnte unsere Arbeitsgruppe die Fähigkeit von Treg bestätigen, die Expression ihres linienspezifischen Markers FOXP3 *in vitro* zu reduzieren. Es wurde gezeigt, dass CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Zellen kaum *in vivo*-aktivierte Tkonv Zellen mit transienter FOXP3 Expression enthalten und es sich um natürliche Treg handelt. Dadurch lässt sich die oben beschriebene These einer Kontamination mit Tkonv weitgehend ausschließen. Um zu prüfen, ob dies auch durch die Entwicklung der Homingrezeptoren bestätigt werden kann, wurde das Rezeptorprofil der FOXP3-negativen expandierten Treg (RA-F-eTreg) mit dem der expandierten FOXP3-positiv Population (RA-F+eTreg) sowie dem der expandierten RA-Tkonv verglichen (RA-eTkonv). Wie bereits oben erwähnt, trugen RA-F-eTreg weniger CCR4 als RA-F+eTreg, wobei auffällig war, dass sich die beiden Subgruppen der expandierten RA-Treg bei keinem anderen Rezeptor voneinander unterscheiden. Wie oben diskutiert liegt eine Assoziation einer CCR4 und FOXP3 Expression nahe, weshalb ein Verlust von CCR4 unter den RA-F-eTreg in Einklang mit ihrer reduzierten

FOXP3 Expression steht. Die homogene Expression sämtlicher anderer Rezeptoren ist ein weiterer Hinweis auf eine Abstammung der Subgruppen aus einer einzigen Zellpopulation und wird durch einen Vergleich der RA-F-Treg mit RA-eTkonv umso deutlicher: Die Homingrezeptorprofile dieser Gruppen wichen stark voneinander ab. Sowohl bei CD103, bei CLA als auch bei CCR4 war der Anteil rezeptorpositiver Zellen unter RA-F-eTreg deutlich größer als unter RA-eTkonv. Außerdem tragen die RA-F-eTreg mit einem geringen, aber signifikanten Unterschied weniger CD49d als RA-eTkonv. Die höhere Expression von CCR4 unter RA-F-eTreg spricht wiederum für eine Abstammung von einer ehemals FOXP3⁺ Zelle. Diese Unterschiede wiesen nicht nur insgesamt auf differente Zelllinien hin, sondern spiegelten bis auf CCR10 genau die an *ex vivo* isolierten Zellen beobachteten Unterschiede zwischen RA-Treg und RA-Tkonv wider, wobei hier eine sichere Abgrenzung über den linienspezifischen Marker FOXP3 vorgenommen worden war. Zusammenfassend untermauern diese Daten die oben beschriebene These einer phänotypischen Plastizität innerhalb der RA-Population als Ursache für die entstehende FOXP3-negativ Gruppe unter RA-eTreg.

5.2.1 Homingrezeptorprofile CD4⁺T-Zellen nach polyklonaler Expansion mit ATRA

Wie unter 1.3.1 beschrieben ist der Darm eines der Hauptzielorgane der akuten GVHD. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Treg nicht nur in LK sondern auch in peripheren Organen alloreaktive T-Zellen supprimieren [152]. Die Migration von Tkonv und Treg in den Darm bei akuter GVHD hängt dabei unter anderem von einer Expression von $\alpha 4\beta 7$ ab [257]. Es gibt Hinweise, dass Patienten mit mehr $\alpha 4\beta 7$ exprimierenden Treg weniger schwer an Darm-GVHD erkranken [258, 259]. Ebenso ist CCR9 an der Rekrutierung von T-Zellen in den Darm bei GVHD beteiligt [272]. Um bei klinischem Einsatz von Treg eine Migration zum gewünschten Wirkungsort zu erzeugen, wurden Methoden entwickelt, um den Zellen *in vitro* vor Transfer bestimmte Homingeigenschaften zu induzieren [226]. Es ist bekannt, dass Metaboliten von Vitamin A die Expression von Homingrezeptoren auf T-Zellen beeinflussen. *In vivo* wird Vitamin A aus der Nahrung über Enterozyten absorbiert und von einer generalisiert vorkommenden Dehydrogenase in Retinal und in einem zweiten Schritt irreversibel von der Retinaldehyd-Dehydrogenase (RALDH) in verschiedene Isoformen des aktiven Metaboliten Retinsäure (RA) umgesetzt. In Zusammenhang mit Immunzellen spielt die Isoform all-trans-RA (ATRA) eine

wesentliche Rolle, die durch das Enzym RALDH2 gebildet und von dem intranukleären RA-Rezeptor alpha (RAR α) gebunden wird [273]. Die Umwandlung durch die RALDH ist zellspezifisch, wobei das nötige Enzym neben Makrophagen und DC in Haut und Lunge, vor allem von CD103⁺DC in gastrointestinalen lymphatischen Geweben (GALT) exprimiert wird [229]. Es konnte gezeigt werden, dass ATRA über eine Steigerung der Expression der Homingmoleküle α 4 β 7 und CCR9 auf Tkonv und Treg deren Migration in die intestinale Lamina propria und das GALT fördert [226, 229]. In dieser Arbeit wurden regulatorische und konventionelle CD4⁺T-Zellen unter dem Zusatz von ATRA expandiert und der Einfluss des Agens auf das Homingrezeptorprofil analysiert. Eine Expansion unter dem Einfluss von ATRA wird bei der Nomenklatur der Populationen im Folgenden durch „(+)“ gekennzeichnet. CCR9 und CD49d stiegen auf allen mit ATRA kultivierten Populationen an. Da der prozentuale Anteil CD49d-positiver Zellen unter herkömmlich expandierten Zellen bereits sehr hoch war, wurde hier der Effekt von ATRA durch eine Messung der MFI CD49d⁺-Zellen untersucht. Die Daten stehen in Einklang mit zahlreichen Studien, die zeigen dass ATRA auf Tkonv und Treg die Expression der Darmhomingrezeptoren α 4 β 7 und CCR9 steigert [226, 229]. Es ist bekannt, dass die Expression des Integrins α 4 direkt über den RA/RAR α Signalweg gesteuert wird [274]. Eine Induktion von Darm-spezifischen Homingrezeptoren ist somit auch in dem von unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll einer Treg Expansion für adoptiven Transfer bei GVHD reproduzierbar. Um die Funktion der exprimierten CCR9 Rezeptoren zu überprüfen, wurden (+)RA+eTreg sowie eine entsprechende unbehandelte Kontrollgruppe im Rahmen eines Migrationsassays mit dem zu CCR9 passenden Chemokin CCL25 konfrontiert und ihr Migrationsverhalten untersucht. Zellen, die unter ATRA kultiviert worden waren, migrierten deutlich stärker zum bereitgestellten Chemokin als herkömmlich expandierte. Die chemotaktische Reaktion korrelierte mit der Konzentration des Chemokins und bestätigte eine funktionelle Expression von CCR9. Eine geringe chemotaktische Reaktion auf CCL25 von expandierten Treg ohne ATRA-Einfluss ist aus der Literatur ebenso bekannt [243], wie die gesteigerte Migration zu CCL25 nach Behandlung mit ATRA. *In vivo* wurde eine gesteigerte Migration von Treg, die *in vitro* mit ATRA vorbehandelt worden waren, in den Darm nachgewiesen. Dies lässt ebenfalls auf die Induktion funktioneller Homingrezeptoren schließen. Es wurde außerdem herausgefunden, dass Treg ihre suppressiven Eigenschaften unter dem

Einfluss von ATRA nicht verändern [226, 229]. Bemerkenswert ist, dass sich die behandelten Kulturen nicht nur hinsichtlich der Expression von CCR9 und $\alpha 4\beta 7$, sondern auch bei CLA von der Kontrollreihe unterschieden: Auf RA-CD4⁺T-Zellen, die sowohl vor als auch nach herkömmlicher Expansion CLA exprimierten, war dieser Rezeptor nach Kultivierung mit ATRA nicht mehr nachweisbar. ATRA supprimiert bereits in viel geringeren Mengen als die hier eingesetzten 100nM bei Kultivierung von CD4⁺T-Zellen die Expression der mRNA der Fucosyltransferase-VII. Dieses Enzym ist maßgeblich für die Expression von CLA, weshalb eine verminderte Anzahl rezeptorpositiver Zellen nach Expansion unter ATRA in Einklang mit publizierten Daten steht [229]. Durch die hier gezeigte Methode ist somit - insbesondere durch Behandlung der zur klinischen Applikation eingesetzten RA+eTreg - die Erzeugung einer funktionellen, auf eine Migration in den Darm ausgerichteten Treg Population möglich.

