

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

Die Bedeutung von TNFR2-Expression auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für  
die Entwicklung regulatorischer T-Zellen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
David Zeller

2020



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

Die Bedeutung von TNFR2-Expression auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für  
die Entwicklung regulatorischer T-Zellen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
David Zeller

2020

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Daniela Männel

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung:

09.02.2021

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	TNF UND TNF REZEPTOREN.....	1
1.1.1	Rezeptoren der TNF Superfamilie (TNFRSF).....	1
1.1.2	TNF-Rezeptoren .....	1
1.1.2.1	TNFR1 .....	2
1.1.2.2	TNFR2.....	3
1.1.2.3	Crosstalk .....	3
1.1.3	Liganden der TNF Superfamilie.....	4
1.1.4	Tumornekrosefaktor .....	4
1.1.4.1	Entdeckung des Tumornekrosefaktors .....	4
1.1.4.2	Struktur des Tumornekrosefaktors.....	5
1.1.4.3	Funktion des Tumornekrosefaktors .....	5
1.1.4.4	Klinische Bedeutung von TNF .....	6
1.1.5	TNCscTNF80 (STAR2) .....	6
1.2	REGULATORISCHE T-ZELLEN (TREG).....	7
1.2.1	Geschichte.....	7
1.2.2	Phänotyp.....	7
1.2.3	Natürliche Treg und induzierte Treg .....	8
1.2.4	Funktion .....	9
1.2.4.1	Zelluläre Mechanismen .....	10
1.2.4.2	Humorale Mechanismen .....	10
1.2.5	Klinische Bedeutung der Treg .....	11
1.3	ZIEL DIESER ARBEIT.....	11
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>13</b>
2.1	MATERIAL .....	13
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	13
2.1.2	Medien und Puffer.....	14
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	14
2.1.4	Kits (Zellisolation, Treg Expansion) .....	15
2.1.5	Verwendete Antikörper.....	15
2.1.6	Verwendete Geräte .....	16
2.1.7	TNCscTNF80 (STAR2) .....	17
2.1.8	Mäuse .....	17
2.1.8.1	Tierhaltung .....	17

2.1.8.2	57BL/6 .....	17
2.1.8.3	TNFR2 <sup>-/-</sup> .....	17
2.1.8.4	TNFR2 <sup>fl/fl</sup> .....	17
2.1.8.5	CD4 <sup>cre</sup> /TNFR2 <sup>fl/fl</sup> .....	18
2.1.9	Software.....	18
2.2	METHODEN .....	18
2.2.1	Zellkulturbedingungen .....	18
2.2.2	Beurteilung der Proliferationsrate mit Hilfe von CFSE .....	19
2.2.2.1	Durchführung .....	20
2.2.3	Durchflusszytometrie.....	21
2.2.3.1	Oberflächenfärbung .....	22
2.2.3.2	Intrazelluläre Färbung mit FoxP3.....	22
2.2.3.3	Durchflusszytometrische Analyse .....	23
2.2.4	MACS und FACS .....	24
2.2.5	T-Zell-Proliferationsassay.....	26
2.2.6	Treg-Expansionsassay.....	26
2.2.7	Statistik .....	27
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>28</b>
3.1	PHÄNOTYPISIERUNG DER MAUSLINIEN .....	28
3.2	UNTERSUCHUNG DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT VON TNF-ELUTIONEN .....	29
3.3	ETABLIERUNG DES PROLIFERATIONSASSAY .....	30
3.3.1	Titration von anti-CD3 $\epsilon$ .....	30
3.3.2	Titration von TNCscTNF80.....	31
3.4	IN VITRO EXPANSION VON TREG .....	34
3.4.1	Stabiler Phänotyp bei Stimulierung von wt Treg mit TNCscTNF80.....	38
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>III</b>
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	III
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	IV
7.3	LITERATURVERZEICHNIS .....	V
7.4	DANKSAGUNG .....	XVIII

# 1 Einleitung

## 1.1 TNF und TNF Rezeptoren

### 1.1.1 Rezeptoren der TNF Superfamilie (TNFRSF)

Zurzeit sind 29 Rezeptoren der TNFR Superfamilie bekannt (1). Es handelt sich hierbei um Typ I Transmembranproteine, bestehend aus einer Ektodomäne, einer Transmembrandomäne sowie einer intrazellulären Domäne, welche weitere intrazelluläre Signalwege aktiviert. Die Ektodomänen der TNFRSF bestehen aus mehreren Cystein-reichen Domänen, welche lange Strukturen bilden, die mit den Liganden interagieren (2,3).

Unterteilt werden die Rezeptoren in (I) Todesrezeptoren (death receptors, DR), welche in ihrem intrazellulären Anteil eine Todesdomäne (death domain, DD) besitzen und Apoptose über die FAS-associated death domain (FADD), TNFR1-assoziierte DD (TRADD) oder andere DD assoziierte Pathways induzieren können.

Die zweite Gruppe der TNFRSF (II) besteht aus Rezeptoren, die mit dem TNFR-associated factor (TRAF) interagieren und eine Rolle bei Entzündungen, bei einer antiviraler Immunantwort sowie bei der Apoptose spielen. Auch der in dieser Arbeit näher betrachtete TNFR2 gehört zu dieser Kategorie (4). Bei der dritten Gruppe (III) handelt es sich um Decoy-Rezeptoren ohne bekannte intrazelluläre Interaktionspartner. Ihre Funktion besteht darin, Mitglieder der TNFR Superfamilie zu binden und zu neutralisieren. Eine Besonderheit der TNFRSF besteht außerdem darin, dass auch die extrazelluläre Domäne von Mitgliedern der Gruppe I und II von der Zellmembran abgespalten werden kann und als Decoy-Rezeptoren dient (1).

### 1.1.2 TNF-Rezeptoren

TNF sowie auch Lymphotoxin (LT) sind sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form in der Lage an zwei unterschiedliche Rezeptoren zu binden, an TNFR1 (TNF receptor type 1; CD120a; p55/60) und an TNFR2 (TNF receptor type 2; CD120b; p75/80). TNFR1 hat eine Größe von 55 kDa und TNFR2 von 75 kDa. Die Liganden dieser Rezeptoren sind membrangebundenes TNF (memTNF), lösliches TNF (sTNF) und das sezernierte homotrimere LT-Molekül (5).



### 1.1.2.1 TNFR1

TNFR1 ist ein ubiquitär auf den meisten Körperzellen exprimierter Rezeptor (6,7). Der Effekt der Aktivierung von TNFR1 (oder auch tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A (TNFRSF1A) bzw. CD120a) wird über die Bildung zweier Komplexe vermittelt (8,9) und kann zu zwei sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen, Zelltod (Apoptose) oder aber Überleben. Zur Bildung des ersten Komplexes kommt es durch eine Bindung von TNF an den TNFR1. Dies führt zu einer Trimerisierung des Rezeptors. Diese Konformationsänderung ermöglicht die Bindung des Adaptermoleküls TRADD an die intrazelluläre Todesdomäne (DD). An TRADD können nun wiederum die intrazellulären Proteine RIP1 sowie TRAF2 binden. Der entstandene Komplex wird als *complex I* bezeichnet und ist im Folgenden in der Lage, sich vom TNFR1 zu lösen, und liegt frei im Intrazellularraum vor. Der freie *complex I* bindet hier FADD, welches wiederum Procaspase-8 rekrutiert. Man spricht nun vom *complex II*. Durch eine Multimerisierung von Procaspase-8 Molekülen werden diese zur Caspase-8 aktiviert und initiieren den Zelltod durch Apoptose (10–13).

In der zweiten Variante der Signalkaskade kommt es nicht zu einer Lösung des *complex I* von der intrazellulären DD des TNFR1. Stattdessen binden weitere Moleküle, unter anderem die Ubiquitin Ligasen cIAP1 und cIAP2, an den *complex I*. Diese Ligasen wiederum rekrutieren „linear ubiquitination chain assembly complex,“ (LUBAC)-Proteine, welche zu einer Polyubiquitinierung von RIP1 führen. Das polyubiquitinierte RIP1 ist nun in der Lage, an die NEMO Komponente des I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase-Komplexes (IKK) sowie an TAK1 zu binden. TAK1 und RIP1 aktivieren im Folgenden den IKK, was wiederum zu einer Phosphorylierung von I $\kappa$ B und dadurch zu dessen Zerstörung, sowie zu einer Freisetzung von nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- $\kappa$ B) führt. NF- $\kappa$ B aktiviert, neben weiteren Mechanismen, die ein Überleben der Zelle fördern, die Transkription von cFLIP. Bei cFLIP handelt es sich um einen Inhibitor der Caspase-8 und führt dadurch zu einem Überleben der Zelle.

Welche Faktoren das Gleichgewicht der beiden Signalkaskaden beeinflussen und somit über Leben und Tod der Zelle entscheiden, ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung (14).

### 1.1.2.2 TNFR2

Beim TNFR2 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B (TNFRSF1B) oder auch CD120b) handelt es sich um einen Rezeptor, dessen Expression stark reguliert ist (15). Seine Expression beschränkt sich auf einige T-Zell Subpopulationen wie z.B. CD4+ und CD8+ Lymphozyten, Endothelzellen, Mikroglia und Neurone, Oligodendrozyten, Myozyten, Thymozyten sowie mesenchymalen Stammzellen (6,7,16). Die Aktivierung von TNFR2 erfolgt ausschließlich über die Bindung von membrangebundenem TNF (memTNF) (17). Im Gegensatz zu TNFR1 besitzt der TNFR2 keine intrazelluläre Todesdomäne. Stattdessen besitzt er Bindungsstellen für intrazelluläre Adaptermoleküle, den TRAFs (TNF Receptor-Associated Factors) (18). TRAF 1, 2, 3, 5 und 6 sind in der Lage, an den intrazellulären Anteil von TNFR2 zu binden. Die Adaptermoleküle sind über unterschiedliche Signalwege in der Lage, über eine langanhaltende Aktivierung von NF- $\kappa$ B ein Überleben und Proliferation der Zelle zu fördern. Die wichtigste Rolle scheint hierbei TRAF2 zu spielen. So wird über TRAF2 die NIK (NuclearFactor-kappa $\beta$  Inducing Kinase) aktiviert, die wie der Name impliziert, NF- $\kappa$ B induziert (11,19). Neben der Aktivierung von NIK führt TRAF2 zu einer Depletion von Inhibitor NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), was wiederum in einem vermehrten Vorliegen von NF- $\kappa$ B resultiert.

Um eine Überaktivierung durch TRAF2 assoziierte Signalwege zu verhindern, existiert eine Feedback Schleife. Bei TNFR2 Aktivierung kommt es zu einer Ubiquitinierung mit konsekutiver Depletion von TRAF2 über Proteasomen (20).

### 1.1.2.3 Crosstalk

Ein weiterer für das Verständnis der Funktion der beiden TNF Rezeptoren wichtiger Mechanismus stellt der Crosstalk zwischen TNFR1 und TNFR2 dar.

Wie in 1.1.2.1 dargestellt, handelt es sich bei den Signalwegen des TNFR1 um ein Gleichgewicht, welches den Ausschlag zwischen Überleben der Zelle und Apoptose geben kann (2,14). Die Funktion von TNFR2 galt lange als ausschließlich anti-apoptotisch und pro-proliferativ. Seit der Entdeckung, dass Zellreihen existieren, bei denen eine alleinige Stimulierung von TNFR2 zur Induktion von Apoptose führt, vermutete man, dass es eine Überschneidung der Signalwege von TNFR1 und TNFR2 geben muss. Einer der Hauptmechanismen scheint hierbei die Depletion von TRAF2 im Rahmen der Autoregulation von TNFR2 zu sein (21). Diese führt zu einer Verschiebung

des TNFR1 Gleichgewichts in Richtung der Caspase-8-vermittelten Apoptose und somit zum Zelltod.

Welchen Einfluss TNFR2 auf die Wirkung von TNFR1 hat, scheint von vielen Faktoren abhängig zu sein. Dazu zählen zum einen der Zelltyp, der Aktivierungszustand der Zelle, die individuelle intra- und extrazelluläre Umgebung, das Alter der Zelle sowie die Tatsache, ob NF- $\kappa$ B konstitutionell exprimiert wird.

### 1.1.3 Liganden der TNF Superfamilie

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte konnten neben den beiden anfänglich entdeckten Zytokinen zahlreiche weitere Mitglieder der TNF Superfamilie identifiziert werden. Aktuell sind 19 Mitglieder bekannt. Zu Ihnen zählen unter anderem TNF, LT, OX40L (Ligand von OX40 oder auch TNFRSF4 genannt) und glucocorticoid-induced TNFR ligand (GITR). Bis auf LT sowie dem „A proliferation-inducing ligand“ (APRIL) handelt es sich um Typ II Transmembranproteine, welche von Zellen des Immunsystems exprimiert werden (22). Neben der membrangebundenen Form existiert für die meisten der TNFRL eine lösliche Form. In der Regel ist die Aktivierung der TNFR über membrangebundene TNFRL effektiver.

Bis auf CD40L, OX40L, GITRL, CD27, CD30L, und 4-1BBL (CD137L) binden die Liganden der Superfamilie an mehr als einen Rezeptor. Das führt zu komplizierten Signalwegen und Interaktionen (1). Die Funktionen der TNFSF Liganden sind vielfältig und reichen von Immunregulation über Zellproliferation und Differenzierung und Organogenese zur Induktion von Zelltodmechanismen (23). Speziell die pro-apoptische Wirkung der TNFSF stand in den letzten Jahren und Jahrzehnten im Fokus der Tumorforschung (2,3,24,25).

### 1.1.4 Tumornekrosefaktor

#### 1.1.4.1 Entdeckung des Tumornekrosefaktors

Der Tumornekrosefaktor (TNF) ist ein Zytokin, welches eine zentrale Rolle sowohl bei lokalen als auch bei systemischen Entzündungsprozessen spielt. Die Existenz eines proinflammatorisch und Zellschaden-induzierenden Moleküls wurde bereits in den 1940er Jahren vermutet und zu diesem Zeitpunkt noch als „Nekrosin“ bezeichnet (26).

Erstmalig näher beschrieben wurde TNF dann von Dr. Gale A Granger im Jahr 1968. Die damalige Bezeichnung für den von Lymphozyten sezernierten zytotoxischen Faktor lautete Lymphotoxin (LT) (27). Die Bezeichnung TNF wurde von Dr. Lloyd J. Old 1975 geprägt, der ebenfalls ein zytotoxisch wirkendes Protein identifizierte, welches allerdings von Makrophagen als Reaktion auf bakterielle Endotoxine ausgeschüttet wurde (28). Bei der Analyse der cDNA fand sich 1984 eine enge Verwandtschaft beider Moleküle, weshalb man sich verwirrenderweise entschloss LT in TNF $\beta$  und Tumornekrosefaktor in TNF $\alpha$  zu benennen (29). Die Tatsache, dass später neben LT $\alpha$  auch ein LT $\beta$  gefunden wurde, führte dazu, TNF $\beta$  wieder LT( $\alpha$ ) zu nennen und TNF, ohne die Zusatzbezeichnung  $\alpha$  abzukürzen. Mit zunehmendem Verständnis der zugrundeliegenden Pathways wandelte sich das Verständnis von TNF als rein proinflammatorischem Molekül zu einem entscheidenden Immunmodulator, welcher bei Erkrankungen wie Diabetes Typ I oder der Lupus Nephritis sogar einen protektiven Einfluss haben kann (30,31).

#### 1.1.4.2 Struktur des Tumornekrosefaktors

Bei TNF handelt es sich um ein 233 Aminosäuren (26 kDa)-großes Typ II Transmembranprotein, welches als Monomer exprimiert wird und sich zu stabilen, membrangebundenen und biologisch aktiven Trimeren zusammenlagert (memTNF). Die lösliche Form des TNF (soluble TNF, sTNF) wird über proteolytische Spaltung durch die Metalloprotease ADAM17 (TACE) von der Zellmembran abgespalten und hat eine Größe von 157 Aminosäure (17 kDa) (32,33). Beide Formen von TNF sind in der Lage, an TNF-Rezeptoren zu binden, dies geschieht mit einer hohen Affinität. Ein Unterschied besteht in der Fähigkeit, die jeweiligen Rezeptoren zu aktivieren. memTNF ist in der Lage, sowohl den TNFR1 als auch den TNFR2 zu aktivieren, während sTNF nur TNFR1 aktiviert. (1,17,34).

#### 1.1.4.3 Funktion des Tumornekrosefaktors

Bei TNF handelt es sich um ein Zytokin, welches eine wichtige Rolle sowohl bei der lokalen als auch bei der systemischen Entzündungsreaktion spielt. Insbesondere bei der Abwehr von bakteriellen und viralen Infektionen ist es von großer Bedeutung. Hauptsächlich wird es von Makrophagen produziert, wobei auch andere Zelltypen wie

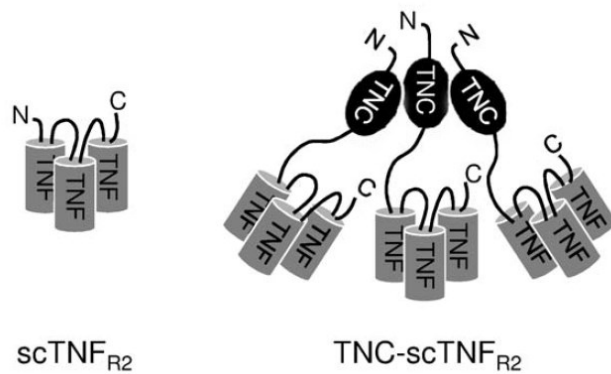
T-Zellen, NK-Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen und Neurone in der Lage sind, TNF zu produzieren.

#### 1.1.4.4 Klinische Bedeutung von TNF

Schon lange vor der Entdeckung des TNF Moleküls fand die Induktion von Entzündung durch die Injektion von Bakterienlösung in Tumoren in Form von Coley's toxin Anwendung (35). Auch wenn die Methoden archaisch waren, ließ sich die Wirkung von TNF schon gezielt nutzen. So fand auch TNF nach seiner Entdeckung zunächst hauptsächlich Anwendung in der Onkologie (36). Unkontrollierbare Entzündungsreaktionen durch zu hohe TNF-Spiegel waren jedoch gefährliche Nebenwirkungen. Mit der zunehmenden Erforschung von Antikörpern und deren therapeutischen Einsatzmöglichkeiten etablierte sich die Therapie mit anti-TNF Antikörper zur effektiven Immunsuppression bei zahlreichen Krankheiten (37–41).