Eine Suppression von CCR4 durch ATRA konnte nicht bestätigt werden [229], sondern im Gegenteil eine Stabilisierung der Expression von CCR4 in RA-F-eTreg. Während diese nach Expansion ohne Agens noch signifikant weniger CCR4 exprimierten als RA-F+eTreg, war dieser Unterschied unter Einfluss von ATRA nicht mehr vorhanden. Dies ist möglicherweise durch den Effekt von ATRA auf die FOXP3 Expression in Treg zu erklären, denn es zeigte sich bei der FACS-basierten Analyse eine deutliche Tendenz zu einer gesteigerten FOXP3 Expression unter den behandelten Zellen. CCR4 scheint wie oben beschrieben mit einer FOXP3 Expression assoziiert zu sein und diese Korrelation könnte in RA-Treg den supprimierenden Effekt von ATRA auf CCR4 übertreffen. Die in der Kontrollgruppe in einigen Kulturen sichtbare FOXP3-negative Population unter RA-eTreg, stellte sich nach Expansion mit ATRA deutlich geringer dar. Tkonv schienen besonders unter der RA+ Subgruppe ihre FOXP3 Expression zu steigern. Es ist bekannt, dass ATRA über verschiedene Mechanismen die FOXP3 Expression verändern kann. ATRA stabilisiert *in vivo* die FOXP3 Expression von nTreg sowohl während der Proliferation als auch in Gegenwart inflammatorischer Zytokine. Es steigert die funktionelle Stabilität naiver Treg, indem es die Histon H4 Acetylierung des FOXP3 Promoters fördert und eine Methylierung der CNS2 Region (siehe 1.2.1) verhindert [275]. Es steigert in Treg die Expression von TGF- β und reduziert die der IL-6 und IL-1 Rezeptoren – so schirmt ATRA die Zellen vor dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine ab, die eine FOXP3 Expression

destabilisieren können [54]. Intestinal produziertes ATRA spielt *in vivo* außerdem eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung der lokalen Homöostase, da es zusammen mit TGF- β die Bildung von pTreg (siehe 1.2.4) induziert [276] und die Entstehung von Th17 Zellen hemmt. Im Rahmen einer Entzündung dagegen fördert RA die Aktivierung von Effektorzellen und wirkt einer Differenzierung von naiven CD4⁺T-Zellen in pTreg entgegen [277]. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen durch eine tendenzielle FOXP3 Induktion in naiven CD4⁺T-Zellen sowie einer Stabilisierung der FOXP3 Expression in Treg diese Daten [275]. Fraglich ist, wie stabil die FOXP3 Expression in Tkonv ist, da inzwischen gezeigt werden konnte, dass ATRA keinen Effekt auf die in diesen Zellen hochmethylierte CNS2 Region innerhalb des FOXP3 Locus hat, dessen Demethylierung Voraussetzung für eine stabile Expression ist (siehe 1.2.1) [278].

Prinzipiell muss die Bedeutung peripherer Homingrezeptoren mit oder ohne *in vitro* Induktion auf transplantierten Treg bei GVHD kritisch diskutiert werden. Die Proliferation und Reifung transplantierten Zellen wird durch die generalisierte Lymphopenie des Empfängers nach stattgehabter Konditionierung allgemein gefördert. Dennoch hängen Treg für ihre regulatorische Wirkung sowohl bei therapeutischer als auch bei prophylaktischer Applikation von einer alloantigenspezifischen Stimulation ihres TCR *in vivo* ab [158, 167]. Die von unserer Arbeitsgruppe zur Suppression von GVHD eingesetzten Treg werden nicht durch PBMCs des Empfängers *in vitro* geprimed, sondern nach polyklonaler Expansion transfundiert. Dadurch wird vor Transfer die Spezifität der Treg nicht nur auf hämatopoetische Zellen reduziert und ein geringerer Graft-versus-Hämatopoese Effekt induziert. Eine alloantigenspezifische Aktivierung *in vivo* ist damit zwar Voraussetzung für ihre Funktion, unklar bleibt aber, ob diese ausschließlich in lymphatischen Organen stattfindet [167] oder auch durch Antigene in den peripheren GVHD Organen ausgelöst werden kann. Bei prophylaktischem Einsatz frisch isolierter Treg im Rahmen der aGVHD ist eine Migration in SLOs nachgewiesenermaßen von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass Treg ihren Schutz vor letaler GVHD unter anderem durch eine Suppression der Expansion alloreaktiver T-Zellen in SLOs vermitteln. Nur der Kotransfer CD62L⁺ positiver Treg - ein Rezeptor, der mit Migration in lymphatische Gewebe assoziiert ist - verhindert einen schweren Gewebeschaden und schützt Mäuse vor Tod durch GVHD. CD62L⁺ Treg haben eine höhere Kapazität die Expansion der Tkonv zu supprimieren, es zeigen sich reduzierte Mengen an Tkonv in SLOs sowie

in GVHD-Zielorganen. Im Darm ist histologisch ein deutlich geringerer Gewebeschaden nachweisbar. Kottransplantierte CD62L⁻ Treg dagegen zeigen nur geringes protektives Potenzial [159]. Dies gilt ebenso für *in vitro* expandierte Treg [166]. Es ist ebenfalls bekannt, dass der Kontakt zu Empfänger-APCs, die sich überwiegend in SLOs aufhalten, für den protektiven Effekt von Treg bei GVHD entscheidend ist [167].

Tierexperimentelle Daten konnten aber auch zeigen, dass eine Expression des peripheren Homingrezeptors CCR5 auf Treg für den Schutz vor letaler GVHD entscheidend ist [170] und Treg ihre protektive Wirkung auch in der Peripherie entfalten. In Einklang mit der Bedeutung peripherer Aktivität von Treg stehen Daten von Engelhardt et al., die zeigen, dass die Expression von Haut- und Darmhomingmolekülen auf Treg mit der Inzidenz der entsprechenden GVHD invers korrelieren [259]. Treg Zellen, auf denen *in vitro* mittels ATRA intestinale Homingrezeptoren induziert worden waren, supprimieren bei Kottransfer mit Colitis-auslösenden Zellen eine akute intestinale Entzündung effektiver als unbehandelte Treg, wobei durch ATRA während der polyklonalen Expansion die Expression von CD62L reduziert wurde [279]. Es stellt sich folglich die Frage, ob die Wirkung der Treg bei therapeutischer Applikation ebenfalls von einer Migration in SLOs abhängt. In diesem Setting hat die Expansion der alloreaktiven Tkonv sowie ihre Migration in das Zielgewebe bereits stattgefunden. Funktionell könnten Treg in den SLOs somit vermutlich weniger ausrichten und ihre Effektivität würde möglicherweise gesteigert werden, wenn sie den "Umweg" über die SLOs umgehen könnten. Allerdings werden Treg möglicherweise erst dort alloge aktiviert und hinsichtlich ihrer Homingrezeptoren für ein bestimmtes Gewebe geprimed. CD62L⁻ Treg konnten beispielsweise bei Kottransfer kaum im Darm akkumulieren [159]. Eine Aktivierung der Treg kann allerdings möglicherweise auch durch Antigene in den GVHD-Zielorganen direkt erfolgen. Es ist bekannt, dass MHC-II-Moleküle, über die Treg eine Aktivierung erfahren, auch von nicht-hämatopoetischen Zellen getragen werden. Insbesondere bei Entzündung wird MHC-II von Epithel- und Endothelzellen in der Peripherie exprimiert [167]. Eine allogene Aktivierung kann außerdem neben APCs auch von Myofibroblasten und plasmazytoiden Zellen des Empfängers [132] und indirekt durch DC des Spenders im Colon [133] geleistet werden. Eine Induktion spezifischer Homingrezeptoren *in vitro* könnte eine zielgerichtete Migration von polyklonalen Treg

in GVHD Zielgewebe vermitteln und möglicherweise den Effekt der Treg bei therapeutischer Applikation verbessern. Diese Frage ist unter anderem deshalb von Bedeutung, da in der Klinik ein therapeutischer Einsatz von Treg bei GVHD gegenüber einem prophylaktischen einige Vorteile mit sich bringt: Da Inzidenz und Schwere einer GVHD kaum vorhersagbar sind, erlaubt dieser Ansatz eine individuellere Therapieplanung und damit einhergehend auch einen geringeren Kostenaufwand als eine standardisierte, präventive Expansion von Spender-Treg zur prophylaktischen Kotransplantation.

5.3 Homingrezeptorprofile CD4⁺T-Zellen nach allogener *in vitro* Stimulation

Regulatorische T-Zellen erfahren nach einem adoptiven Transfer im Rahmen der HSZT eine allogene Aktivierung, wobei nicht abschließend geklärt ist, wodurch der Stimulus ausgelöst wird. Bekannt ist, dass APCs des Empfängers wesentlich an ihrer Aktivierung beteiligt sind [167] und ebenso, dass APCs, die aus dem Spender-Knochenmark herangereift sind, für den Erhalt der Treg nach Transplantation von Bedeutung sind [280]. Eine allogenen Stimulation kann *in vitro* durch eine gemischte Lymphozytenreaktion ausgelöst werden, bei der APCs als Aktivatoren mit MHC-differenten CD4⁺T-Zellen kokultiviert werden. Da das Migrationsverhalten von transplantierten Treg im Rahmen einer GVHD für ihre Funktion entscheidend ist, wurde die Veränderung ihres Homingrezeptorprofils bei einer solchen allogenen Aktivierung untersucht. Die CD4⁺T-Zellen wurden vor der Konfrontation mit CFSE gelabelt. Da sich der Gehalt dieses Farbstoffs pro Zelle bei einer Teilung reduziert, können durch ihn die einzelnen Proliferationszyklen visualisiert werden. Dies erlaubt wiederum eine Detektion der alloreaktiven Zellen, da nur sie mit einer Proliferation auf den Stimulus reagieren. Um ausschließlich aktivierte Zellen zu detektieren, wurde bei der Auswertung in der Gruppe der proliferierten Zellen stringent auf die Zellen gegatet, die mindestens drei Teilungen durchlaufen hatten. Nach vier Tagen konnte eine ausreichend große, proliferierte Population abgegrenzt werden, weshalb hier die erste und am Tag fünf die zweite Analyse erfolgte. Eine intranukleäre FOXP3-Färbung erlaubte die Identifikation der Treg und die Abgrenzung der vergleichend analysierten Tkonv.

Treg, die über fünf Tage durch den allogenen Stimulus aktiviert worden waren, trugen mehr CLA und CCR4 als die Treg, die in diesem Zeitraum nicht proliferierten. CD49d ($\alpha 4$) war am Tag fünf zwar auf beiden Populationen in hohem Maße nachzuweisen, die

alloreaktiven Treg steigerten aber ihre Expression noch mehr und waren nach Proliferation gänzlich positiv. Alloreaktive konventionelle CD4⁺T-Zellen zeigten eine ähnliche Entwicklung: FOXP3-negative Zellen, die proliferiert waren, unterschieden sich in keinem der analysierten Rezeptoren signifikant von proliferierten Treg. Eine gesteigerte Expression von Homingrezeptoren nach antigenspezifischer Aktivierung wurde *in vivo* vielfach beschrieben [192, 200]. Die gesteigerte Expression von CLA auf Treg steht in Einklang mit der oben beschriebenen Entwicklung RA+Treg bei polyklonaler Expansion, während allerdings der in der MLR beobachtete Anstieg von CCR4 bei antigenunspezifischer Stimulation nicht auftrat. Es stellt sich die Frage, ob diese unterschiedliche Reaktion der Treg durch den differenten Stimulus ausgelöst wurde. Vermutlich hat zwar vor allem – wie oben diskutiert – die im Moment der Aktivierung vorherrschende lymphatische Umgebung Einfluss auf das induzierte Homingrezeptorprofil von T-Zellen [227], ein antigenspezifisches Priming kann jedoch ebenfalls beobachtet werden [196]. Ein Anstieg von CCR4 sowie das Ausbleiben einer CCR9 Expression passt zu tierexperimentellen Daten, die an murinen Treg nach mehr als drei Teilungen bei antigenspezifischer Stimulation erhoben wurden. Indirekt wird hier durch eine Messung von $\alpha 4\beta 7$ auch der Anstieg von CD49d bestätigt [200]. Diese Entwicklung von CD49d war auch bei polyklonaler Stimulation zu beobachten und unterstreicht die These, dass dieser Rezeptor bei Aktivierung allgemein gesteigert wird. Auch wenn der aktivierende Stimulus auf Treg nach Transfer bei GVHD noch immer nicht abschließend identifiziert wurde, deuten die gezeigten Daten darauf hin, dass sowohl Tkonv als auch Treg nach Aktivierung durch einen allogenen Stimulus CCR4 und CLA exprimieren und dadurch die Fähigkeit für eine Migration in peripheres Gewebe, insbesondere die Haut erlangen. Es bleibt aber zu beachten, dass in der MLR *ex-vivo* isolierte Treg eingesetzt worden waren, unter denen sowohl naive als auch bereits antigenerfahrene Treg auf den allogenen Stimulus reagieren können. Nach polyklonaler Stimulation für adoptiven Transfer liegen dagegen ausschließlich RA-Treg vor, die *in vivo* reaktiviert werden. Um die Situation einer Treg Zelle nach adoptivem Transfer *in vitro* noch genauer zu simulieren, wäre ein MLR mit polyklonal expandierten Treg zielführend. Dies würde eine bessere Aussage erlauben, wie eine allogene Aktivierung nach polyklonalem Stimulus das Homingrezeptorprofil verändert und damit über das Migrationsverhalten von transplantierten Treg.

6 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund eines adoptiven Transfers regulatorischer Spender T-Zellen bei GVHD wurde ihr Homingrezeptorprofil in verschiedenen Situationen untersucht, die in diesem Setting von Bedeutung sind. Es zeigte sich, dass das Homingrezeptorprofil naiver, regulatorischer T-Zellen durch eine polyklonale Expansion - wie sie vor einem potenziellen Transfer erfolgt – nur geringgradig beeinflusst wird. Der Vergleich zu *in vivo* aktivierten Treg verdeutlichte, dass die polyklonale Expansion auf naiven Treg ein weniger umfangreiches Homingrezeptorprofil induzierte als eine *in vivo* Aktivierung. Bereits aktivierte Treg verloren bei dieser *in vitro* Stimulation teilweise ihre peripheren Homingrezeptoren. Durch eine Expansion unter dem Zusatz von all-trans Retinsäure konnte eine spezifische Expression von funktionellen Darmhoming-Rezeptoren induziert werden. Eine allogene *in vitro* Stimulation - die die Situation der Treg nach Transfer bei GVHD simulieren sollte - induzierte vor allem die Expression von Hautrezeptoren.

Zahlreiche Studien, die vergleichend das Homingrezeptorprofil regulatorischer T-Zellen vor und nach Antigenkontakt analysierten, führten zu der Annahme, dass die Aktivierung der Zelle zu einem Wechsel des Homingrezeptorprofils im Sinne einer gesteigerten Expression peripherer Rezeptoren führt. Diese Arbeit zeigte, dass neben einer TCR-Stimulation zahlreiche weitere Faktoren für die Induktion des *in vivo* beobachteten, umfangreichen Homingrezeptorprofils auf antigenerfahrenen Treg entscheidend sein müssen. Die Ergebnisse der allogenen Stimulation weisen auf die Effekte einer antigenspezifischen Aktivierung hin.

Bei detaillierter Analyse der Rezeptoren zeigt sich, dass naive Treg bei polyklonaler Expansion vermehrt CLA und CD49d exprimieren, durch Zusatz von all-trans Retinsäure zusätzlich CCR9 induziert werden kann und durch allogene Stimulation die Expression von CD49d, CLA und CCR4 ansteigt. Eine Expression von CCR4 scheint allgemein von einer antigenspezifischen Aktivierung oder bestimmten kostimulatorischen Molekülen abhängig zu sein. Der Transkriptionsfaktor FOXP3 scheint die Expression von CCR4 zu stabilisieren. CD49d wurde durch alle gewählten *in vitro* Stimulationsbedingungen induziert. Dabei blieb *in vitro* die *in vivo* beobachtete, parallele Entwicklung einer partiellen Negativpopulation aus, die möglicherweise eine Population von Gedächtnis-Treg ist, deren Induktion und Erhalt noch Gegenstand aktueller Forschung ist. Der Rezeptor CLA stieg in allen durchgeführten Versuchen bei

Proliferation an, eine polyklonale Expansion erhielt eine bestehende Expression jedoch nicht aufrecht - sie schien von anderen Faktoren abhängig zu sein. Eine Expression von CCR9 und CCR10 trat bei keiner der durchgeführten Stimulationsmethoden auf, während dagegen die *in vivo* Aktivierung ihre Expression induzierte. Durch den Zusatz von Vitamin A konnte bei polyklonaler Expansion eine funktionelle Expression des Rezeptors CCR9 erreicht werden. Das Vitamin führte zudem tendenziell zu einer Induktion von FOXP3. CD103 schien im Gegensatz zum murinen Organismus auf humanen Treg eine untergeordnete Rolle zu spielen [71].