#### 1.1.5 TNCscTNF80 (STAR2)

Als Alternative zu Antikörpern zur Steuerung der Aktivierung von TNF-Rezeptoren entstand aus dem von Krippner-Heidenreich et al (42) beschriebenen Single-Chain TNF durch genetische Fusion ein als TNCscTNF80 bezeichnetes Protein. Bei TNCscTNF80 (tenascin-trimerized single-chain mouse TNF receptor p80 (TNFR2) - specific TNF) handelt es sich um einen TNFR2-spezifischen Agonisten, welcher in aktuellen Publikationen auch als STAR2 (selective mouse TNF-based agonist of TNF receptor 2) bezeichnet wird (43). Der Aufbau des Moleküls ist in **Abb. 1** schematisch dargestellt. Die Selektivität der Bindung des Proteins an TNFR2 wird über die Mutation zweier Aminosäuren (D143N/A145R) erreicht (44). Dies wurde in *in vitro* Assays evaluiert und bestätigt (44). Die Trimerisierung über Tenascin-Domänen wiederum ahmt die nonamere Konfiguration membranständiger TNF Moleküle nach und ermöglicht so die von Zellmembranen unabhängige Bindung von TNCscTNF80 an TNFR2 und dessen Aktivierung mit nachfolgenden Signalkaskaden (17,43,45). Hierdurch konnten anti-apoptotische Effekte von TNFR2 durch TNCscTNF80 ausgelöst werden (45).



**Abb. 1** Schematische Darstellung von TNCscTNF80

Das Molekül besteht aus drei über GGGGS-linker verknüpfte TNF Monomeren (scTNF) welche sich wiederum über Tenascin-Domänen zu einem Trimer zusammenlagern (TNCscTNF80). Funktionell handelt es sich hierbei um ein scTNF80 Nonamer. Abbildung modifiziert nach Fischer et al. (45).

## 1.2 Regulatorische T-Zellen (Treg)

### 1.2.1 Geschichte

Das Konzept der immunsuppressiv wirksamen T-Zelle wurde erstmals in den 1970er Jahren von Richard K. Gershon diskutiert (46). Die technischen Voraussetzungen zur genauen Charakterisierung der Zellpopulation und Analyse möglicher Wirkmechanismen waren zu dieser Zeit jedoch nicht gegeben und wurden erst in den nächsten Jahrzehnten geschaffen. Folglich wurde die Existenz der „suppressor T-cells“ angezweifelt und geriet aus dem Fokus der Wissenschaft. Erst in den 1990er Jahren gelang es Simon Sakaguchi, die Subpopulation der Treg näher zu beschreiben und deren Existenz zu bestätigen (47–49).

### 1.2.2 Phänotyp

Auch mit dem Nachweis der Treg als Teil des adaptiven Immunsystems durch Sakaguchi et al. (47) war eine eindeutige Phänotypisierung der Subpopulationen initial nicht möglich. Denn, wie sich im Verlauf der Jahre herausstellte, handelt es sich bei um eine sehr heterogene Gruppe.

So erwies sich auch die Annahme von Simon Sakaguchi, dass es sich bei Treg um eine klar definierte Population der  $\text{CD4}^+$  T-Zellen handle, als nicht vollständig korrekt (49). Vielmehr werden aktuell zur Gruppe der Treg Interleukin (IL) 17-produzierenden Th17-Zellen, IL-10 produzierende  $\text{T}_{R1}$ -Zellen, Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  produzierende  $\text{T}_{H3}$ -Lymphozyten, NK-T-Zellen sowie  $\text{CD8}^+$  Treg gezählt (50–52).

Herausragend in ihrer suppressiven Potenz und klinischen Bedeutung sind jedoch die ursprünglich von Sakaguchi et al. beschriebenen (47,49,53) und mittlerweile gut charakterisierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen.

Kennzeichnend für diese Zellpopulation ist eine dauerhafte Expression von CD25<sup>+</sup>, der alpha Untereinheit des IL-2 Rezeptors (54). Diese wird zwar auch von konventionellen T-Zellen exprimiert, allerdings nur bei Aktivierung der Zellen und nicht konstant.

Ein weiterer phänotypischer Marker stellt der Transkriptionsfaktor forkhead/winged-helix transcription factor box p3 (Foxp3, scurfin) dar (55,56). Es handelt sich hierbei um ein Protein, welches entscheidend für die Funktion der Treg ist (57) (siehe 1.2.4). Ein entscheidender Nachteil von FoxP3 als Marker zu Phänotypisierung von Treg stellt die intrazelluläre Lokalisation dar. Eine immunhistologische Färbung ist daher nur mit fixierten Zellen möglich, deren Zellwände permeabilisiert wurden und somit für Antikörper-Fluorochrom Komplexe durchgängig sind (58).

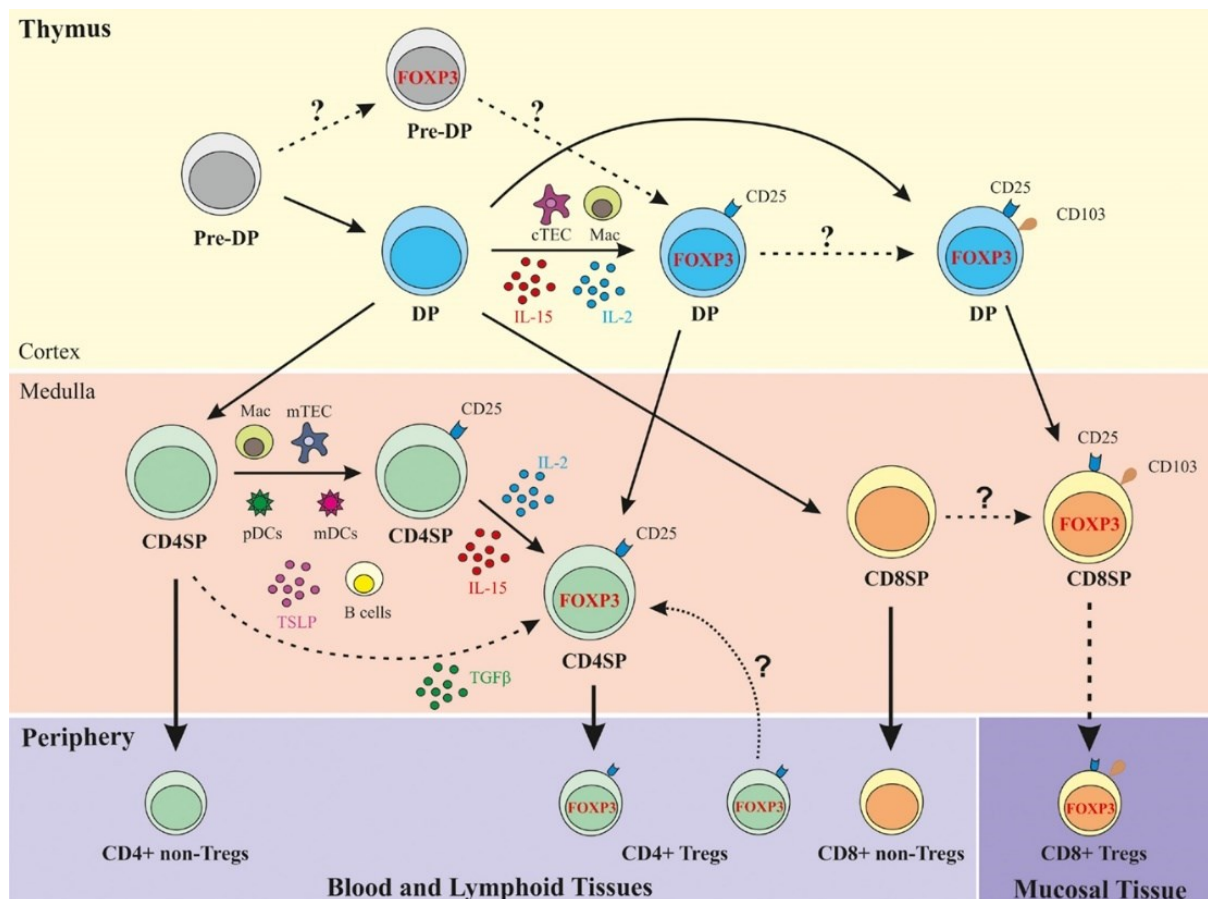
In dieser Arbeit liegt der Fokus auf Treg mit dem Phänotyp CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Zellen dieses Phänotyps haben sich als potente Regulatoren der Immunantwort sowohl durch zelluläre als auch humorale Faktoren erwiesen (59).

Des Weiteren war man in der Lage, Phänotypen zu bestimmen, die Aussagen über die Suppressivität der Treg zulassen. Zu diesen Markern zählt unter anderem TNFR2 (60–63) sowie CD62L in naiven Mäusen (64).

### 1.2.3 Natürliche Treg und induzierte Treg

Treg lassen sich nach ihrem Ursprungsort einteilen. Der primäre Entstehungsort von Treg befindet sich im Thymus, man spricht in diesem Fall von natürlichen Treg (nTreg) (34). Die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelpositiven Zellen zu nTreg erfolgt im Rahmen der Affinitätsreifung in Bezug auf Selbstreaktivität für den MHC Komplex. Lymphozyten-Vorläuferzellen mit hoher Affinität zu Selbstantigenen gehen in Apoptose um eine Autoreaktivität zu verhindern (negative Selektion) (65). Lymphozyten-Vorläuferzellen mit einer niedrigen Affinität werden zu konventionellen T-Zellen. Die Population der T-Zellen mit einer mittleren Affinität reifen unter der Stimulierung mit IL-2 und IL-15 (66,67) zu nTreg heran. Der Prozess ist schematisch in **Abb. 2** dargestellt.

Differenzieren sich Treg in der Peripherie aus konventionellen CD4<sup>+</sup>-Zellen spricht man von induzierten Treg (iTreg). Die Entstehung der iTreg wird durch eine Stimulierung des T-Zell Rezeptors (TCR) in Anwesenheit der Zytokine IL-2 und TGFβ angestoßen, TNF wird nicht benötigt (68,69). Eine phänotypische Unterscheidung der Zellpopulationen ist schwierig (70).



**Abb. 2** Schematische Darstellung der Treg Entwicklung im Thymus

DP, doppelt positiv (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>); CD4SP, CD4 einfach positiv (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>neg</sup>); CD8SP, CD8 einfach positiv (CD8<sup>+</sup>CD4<sup>neg</sup>); cTEC, kortikale Epithelzellen des Thymus; mTEC, medulläre TEC; Mac, Makrophage; FOXP3, Forkhead box P3; TSLP, thymic stromal lymphopoietin. Abbildung modifiziert nach Nie et al. 2015 (71).

### 1.2.4 Funktion

Treg sind ein wichtiger Bestandteil der Selbsttoleranz und verhindern eine Autoreaktivität des Immunsystems. Ihre Wirkung entfalten Treg an verschiedenen anderen Zellen des Immunsystems, unter anderem auf CD4<sup>+</sup>-Zellen. Diese Wirkung beschrieb Simon Sakaguchi erstmals 1995 (47). Eine Fehlfunktion der Treg kann sich als entzündliche Autoimmunerkrankung äußern. Ein Beispiel hierfür ist die immunodysregulation



polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome (IPEX), bei welchem der Transkriptionsfaktor FoxP3, welcher eine entscheidende Rolle in der Funktion der Treg spielt, defekt ist. Die erkrankten Patienten leiden unter einer deutlichen Vergrößerung der sekundären Lymphorgane und entwickeln sehr früh ausgeprägte Autoimmunreaktionen mit Enteropathie und Endokrinopathie. Als Folge treten typischerweise Durchfälle, Ekzeme, ein neonataler Diabetes mellitus sowie eine Hypothyreose auf. Blair et al. (72) zeigten, dass der Transfer von CD4<sup>+</sup> Zellen gesunder Mäuse zu einer Heilung der Erkrankung führt.

#### 1.2.4.1 Zelluläre Mechanismen

Versuche, in denen Treg und Effektor T-Zellen (Teff) durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt wurden, machten deutlich, dass der Zell-Zellkontakt ein wichtiger Bestandteil der suppressiven Mechanismen von Treg ist. Dies gilt sowohl für murine als auch für humane Zellen (49,73).

Die suppressiven Effekte von Treg werden durch Oberflächenantigene auf Treg wie CTLA-4 (CD152), lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) oder aber auch durch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf Antigen Presenting Cells (APCs) vermittelt (74,75).

Durch CTLA-4 Stimulierung wird der Tryptophan Katabolismus von APC aktiviert, welcher in Teff eine verminderte IL-2 Genexpression zur Folge hat, woraus wiederum eine Treg-vermittelte verminderte Proliferation von Zellen der Immunantwort resultiert (76). Eine gezielte Blockade von CTLA-4 *in vivo* führt zu Autoimmunreaktionen, wie sie auch typischerweise bei einer Depletion von Treg auftreten (74,77).

#### 1.2.4.2 Humorale Mechanismen

Neben den über Zell-Zell Kontakt-vermittelten Suppressionsmechanismen verfügen Treg auch über die Möglichkeit, ihr suppressives Potential über humorale Mechanismen wie die Produktion von IL-10 zu vermitteln. Annacker et. al konnte dies am Beispiel von CD4<sup>+</sup> Zellen im murinen Colitis-Model zeigen (78).

Neben IL-10 scheint auch TGF- $\beta$  als weiteres Zytokin eine Rolle zu spielen (79). Da TGF- $\beta$  allerdings primär in membrangebundener Form auf Treg zu finden ist, liegt dessen Rolle am ehesten in der zellvermittelten Immunsuppression (80).

### 1.2.5 Klinische Bedeutung der Treg

Im klinischen Alltag spielen in Bezug auf Treg zwei Komponenten eine Rolle. Dies sind zum einen Ursachen von Erkrankungen, zum anderen Therapiemöglichkeiten. Zu ersterem zählen durch eine Fehlfunktion der Treg ausgelösten Erkrankungen mit autoimmunologischer Genese (81).

So gehört bei Patienten mit dem IPEX Syndrom (siehe 1.2.4) und der damit einhergehenden gestörten Funktion von Treg ein sich früh manifestierender Diabetes Typ I zum Bild der Erkrankung (82). Auch bei der multiplen Sklerose, der rheumatoiden Arthritis, sowie dem systemischen Lupus erythematodes scheint eine gestörte Funktion der Treg eine Rolle zu spielen (83–86).

Daraus folgt die Überlegung, Treg durch gezielte Hemmung oder Stimulierung dieser Zellen therapeutisch zu nutzen.

Besonders im Bereich der Zelltherapie zur Behandlung der Graft-versus-host Disease konnte der protektive Effekt von Treg in Bezug auf Prävention und Prognose der Erkrankung nachgewiesen werden (64).

### 1.3 Ziel dieser Arbeit

Aufgrund der Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Männel am Institut für Immunologie der Universität Regensburg war zu erwarten, dass sich natürlich vorkommende Treg der gesunden Maus (nTreg) durch TNCscTNF80 genauso expandieren lassen, wie es für humane nTreg durch einen agonistischen TNFR2-spezifischen Antikörper von Okubo et al. (87) beschrieben wurde. Daher sollen nTreg von wt- und TNFR2-defizienten Mäusen mit einem recombinanten, multimerisierten TNF (TNCscTNF80) +/- IL-2 in Kultur genommen und die Entwicklung der Treg anhand der Proliferation, der IL-2-Produktion, der Foxp3- und CD25-Expression sowie der GITR- und TNFR2-Expression verfolgt werden.

Mit Hilfe einer Mauslinie, deren CD4-Zellen keinen TNFR2 exprimieren (CD4cre/TNFR2<sup>fl/fl</sup>) sollte des Weiteren überprüft werden, ob der Phänotyp TNFR2-defizienter Mäuse in Bezug auf die gestörte Treg-Entwicklung davon abhängig ist, dass nTreg auf ihrer Zellmembran TNFR2 tragen, oder ob der vermehrte, lösliche TNFR2-Spiegel in diesen Mäusen für den Phänotyp verantwortlich ist. Im Vergleich zu wt- bzw. TNFR2-defizienten Mäusen wurde dafür in naiven CD4cre/TNFR2<sup>fl/fl</sup>, sowie

in wt-Mäusen, die Treg-Frequenz und deren Phänotyp durchflußzytometrisch bestimmt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien

Reagenz	Hersteller
$\beta$ -Mercaptoethanol	Pan - Biotech GmbH
$\beta$ -Mercaptoethanol	Gibco LifeTechnologies
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Invitrogen
DMEM w/o L-Glutamin	Gibco LifeTechnologies
Fetal Bovine Serum (FCS)	Pan - Biotech GmbH
Fetal Bovine Serum (FCS)	Gibco LifeTechnologies
Foxp3-Staining Buffer Set	BD Biosciences GmbH
HEPES 1M	Pan - Biotech GmbH
IL-2 (Proleukin S)	Novartis
L-Glutamin	Pan - Biotech GmbH
MEM-Vitamin Solution	Pan - Biotech GmbH
Natrium-Pyruvat 1 mM	Pan - Biotech GmbH
Para-Formaldehyd	Merck Millipore
Penicillin /Streptomycin	Gibco LifeTechnologies
Penicillin /Streptomycin	Pan - Biotech GmbH
RPMI 1640	Pan - Biotech GmbH
Tris-HCL	Merck Millipore
Trypan-Blau Lösung 0,2 %	Sigma Aldrich
TÜRK'sche Lösung	Merck Millipore
Tween 20	Fluka

## 2.1.2 Medien und Puffer

Tabelle 2: Liste der Medien und Puffer

Material	Zusammensetzung
Erythrozyten-Lyse Puffer (ACK-Puffer)	8,29 g NH <sub>4</sub> Cl, 1 g KHCO <sub>3</sub> , 37.2 mg Na <sub>2</sub> EDTA, 800 ml H <sub>2</sub> O, pH 7,2-7,4, autoklaviert, Lagerung bei 4 °C
FACS-Buffer	1 % FKS/PBS
MACS-Buffer	2 mM EDTA, 1 % FKS/PBS
Zellkulturmedium für Treg-Expansion	40 ml DMEM 1x, 4 ml FCS, 200 µl MEM-Vitamin Solution, 400 µl Natrium-Pyruvat, 400 µl P/S, 400 µl HEPES 40 µl β-Mercaptoethanol 400 µl L-Glutamin
Zellkulturmedium Milzzellkultur	RPMI 1640, 10 % FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 U/mL Penicillin, 100 U/mL Streptomycin

## 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Liste der Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Eppendorf Cups	Eppendorf, Hamburg & Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Foxp3-Staining Buffer Set Fixation/Permeabilization (Concentrate & Diluent)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, USA
Kanülen (20 G, 22 G, 27 G)	BD Biosciences, Heidelberg
MACS Separation Columns 25 LS/MS/L	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PCR-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (6 cm, 12 cm)	BD Biosciences, Heidelberg
Petrischalen (12 cm)	Corning, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl)	Rainin, USA
Sarstedt-Cups (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Serologische Pipetten (steril) (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (steril) (1 ml, 5 ml, 10 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkultur Multiwellplatten (6, 12, 96 well)	Becton Dickinson Labware, USA
Zellkultur Multiwellplatten 96 well	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Zellsieb Cell Strainer 40 µm, 70 µm (Nylon)	BD Bioscience, Heidelberg

#### 2.1.4 Kits (Zellisolation, Treg Expansion)

Tabelle 4: Kits

Kit	Hersteller
Treg Expansion Beads CD3/CD28	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-PE beads UltraPure	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

#### 2.1.5 Verwendete Antikörper

Tabelle 5: Antikörper

Zielantigen	Konjugat	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD3	PE	SP34-2	1:200	BD Biosciences
CD3ε	-	145.2C11	Versuchsabhängig	AG Männel
CD4	PerCP	RM 4-5		eBioscience
CD4	APC	RM 4-5		eBioscience
CD4	PE	RM 4-5		eBioscience
CD4	FITC	RM 4-5	1:1000	BD Biosciences
CD4	Pacific-Blue	RM4-5	1:1600	BD Biosciences
CD8	PerCP	53-6.7	1:2000	BD Biosciences
CD25	APC	PC 61.5		
CD25	PE	PC61		BD Biosciences
FoxP3	PE	FJK-16s		
CD62L	PE			
CD62L	APC	MEL-14		BD Biosciences
GITR	PE			

CTLA-4	Brilliant Violet			
FcγR-AK	-	2.4G2		AG Männel
TNFR2	PE			

## 2.1.6 Verwendete Geräte

Tabelle 6: Geräteliste

Gerät	Hersteller
CO2-Inkubatoren, Cell Safe	Integra Biosciences
Durchflusszytometer BD LSRII	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSAria™	BD Biosciences, Heidelberg
Inverses Mikroskop Leitz DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar
Inverses Mikroskop Olympus ck2	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop Axiostar Plus	Carl Zeiss, Jena
MACS Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Microplaterereader Emax (Elisa)	Molecular Devices, USA
Multikanalpipette (100 µl und 300 µl)	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brandt, Wertheim
Pipettensätze:	
(10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Reference (10 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Research (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Lite XLS (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Rainin, USA
(20µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Frankreich
Discovery (1000 µl)	ABIMED, Langenfeld
Labmate (10 µl, 200 µl)	ABIMED, Langenfeld
Pipettierhilfe Accu-Jet Pro	Brandt, Wertheim
Sterilwerkbank Laminar Flow HB2448	Heraeus, Hanau
Vortex MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Wasserbad TW20	Julabo, Seelbach

Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.7 TNCscTNF80 (STAR2)

Das in den Versuchen verwendete TNCscTNF80 wurde von Dorothea Weber-Steffens aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Männel, Institut für Immunologie der Universität Regensburg hergestellt und gereinigt.