Derzeit erfolgt von unserer Arbeitsgruppe eine Analyse des Homingrezeptorprofils auf *ex vivo* isolierten Treg von Patienten, die bei steroidrefraktärer aGVHD eine Therapie mittels polyklonal expandierter Spender-Treg erhalten hatten. Damit wird eine genauere Aussage über die Entwicklung peripherer Homingrezeptoren bei Konfrontation mit der alloreaktiven Entzündung im Empfänger möglich sein als bei einer allogenen *in vitro* Stimulation. Dieser Versuch wird wesentliche Hinweise für das Migrationsverhalten transplantierte Treg liefern. Die polyklonale Stimulation hat sich bereits als die effektivste Methode einer Treg Expansion zum adoptiven Transfer etabliert und vermutlich hängt in Folge die Wirkung therapeutisch applizierter Treg von einer raschen und zielgerichteten Migration in das von der GVHD befallene Organ ab. Vor diesem Hintergrund wäre eine Induktion von Homingrezeptoren im Rahmen der polyklonalen Expansion für einen individualisierten, therapeutischen Einsatz der Treg von großem Interesse. Im Mausmodell könnten bereits unter dem Einfluss von ATRA expandierte Treg eingesetzt werden und geprüft, ob durch Induktion intestinaler Homingmoleküle eine verbesserte therapeutische Wirkung bei Darm-GVHD eintritt. Eine Untersuchung der Effekte anderer Vitamine und Reagenzien könnte das Spektrum induzierbarer Rezeptoren erweitern.

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Chemikalien und Reagenzien	38
Tabelle 3.2: Medien, Puffer, Lösungen	39
Tabelle 3.3: Allgemeine Verbrauchsmaterialien	40
Tabelle 3.4: Antikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)	41
Tabelle 3.5: Magnetische Beads	41
Tabelle 3.6: Geräte	42
Tabelle 3.7: Software und Programme	42

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gatingstrategie der FACS-basierten Analyse des Homingrezeptorprofils <i>ex vivo</i> isolierter CD4 ⁺ T-Zellen	53
Abb. 2: Zusammengefasste Daten zur Expression von Homingrezeptoren auf <i>ex vivo</i> isolierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	55
Abb. 3: FACS-basierte Sortierung von CD45RA ⁺ und CD45RA ⁻ Treg und Tkonv	56
Abb. 4: Gatingstrategie der CD4 ⁺ Gesamtpopulation im Rahmen der FACS-basierten Analyse des Homingrezeptorprofils nach polyklonaler Expansion	58
Abb. 5: Gatingstrategie der Homingrezeptoren auf CD4 ⁺ T-Zellen im Rahmen der FACS-basierten Analyse nach polyklonaler Expansion	59
Abb. 6: Expression von Homingrezeptoren auf Subpopulationen CD4 ⁺ T-Zellen nach polyklonaler Expansion	61
Abb. 7: Vergleich der Homingrezeptorexpression vor und nach polyklonaler Expansion von CD4 ⁺ T-Zellen.....	63
Abb. 8: Analyse der MFI von CD49d von CD4 ⁺ T-Zellen vor und nach polyklonaler Expansion	64
Abb. 9: Homingrezeptorprofil CD4 ⁺ T-Zellen nach Expansion mit ATRA.....	68
Abb. 10: Migrationsassay mit RA ⁺ Treg nach Expansion unter ATRA-Zusatz	69
Abb. 11: FOXP3 Expression bei polyklonaler Expansion CD4 ⁺ T-Zellen mit ATRA ..	70
Abb. 12: Gatingstrategie der FACS-basierten Analyse des Homingrezeptorprofils CD4 ⁺ T-Zellen nach allogener <i>in vitro</i> Stimulation.....	72
Abb. 13: Homingrezeptorprofil CD4 ⁺ T-Zellen nach allogener <i>in vitro</i> Stimulation.....	74

8 Literaturverzeichnis

1. Kenneth Murphy. Basic concepts in Immunology. In *Janeways's Immunobiology* (9th ed., pp. 3–25).
2. Kenneth Murphy C W. Antigen presentation to T Lymphocytes: The major histocompatibility complex and its function. In *Janeways's Immunobiology* (9th ed., pp. 231–238).
3. Kenneth Murphy C W. Lymphocyte receptor signaling: Antigen receptor signaling and lymphocyte activation. In *Janeways's Immunobiology* (9th ed., pp. 265–272).
4. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Immune Receptors and Signal Transduction. In Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai (Ed.), *Cellular and molecular immunology* (7th ed., pp. 139–159).
5. Frauwirth K A, Thompson C B. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* 2002;109(3): 295–299.
6. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: Keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 2003;3(8): 609–620.
7. Sharpe A H, Freeman G J. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2(2): 116–126.
8. Kappler J W, Roehm N, Murrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987;49(2): 273–280.
9. Gershon R K, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18(5): 723–737.
10. Penhale W J, Farmer A, McKenna R P, et al. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin Exp Immunol* 1973;15(2): 225–236.
11. Penhale W J, Farmer A, Irvine W J. Thyroiditis in T cell-depleted rats. Influence of strain, radiation dose, adjuvants and antilymphocyte serum. *Clin Exp Immunol* 1975;21(3): 362–375.
12. Penhale W J, Irvine W J, Inglis J R, et al. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clin Exp Immunol* 1976;25(1): 6–16.
13. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in

- normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med* 1982;156(6): 1577–1586.
14. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155(3): 1151–1164.
 15. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996;184(2): 387–396.
 16. Baecher-Allan C, Brown J A, Freeman G J, et al. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167(3): 1245–1253.
 17. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, et al. Ex Vivo Isolation and Characterization of Cd4+Cd25+ T Cells with Regulatory Properties from Human Blood. *Journal of Experimental Medicine* 2001;193(11): 1303–1310.
 18. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, et al. Identification and Functional Characterization of Human Cd4+Cd25+ T Cells with Regulatory Properties Isolated from Peripheral Blood. *Journal of Experimental Medicine* 2001;193(11): 1285–1294.
 19. Levings M K, Sangregorio R, Roncarolo M-G. Human Cd25+Cd4+ T Regulatory Cells Suppress Naive and Memory T Cell Proliferation and Can Be Expanded in Vitro without Loss of Function. *Journal of Experimental Medicine* 2001;193(11): 1295–1302.
 20. Bensing S J, Bandeira A, Jordan M S, et al. Major Histocompatibility Complex Class II-Positive Cortical Epithelium Mediates the Selection of Cd4+25+ Immunoregulatory T Cells. *Journal of Experimental Medicine* 2001;194(4): 427–438.
 21. Jordan M S, Boesteanu A, Reed A J, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001;2(4): 301–306.
 22. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 2012;37(5): 785–799.

23. Fontenot J D, Rasmussen J P, Gavin M A, et al. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005;6(11): 1142–1151.
24. Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, et al. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* 2005;6(2): 152–162.
25. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162(9): 5317–5326.
26. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3(2): 135–142.
27. McHugh R S, Whitters M J, Piccirillo C A, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16(2): 311–323.
28. Huang C-T, Workman C J, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004;21(4): 503–513.
29. Liang B, Workman C, Lee J, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 2008;180(9): 5916–5926.
30. Wing K, Suri-Payer E, Rudin A. CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scand J Immunol* 2005;62(1): 1–15.
31. Allan S E, Crome S Q, Crellin N K, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 2007;19(4): 345–354.
32. Aerts N E, Dombrecht E J, Ebo D G, et al. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 2008;251(2): 109–115.
33. Godfrey V L, Wilkinson J E, Russell L B. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol* 1991;138(6): 1379–1387.
34. Brunkow M E, Jeffery E W, Hjerrild K A, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27(1): 68–73.