### 2.1.8 Mäuse

#### 2.1.8.1 Tierhaltung

Alle Mäuse wurden gemäß der deutschen Tierhaltungsrichtlinien gehalten. Das Zuchtprogramm wurde von der Regierung von Unterfranken, Würzburg genehmigt. (Az: 54-2532.1-27/10, AZ: 54-2532.1-37/13).

#### 2.1.8.2 57BL/6

Die C57BL/6 Mäuse wurden bei Janvier (LeGenest, France) erworben, es handelt sich hierbei um den Wildtyp (wt).

#### 2.1.8.3 TNFR2<sup>-/-</sup>

Die TNFR2-defizienten Mäuse (C57BL/6-Tnfrsf1btm1Mwm) (88) wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) erworben.

#### 2.1.8.4 TNFR2<sup>fl/fl</sup>

Die Mäuse mit dem konditionellen TNFR2<sup>fl/fl</sup> Allel (TNFR2<sup>fl/fl</sup>) wurden durch die Zucht von Tnfrsf1b<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi</sup> Mäusen zu FLPe-delete Mäusen erzeugt (89). Die Position und Orientierung der beiden loxP Domänen sowie die Deletion des beta-galactosidase Reporter Gens und der Neomycin Resistenz Kasette wurden durch Klonieren des korrespondierenden PCR Produkts und Sequenzanalysen verifiziert. Zur Genotypisierung wurden folgende Primer genutzt: 5' TGTGAGTGCAAGGACACACGGTGC 3' und 5' GGCCAGGAAGTGGGTTACTTTAGGGC 3'.



#### 2.1.8.5 CD4<sup>cre</sup>/TNFR2<sup>fl/fl</sup>

Die zellspezifische Deletion von TNFR2 auf T-Zellen (CD4<sup>cre</sup>/TNFR2<sup>fl/fl</sup>) wurde durch die Paarung von TNFR2<sup>fl/fl</sup> Mäusen mit CD4-Cre Mäusen erreicht (90). CD4<sup>cre</sup>/TNFR2<sup>fl/fl</sup> Mäusen exprimieren keinen TNFR2 auf der Oberfläche ihrer T-Zellen. Andere Zelllinien tragen den Rezeptor weiterhin.

Die Tatsache, dass auch die CD8<sup>+</sup>Zellen dieser Mäuse TNFR2 defizient sind, ist auf ein Knockout des TNFR2 im CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> doppelpositiven Entwicklungsstadium der Zellen im Thymus zurückzuführen (91).

#### 2.1.9 Software

Die Arbeit wurde mit Microsoft Office 2016 erstellt. Die zitierte Literatur wurde mit Citavi 6.5.0 verwaltet. Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit FlowJo 7.6.5 (FlowJo, LLC in Ashland, Oregon). Alle Graphen, Diagramme und statistische Tests wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, USA) erstellt.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkulturbedingungen

Sämtliche Arbeitsschritte zur Anlage und Fortführung von Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar Flow HB2448 Herasafe Sterilwerkbank. Zur Handhabung der Zellen wurden ausschließlich sterile Reagenzien, Pipetten und Zellkulturplatten verwendet. Die Zellkulturen wurden regelmäßig auf Pilz oder bakterielle Kontamination überprüft.

#### Proliferationsassay:

Die Versuche mit in Kultur genommener Milzzellsuspension wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Medium (RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin und 90 µM β-Mercaptoethanol) durchgeführt.

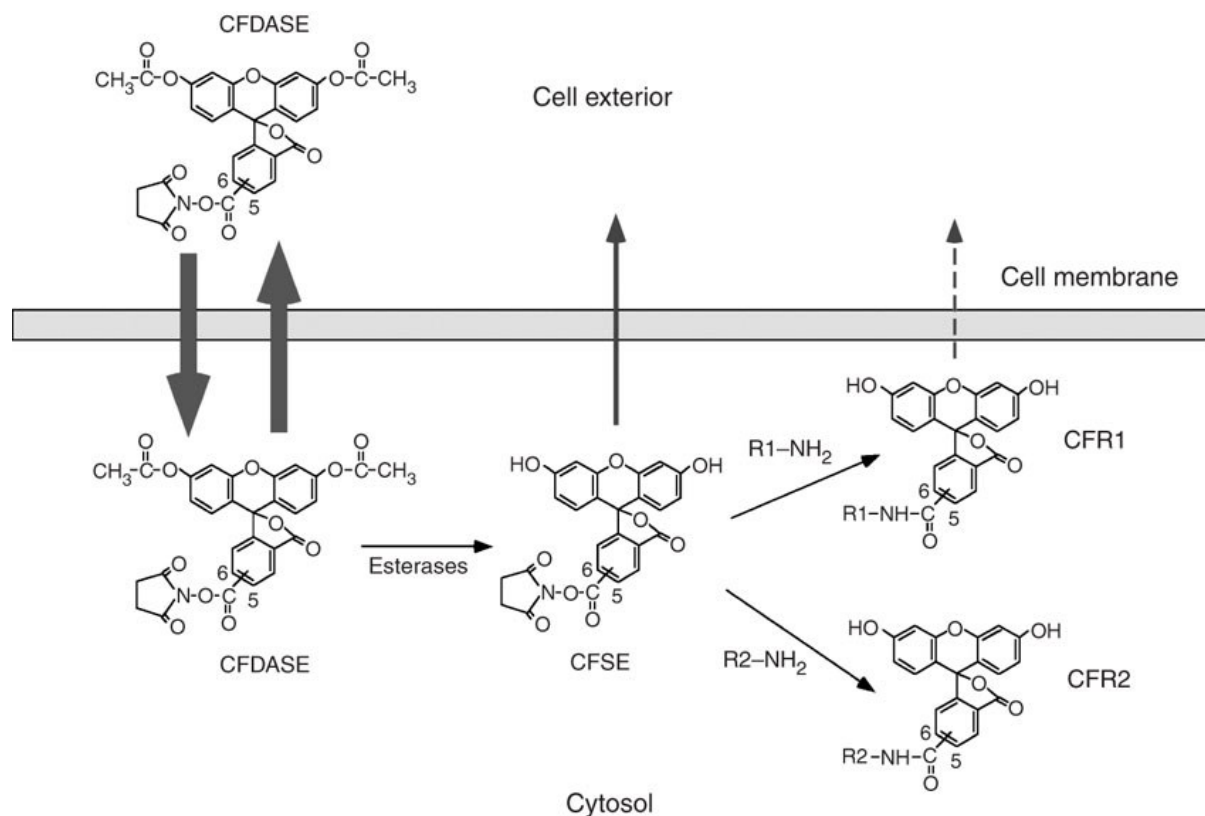
#### Treg-Expansion:

Die Versuche mit aus wt Mäusen isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup> Zellen (siehe 0) wurden bei 37 °C und 7,5 % CO<sub>2</sub> in Medium (DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS),

1 % Penicillin/ Streptomycin, 50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,5 % MEM-Vitamin Solution, 1 mM Natrium Pyruvat, 10 mM HEPES) durchgeführt.

## 2.2.2 Beurteilung der Proliferationsrate mit Hilfe von CFSE

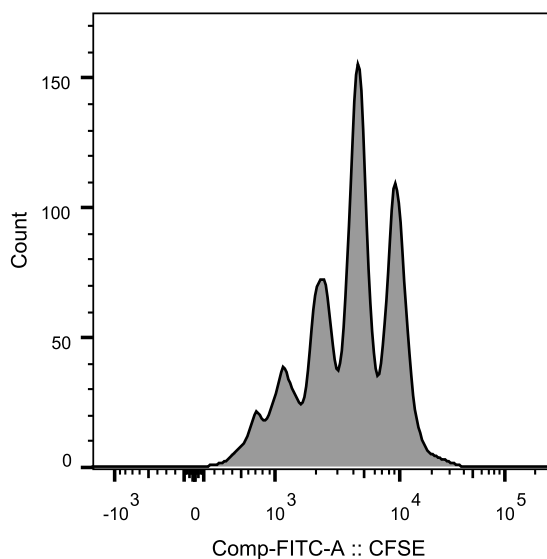
Um den Effekt von TNCscTNF80 auf die Proliferationsrate von Lymphozyten *in vitro* besser beurteilen zu können, wurden die Milzzellen im Verlauf der Aufarbeitung mit dem zellmembrangängigen carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDASE) markiert. CFDASE ist in höheren Konzentrationen zytotoxisch. In niedrigen Konzentrationen, wie sie für diese Versuche verwendet wurden, ist die Toxizität minimal und kann vernachlässigt werden. Die intrazellulären Vorgänge sind im Folgenden in **Abb. 3** dargestellt.



**Abb. 3** CFSE-Schema

Eine schematische Darstellung der unterschiedlichen Vorgänge die während der Markierung von Zellen mit Hilfe von CFDASE ablaufen. CFDASE ist ein gut membrangängiges Molekül. Intrazellulär kommt es durch Esterasen zur Abspaltung von Acetatgruppen. Das entstandene CFSE ist nach wie vor membrangängig, ist allerdings in der Lage über eine Succinimidyl-Gruppe kovalente Bindungen zu intrazellulären Proteinen zu formen. Eine Diffusion über die Zellmembran ist nun nicht mehr möglich. Abbildung modifiziert nach Quah et al 2007 (92).

Im Verlauf des Zellzyklus der proliferierenden Zelle kommt es im Rahmen der Zellteilung zu einer gleichmäßigen Verteilung der zytosolischen Proteine. Durch die kovalente Bindung der CFSE Moleküle an die intrazellulären Proteine wird mit jeder Zellteilung auch jeweils die Hälfte des Farbstoffs auf die Tochterzellen aufgeteilt. In der durchflusszytologischen Messung kommt es mit jeder Zellteilung zu einer Reduktion der Fluoreszenzintensität um die Hälfte. In der Messung stellt sich dies als Fluoreszenzpeak dar (**Abb. 4**).



**Abb. 4** Beispiel einer Proliferationsanalyse mittels CFSE und durchflusszytometrischer Analyse  
 Jeder Peak im abgebildeten Histogramm stellt einen Proliferationszyklus dar. Durch Gating lässt sich der Prozentsatz der Zellen der Anzahl der Teilungszyklen zuordnen.

### 2.2.2.1 Durchführung

Zur Entnahme der Milz wurde die Maus zunächst mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Milz wurde anschließend entnommen und in ein mit sterilem 1 ml kaltem PBS gefüllten 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Unter sterilen Bedingungen wurde die Milz nun über ein 40 µm Sieb mit Hilfe eines Spritzenstempels in ein 50 ml Falcon Tube zerdrückt. Das Sieb wurde in regelmäßigen Abständen mit kaltem sterilem PBS gespült, bis ein Endvolumen von 15 ml Zellsuspension erreicht war und sämtliche Milzzellen aus der Milzkapsel herausgelöst waren und sich in Suspension befanden. Die Milzzellen wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation (300 g, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde im Folgenden mit 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (6 ml steriler ACK-Puffer + 4 ml 1 % FKS/PBS) sorgfältig resuspendiert und 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 6 Min. (300 g, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Das Pellet wurde in 10 ml 10 % FKS/PBS resuspendiert und für 7 Min. zentrifugiert (300 g 4 °C). Die Zellen wurden nun in 10 ml 1 % FKS/PBS resuspendiert und erneut über ein steriles 40 µm Sieb in ein neues 50 ml Falcon-Tube filtriert. Das alte Falcon Tube wurde nun erneut mit 5 ml kaltem 1 % FKS/PBS gespült und die entstandene Suspension wurde über das Sieb in das neue Falcon-Tube filtriert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellkonzentration mittels Färbung mit 1:10 Trypanblau und der Zählung in einer Neubauerzählkammer. Die benötigte Menge an Zellsuspension wurde anschließend aus dem Falcon Tube in ein neues 15 ml Falcon Tube überführt und für 5 Min. zentrifugiert (300 g, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit 0,5 µl einer 2,5 µM CFSE-Lösung/10<sup>7</sup> Zellen in 2 ml sterilem 1 % FKS/PBS. Die Zellen wurden sorgfältig in der Färbelösung resuspendiert und anschließend im Dunkeln für 8 Min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Sofort im Anschluss wurde die Färbung durch Zugabe der 4-fachen Menge an eiskaltem 10 % FKS/PBS gestoppt. Es erfolgt eine erneute Zentrifugation (5 Min., 300 g, 4 °C). Das makroskopisch gelb erscheinende Zellpellet wurde in 5 ml Kompletmedium aufgenommen und gründlich resuspendiert. Die Zellzahl wurde erneut mittels Trypanblau-Färbung und Zählung in der Neubauer-Kammer bestimmt. Anschließend wurde die Zell-Konzentration der Suspension durch Zugabe von mehr Kompletmedium auf eine Endkonzentration von 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und in Versuchen weiterverarbeitet. Eine kleine Menge gefärbter sowie ungefärbter Zellen wurden direkt im Anschluss zur Färbung durchflusszytometrisch auf ein starkes Fluoreszenzsignal im FITC Kanal überprüft.

### 2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein Verfahren zur phänotypischen und funktionellen Analyse einzelner Zellen dar. Die Zellen werden bei diesem Verfahren in einer mobilen Phase einzeln durch einen Laserstrahl geleitet. Je nach Granularität und Größe der Zellen unterscheidet sich der Brechungsgrad des Lichts. Die gebrochenen Lichtstrahlen werden durch Detektoren erfasst.

Außerdem besteht die Möglichkeit mit Laser unterschiedlicher Wellenlängen Fluorochrome (2.1.5) auf der Oberfläche der zu analysierenden Zellen anzuregen. Das von den Fluorochromen emittierte Licht wird wiederum von Detektoren erfasst.

### 2.2.3.1 Oberflächenfärbung

Zur genauen Analyse der in den Versuchen gewonnenen Zellen wurden zur Identifizierung nötige Oberflächenantigene mit an Fluorochrome gekoppelte Antikörper gefärbt. Hierzu wurden die Zellen aus den Proliferationsassays bzw. den Treg-Expansions-Assays durch sorgfältiges Pipettieren und gründlichem Resuspendieren aus den 96 well Platten in mit 1 ml PBS befüllten FACS-Tubes überführen. Anschließend wurden die wells mit je 100 µl PBS nachgespült. Dann wurden die FACS-Tubes zentrifugiert (5 Min., 4 °C, 300 g). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und jedes der Zellpellets in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (5 Min., 4 °C, 300 g). Der Überstand wurde nach dem Waschschrift erneut dekantiert. Zu den analysierenden Proben sowie der Kompensationskontrolle wurden nun 250 µl einer 1:1000 Verdünnung von Viability Dye hinzugegeben. Die Zellsuspension mit Viability Dye wurde nun für 30 Min. bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Im Folgenden wurde die Färbung durch Zugabe von 2 ml 1 % FKS/PBS unterbrochen und die Tubes erneut zentrifugiert (5 Min., 4 °C, 300 g).

Der Überstand wurde dekantiert und zu sämtlichen Proben wurden jeweils 5 µl einer 0,2 µg/µl Lösung eines FcγR-Antikörpers hinzu pipettiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Zelloberfläche zu blockieren. Die Mischung wurde nun kurz zentrifugiert (1 Min., 4°C, 300g), danach kurz geschüttelt und für 10 Min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung mit den in 2.1.5 aufgelisteten Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten in der entsprechenden Verdünnung in 5 µl 1 % FKS/PBS. Nach erneuter Zentrifugation und Inkubation der Proben für 30 Min. bei 4 °C im Dunkeln erfolgte ein letzter Waschschrift mit 1 ml 1 % FKS/PBS und die anschließende Fixierung der Proben mit 200 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA). Bei der Analyse Treg erfolgte anstatt der Fixierung mit PFA die weitere intrazelluläre Färbung mit Anti-FoxP3 Antikörper.

### 2.2.3.2 Intrazelluläre Färbung mit FoxP3

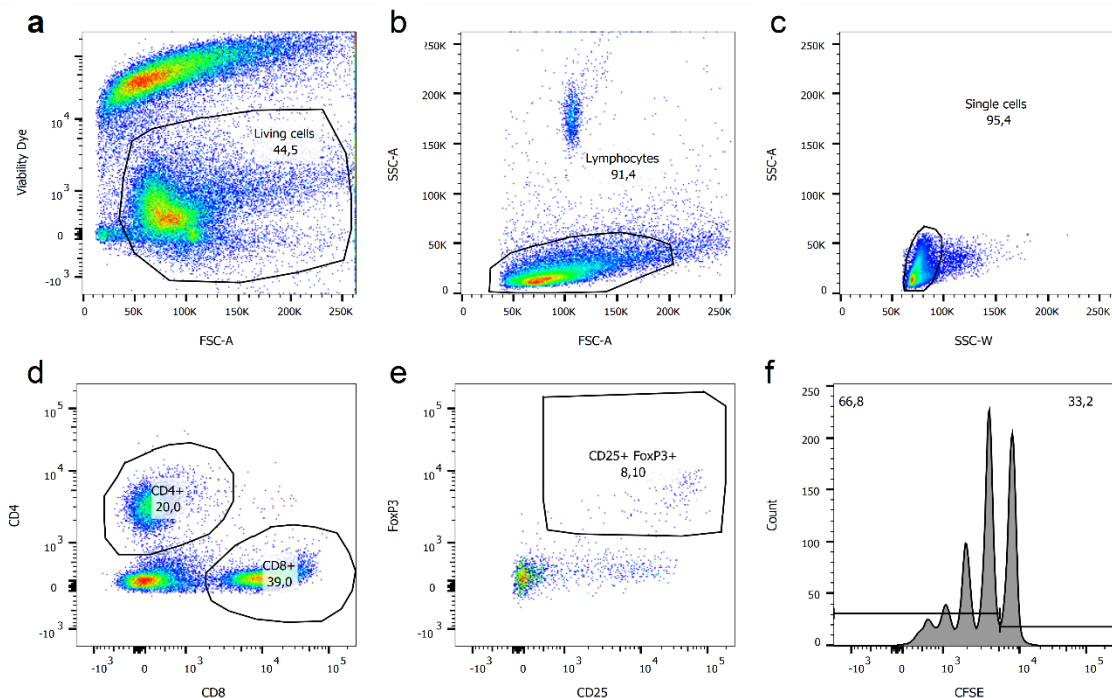
Da es sich bei FoxP3 um ein intrazelluläres Protein handelt, ist zur Färbung eine Permeabilisierung der Zellmembran nötig. Die Tubes mit intrazellulär zu färbenden Zellen wurden mit 500 µl frisch hergestellter Fixation/Permeabilization working solution versetzt und kurz gevortext. Anschließend wurden die Proben für mindestens 30 Min. bei

4 °C im Dunklen inkubiert. Der Permeabilisationsprozess wurde nun mit 2 ml Permeabilization Buffer beendet. Die Zellsuspension wurde nun erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu jedem zu färbenden Tube wurden 30 µl einer mit Anti-FoxP3-AK (in Permeabilization Buffer) versetzten Lösung hinzu pipettiert. Die Tubes wurden erneut zentrifugiert (1 Min., 4 °C, 300 g). Jetzt wurden die Proben mit 1 ml Permeabilization Buffer versetzt. Erneute Zentrifugation (5 Min., 4 °C, 300 g). Verwerfen des Überstandes und Zugabe von 200 µl PBS. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben im Durchflusszytometer.

### 2.2.3.3 Durchflusszytometrische Analyse

Nach der in 2.2.3.1 und 2.2.3.2 durchgeführten Färbung der zu untersuchenden Zellpopulationen wurden die Zellen im Durchflusszytometer LSRII analysiert.

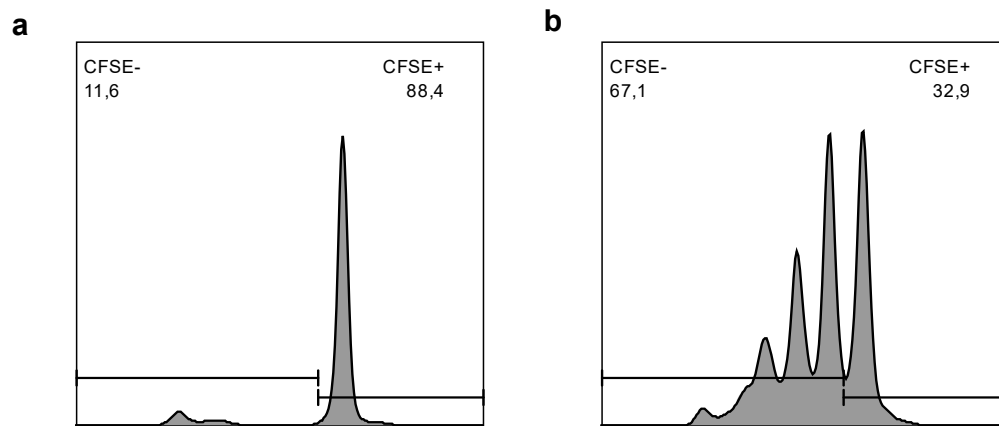
Durch die Färbung auf CFSE (2.2.2.1) von CD4, CD8, CD25, FoxP3, GITR, CD62 und TNFR2 war es möglich einzelne Zellpopulationen zu betrachten und Aussagen bezüglich ihres Phänotyps zu treffen. Das Gating mittels FlowJo erfolgte wie in **Abb. 5** dargestellt.



**Abb. 5** Gating nach CFSE-Labeling

Nach der Durchflusszytometrischen Analyse wurden mit Hilfe von FlowJo Gates erstellt, um einzelne Zellpopulationen zu unterscheiden. Das erste Gate **a** wurde erstellt, um toten Zellen von der weiteren Betrachtung auszuschließen. Anschließend wurde ein Gate um die zu untersuchende Population **b** in

diesem Fall Lymphozyten gesetzt. Um Dubletten und Zellcluster aus der Analyse auszuschließen wurde ein weiteres Gate **c** erstellt. Anschließend konnten Subpopulationen der Lymphozyten anhand ihrer Fluoreszenzsignale unterschieden werden **d**. Die Subpopulationen wurden im Weiteren auf ihren Phänotyp bezüglich CD25 und FoxP3 **e** sowie ihres Proliferationsverhaltens **f** (und **Abb. 6**) untersucht.



**Abb. 6** Auswertung der Proliferationsrate

Zunächst wurde anhand einer nicht stimulierten Negativkontrolle ein Gate gesetzt um den Cut-off für nicht proliferierende Zellen zu setzen (a). Im Folgenden wurde das Gate auf die restlichen Proben angewendet, um den Anteil der proliferierenden Zellen zu identifizieren (b).

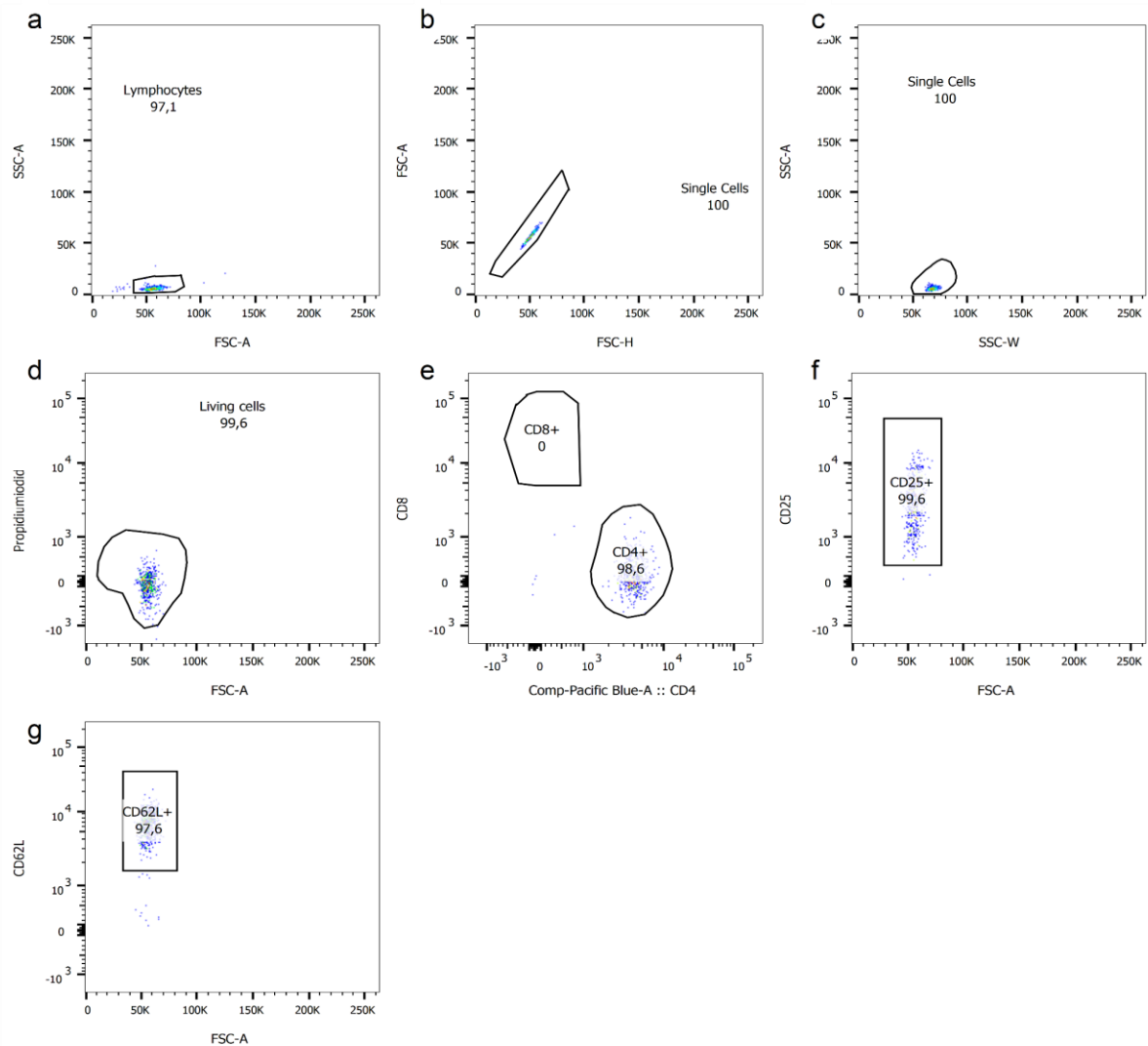
Mit Hilfe der Gating Strategie in **Abb. 5** ist es möglich, nicht proliferierende Zellen, welche keine Reduktion der Fluoreszenzintensität aufweisen, von einer weiteren Analyse auszuschließen. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden die Ergebnisse im Bezug zu einer Probe mit anti-CD3 $\epsilon$ -gefärbten Zellen normiert und in Prozent (%) dieser Kontrolle angegeben.

#### 2.2.4 MACS und FACS

Um gezielt Treg aus Milzzellsuspension zu gewinnen und in Kultur zu nehmen, wurden zwei Verfahren kombiniert, um eine maximal homogene Zellpopulation zu erhalten. Nach Herstellung der Milzzellsuspension wurden die Zellen mit Anti-CD25-PE Antikörpern gefärbt und über einen weiteren Schritt mit Anti-PE-Antikörpern gekoppelten Microbeads per Positivselektion über eine MACS-LS Säule angereichert (93). Im nächsten Schritt erfolgte eine weitere Färbung mittels Anti-CD8-PerCP, sowie Anti-CD62L-APC und Anti-CD4-PacificBlue.

Direkt vor der durchflusszytometrischen Sortierung am FACS-ARIA wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt, um tote Zellen zu identifizieren und zu verwerfen. Im FACS-ARIA erfolgte nun die gezielte Gewinnung von lebenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup>

(Treg) Zellen. Anschließend erfolgte eine Reanalyse zur Bestätigung der Reinheit, diese ist in **Abb. 7** exemplarisch dargestellt.



**Abb. 7** Gating der Reinheitsanalyse der  $CD4^+CD25^{high}CD62L^+$  Zellen nach Sort am FACS-Aria

Im ersten Schritt (a) wurde ein Gate um die Lymphozyten Population gelegt. Bei den nicht im Gate liegenden Signalen handelt es sich am ehesten um Zelltrümmer. Im Weiteren erfolgte ein Gating auf Einzelzellen (b-c). Hierbei zeigt sich, dass keine Doubletten vorhanden sind. Nach einem Gating auf lebende Zellen mit Hilfe von Propidiumiodid sowie auf  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zellen zeigt sich eine hohe Reinheit von 98,6 %  $CD4^+$  Zellen. Diese wiederum sind fast ausschließlich  $CD25^{high}$  und  $CD62L^+$ .



### 2.2.5 T-Zell-Proliferationsassay

Für diesen Versuchsaufbau wurden Milzen von naiven Mäusen unterschiedlicher Mauslinien wie unter 2.2.2.1 aufbereitet und in Kultur genommen und über einen Zeitraum von 72 h mit einem anti-CD3 $\epsilon$  Antikörper (0,1-0,5  $\mu$ g/ml) sowie unterschiedlicher Konzentrationen (im Bereich von 0,5 ng/ml bis zu 500 ng/ml) von TCN-scTNF80 stimuliert.

Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung wie in 2.2.3.1 dargestellt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte wie unter 2.2.3.3 beschrieben am LSRII mit nachfolgender Auswertung mit FlowJo.

### 2.2.6 Treg-Expansionsassay

Die Milzen von naiven Mäusen wurden wie in 2.2.2.1 zu einer Milzzellsuspension verarbeitet. Um eine isolierte Betrachtung der Treg zu ermöglichen, erfolgte nach einer Anreicherung über MACS-Säulen (siehe 0) die fluoreszenzassistierte durchflusszytometrische Sortierung am FACS Aria. Das Resultat sind Treg mit einer maximalen Reinheit von mehr als 98 % und dem Phänotyp CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup> (**Abb. 7**). Die Zellen wurden wie unter 2.2.1 beschrieben auf 96 well Platten in Kultur genommen und mit anti-CD3 $\epsilon$ - und anti-CD28-beschichteten Beads sowie humanem rekombinantem IL-2 und TNCscTNF80 stimuliert. An Tag 4 wurden die Zellen erneut mit 100  $\mu$ l Medium mit 2000 U/mL IL-2 +/- 100ng/ml TNCscTNF80 gefüttert. Im Falle von verbrauchtem Medium oder Erreichen eines dichten Zellrasens wurden die Zellen gesplittet.

An Tag 7 werden die Zellen geerntet, gewaschen und durch kurze Bindung der Tubes an einen Magneten von anti-CD3 $\epsilon$ - und anti-CD28-beschichteten Beads befreit.

Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium mit 2000 U/mL IL-2 resuspendiert und ausgezählt.

Ein Teil der Zellen wurde wie in 2.2.3.1 - 2.2.3.3 beschrieben gefärbt und analysiert. In einer 24 well Platte wurden die übrigen Zellen anschließend mit einer Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen/1000 $\mu$ l mit zu Tag 0 -Tag 7 identischen Zellkulturbedingungen und Stimulierung ausgesät und über weitere 7 Tage inkubiert. Zwischen Tag 7 und Tag 14 der Zellkultur erfolgte wie bereits in der ersten Woche eine regelmäßige Beurteilung der Zelldichte, eine Fütterung der Zellen erfolgte zunächst an Tag 9 und erneut nach

einem Splitten der Zellen an Tag 11. An Tag 14 wurden alle Zellen geerntet, ausgezählt und erneut wie oben beschrieben, gefärbt und analysiert.

### 2.2.7 Statistik

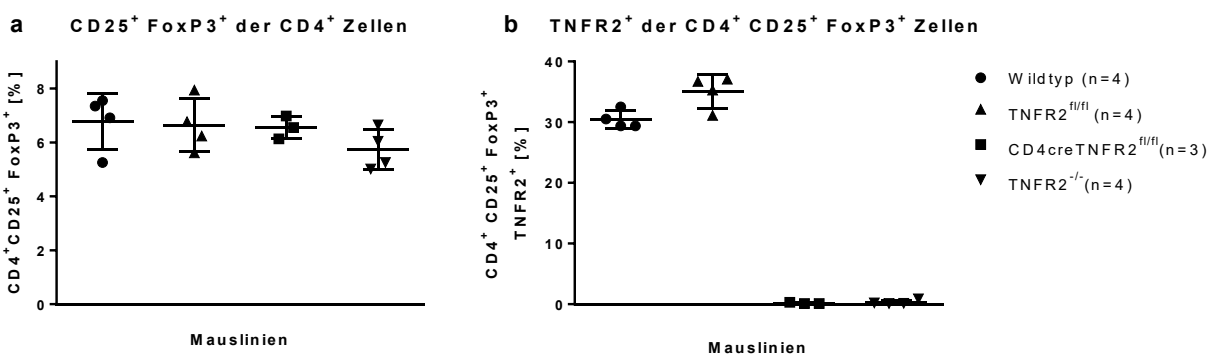
Sofern nicht anders beschrieben, wurde in sämtlichen Experimenten mit technischen Triplikaten oder Duplikaten gearbeitet. Die statistische Auswertung der Datensätze erfolgte mit Graphpad Prism unter Verwendung des „regular two-way ANOVA“ mit Post-Hoc Bonferroni Korrektur oder des students t-test. Die abgebildeten Fehlerbalken geben, sofern nicht anders angegeben, die Standardabweichung (standard deviation, SD) an. Als signifikant wurden p-Werte von  $<0,05$  (\*) gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Phänotypisierung der Mauslinien

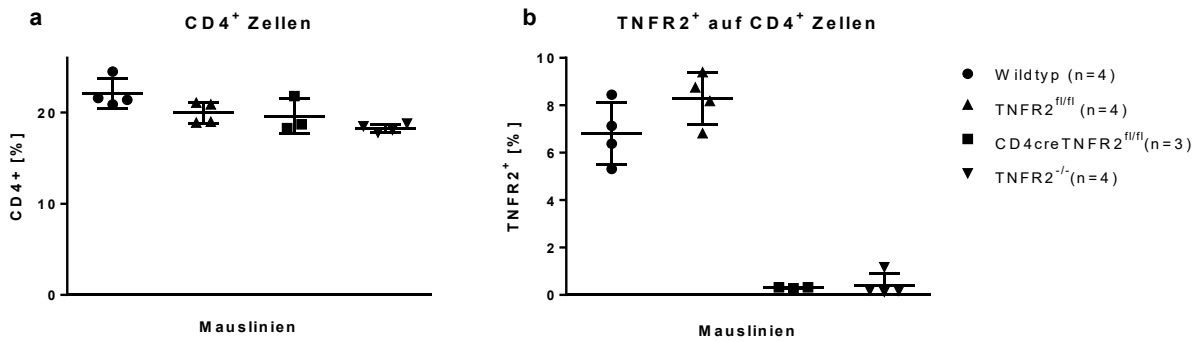
Die Milzen der verwendeten Mauslinien, welche alle die C57bl/6 Mauslinie (Wildtyp, wt) als genetische Grundlage haben, wurden, wie in 2.2.2.1 beschrieben, zu einer Milzszellsuspension verarbeitet und anschließend, wie in 2.2.3.1 und 2.2.3.2 dargestellt, mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Spezielles Augenmerk lag hierbei auf der Betrachtung der TNFR2-Expression und dem Nachweis des erfolgten konditionellen Knockouts von TNFR2 auf CD4<sup>+</sup> Zellen im Falle der CD4creTNFR2<sup>fl/fl</sup> Maus sowie dem ubiquitären Fehlen von TNFR2 auf allen Zelllinien im Falle der TNFR2<sup>-/-</sup> Maus. Anschließend erfolgte die Analyse der Zellen am Durchflusszytometer LSR II unter anschließender Auswertung der Daten in FlowJo und Graphpad Prism. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, in **Abb. 8**, **Abb. 9** und **Abb. 10** sind die Ergebnisse repräsentativ dargestellt.