35. Wildin R S, Ramsdell F, Peake J, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001;27(1): 18–20.
36. Chatila T A, Blaeser F, Ho N, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000;106(12): 81.
37. Bennett C L, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27(1): 20–21.
38. Powell B R, Buist N R, Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr* 1982;100(5): 731–737.
39. Godfrey V L, Rouse B T, Wilkinson J E. Transplantation of T cell-mediated, lymphoreticular disease from the scurfy (sf) mouse. *Am J Pathol* 1994;145(2): 281–286.
40. Bassuny W M, Ihara K, Sasaki Y, et al. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2003;55(3): 149–156.
41. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299(5609): 1057–1061.
42. Khattri R, Cox T, Yasayko S-A, et al. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4(4): 337–342.
43. Ziegler S F. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24: 209–226.
44. Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, et al. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* 2000;12(8): 1145–1155.
45. Pereira L M S, Gomes S T M, Ishak R, et al. Regulatory T Cell and Forkhead Box Protein 3 as Modulators of Immune Homeostasis. *Front Immunol* 2017;8: 605.
46. Gavin M A, Rasmussen J P, Fontenot J D, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007;445(7129): 771–775.
47. Wan Y Y, Flavell R A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007;445(7129): 766–770.

48. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2005;102(14): 5138–5143.
49. Lin W, Haribhai D, Relland L M, et al. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* 2007;8(4): 359–368.
50. Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4(4): 330–336.
51. Li C, Ebert P J R, Li Q-J. T cell receptor (TCR) and transforming growth factor β (TGF- β) signaling converge on DNA (cytosine-5)-methyltransferase to control forkhead box protein 3 (foxp3) locus methylation and inducible regulatory T cell differentiation. *J Biol Chem* 2013;288(26): 19127–19139.
52. Williams L M, Rudensky A Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007;8(3): 277–284.
53. Nair V S, Song M H, Ko M, et al. DNA Demethylation of the Foxp3 Enhancer Is Maintained through Modulation of Ten-Eleven-Translocation and DNA Methyltransferases. *Mol Cells* 2016;39(12): 888–897.
54. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol* 2017;17(11): 703–717.
55. Sallusto F, Lenig D, Förster R, et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401(6754): 708–712.
56. Michie C A, McLean A, Alcock C, et al. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 1992;360(6401): 264–265.
57. Lynch K W, Weiss A. A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras. *Mol Cell Biol* 2000;20(1): 70–80.
58. Hermiston M L, Xu Z, Weiss A. CD45: A critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21: 107–137.
59. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009;30(6): 899–911.

60. Valmori D, Merlo A, Souleimanian N E, et al. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Invest* 2005;115(7): 1953–1962.
61. Booth N J, McQuaid A J, Sobande T, et al. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol* 2010;184(8): 4317–4326.
62. Hoffmann P, Eder R, Boeld T J, et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 2006;108(13): 4260–4267.
63. Fritzsching B, Oberle N, Pauly E, et al. Naive regulatory T cells: A novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood* 2006;108(10): 3371–3378.
64. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye S G, et al. Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood* 2006;107(7): 2830–2838.
65. Smigiel K S, Richards E, Srivastava S, et al. CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. *J Exp Med* 2014;211(1): 121–136.
66. Levine A G, Arvey A, Jin W, et al. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat Immunol* 2014;15(11): 1070–1078.
67. Li M O, Rudensky A Y. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol* 2016;16(4): 220–233.
68. Ito T, Hanabuchi S, Wang Y-H, et al. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008;28(6): 870–880.
69. Kimmig S, Przybylski G K, Schmidt C A, et al. Two Subsets of Naive T Helper Cells with Distinct T Cell Receptor Excision Circle Content in Human Adult Peripheral Blood. *Journal of Experimental Medicine* 2002;195(6): 789–794.
70. Lee J H, Kang S G, Kim C H. FoxP3+ T Cells Undergo Conventional First Switch to Lymphoid Tissue Homing Receptors in Thymus but Accelerated Second Switch to Nonlymphoid Tissue Homing Receptors in Secondary Lymphoid Tissues. *J Immunol* 2006;178(1): 301–311.
71. Lim H W, Broxmeyer H E, Kim C H. Regulation of Trafficking Receptor Expression in Human Forkhead Box P3+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 2006;177(2): 840–851.

72. Vahl J C, Drees C, Heger K, et al. Continuous T cell receptor signals maintain a functional regulatory T cell pool. *Immunity* 2014;41(5): 722–736.
73. Ng W F, Duggan P J, Ponchel F, et al. Human CD4(+)CD25(+) cells: A naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001;98(9): 2736–2744.
74. Luo C T, Liao W, Dadi S, et al. Graded Foxo1 activity in Treg cells differentiates tumour immunity from spontaneous autoimmunity. *Nature* 2016;529(7587): 532–536.
75. Bensinger S J, Walsh P T, Zhang J, et al. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172(9): 5287–5296.
76. Campbell D J. Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. *The Journal of Immunology* 2015;195(6): 2507–2513.
77. Sarris M, Andersen K G, Randow F, et al. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 2008;28(3): 402–413.
78. Fallarino F, Grohmann U, Hwang K W, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4(12): 1206–1212.
79. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007;110(4): 1225–1232.
80. Yu X, Harden K, Gonzalez L C, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 2009;10(1): 48–57.
81. Chaturvedi V, Collison L W, Guy C S, et al. Retraction. Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol* 2013;191(4): 2018.
82. Josefowicz S Z, Lu L-F, Rudensky A Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012;30: 531–564.
83. Abbas A K, Benoist C, Bluestone J A, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 2013;14(4): 307–308.
84. Josefowicz S Z, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009;30(5): 616–625.
85. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, et al. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005;6(12): 1219–1227.

86. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013;504(7480): 446–450.
87. Coombes J L, Siddiqui K R R, Arancibia-Cárcamo C V, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine* 2007;204(8): 1757–1764.
88. Thornton A M, Korty P E, Tran D Q, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010;184(7): 3433–3441.
89. Weiss J M, Bilate A M, Gobert M, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* 2012;209(10): 1723-42, S1.
90. Gottschalk R A, Corse E, Allison J P. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2012;188(3): 976–980.
91. Petzold C, Steinbronn N, Gereke M, et al. Fluorochrome-based definition of naturally occurring Foxp3(+) regulatory T cells of intra- and extrathymic origin. *Eur J Immunol* 2014;44(12): 3632–3645.
92. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine* 2003;198(12): 1875–1886.
93. Koenecke C, Czeloth N, Bubke A, et al. Alloantigen-specific de novo-induced Foxp3+ Treg revert in vivo and do not protect from experimental GVHD. *Eur J Immunol* 2009;39(11): 3091–3096.
94. Floess S, Freyer J, Siewert C, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007;5(2): e38.
95. Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006;354(11): 1166–1176.
96. Peter Dreger, Dietrich Wilhelm Beelen, Martin Bornhäuser, Hermann Einsele, Nicolaus Kröger, Jakob Passweg, Robert Zeiser 2016. Indikationen der allogenen Stammzelltransplantation.
97. Storb R. Reduced-intensity conditioning transplantation in myeloid malignancies. *Curr Opin Oncol* 2009;21 Suppl 1: S3-5.

98. Bornhäuser M, Kienast J, Trenschele R, et al. Reduced-intensity conditioning versus standard conditioning before allogeneic haemopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia in first complete remission: A prospective, open-label randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2012;13(10): 1035–1044.
99. Gyurkocza B, Sandmaier B M. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: One size does not fit all. *Blood* 2014;124(3): 344–353.
100. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, et al. Pillars Article: CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell*. 1999. 99: 23-33. *J Immunol* 2016;196(1): 5–15.
101. Luznik L, O'Donnell P V, Symons H J, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(6): 641–650.
102. Gerhard Ehninger 2014. Richtlinie: Hämatopoetische Stammzelltransplantation.
103. Martin P J, Levine D M, Storer B E, et al. Genome-wide minor histocompatibility matching as related to the risk of graft-versus-host disease. *Blood* 2017;129(6): 791–798.
104. Santos N, Rodríguez-Romanos R, Nieto J B, et al. UGT2B17 minor histocompatibility mismatch and clinical outcome after HLA-identical sibling donor stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2016;51(1): 79–82.
105. Hambach L, Spierings E, Goulmy E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Minor histocompatibility antigens. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20(2): 171–187.
106. Weiden P L, Flournoy N, Thomas E D, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979;300(19): 1068–1073.
107. Truitt R L, Johnson B D. Principles of graft-vs.-leukemia reactivity. *Biol Blood Marrow Transplant* 1995;1(2): 61–68.
108. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998;339(17): 1186–1193.