Der Phänotyp entsprach den Erwartungen. Wie in **Abb. 8a** zu sehen ist, besitzen alle Mauslinien einen vergleichbaren prozentualen Anteil an Treg im Bereich von 6-8%. Signifikante Unterschiede sind nicht festzustellen. Die TNFR2-Expression auf den weiter untersuchten Treg zeigt ein komplettes Fehlen von TNFR2 sowohl auf den CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und Treg der TNFR2<sup>-/-</sup> Maus als auch der CD4creTNFR2<sup>fl/fl</sup> Mäuse (siehe **Abb. 9** und **Abb. 10**)



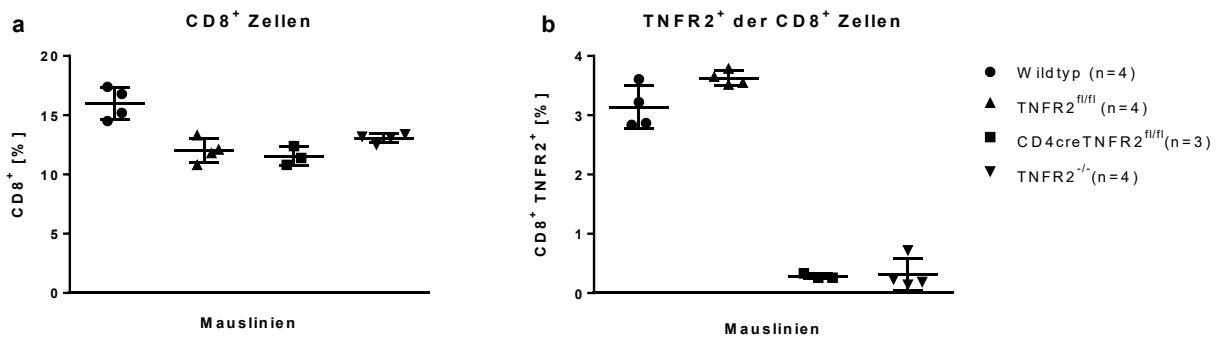
**Abb. 8** Phänotypisierung in Bezug auf Treg

Abgebildet sind in (a) jeweils der prozentuale Anteil der Treg an der Gesamtpopulation der Lymphozyten. In (b) ist deren TNFR2-Expression dargestellt.



**Abb. 9** Phänotypisierung in Bezug auf CD4<sup>+</sup> Zellen

Abgebildet sind in (a) jeweils der prozentuale Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen an der Gesamtpopulation der Lymphozyten. In (b) ist deren TNFR2-Expression dargestellt.



**Abb. 10** Phänotypisierung in Bezug auf CD8<sup>+</sup> Zellen

Abgebildet sind in (a) jeweils der prozentuale Anteil der CD8<sup>+</sup> Zellen an der Gesamtpopulation der Lymphozyten. (b) ist deren TNFR2-Expression dargestellt.

Neben der Betrachtung der TNFR2-Expressionsmuster der Mauslinien konnte gezeigt werden, dass sich die TNFR2<sup>fl/fl</sup> Mauslinie in Bezug auf ihren Phänotyp wie der wt verhält.

### 3.2 Untersuchung der biologischen Aktivität von TNF-Elutionen

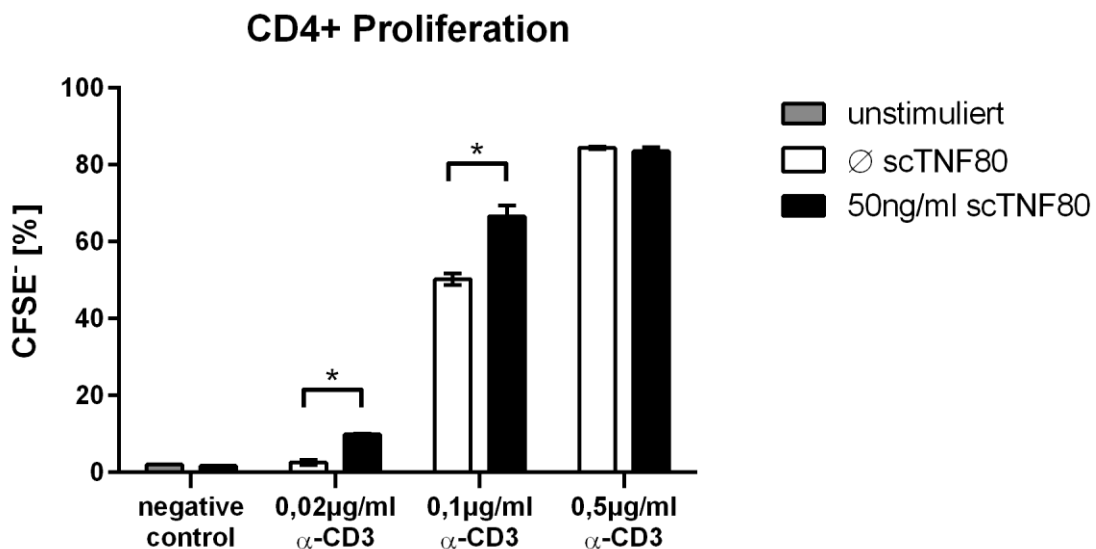
Vor Beginn der *in vitro* Experimente wurde durch Dorothea Weber-Steffens und Tobias Schmid aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Männel, Institut für Immunologie der Universität Regensburg, die Produktion von TNCscTNF80 etabliert (94).

Daran anschließend wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine standardisierte Überprüfung des durch Flag-Elution gereinigten TNCscTNF80 durchgeführt.

### 3.3 Etablierung des Proliferationsassay

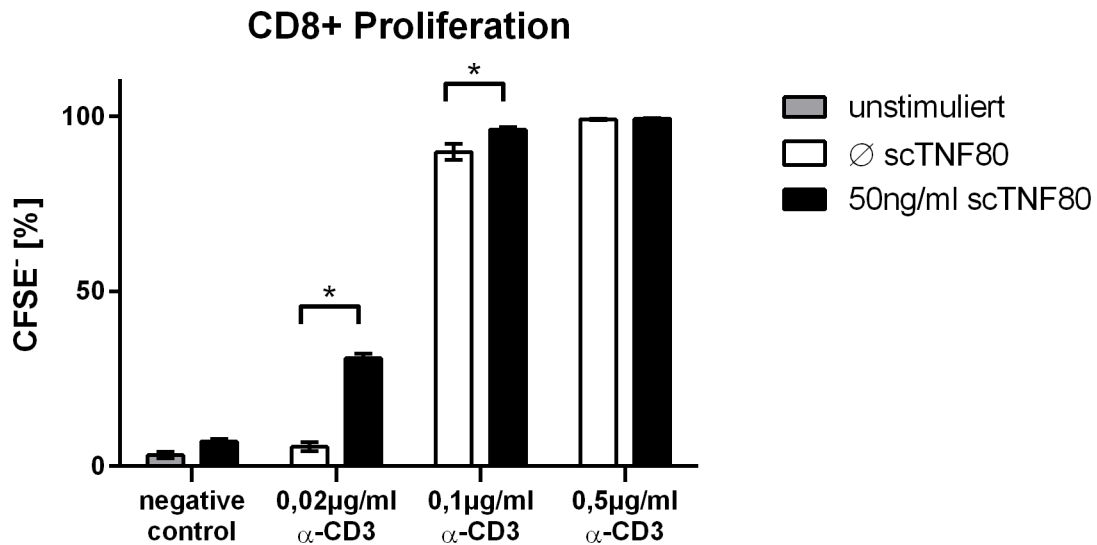
#### 3.3.1 Titration von anti-CD3 $\epsilon$

In einem 72 h T-Zell Proliferationsassay mit einer Milzzellkultur wurde zunächst eine optimale Konzentration an anti-CD3 $\epsilon$  durch Titration ermittelt. Es wurde eine feste Konzentration an TNCscTNF80 verwendet, welche sich an den Vorarbeiten von Konstantin Molitor (95) und Nils Müller (96) orientierte. Bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD3 $\epsilon$  fand sich hierbei eine gute mittlere Proliferationsrate mit signifikantem kostimulatorischen Effekt auf CD4 $^+$  Zellen (**Abb. 11**) und ebenso für CD8 $^+$  Zellen bei niedrigen Konzentrationen von anti-CD3 $\epsilon$  (**Abb. 12**). Die weiteren Experimente wurden daher mit der ermittelten optimalen Konzentration von 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD3 $\epsilon$  für CD4 $^+$  Zellen durchgeführt.



**Abb. 11** Titration von anti-CD3 $\epsilon$  (CD4 $^+$ )

In einem 72 h Proliferationsassay wurde eine optimale Konzentration von anti-CD3 $\epsilon$  ermittelt, um den vermuteten kostimulatorischen Effekt von TNCscTNF80 bei CD4 $^+$  Zellen zu beobachten.



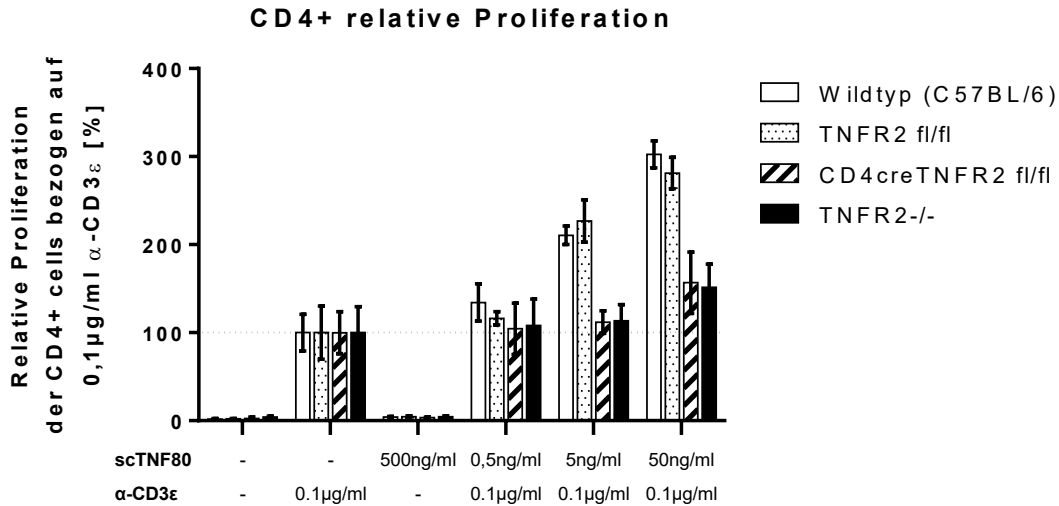
**Abb. 12** Titration von  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  (CD8<sup>+</sup>)

In einem 72 h Proliferationsassay wurde eine optimale Konzentration von  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$  ermittelt, um den vermuteten kostimulatorischen Effekt bei CD8<sup>+</sup> Zellen von TNCscTNF80 zu beobachten.

### 3.3.2 Titration von TNCscTNF80

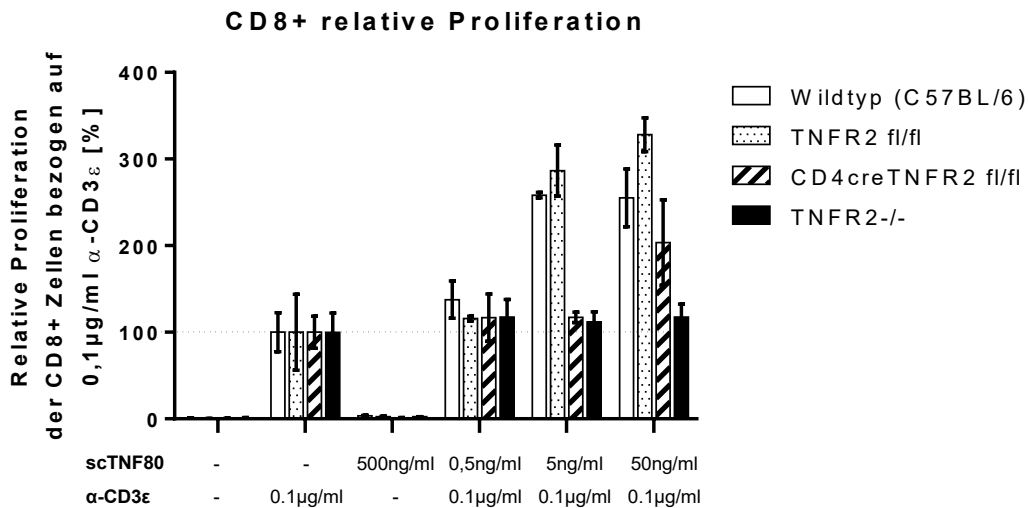
Nachdem eine Konzentration von anti-CD3 $\epsilon$  festgelegt war, erfolgte die Titration von TNCscTNF80, um zu untersuchen, ob bei der Stimulierung mit TNCscTNF80 eine Dosis-Abhängigkeit des bekannten kostimulatorischen Effektes besteht.

Mit zunehmender Konzentration von TNCscTNF80 zeigte sich eine Steigerung der Proliferation sowohl in der CD4<sup>+</sup> Population als auch in der Gruppe der CD8<sup>+</sup> Lymphozyten (**Abb. 13**, **Abb. 14**). Der Effekt von TNCscTNF80 ließ sich nur bei gleichzeitiger Stimulierung des T-Zell Rezeptors mit  $\alpha$ -CD3 $\epsilon$ -Antikörpern beobachten. Eine alleinige Stimulierung des TNFR2 durch den Agonisten hatte keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen. In der Negativkontrolle sowie in der ausschließlich mit TNCscTNF80 stimulierten Probe fanden sich am Ende der 72 h nahezu keine Treg wieder (**Abb. 15**).



**Abb. 13** TNCscTNF80-abhängige Proliferation der CD4<sup>+</sup>Zellen

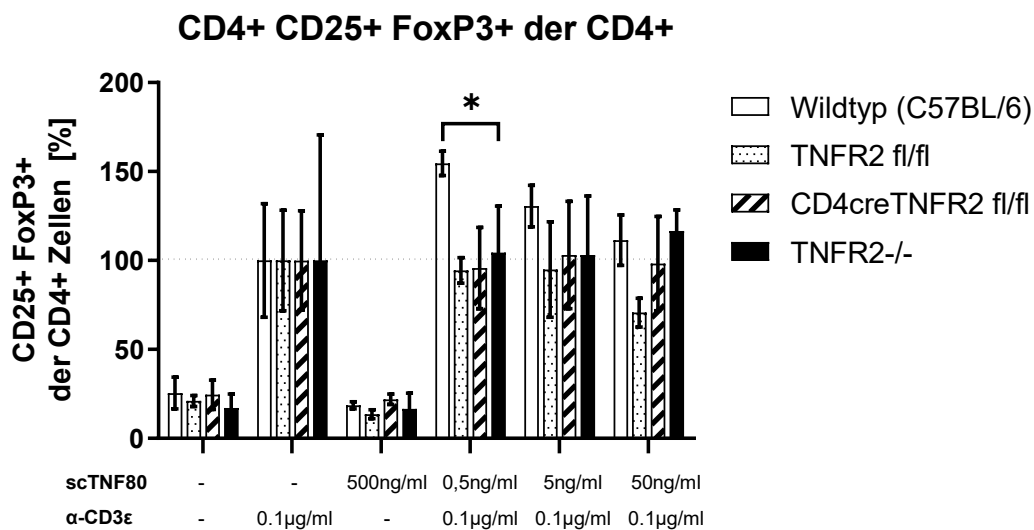
In einem 72 h T-Zell Proliferationsassay wurde der kostimulatorische Effekt einer Gesamtmilzsuspension mit dem TNFR2 spezifischen Agonisten TNCscTNF80 untersucht. Zur Aktivierung der T-Zellen erfolgte die Zugabe eines α-CD3ε-Antikörpers. Die alleinige Stimulierung mit 0,1 µg/ml α-CD3ε wurde als 100 % definiert.



**Abb. 14** TNCscTNF80-abhängige Proliferation der CD8<sup>+</sup> Zellen

In einem 72 h T-Zell Proliferationsassay wurde der kostimulatorische Effekt einer Gesamtmilzsuspension mit dem TNFR2 spezifischen Agonisten TNCscTNF80 untersucht. Zur Aktivierung der T-Zellen erfolgte die Zugabe eines α-CD3ε-Antikörpers. Die alleinige Stimulierung mit 0,1 µg/ml α-CD3ε wurde als 100 % definiert.