109. Zecca M, Strocchio L, Pagliara D, et al. HLA-haploidentical T cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with Fanconi anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(4): 571–576.
110. Goldman J M, Gale R P, Horowitz M M, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 1988;108(6): 806–814.
111. Kolb H J, Mittermüller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76(12): 2462–2465.
112. Raiola A M, Van Lint, M T, Valbonesi M, et al. Factors predicting response and graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions: a study on 593 infusions. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(8): 687–693.
113. Keever C A, Small T N, Flomenberg N, et al. Immune reconstitution following bone marrow transplantation: Comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts. *Blood* 1989;73(5): 1340–1350.
114. Jagasia M H, Greinix H T, Arora M, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(3): 389-401.e1.
115. Zeiser R, Blazar B R. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med* 2017;377(22): 2167–2179.
116. Shono Y, Ueha S, Wang Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: Early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2010;115(26): 5401–5411.
117. Harris A C, Young R, Devine S, et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22(1): 4–10.
118. Robert Zeiser, Daniel Wolff, Christof Scheid, Thomas Luft, Hildegard Greinix, Peter Dreger, Jürgen Finke, Ernst Holler 2018. Allogene Stammzelltransplantation Graft-versus-Host-Erkrankung akut.

119. Hill G R, Ferrara J L. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: Rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95(9): 2754–2759.
120. Hill G R, Crawford J M, Cooke K R, et al. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: The role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997;90(8): 3204–3213.
121. Hill G R, Teshima T, Gerbitz A, et al. Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *J Clin Invest* 1999;104(4): 459–467.
122. Ferrara J L, Smith C M, Sheets J, et al. Altered homeostatic regulation of innate and adaptive immunity in lower gastrointestinal tract GVHD pathogenesis. *J Clin Invest* 2017;127(7): 2441–2451.
123. Wilhelm K, Ganesan J, Müller T, et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* 2010;16(12): 1434–1438.
124. Heidegger S, van den Brink M R M, Haas T, et al. The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Front Immunol* 2014;5: 337.
125. Blazar B R, Murphy W J, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012;12(6): 443–458.
126. Cooke K R, Gerbitz A, Crawford J M, et al. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2001;107(12): 1581–1589.
127. Heimesaat M M, Nogai A, Bereswill S, et al. MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. *Gut* 2010;59(8): 1079–1087.
128. Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, et al. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med* 2014;20(6): 648–654.
129. Reinhardt K, Foell D, Vogl T, et al. Monocyte-induced development of Th17 cells and the release of S100 proteins are involved in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *J Immunol* 2014;193(7): 3355–3365.

130. Riesner K, Shi Y, Jacobi A, et al. Initiation of acute graft-versus-host disease by angiogenesis. *Blood* 2017;129(14): 2021–2032.
131. Nestel F P. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *Journal of Experimental Medicine* 1992;175(2): 405–413.
132. Koyama M, Kuns R D, Olver S D, et al. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med* 2011;18(1): 135–142.
133. Koyama M, Cheong M, Markey K A, et al. Donor colonic CD103+ dendritic cells determine the severity of acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2015;212(8): 1303–1321.
134. Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens: New concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev* 1997;157: 125–140.
135. Schönle A, Hartl F A, Mentzel J, et al. Caveolin-1 regulates TCR signal strength and regulatory T-cell differentiation into alloreactive T cells. *Blood* 2016;127(15): 1930–1939.
136. Briones J, Novelli S, Sierra J. T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus-host disease: Therapeutic implications. *Bone Marrow Res* 2011;2011: 976793.
137. Klämbt V, Wohlfeil S A, Schwab L, et al. A Novel Function for P2Y2 in Myeloid Recipient-Derived Cells during Graft-versus-Host Disease. *J Immunol* 2015;195(12): 5795–5804.
138. Antin J H, Ferrara J L. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992;80(12): 2964–2968.
139. Sackstein R. A revision of Billingham's tenets: The central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(1 Suppl 1): 2–8.
140. Braun M Y, Lowin B, French L, et al. Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Journal of Experimental Medicine* 1996;183(2): 657–661.
141. Graubert T A, Russell J H, Ley T J. The role of granzyme B in murine models of acute graft-versus-host disease and graft rejection. *Blood* 1996;87(4): 1232–1237.

142. Madara J L, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1989;83(2): 724–727.
143. Greinix H T, Worel N, Just U, et al. Extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease. *Transfus Apher Sci* 2014;50(3): 349–357.
144. Mottet C, Uhlig H H, Powrie F. Cutting edge: Cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;170(8): 3939–3943.
145. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, et al. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002;196(3): 389–399.
146. Taylor P A, Noelle R J, Blazar B R. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 2001;193(11): 1311–1318.
147. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9(9): 1144–1150.
148. Cohen J L, Trenado A, Vasey D, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002;196(3): 401–406.
149. Jones S C, Murphy G F, Korngold R. Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9(4): 243–256.
150. Taylor P A, Lees C J, Blazar B R. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99(10): 3493–3499.
151. Xia G, Kovochich M, Truitt R L, et al. Tracking ex vivo-expanded CD4+CD25+ and CD8+CD25+ regulatory T cells after infusion to prevent donor lymphocyte infusion-induced lethal acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10(11): 748–760.
152. Nguyen V H, Zeiser R, Dasilva D L, et al. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 2007;109(6): 2649–2656.

153. Pierini A, Strober W, Moffett C, et al. TNF- α priming enhances CD4 + FoxP3 + regulatory T-cell suppressive function in murine GVHD prevention and treatment. *Blood* 2016;128(6): 866–871.
154. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6(4): 345–352.
155. Edinger M. Regulatory T cells for the prevention of graft-versus-host disease: Professionals defeat amateurs. *Eur J Immunol* 2009;39(11): 2966–2968.
156. Hanash A M, Levy R B. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2005;105(4): 1828–1836.
157. Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, et al. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood* 2004;103(11): 4216–4221.
158. Trenado A, Charlotte F, Fisson S, et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 2003;112(11): 1688–1696.
159. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, et al. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 2005;105(5): 2220–2226.
160. Nguyen V H, Shashidhar S, Chang D S, et al. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2008;111(2): 945–953.
161. Teshima T, Ordemann R, Reddy P, et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* 2002;8(6): 575–581.
162. Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, et al. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol* 2003;4(2): 154–160.
163. Li B, New J Y, Tay Y K, et al. Delaying acute graft-versus-host disease in mouse bone marrow transplantation by treating donor cells with antibodies directed at I-

- selectin and alpha4-integrin prior to infusion. *Scand J Immunol* 2004;59(5): 464–468.
164. Chen B J, Cui X, Sempowski G D, et al. Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease. *Blood* 2004;103(4): 1534–1541.
165. Anderson B E, McNiff J, Yan J, et al. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2003;112(1): 101–108.
166. Taylor P A, Panoskaltsis-Mortari A, Swedin J M, et al. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood* 2004;104(12): 3804–3812.
167. Tawara I, Shlomchik W D, Jones A, et al. A crucial role for host APCs in the induction of donor CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated suppression of experimental graft-versus-host disease. *J Immunol* 2010;185(7): 3866–3872.
168. Lin K L, Fulton L M, Berginski M, et al. Intravital imaging of donor allogeneic effector and regulatory T cells with host dendritic cells during GVHD. *Blood* 2014;123(10): 1604–1614.
169. Sarween N, Chodos A, Raykundalia C, et al. CD4+CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion. *J Immunol* 2004;173(5): 2942–2951.
170. Wysocki C A, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar B R, et al. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105(11): 4191–4199.
171. Burzyn D, Benoist C, Mathis D. Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. *Nat Immunol* 2013;14(10): 1007–1013.
172. Kedl R M, Rees W A, Hildeman D A, et al. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *Journal of Experimental Medicine* 2000;192(8): 1105–1113.
173. Haase D, Starke M, Puan K J, et al. Immune modulation of inflammatory conditions: Regulatory T cells for treatment of GvHD. *Immunol Res* 2012;53(1-3): 200–212.
174. Martin G H, Grégoire S, Landau D A, et al. In vivo activation of transferred regulatory T cells specific for third-party exogenous antigen controls GVH disease in mice. *Eur J Immunol* 2013;43(9): 2263–2272.

175. Brunstein C G, Miller J S, Cao Q, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 2011;117(3): 1061–1070.
176. Edinger M, Hoffmann P. Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Curr Opin Immunol* 2011;23(5): 679–684.
177. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117(14): 3921–3928.
178. Martelli M F, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood* 2014;124(4): 638–644.
179. Theil A, Tuve S, Oelschlägel U, et al. Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease. *Cytotherapy* 2015;17(4): 473–486.
180. EU Clinical Trials Register Service 2018. The European Union Clinical Trials Register.
181. Romano M, Tung S L, Smyth L A, et al. Treg therapy in transplantation: A general overview. *Transpl Int* 2017;30(8): 745–753.
182. MacDonald K G, Hoeppli R E, Huang Q, et al. Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *J Clin Invest* 2016;126(4): 1413–1424.
183. Hoffmann P, Boeld T J, Eder R, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol* 2009;39(4): 1088–1097.
184. Putnam A L, Brusko T M, Lee M R, et al. Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2009;58(3): 652–662.
185. Deknuydt F, Bioley G, Valmori D, et al. IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin Immunol* 2009;131(2): 298–307.
186. Koenen, Hans J P M, Smeets R L, Vink P M, et al. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 2008;112(6): 2340–2352.
187. Huehn J, Polansky J K, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: The key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* 2009;9(2): 83–89.

188. Fuhlbrigge R C, King S L, Dimitroff C J, et al. Direct Real-Time Observation of E- and P-Selectin-Mediated Rolling on Cutaneous Lymphocyte-Associated Antigen Immobilized on Western Blots. *J Immunol* 2002;168(11): 5645–5651.
189. Weninger W, Ulfman L H, Cheng G, et al. Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. *Immunity* 2000;12(6): 665–676.
190. Dudda J C, Perdue N, Bachtanian E, et al. Foxp3+ regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *J Exp Med* 2008;205(7): 1559–1565.
191. Siegmund K, Feuerer M, Siewert C, et al. Migration matters: Regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* 2005;106(9): 3097–3104.
192. Hirahara K, Liu L, Clark R A, et al. The majority of human peripheral blood CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol* 2006;177(7): 4488–4494.
193. Iellem A, Colantonio L, D'Ambrosio D. Skin-versus gut-skewed homing receptor expression and intrinsic CCR4 expression on human peripheral blood CD4+CD25+ suppressor T cells. *Eur J Immunol* 2003;33(6): 1488–1496.
194. Issa F, Hester J, Milward K, et al. Homing of regulatory T cells to human skin is important for the prevention of alloimmune-mediated pathology in an in vivo cellular therapy model. *PLoS ONE* 2012;7(12): e53331.
195. Chong B F, Murphy J-E, Kupper T S, et al. E-selectin, thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17, and intercellular adhesion molecule-1 are constitutively coexpressed in dermal microvessels: A foundation for a cutaneous immunosurveillance system. *J Immunol* 2004;172(3): 1575–1581.
196. Sather B D, Treuting P, Perdue N, et al. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *Journal of Experimental Medicine* 2007;204(6): 1335–1347.
197. Griffith J W, Sokol C L, Luster A D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 2014;32: 659–702.
198. Tang H L. Chemokine Up-Regulation and Activated T Cell Attraction by Maturing Dendritic Cells. *Science* 1999;284(5415): 819–822.

199. Iellem A, Mariani M, Lang R, et al. Unique Chemotactic Response Profile and Specific Expression of Chemokine Receptors Ccr4 and Ccr8 by Cd4 + Cd25 + Regulatory T Cells. *Journal of Experimental Medicine* 2001;194(6): 847–854.
200. Lee J H, Kang S G, Kim C H. FoxP3+ T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in secondary lymphoid tissues. *J Immunol* 2007;178(1): 301–311.
201. Yuan Q, Bromley S K, Means T K, et al. CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *Journal of Experimental Medicine* 2007;204(6): 1327–1334.
202. Eksteen B, Miles A, Curbishley S M, et al. Epithelial inflammation is associated with CCL28 production and the recruitment of regulatory T cells expressing CCR10. *J Immunol* 2006;177(1): 593–603.
203. Homey B, Alenius H, Müller A, et al. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 2002;8(2): 157–165.
204. Cepek K L, Parker C M, Madara J L, et al. Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol* 1993;150(8 Pt 1): 3459–3470.
205. Geiger B, Ayalon O. Cadherins. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8: 307–332.
206. Huehn J, Siegmund K, Lehmann J C U, et al. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* 2004;199(3): 303–313.
207. Strauch U G, Mueller R C, Li X Y, et al. Integrin alpha E(CD103)beta 7 mediates adhesion to intestinal microvascular endothelial cell lines via an E-cadherin-independent interaction. *J Immunol* 2001;166(5): 3506–3514.
208. Suffia I, Reckling S K, Salay G, et al. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol* 2005;174(9): 5444–5455.
209. Annacker O, Coombes J L, Malmstrom V, et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *Journal of Experimental Medicine* 2005;202(8): 1051–1061.

210. Papadakis K A, Prehn J, Nelson V, et al. The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *J Immunol* 2000;165(9): 5069–5076.
211. Rivera-Nieves J, Ho J, Bamias G, et al. Antibody blockade of CCL25/CCR9 ameliorates early but not late chronic murine ileitis. *Gastroenterology* 2006;131(5): 1518–1529.
212. Hosoe N, Miura S, Watanabe C, et al. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286(3): G458-66.
213. Saruta M, Yu Q T, Avanesyan A, et al. Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *J Immunol* 2007;178(5): 3293–3300.
214. Uehara S, Grinberg A, Farber J M, et al. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol* 2002;168(6): 2811–2819.
215. Berlin C, Bargatze R F, Campbell J J, et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80(3): 413–422.
216. Berlin C, Berg E L, Briskin M J, et al. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993;74(1): 185–195.
217. Hamann A, Andrew D P, Jablonski-Westrich D, et al. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol* 1994;152(7): 3282–3293.
218. Polman C H, O'Connor P W, Havrdova E, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354(9): 899–910.
219. Feagan B G, Rutgeerts P, Sands B E, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2013;369(8): 699–710.
220. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Leucocyte migration into tissues. In Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai (Ed.), *Cellular and molecular immunology* (7th ed., pp. 37–51).

221. Kenneth Murphy C W. The induced response of innate immunity: Microbial recognition and tissue damage initiate an inflammatory response. In *Janeway's Immunobiology* (9th ed., pp. 85–87).
222. Szanya V, Ermann J, Taylor C, et al. The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol* 2002;169(5): 2461–2465.
223. Kenneth Murphy C W. T-cell mediated immunity: Development and function of secondary lymphoid organs - sites for the initiation of adaptive immune responses. In *Janeway's Immunobiology* (9th ed., pp. 347–356).
224. Campbell D J, Koch M A. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011;11(2): 119–130.
225. Kenneth Murphy C W. Integrated Dynamics of innate and adaptive immunity: effector t cells augment the effector functions of innate immune cells. In *Janeway's Immunobiology* (9th ed., pp. 452–457).
226. Siewert C, Menning A, Dudda J, et al. Induction of organ-selective CD4+ regulatory T cell homing. *Eur J Immunol* 2007;37(4): 978–989.
227. Campbell D J, Butcher E C. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *Journal of Experimental Medicine* 2002;195(1): 135–141.
228. Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 2008;205(9): 2139–2149.
229. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, et al. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004;21(4): 527–538.
230. Mora J R, Cheng G, Picarella D, et al. Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *Journal of Experimental Medicine* 2005;201(2): 303–316.
231. Campbell D J, Butcher E C. Rapid Acquisition of Tissue-specific Homing Phenotypes by CD4 + T Cells Activated in Cutaneous or Mucosal Lymphoid Tissues. *Journal of Experimental Medicine* 2002;195(1): 135–141.
232. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes G F, et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol* 2007;8(3): 285–293.