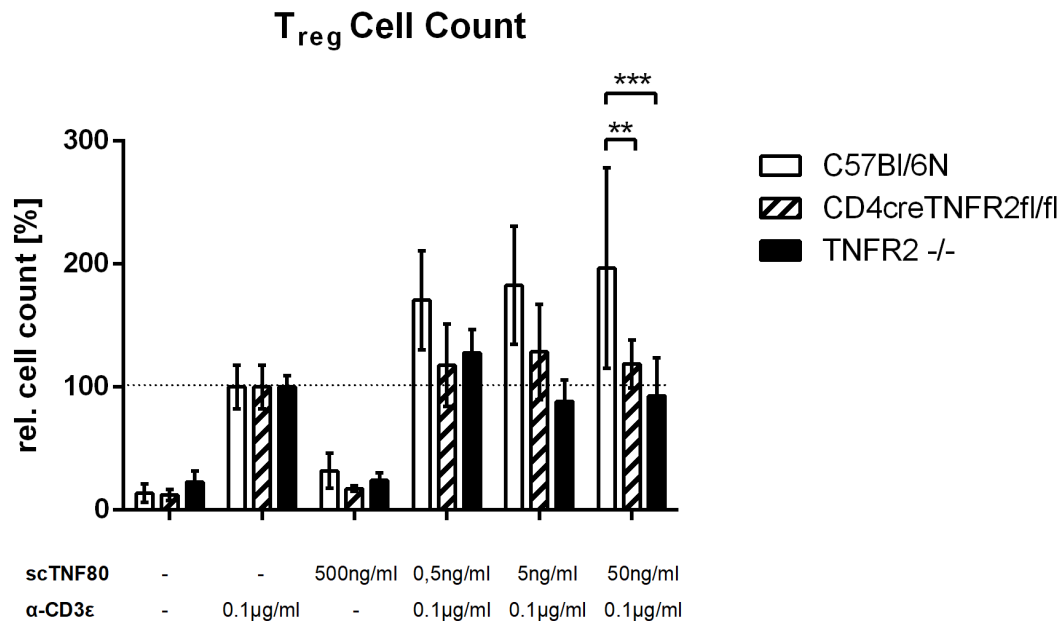
In einer noch niedrigen Konzentration von 0,5 ng/ml TNFscTNF80 fand sich zudem eine Zunahme der Treg Population an den CD4<sup>+</sup> Zellen (**Abb. 15**). Dies bestätigte sich in weiteren Experimenten. In höheren Konzentrationen des Agonisten verschwand der signifikante Unterschied bezüglich des prozentualen Anteils der Treg in der CD4<sup>+</sup> Zellpopulation. Die absoluten Zellzahlen nahmen jedoch mit zunehmender Dosis von TNCscTNF80 zu (**Abb. 15**). Im Rahmen der Titration **Abb. 14** zeigte sich neben Wirkung von TNCscTNF80 auf Treg auch ein deutlicher kostimulatorischer Effekt auf CD8<sup>+</sup> Zellen. Dieser Effekt ließ sich nicht auf CD8<sup>+</sup> Zellen von TNFR2<sup>-/-</sup> Mäusen nachweisen.



**Abb. 15** Prozentualer Anteil der Treg an den CD4<sup>+</sup> Zellen

In einem 72 h T-Zell Proliferationsassay wurde der kostimulatorische Effekt bei der Stimulierung einer Gesamtmilzzellsuspension mit dem TNFR2 spezifischen Agonisten TNCscTNF80 untersucht. Zur Aktivierung der T-Zellen erfolgte die Zugabe eines α-CD3ε-Antikörpers. Die alleinige Stimulierung mit 0,1 μg/ml α-CD3ε wurde als 100 % definiert.





**Abb. 16** Treg-Zellzahl relativ zur Positivkontrolle

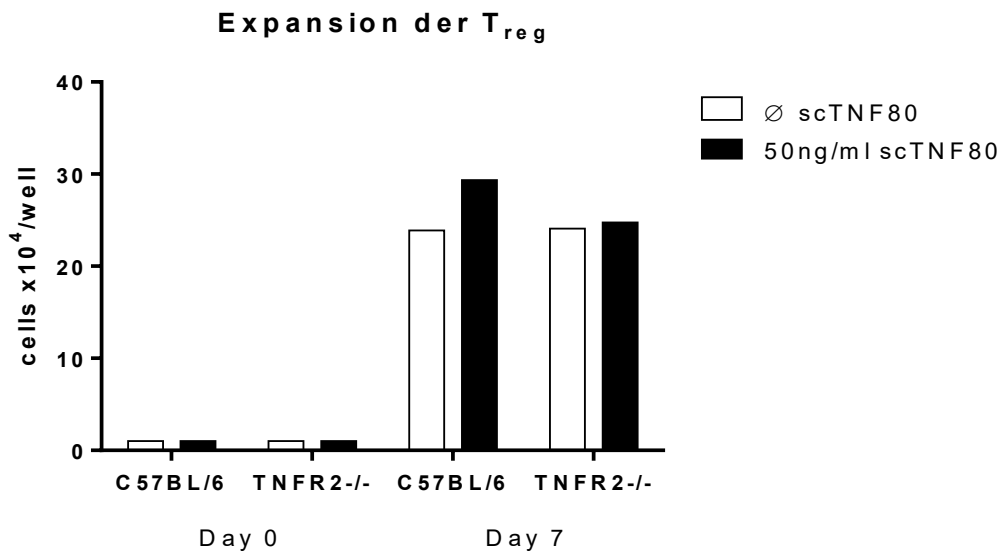
In einem 72 h T-Zell Proliferationsassay wurde der kostimulatorische Effekt bei der Stimulierung einer Gesamtmilzzellsuspension mit dem TNFR2 spezifischen Agonisten TNCscTNF80 untersucht. Zur Aktivierung der T-Zellen erfolgte die Zugabe eines α-CD3ε-Antikörpers. Die alleinige Stimulierung mit 0,1 μg/ml α-CD3ε wurde als Positivkontrolle definiert.

### 3.4 *In vitro* Expansion von Treg

Um spezifisch den Effekt von TNCscTNF80 auf Treg, unter Ausschluss anderer Milzzellen und deren Zell-Zellinteraktionen, zu betrachten, wurde eine Kultur mit möglichst reinen Treg angelegt. Die sich darauf anschließende *in vitro* Expansion der Treg erfolgte nach einem Expansions-Protokoll der Arbeitsgruppe Edinger-Hoffmann (94), um den zuvor in der Gesamtmilzsuspension beobachteten kostimulatorischen Effekt auf Treg gezielt nachzuweisen.

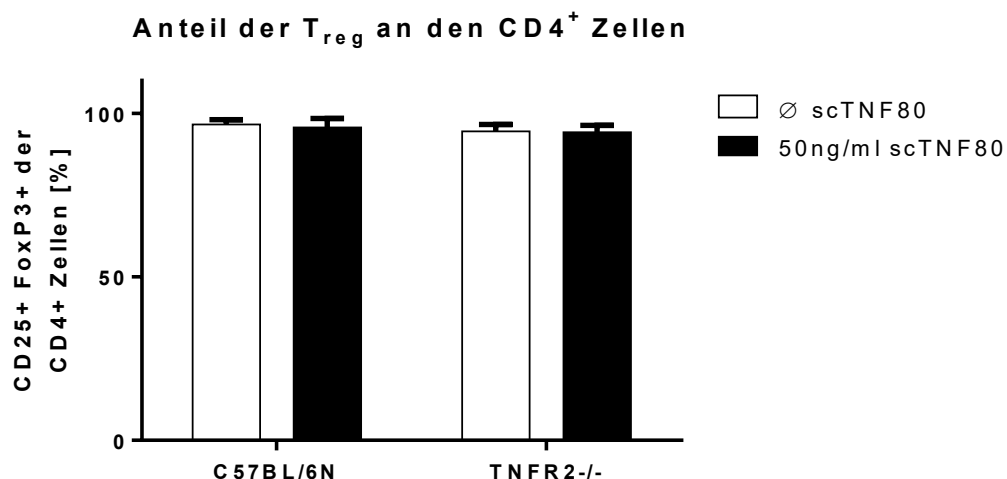
Treg wurden wie unter 2.2.4 beschrieben gewonnen und wie unter 2.2.6 beschrieben in Kultur genommen. Es ließ sich unter Zugabe von TNCscTNF80 eine 29,4-fache Expansionsrate gegenüber einer 23,9-fachen Expansionsrate mit dem Standardprotokoll von Miltenyi Biotec ( $\triangleq$   $\emptyset$  scTNF80 in **Abb. 17**) nachweisen (**Abb. 17**). Wie erwartet, profitierten die Treg aus TNFR2-defizienten Mäusen nicht von der exogenen Zufuhr des TNFR2 Agonisten. Die in drei unabhängigen Experimenten ermittelten Expansionsraten lagen hierbei maximal bei 24,7-fach bei TNFR2<sup>-/-</sup> Treg und bewegten sich

somit im gleichen Bereich wie die 24,1-fache Expansion mit Hilfe des Standardprotokolls bei wt Mäusen ohne Zugabe von TNCscTNF80 (**Abb. 17**). Auch die Reinheit der expandierten Treg lag mit 97 % nahe dem Ausgangswert von Tag 0 (**Abb. 18**).



**Abb. 17** Treg-Expansion - Vergleich der Mauslinien

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup> Treg von wt Mäusen sowie von TNFR2-defizienten (TNFR2<sup>-/-</sup>) Mäusen wurden in Gegenwart von anti-CD3 $\epsilon$ , anti-CD28, und rekombinatem humanen IL-2 ( $\triangleq$  Protokoll von Miltenyi Biotech) mit oder ohne TNCscTNF80 in Kultur genommen. Nach 7 Tagen wurde die Ausbeute der Treg (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) von wt Mäusen und TNFR2-defizienten Mäusen bestimmt und die Expansionsrate berechnet.

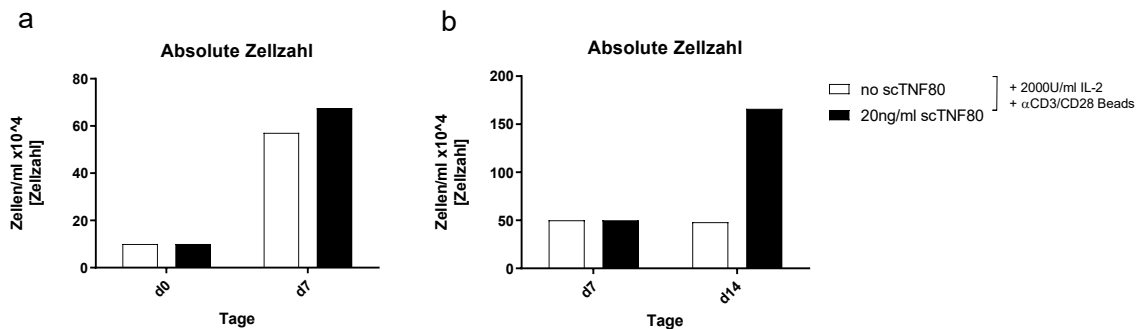


**Abb. 18** Treg-Reinheit nach der Expansion

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup> Treg von wt Mäusen sowie von TNFR2-defizienten (TNFR2<sup>-/-</sup>) Mäusen wurden in Gegenwart von anti-CD3 $\epsilon$ , anti-CD28, und rekombinatem humanen IL-2 mit oder ohne

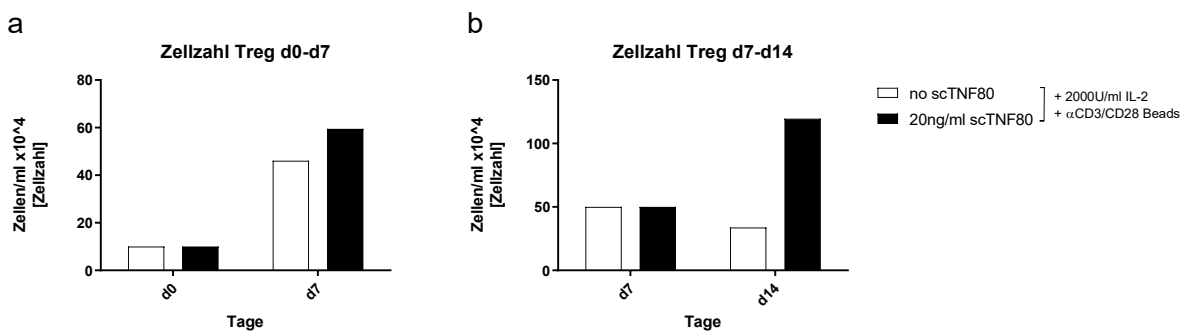
TNCscTNF80 in Kultur genommen. Nach 7 Tagen wurde die Reinheit der Zellkultur in Bezug auf Treg (CD4+Foxp3+) von wt Mäusen und TNFR2-defizienten Mäusen bestimmt.

In einer Wiederholung des Experimentes mit wt Mäusen über einen Zeitraum von insgesamt 14 Tagen, wobei nach 7 Tagen die Kulturen neu angelegt werden mussten, ließ sich bei niedrigerer Expansionsrate derselbe kostimulatorische Effekt von TNCscTNF80 in Kombination mit dem Expansionsprotokoll der Firma Miltenyi auf Treg nachweisen wie in **Abb. 19** und **Abb. 20**. dargestellt.



**Abb. 19** Expansion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup> Treg von wt Mäusen

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup> Treg von wt Mäusen wurden in Gegenwart von anti-CD3 $\epsilon$ , anti-CD28, und rekombinantem humanen IL-2 mit oder ohne TNCscTNF80 in Kultur genommen. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet, die Zellzahl bestimmt (a), eine Färbung auf CD4, CD8 und FoxP3 durchgeführt und die Zellen erneut für 7 Tage in Kultur genommen, erneut gezählt und gefärbt (b).

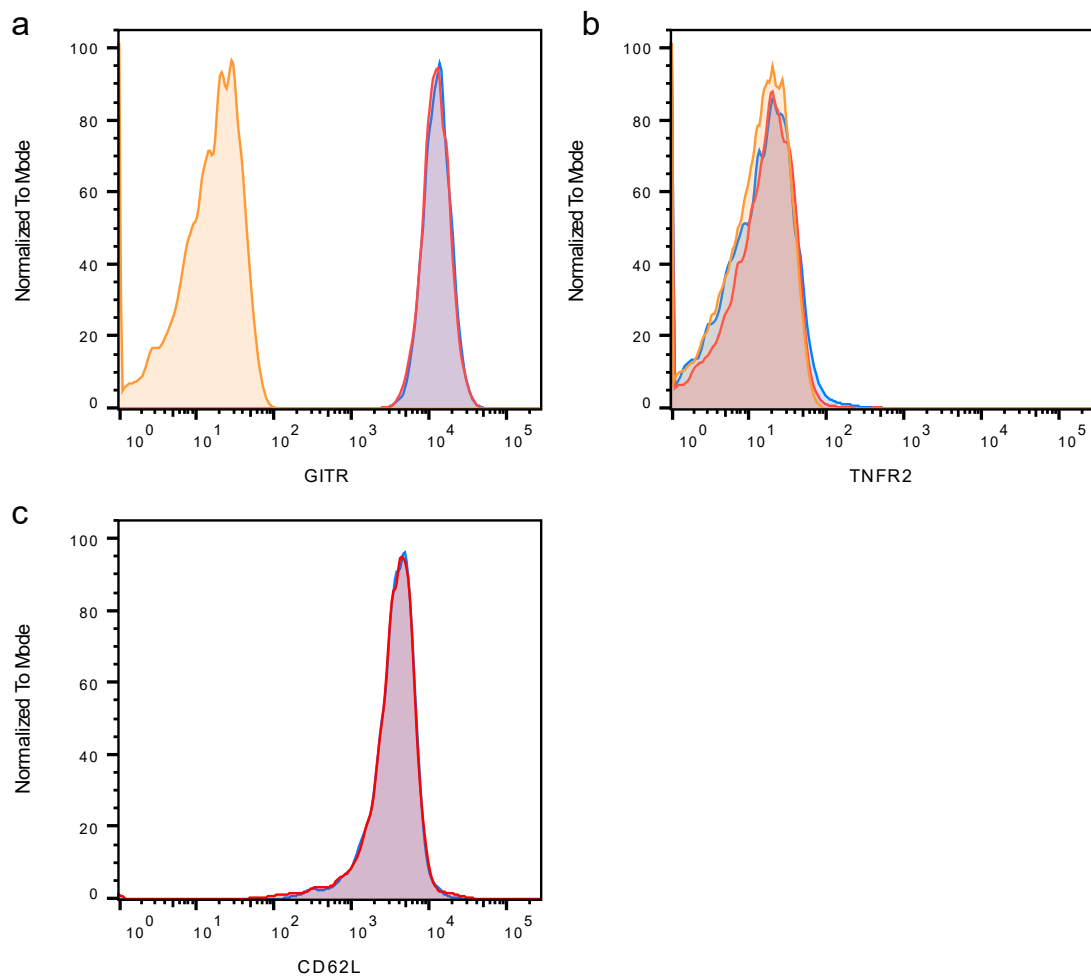


**Abb. 20** Absolute Zellzahlen der Treg nach d0, d7, d14

Ausgehend von den in **Abb. 19** dargestellten Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe der FACS Daten die absolute Zellzahl von vitalen Treg errechnet. Die proportionale Verteilung entspricht den in **Abb. 19** dargestellten Ergebnissen.

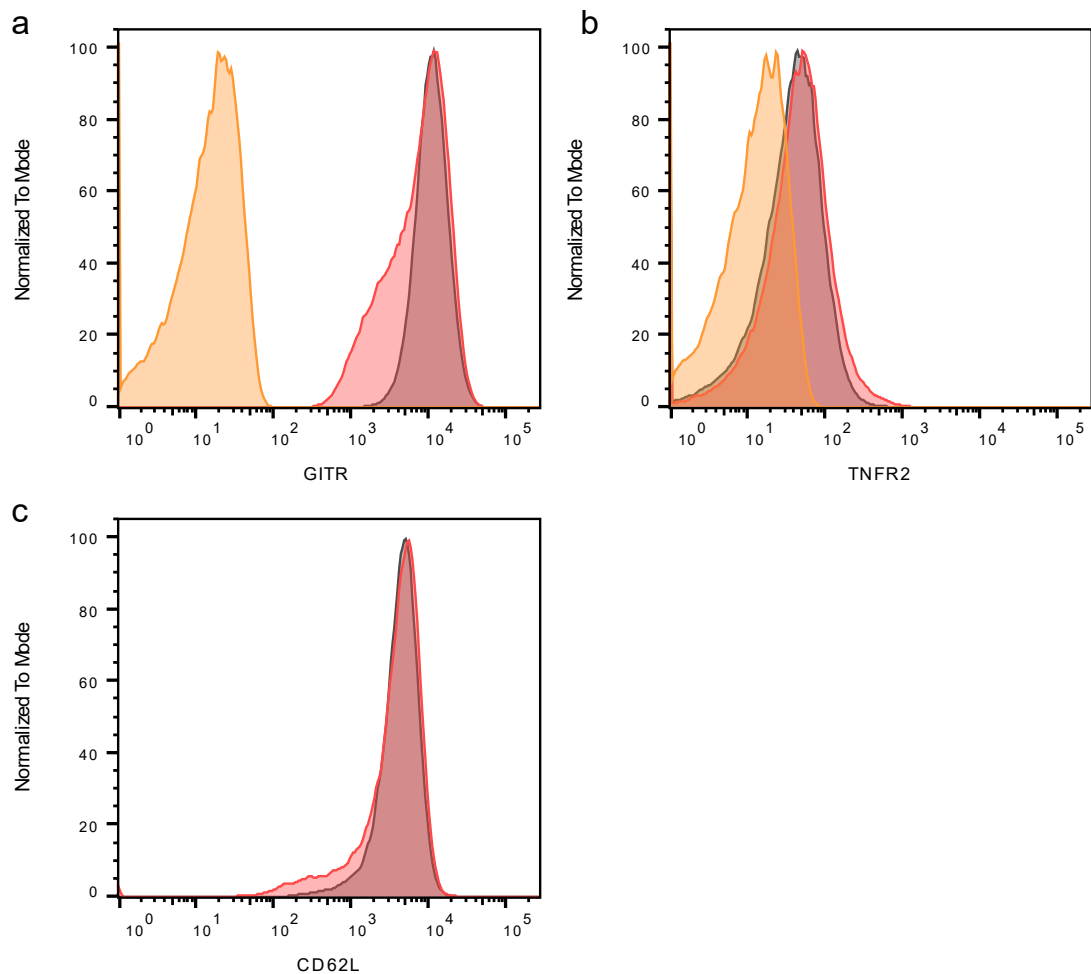
Die im Rahmen von **2.2.6** gewonnenen und in **Abb. 19** gezeigten Zellen wurden mit CD4, CD8 und FoxP3 Antikörpern gefärbt und der Anteil der Treg an den lebenden Einzelzellen berechnet. Ausgehend hiervon wurden die absoluten Zellzahlen der Treg berechnet. In **a**) sind Tag 0 – 7 und in **b**) Tag 7 - 14 der Kultur aufgetragen (**Abb. 20**).

Die untersuchten Oberflächenmarker für Treg zeigten, wie in **Abb. 21** dargestellt, eine nahezu identische Expression der Oberflächenmarker für CD62L bei wt- und TNFR2-defizienten Mäusen (**Abb. 22a**). Die Expression von GITR ist nach Stimulierung mit 50 ng/ml TNCscTNF80 leicht reduziert (**Abb. 22a**). Bei den TNFR2-defizienten Mäusen lässt sich, wie zu erwarten war, kein TNFR2 auf der Oberfläche nachweisen (**Abb. 21b**).



**Abb. 21** Phänotypisierung von Treg nach Expansion (d7) aus TNFR2<sup>-/-</sup>

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup> Treg von TNFR2<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden in Gegenwart von anti-CD3 $\epsilon$ , anti-CD28, und rekombinantem humanen IL-2 mit (blau) oder ohne TNCscTNF80 (rot) in Kultur genommen. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und der Phänotyp über Oberflächenfärbungen bestimmt, im Fall von GITR und TNFR2 erfolgt der Vergleich mit einer Isotyp Färbung (gelb). Die Expression der untersuchten Oberflächenmarker sind in **a** GITR **b** TNFR2 sowie **c** CD62L dargestellt.



**Abb. 22** Phänotypisierung von Treg nach Expansion (d7) aus wt

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup> Treg von wt Mäusen wurden in Gegenwart von anti-CD3ε, anti-CD28, und rekombinanten humanen IL-2 mit (blau) oder ohne TNCscTNF80 (rot) in Kultur genommen. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und der Phänotyp über Oberflächenfärbungen bestimmt, im Fall von GITR und TNFR2 erfolgt der Vergleich mit einer Isotyp Färbung (gelb). **b** u. **c** Expression von CD62L sowie TNFR2.

### 3.4.1 Stabiler Phänotyp bei Stimulierung von wt Treg mit TNCscTNF80

In Bezug auf die untersuchten phänotypischen Merkmale wurde zwischen den Kulturen mit TNCscTNF80 und den Kulturen ohne TNCscTNF80 kein messbarer Unterschied gefunden. Die untersuchten Treg exprimierten weiterhin CD62L, GITR und TNFR2 (**Abb. 22**).

#### 4 Diskussion

Die Therapie von Erkrankungen, denen eine Dysfunktion unseres Immunsystems zugrunde liegt, gestaltete sich bisher immer als schwierig. Eine besondere Herausforderung ist die Balance zwischen zu viel Aktivierung im Falle der pathologischen Autoimmunität und der Unfähigkeit, adäquat auf Pathogene oder entartete Zellen zu reagieren im Falle der Immunsuppression oder bei Tumorerkrankungen. Bei vielen Erkrankungen, die sich aus einer Dysbalance des Immunsystems ergeben, wie den entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems und auch der rheumatoiden Arthritis, handelt es sich um Krankheitsbilder, die oft einen chronischen Verlauf haben (97,98). Die Therapiemöglichkeiten sind eingeschränkt und eine medikamentöse Immunsuppression birgt Risiken wie eine erhöhte Empfänglichkeit für bakterielle, virale und Pilzinfektionen. In den vergangenen Jahren wurden immer wieder Anhaltspunkte dafür gefunden, dass eine Dysfunktion von Treg oder des TNF-TNFR Systems eine wichtige Rolle in der Ätiologie dieser Erkrankungen spielen. Die TNFR2-gesteuerte Expansion von Treg wurde als vielversprechendes therapeutisches Ziel identifiziert, dies gilt z.B. für die rheumatoide Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (86,99,100). In Mausmodellen wurde aber auch für weitere Erkrankungen wie den Pemphigus vulgaris, der Autoimmunhepatitis, der multiplen Sklerose, dem Asthma bronchiale oder auch für Allergien im Allgemeinen gezeigt, dass Treg in der Krankheitsentstehung beteiligt sind und der Einsatz von Antigen-spezifischen Treg einen neuen Therapieansatz darstellen könnte (101–103). Clough et al zeigen außerdem, dass eine Therapie mit Treg nicht nur kurzzeitige Effekte hat, sondern, dass sich expandierte Treg auch noch ein Jahr nach Therapie in relevanten Mengen in Probanden nachweisen ließen (100). Speziell für den systemischen Lupus erythematodes führte die Gabe von in *ex vivo* expandierten Treg in den Mäusen zu einer erst später im Verlauf einsetzenden Nierenbeteiligung und dadurch zu einem verlängerten Überleben (104,105). Es konnte auch in ersten Versuchen an Patienten mit systemischem Lupus erythematodes durch Gabe von rekombinantem IL-2 die Treg-Proliferation angeregt und dadurch eine Reduktion der Krankheitsaktivität erreicht werden (106).

Als medikamentöser Angriffspunkt ist TNFR2 interessant sowohl für Erkrankungen mit überreaktivem Immunsystem (84,107,108) als auch für Erkrankungen mit krankhafter

Treg-Aktivität, wie z.B. im Rahmen von Tumorerkrankungen (109), bei welchen Tumore durch die Präsenz von Treg vor einer effektiven Immunantwort geschützt werden. Ein möglicher Therapieansatz wäre eine gezielte Suppression von TNFR2 mit antagonistischen Antikörpern oder einem TNF-Fusionsproteinen (110,111). Dadurch wären durch eine TNFR2 vermittelte Hemmung der Proliferation von Treg wieder zugänglich für die zelluläre Immunantwort.

Durch das gezielte Ansteuern von TNFR2 erhofft man sich, die Wirkung auf den gewünschten Effekt zu begrenzen und dadurch Nebenwirkungen zu verhindern. Dies ist von besonderem Interesse, da in der bereits etablierten Therapie mit anti-TNF-Medikamenten, wie z.B. Infliximab, Eterncept oder Adalimumab, z.T. so starke Nebenwirkungen auftreten, dass die anti-TNF-Therapie beendet werden muss. Ein Beispiel hierfür ist der Anti-TNF-induzierte systemische Lupus erythematosus, der mit einer Inzidenz von ca. 0,2 % unter Therapie mit Infliximab auftritt (112). In Einzelfällen wurde auch von Demyelinisierung im ZNS als Nebenwirkung der anti-TNF-Therapie berichtet. Die betroffenen Patienten entwickelten eine Neuritis nervi optici, Verwirrtheit oder Gangstörungen (113,114). Dies ist interessant, da bei demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS wie der multiplen Sklerose bekannt ist, dass das TNF-TNFR-System in der Krankheitsentstehung beteiligt ist (115,116). Daher ist ein genaueres Verständnis der Pathomechanismen von Nöten, um hier gezielt therapieren zu können. Es zeichnet sich jedoch ab, dass ein gezielter TNFR2-Agonismus einen neuroprotektiven Effekt hat (117).

Die Wirkung der anti-TNF Antikörper zeigt sich durch Blockade von TNFR1, dessen Signalwege bereits sehr gut untersucht wurden, im Gegensatz dazu sind die für den TNFR2 relevanten Signalwege nach wie vor nicht bis ins letzte Detail erforscht. Insbesondere die Ambiguität in Bezug auf Apoptose und Zellproliferation birgt eine nicht zu unterschätzende Komplexität für die Identifikation von Therapiemöglichkeiten.

Nach Abschluss der *in vivo* Experimente im Mausmodell ist der systemische Einsatz von TNCscTNF80 zur Immunmodulation beim Menschen durchaus denkbar. Ein zu dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten murinen TNCscTNF80 analoges humanes Protein existiert bereits (43).

Da TNFR2 seine herausragende immunmodulatorische Rolle durch Stimulierung von T-Zell Subpopulationen, unter anderem von Treg, zu entfalten scheint, ist die phänotypische und in Bezug auf ihre Expansion auch funktionelle Analyse dieser Zellen das Hauptziel dieser Arbeit. Hierzu kamen Zellen unterschiedlicher Mauslinien mit modifizierter TNFR2-Expression sowie der spezifische TNFR2-Agonist TNCscTNF80 zum Einsatz.

Ein spezieller Fokus dieser Arbeit lag auf der gezielten Expansion von Treg *in vitro* unter der Verwendung von TNCscTNF80 im Hinblick auf eine mögliche Anwendung zur Zelltherapie. In weiteren Schritten kann TNCscTNF80 dann auch ergänzend als Immunmodulator *in vivo* zur Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen verwendet werden, wie dies bereits von Lamontain et al. im Mausmodell gezeigt wurde (86).

Da die Phänotypisierung der in den Versuchen eingesetzten Mauslinien keinen signifikanten Unterschied bezüglich der TNFR2 Expression zwischen den wt Mäusen sowie den TNFR2<sup>fl/fl</sup> zeigte und der konditionelle Knockout des TNFR2 auf T-Zellen in der CD4creTNFR2<sup>fl/fl</sup> Maus sowohl bei CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Zellen erfolgreich war, konnte die Wirkung des TNFR2-Agonisten im Proliferationsassay getestet werden und eine optimale Dosis der TNCscTNF80 Konzentration für weitere Versuche bestimmt werden.

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass durch eine Stimulierung des TNFR2 in Kombination mit TCR Aktivierung in einer Gesamtmilzsuspension eine starke T-Zell Proliferation erreicht wird.

Bereits in früheren Arbeiten war ein kostimulatorischer Effekt bei TCR-Stimulierung in Kombination mit einem TNFR2-Agonismus unabhängig von der TNFR1-Aktivierung beobachtet worden. (118). Diese Ergebnisse ließen sich in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen erneut bestätigen. Sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten nach Aktivierung des TNFR2 mit einem selektiven Agonisten eine erhöhte Proliferationsrate (siehe **3.3.2**). Dies bestätigt frühere Ergebnisse von Kim et al. welcher eine Steigerung der T-Zell Aktivität nach TNFR2-Stimulierung beschrieb (119). Aufgrund der ausgesprochen starken Proliferation von CD8<sup>+</sup> Zellen ist zu erwarten, dass eine selektive effektive Treg-Expansion aus einer Gesamtmilzsuspension nicht



möglich ist. Da CD8<sup>+</sup> T-Zellen insbesondere auch bei Autoimmunerkrankungen eine herausragende Rolle sowohl in der Entstehung als auch in deren physiologischer Regulation spielen (120), sollte in Zukunft eine genauere Untersuchung der Wirkung des TNFR2-spezifischen Agonisten auf CD8<sup>+</sup> Zellen erfolgen.

Bei einer *in vitro* Expansion von Treg muss sichergestellt sein, dass keine Kontamination der Treg durch andere Zellpopulationen wie Teff oder Bakterien geschieht und die Funktion der entstandenen Treg unbeeinträchtigt bleibt (121). In **3.4** konnte nachgewiesen werden, dass TNCscTNF80 gegenüber einem Standard-Protokoll der Treg Expansion eine höhere Treg-Ausbeute bei gleichbleibender Reinheit und identischem Phänotyp in Bezug auf CD62L, FoxP3, GITR erbringt. Der Effekt ließ sich wie erwartet bei TNFR2<sup>-/-</sup> Treg nicht nachweisen (siehe **Abb. 17**). Nach Stimulierung mit TNCscTNF80 kam es zu einer leichten Verminderung der Expression von CD25, dies ist konsistent mit ähnlichen Experimenten von Konstantin Molitor (95).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass TNCscTNF80 zusammen mit TCR-Aktivierung einen TNFR2 abhängigen kostimulatorischen Effekt auf T-Zellen im Allgemeinen hat und in einer reinen Treg-Kultur ohne Verlust der spezifischen Treg-Merkmale eine höhere Ausbeute im Expansionsassay ermöglicht.

## 5 Ausblick

*In vitro* Expansion von Treg unter Verwendung von TNCscTNF80 mit anschließender Replantation *in vivo* birgt großes Potential. Besonders im Vergleich mit der bereits etablierten *in vitro* Expansion mit den Protokollen der Firma Miltenyi Biotec ist eine Steigerung der Ausbeute an Treg interessant.

Die *in vivo* Experimente von Lamontain et al., welche in Kooperation mit der Abteilung für experimentelle Rheumatologie und Neuroendokrino-Immunologie der Universität Regensburg durchgeführt wurden, zeigten im Mausmodell für die rheumatoide Arthritis nach Gabe von TNCscTNF80 *in vivo* eine effektive Suppressivität der stimulierten Treg mit einer einhergehenden Immunmodulation und in Folge reduzierten Krankheitsaktivität. (86).

Es sind weitere Versuche mit durch TNCscTNF80 *in vitro* expandierten und anschließend *in vivo* replantierten Treg nötig, um zu beurteilen, ob sich TNCscTNF80 im Vergleich zu bisherigen Treg-Expansionsassays bewährt. Dadurch ließe sich möglicherweise eine Verbesserung der bisherigen *in vivo* Zelltherapie, wie sie z.B. von Arbeitsgruppe Edinger-Hoffmann, José Carreras Centrum für Interventionelle Immunologie, Universität Regensburg sowie von weiteren internationalen Arbeitsgruppen durchgeführt wird, erreichen (101,122).

Trotz vielversprechenden Therapieoptionen durch gezielte TNFR2 vermittelte Immunmodulation sollte für eine mögliche zukünftige klinische Anwendung beachtet werden, dass der direkte Eingriff in das T-Zell-Signaling bereits früher zu unerwarteten schwerwiegenden Nebenwirkungen geführt hat (123).

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von TNCscTNF80 *in vitro* auf Zellen der T-Zell Reihe, insbesondere jedoch auf Treg. Nach Bestimmung optimaler Kulturbedingungen und Titration von TNCscTNF80, erfolgte eine Phänotypisierung der Milzzellen, um eine grundlegende Charakteristik der Zellen zu erhalten. Die Zellen hierfür wurden aus unterschiedlicher Mauslinien (wt, TNFR2<sup>-/-</sup>, TNFR2<sup>fl/fl</sup>, CD4cre/TNFR2<sup>fl/fl</sup>) Milzen gewonnen. Wir konnten den stark proliferativen Effekt von TNCscTNF80 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Gesamtmilzkultur nachweisen.

In weiteren Experimenten wurden aus Milzen der zuvor phänotypisierten Mauslinien Treg über MACS und FACS isoliert und in Einzelkultur überführt. Anschließend erfolgte eine TNCscTNF80 vermittelte TNFR2-Stimulierung. Hier konnte eine Steigerung der Zell-Expansion bei stabilem Phänotyp der gewonnenen Zellen nachgewiesen werden.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Antigen Presenting Cell
CFDASE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CTLA	cytotoxic lymphocyte antigen
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	FAS-associated protein with death domain
FAS	first apoptosis signal receptor
FcγR	Fc-γ-Rezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GITR)	glucocorticoid-induced TNFR ligand
IκB	Inhibitor of NF-κB
IL	Interleuktin
IPEX	immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
LUBAC	linear ubiquitination chain assembly complex
LT	Lymphotoxin
MACS	Magnetic-activated cell sorting
memTNF	Membrangebundener Tumornekrosefaktor
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
SD	standard deviation
STAR2	selective mouse TNF-based agonist of TNF receptor 2 (siehe TNCscTNF80)
sTNF	Soluble Tumornekrosefaktor
TACE	tumor necrosis factor-α-converting enzyme (auch ADAM17)
TCR	T-Zell Rezeptor
Teff	Effektor T-Zellen
TGF	Transforming growth factor

TNF	Tumornekrosefaktor
TNCscTNF80	spezifischer TNF-Rezeptor Agonist (siehe STAR2)
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH Domain protein
TRAF	TNF-receptor adaptor factor
Treg	regulatorische CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> T-Zellen
wt	Wildtyp

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b>	Schematische Darstellung von TNCscTNF80 .....	7
<b>Abb. 2</b>	Schematische Darstellung der Treg Entwicklung im Thymus .....	9
<b>Abb. 3</b>	CFSE-Schema.....	19
<b>Abb. 4</b>	Beispiel einer Proliferationsanalyse mittels CFSE .....	20
<b>Abb. 5</b>	Gating nach CFSE-Labeling .....	23
<b>Abb. 6</b>	Auswertung der Proliferationsrate .....	24
<b>Abb. 7</b>	Gating der Reinheitsanalyse.....	25
<b>Abb. 8</b>	Phänotypisierung in Bezug auf Treg.....	28
<b>Abb. 9</b>	Phänotypisierung in Bezug auf CD4 <sup>+</sup> Zellen.....	29
<b>Abb. 10</b>	Phänotypisierung in Bezug auf CD8 <sup>+</sup> Zellen.....	29
<b>Abb. 11</b>	Titration von anti-CD3ε (CD4 <sup>+</sup> ) .....	30
<b>Abb. 12</b>	Titration von anti-CD3ε (CD8 <sup>+</sup> ) .....	31
<b>Abb. 13</b>	TNCscTNF80-abhängige Proliferation der CD4 <sup>+</sup> Zellen .....	32
<b>Abb. 14</b>	TNCscTNF80-abhängige Proliferation der CD8 <sup>+</sup> Zellen .....	32
<b>Abb. 15</b>	Prozentualer Anteil der Treg an den CD4 <sup>+</sup> Zellen.....	33
<b>Abb. 16</b>	Treg-Zellzahl relativ zur Positivkontrolle .....	34
<b>Abb. 17</b>	Treg-Expansion - Vergleich der Mauslinien .....	35
<b>Abb. 18</b>	Treg-Reinheit nach der Expansion .....	35
<b>Abb. 19</b>	Expansion von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD62L <sup>+</sup> Treg von wt Mäusen .....	36
<b>Abb. 20</b>	Absolute Zellzahlen der Treg nach d0, d7, d14 .....	36
<b>Abb. 21</b>	Phänotypisierung von Treg nach Expansion (d7) aus TNFR2 <sup>-/-</sup> .....	37
<b>Abb. 22</b>	Phänotypisierung von Treg nach Expansion (d7) aus wt.....	38