233. Chaudhry A, Rudensky A Y. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. *J Clin Invest* 2013;123(3): 939–944.
234. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon P P, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *Journal of Experimental Medicine* 1998;187(1): 129–134.
235. Koch M A, Thomas K R, Perdue N R, et al. T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor β 2. *Immunity* 2012;37(3): 501–510.
236. Koch M A, Tucker-Heard G's, Perdue N R, et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 2009;10(6): 595–602.
237. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 2009;326(5955): 986–991.
238. Quah B J C, Parish C R. New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *J Immunol Methods* 2012;379(1-2): 1–14.
239. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart L A, et al. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004;104(3): 895–903.
240. Gavin M A, Torgerson T R, Houston E, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2006;103(17): 6659–6664.
241. Henson S M, Riddell N E, Akbar A N. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. *Curr Opin Immunol* 2012;24(4): 476–481.
242. Bluestone J A, Buckner J H, Fitch M, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 2015;7(315): 315ra189.
243. Chakraborty R, Rooney C, Dotti G, et al. Changes in chemokine receptor expression of regulatory T cells after ex vivo culture. *J Immunother* 2012;35(4): 329–336.
244. Duhén T, Duhén R, Lanzavecchia A, et al. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood* 2012;119(19): 4430–4440.

245. Butcher E C, Picker L J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272(5258): 60–66.
246. Rosenblum M D, Way S S, Abbas A K. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol* 2016;16(2): 90–101.
247. Sanchez A M, Zhu J, Huang X, et al. The development and function of memory regulatory T cells after acute viral infections. *J Immunol* 2012;189(6): 2805–2814.
248. Sanchez Rodriguez R, Pauli M L, Neuhaus I M, et al. Memory regulatory T cells reside in human skin. *J Clin Invest* 2014;124(3): 1027–1036.
249. Ali N, Rosenblum M D. Regulatory T cells in skin. *Immunology* 2017;152(3): 372–381.
250. Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D, et al. CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood* 2009;113(4): 827–836.
251. Pabbisetty S K, Rabacal W, Volanakis E J, et al. Peripheral tolerance can be modified by altering KLF2-regulated Treg migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113(32): E4662-70.
252. Lamers C H, van de Griend R J, Braakman E, et al. Optimization of culture conditions for activation and large-scale expansion of human T lymphocytes for bispecific antibody-directed cellular immunotherapy. *Int J Cancer* 1992;51(6): 973–979.
253. Imboden J B, Weiss A, Stobo J D. Transmembrane signalling by the T3-antigen receptor complex. *Immunol Today* 1985;6(11): 328–331.
254. Clark E A, Ledbetter J A. Amplification of the immune response by agonistic antibodies. *Immunol Today* 1986;7(9): 267–270.
255. Esensten J H, Helou Y A, Chopra G, et al. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* 2016;44(5): 973–988.
256. Trickett A, Kwan Y L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods* 2003;275(1-2): 251–255.
257. Chen Y-B, Kim H T, McDonough S, et al. Up-Regulation of alpha4beta7 integrin on peripheral T cell subsets correlates with the development of acute intestinal graft-versus-host disease following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15(9): 1066–1076.

258. Engelhardt B G, Jagasia M, Savani B N, et al. Regulatory T cell expression of CLA or $\alpha(4)\beta(7)$ and skin or gut acute GVHD outcomes. *Bone Marrow Transplant* 2011;46(3): 436–442.
259. Engelhardt B G, Sengsayadeth S M, Jagasia M, et al. Tissue-specific regulatory T cells: Biomarker for acute graft-vs-host disease and survival. *Exp Hematol* 2012;40(12): 974-982.e1.
260. Rivera-Nieves J, Olson T, Bamias G, et al. L-Selectin, 4 1, and 4 7 Integrins Participate in CD4+ T Cell Recruitment to Chronically Inflamed Small Intestine. *J Immunol* 2005;174(4): 2343–2352.
261. Tang Q, Henriksen K J, Boden E K, et al. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;171(7): 3348–3352.
262. Tan A H-M, Wong S-C, Lam K-P. Regulation of mouse inducible costimulator (ICOS) expression by Fyn-NFATc2 and ERK signaling in T cells. *J Biol Chem* 2006;281(39): 28666–28678.
263. Yoshinaga S K, Whoriskey J S, Khare S D, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999;402(6763): 827–832.
264. Delacher M, Imbusch C D, Weichenhan D, et al. Genome-wide DNA-methylation landscape defines specialization of regulatory T cells in tissues. *Nat Immunol* 2017;18(10): 1160–1172.
265. McMurchy A N, Gillies J, Gizzi M C, et al. A novel function for FOXP3 in humans: Intrinsic regulation of conventional T cells. *Blood* 2013;121(8): 1265–1275.
266. Burmeister Y, Lischke T, Dahler A C, et al. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008;180(2): 774–782.
267. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler D A. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol* 2006;176(8): 4622–4631.
268. Gratz I K, Truong H-A, Yang S H-Y, et al. Cutting Edge: Memory regulatory t cells require IL-7 and not IL-2 for their maintenance in peripheral tissues. *J Immunol* 2013;190(9): 4483–4487.
269. Smith P M, Howitt M R, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013;341(6145): 569–573.

270. Zhang N, Schröppel B, Lal G, et al. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* 2009;30(3): 458–469.
271. Zhang Z, Zhang W, Guo J, et al. Activation and Functional Specialization of Regulatory T Cells Lead to the Generation of Foxp3 Instability. *J Immunol* 2017;198(7): 2612–2625.
272. Chen X, Dodge J, Komorowski R, et al. A critical role for the retinoic acid signaling pathway in the pathophysiology of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2013;121(19): 3970–3980.
273. Raverdeau M, Mills K H G. Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic Acid. *J Immunol* 2014;192(7): 2953–2958.
274. Kang S G, Park J, Cho J Y, et al. Complementary roles of retinoic acid and TGF- β 1 in coordinated expression of mucosal integrins by T cells. *Mucosal Immunol* 2011;4(1): 66–82.
275. Lu L, Lan Q, Li Z, et al. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(33): E3432-40.
276. Kang S G, Lim H W, Andrisani O M, et al. Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;179(6): 3724–3733.
277. DePaolo R W, Abadie V, Tang F, et al. Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature* 2011;471(7337): 220–224.
278. Candia E, Reyes P, Covian C, et al. Single and combined effect of retinoic acid and rapamycin modulate the generation, activity and homing potential of induced human regulatory T cells. *PLoS ONE* 2017;12(7): e0182009.
279. Menning A, Loddenkemper C, Westendorf A M, et al. Retinoic acid-induced gut tropism improves the protective capacity of Treg in acute but not in chronic gut inflammation. *Eur J Immunol* 2010;40(9): 2539–2548.
280. Coghill J M, Fowler K A, West M L, et al. CC chemokine receptor 8 potentiates donor Treg survival and is critical for the prevention of murine graft-versus-host disease. *Blood* 2013;122(5): 825–836.

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Matthias Edinger, von dem ich als Doktorvater und Betreuer ein hohes Maß an individueller Förderung erfahren habe. Eine spannende Fragestellung, die Integration in eine hervorragende Forschungsgruppe und aufrichtiger Austausch haben mir einen idealen Start in die Wissenschaft ermöglicht. Ich bedanke mich bei Frau PD Petra Hoffmann für die Begleitung durch diese Arbeit mit einzigartiger fachlicher Kompetenz, Diskussionsbereitschaft und konstruktiver Kritik. Dies hat mir nachhaltig einen hohen Anspruch an wissenschaftliches Arbeiten vermittelt. Ich danke Herrn Prof. Wolfgang Herr, dass ich als Doktorandin Teil der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Universität Regensburg werden konnte. Diese Abteilung stellte durch die vielfältige wissenschaftliche Aktivität und den menschlichen Zusammenhalt ein einzigartiges Umfeld dar. In besonderem Maße danke ich Frau Dr. Christin Riegel für den hervorragenden fachlichen Austausch sowie Rüdiger Eder und den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Edinger/Hoffmann“ für die Begleitung meines Projekts. Christina Kohlbeck danke ich für die Beratung bei der Ausgestaltung meiner Arbeit.

Mein größter Dank richtet sich schließlich an meine Familie, die mir durch die besten Voraussetzungen für meinen Lebensweg diese Arbeit erst ermöglichte.