### 7.3 Literaturverzeichnis

1. Vanamee ÉS, Faustman DL. Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. *Sci Signal*. 2018;11(511). doi:10.1126/scisignal.aao4910
2. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745–56. doi:10.1038/nri1184
3. Bodmer J-L, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(1):19–26.
4. Inoue Ji, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S, Yamamoto T. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: Adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res*. 2000;254(1):14–24. doi:10.1006/excr.1999.4733
5. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):45–65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189
6. The Human Protein Atlas [Internet]. Available from: <https://www.proteinatlas.org>
7. Berglund L, Björling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, Szigyaró CA-K, Persson A, Ottosson J, Wernérus H, Nilsson P, Lundberg E, Sivertsson A, Navani S, Wester K, Kampf C, Hober S, Pontén F, Uhlén M. A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(10):2019–27. doi:10.1074/mcp.R800013-MCP200
8. Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem*. 1989;264(29):17595–605.
9. Tuma R, Russell M, Rosendahl M, Thomas GJ. Solution conformation of the extracellular domain of the human tumor necrosis factor receptor probed by Raman and UV-resonance Raman spectroscopy: Structural effects of an engineered PEG linker. *Biochemistry*. 1995;34(46):15150–6.
10. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003;114(2):181–90.
11. Mak TW, Yeh W-C. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3S243-52. doi:10.1186/ar569

12. Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenabeele P, Fiers W. Cell death induction by receptors of the TNF family: Towards a molecular understanding. *FEBS Lett.* 1997;410(1):96–106.
13. Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M. The 'complexities' of life and death: Death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res.* 2012;318(11):1269–77. doi:10.1016/j.yexcr.2012.04.005
14. MacEwan DJ. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol.* 2002;135(4):855–75. doi:10.1038/sj.bjp.0704549
15. Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: Drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(6):482–93. doi:10.1038/nrd3030
16. Carpentier I, Coornaert B, Beyaert R. Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2. *Curr Med Chem.* 2004;11(16):2205–12.
17. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhdén M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1995;83(5):793–802.
18. Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, Yoshioka Y, Tsunoda S-i, Nakagawa S, Yamagata Y, Tsutsumi Y. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal.* 2010;3(148):ra83. doi:10.1126/scisignal.2000954
19. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene.* 1998;17(25):3261–70. doi:10.1038/sj.onc.1202568
20. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal.* 2012;24(6):1297–305. doi:10.1016/j.cellsig.2012.02.006
21. Naudé PJW, den Boer JA, Luiten PGM, Eisel ULM. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J.* 2011;278(6):888–98. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08017.x
22. Sun M, Fink PJ. A New Class of Reverse Signaling Costimulators Belongs to the TNF Family. *The Journal of Immunology.* 2007;179(7):4307–12. doi:10.4049/jimmunol.179.7.4307

23. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115(1):1–20. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x
24. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487–501.
25. van Horssen R, Ten Hagen, Timo L M, Eggermont, Alexander M M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*. 2006;11(4):397–408. eng. doi:10.1634/theoncologist.11-4-397
26. Menkin V. Newer concepts of inflammation. Springfield, Ill.: C.C. Thomas; 1950. English.
27. Kolb WP, Granger GA. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Characterization of human lymphotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1968;61(4):1250–5. doi:10.1073/pnas.61.4.1250
28. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975;72(9):3666–70. doi:10.1073/pnas.72.9.3666
29. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*. 1984;312(5996):724–9. doi:10.1038/312724a0
30. Jacob CO, Aiso S, Michie SA, McDevitt HO, Acha-Orbea H. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(3):968–72.
31. Jacob CO, McDevitt HO. Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune 'lupus' nephritis. *Nature*. 1988;331(6154):356–8. doi:10.1038/331356a0
32. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988;53(1):45–53. doi:10.1016/0092-8674(88)90486-2
33. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S-i, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(7):1215–28. doi:10.1093/rheumatology/keq031



34. Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front. Cell Dev. Biol.* 2019;791. doi:10.3389/fcell.2019.00091
35. Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: A historical perspective. *Pharmacology & Therapeutics.* 1994;64(3):529–64. doi:10.1016/0163-7258(94)90023-X
36. Eggermont AM, Schraffordt Koops H, Liénard D, Kroon BB, van Geel AN, Hoekstra HJ, Lejeune FJ. Isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma and melphalan for non-resectable extremity soft tissue sarcomas: a multicenter trial. *J Clin Oncol.* 1996;14(10):2653–65. doi:10.1200/JCO.1996.14.10.2653
37. Monaco C, Nanchahal J, Taylor P, Feldmann M. Anti-TNF therapy: Past, present and future. *Int Immunol.* 2015;27(1):55–62. doi:10.1093/intimm/dxu102
38. Bremer E. Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. *ISRN Oncol.* 2013;2013371854. doi:10.1155/2013/371854
39. Faustman DL, Davis M. TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine. *Front Immunol.* 2013;4478. doi:10.3389/fimmu.2013.00478
40. Feldmann M, Maini RN. Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med.* 2003;9(10):1245–50. doi:10.1038/nm939
41. Williams RO. Collagen-induced arthritis in mice: a major role for tumor necrosis factor-alpha. *Methods Mol Biol.* 2007;361265–84. doi:10.1385/1-59745-208-4:265
42. Krippner-Heidenreich A, Grunwald I, Zimmermann G, Kühnle M, Gerspach J, Sterns T, Shnyder SD, Gill JH, Männel DN, Pfizenmaier K, Scheurich P. Single-chain TNF, a TNF derivative with enhanced stability and antitumoral activity. *J Immunol.* 2008;180(12):8176–83. doi:10.4049/jimmunol.180.12.8176
43. Chopra M, Biehl M, Steinfatt T, Brandl A, Kums J, Amich J, Vaeth M, Kuen J, Holtappels R, Podlech J, Mottok A, Kraus S, Jordán-Garrote A-L, Bäuerlein CA, Brede C, Ribechini E, Fick A, Seher A, Polz J, Ottmüller KJ, Baker J, Nishikii H, Ritz M, Mattenheimer K, Schwinn S, Winter T, Schäfer V, Krappmann S, Einsele H, Müller TD, Reddehase MJ, Lutz MB, Männel DN, Berberich-Siebelt F, Wajant

- H, Beilhack A. Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion. *J Exp Med.* 2016;213(9):1881–900. doi:10.1084/jem.20151563
44. Loetscher H, Stueber D, Banner D, Mackay F, Lesslauer W. Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J Biol Chem.* 1993;268(35):26350–7.
  45. Fischer R, Maier O, Siegemund M, Wajant H, Scheurich P, Pfizenmaier K. A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27621. eng. doi:10.1371/journal.pone.0027621
  46. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaber SA. Suppressor T cells. *J Immunol.* 1972;108(3):586–90.
  47. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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):1151–64.
  48. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: Induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998;10(12):1969–80.
  49. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Experimental Medicine.* 2000;192(2):303–10.
  50. Singh B, Schwartz JA, Sandrock C, Bellemore SM, Nikoopour E. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *Indian J Med Res.* 2013;138(5):591–4.
  51. Lan RY, Ansari AA, Lian Z-X, Gershwin ME. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005;4(6):351–63. doi:10.1016/j.autrev.2005.01.007

52. Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Front Immunol.* 2012;330. doi:10.3389/fimmu.2012.00030
53. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6(4):345–52. doi:10.1038/ni1178
54. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: More questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(6):389–400. doi:10.1038/nri821
55. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 2003. 299: 1057-1061. *J Immunol.* 2017;198(3):981–5.
56. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057–61. doi:10.1126/science.1079490
57. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330–6. doi:10.1038/ni904
58. Law JP, Hirschhorn DF, Owen RE, Biswas HH, Norris PJ, Lanteri MC. The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in identifying CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Cytometry A.* 2009;75(12):1040–50. doi:10.1002/cyto.a.20815
59. Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard, O. M. Zack, Männel DN, Oppenheim JJ. Cutting edge: Expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol.* 2008;180(10):6467–71.
60. Chen X, Wu X, Zhou Q, Howard, O M Zack, Netea MG, Oppenheim JJ. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol.* 2013;190(3):1076–84. doi:10.4049/jimmunol.1202659
61. Chen X, Subleski JJ, Hamano R, Howard, O M Zack, Wiltout RH, Oppenheim JJ. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional

- CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur J Immunol.* 2010;40(4):1099–106. eng. doi:10.1002/eji.200940022
62. Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard, O. M. Zack, Männel DN, Oppenheim JJ. Cutting Edge: Expression of TNFR2 Defines a Maximally Suppressive Subset of Mouse CD4+CD25+FoxP3+ T Regulatory Cells: Applicability to Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology.* 2008;180(10):6467–71. doi:10.4049/jimmunol.180.10.6467
  63. Chen X, Bäümel M, Männel DN, Howard, O. M. Zack, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2007;179(1):154–61.
  64. Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, Negrin RS, Fathman CG, Strober S. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood.* 2005;105(5):2220–6. doi:10.1182/blood-2004-05-2044
  65. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:139–76. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107
  66. Apert C, Romagnoli P, van Meerwijk JPM. IL-2 and IL-15 dependent thymic development of Foxp3-expressing regulatory T lymphocytes. *Protein Cell.* 2018;9(4):322–32. doi:10.1007/s13238-017-0425-3
  67. Kieback E, Hilgenberg E, Stervbo U, Lampropoulou V, Shen P, Bunse M, Jaimes Y, Boudinot P, Radbruch A, Klemm U, Köhl AA, Liblau R, Hoevelmeyer N, Anderton SM, Uckert W, Fillatreau S. Thymus-Derived Regulatory T Cells Are Positively Selected on Natural Self-Antigen through Cognate Interactions of High Functional Avidity. *Immunity.* 2016;44(5):1114–26. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.018
  68. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-j, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. 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):1875–86. doi:10.1084/jem.20030152

69. Housley WJ, Adams CO, Nichols FC, Puddington L, Lingenheld EG, Zhu L, Rajan TV, Clark RB. Natural but not inducible regulatory T cells require TNF- $\alpha$  signaling for in vivo function. *J Immunol.* 2011;186(12):6779–87. doi:10.4049/jimmunol.1003868
70. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490–500. doi:10.1038/nri2785
71. Nie J, Li YY, Zheng SG, Tsun A, Li B. FOXP3(+) Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2015;6:493. doi:10.3389/fimmu.2015.00493
72. Blair PJ, Bultman SJ, Haas JC, Rouse BT, Wilkinson JE, Godfrey VL. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J Immunol.* 1994;153(8):3764–74.
73. Thornton AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *Journal of Experimental Medicine.* 1998;188(2):287–96.
74. Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531–62. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122
75. Huang C-T, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DAA. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004;21(4):503–13. doi:10.1016/j.immuni.2004.08.010
76. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol.* 2006;176(11):6752–61.
77. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine.* 2000;192(2):295–302.

78. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* 2001;166(5):3008–18.
79. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006;21228–50. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x
80. Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.* 2004;172(2):834–42.
81. Long SA, Buckner JH. CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *J Immunol.* 2011;187(5):2061–6. doi:10.4049/jimmunol.1003224
82. Ochs HD, Gambineri E, Torgerson TR. IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity. *Immunol Res.* 2007;38(1-3):112–21. doi:10.1007/s12026-007-0022-2
83. Kleinewietfeld M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol Rev.* 2014;259(1):231–44. doi:10.1111/imr.12169
84. Ohl K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 2015;45(2):344–55. doi:10.1002/eji.201344280
85. Cooles FAH, Isaacs JD, Anderson AE. Treg cells in rheumatoid arthritis: an update. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;15(9):352. doi:10.1007/s11926-013-0352-0
86. Lamontain V, Schmid T, Weber-Steffens D, Zeller D, Jenei-Lanzl Z, Wajant H, Straub RH, Männel DN. Stimulation of TNF receptor type 2 expands regulatory T cells and ameliorates established collagen-induced arthritis in mice. *Cell Mol Immunol.* 2018. doi:10.1038/cmi.2017.138
87. Okubo Y, Mera T, Wang L, Faustman DL. Homogeneous expansion of human T-regulatory cells via tumor necrosis factor receptor 2. *Sci Rep.* 2013;33153. eng. doi:10.1038/srep03153
88. Erickson SL, Sauvage FJ de, Kikly K, Carver-Moore K, Pitts-Meek S, Gillett N, Sheehan KC, Schreiber RD, Goeddel DV, Moore MW. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature.* 1994;372(6506):560–3. doi:10.1038/372560a0

89. Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet.* 2000;25(2):139–40. doi:10.1038/75973
90. Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, Jessup HK, Lehar S, Makar KW, Pérez-Melgosa M, Sweetser MT, Schlissel MS, Nguyen S, Cherry SR, Tsai JH, Tucker SM, Weaver WM, Kelso A, Jaenisch R, Wilson CB. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity.* 2001;15(5):763–74.
91. Parel Y, Chizzolini C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev.* 2004;3(3):215–20. doi:10.1016/j.autrev.2003.09.001
92. Quah BJC, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc.* 2007;2(9):2049–56. doi:10.1038/nprot.2007.296
93. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 1990;11(2):231–8. doi:10.1002/cyto.990110203
94. Schmid T, Falter L, Weber S, Müller N, Molitor K, Zeller D, Weber-Steffens D, Hehlgans T, Wajant H, Mostböck S, Männel DN. Chronic Inflammation Increases the Sensitivity of Mouse Treg for TNFR2 Costimulation. *Front Immunol.* 2017;8:1471. doi:10.3389/fimmu.2017.01471
95. Molitor KB. Modulation von T-Zell-Funktionen durch Aktivierung von TNFR2 mit Fokus auf regulatorische T-Zellen. Available from: <https://epub.uni-regensburg.de/33566/>
96. Müller NB. Einfluss des TNF/TNF-Rezeptor-Systems auf Myeloid-Derived Suppressor Cells. Available from: <https://epub.uni-regensburg.de/36061/>
97. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl JA, Woody JN. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor  $\alpha$  (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *The Lancet.* 1994;344(8930):1105–10. doi:10.1016/S0140-6736(94)90628-9
98. Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A New Venue of TNF Targeting. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5). doi:10.3390/ijms19051442

99. Punit S, Dubé PE, Liu CY, Girish N, Washington MK, Polk DB. Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Restricts the Pathogenicity of CD8(+) T Cells in Mice With Colitis. *Gastroenterology*. 2015;149(4):993-1005.e2. doi:10.1053/j.gastro.2015.06.004
100. Zou H, Li R, Hu H, Hu Y, Chen X. Modulation of Regulatory T Cell Activity by TNF Receptor Type II-Targeting Pharmacological Agents. *Front Immunol*. 2018;9:594. doi:10.3389/fimmu.2018.00594
101. Clough JN, Omer OS, Tasker S, Lord GM, Irving PM. Regulatory T-cell therapy in Crohn's disease: challenges and advances. *Gut*. 2020;69(5):942–52. doi:10.1136/gutjnl-2019-319850
102. Brinke A ten, Martinez-Llordella M, Cools N, Hilkens CMU, van Ham SM, Sawitzki B, Geissler EK, Lombardi G, Trzonkowski P, Martinez-Caceres E. Ways Forward for Tolerance-Inducing Cellular Therapies- an AFACTT Perspective. *Front Immunol*. 2019;10:181. doi:10.3389/fimmu.2019.00181
103. Singer BD, King LS, D'Alessio FR. Regulatory T cells as immunotherapy. *Front Immunol*. 2014;5:46. doi:10.3389/fimmu.2014.00046
104. Scalapino KJ, Daikh DI. Suppression of glomerulonephritis in NZB/NZW lupus prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *PLoS ONE*. 2009;4(6):e6031. doi:10.1371/journal.pone.0006031
105. Scalapino KJ, Tang Q, Bluestone JA, Bonyhadi ML, Daikh DI. Suppression of disease in New Zealand Black/New Zealand White lupus-prone mice by adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells. *J Immunol*. 2006;177(3):1451–9. doi:10.4049/jimmunol.177.3.1451
106. He J, Zhang X, Wei Y, Sun X, Chen Y, Deng J, Jin Y, Gan Y, Hu X, Jia R, Xu C, Hou Z, Leong YA, Zhu L, Feng J, An Y, Jia Y, Li C, Liu X, Ye H, Ren L, Li R, Yao H, Li Y, Chen S, Zhang X, Su Y, Guo J, Shen N, Morand EF, Di Yu, Li Z. Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4(+) T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat Med*. 2016;22(9):991–3. doi:10.1038/nm.4148
107. Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine*. 2015;72(2):146–53. doi:10.1016/j.cyto.2014.12.027



108. Okubo Y, Torrey H, Butterworth J, Zheng H, Faustman DL. Treg activation defect in type 1 diabetes: correction with TNFR2 agonism. *Clin Transl Immunology*. 2016;5(1):e56. doi:10.1038/cti.2015.43
109. Torrey H, Butterworth J, Mera T, Okubo Y, Wang L, Baum D, Defusco A, Plager S, Warden S, Huang D, Vanamee E, Foster R, Faustman DL. Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs. *Sci Signal*. 2017;10(462). doi:10.1126/scisignal.aaf8608
110. Wajant H, Beilhack A. Targeting Regulatory T Cells by Addressing Tumor Necrosis Factor and Its Receptors in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation and Cancer. *Front Immunol*. 2019;102040. doi:10.3389/fimmu.2019.02040
111. Medler J, Wajant H. Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets*. 2019;23(4):295–307. doi:10.1080/14728222.2019.1586886
112. Almoallim H, Al-Ghamdi Y, Almaghrabi H, Alyasi O. Anti-Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induced Systemic Lupus Erythematosus. *Open Rheumatol J*. 2012;6315–9. doi:10.2174/1874312901206010315
113. Mohan N, Edwards ET, Cupps TR, Oliverio PJ, Sandberg G, Crayton H, Richert JR, Siegel JN. Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor ? therapy for inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*. 2001;44(12):2862–9. doi:10.1002/1529-0131(200112)44:12<2862:aid-art474>3.0.co;2-w
114. Simsek I, Erdem H, Pay S, Sobaci G, Dinc A. Optic neuritis occurring with anti-tumour necrosis factor alpha therapy. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(9):1255–8. doi:10.1136/ard.2006.066787
115. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *Journal of Experimental Medicine*. 1989;170(2):607–12. doi:10.1084/jem.170.2.607
116. Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1991;325(7):467–72. doi:10.1056/NEJM199108153250704
117. Dong Y, Fischer R, Naudé PJW, Maier O, Nyakas C, Duffey M, van der Zee EA, Dekens D, Douwenga W, Herrmann A, Guenzi E, Kontermann RE, Pfizenmaier

- K, Eisel ULM. Essential protective role of tumor necrosis factor receptor 2 in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(43):12304–9. doi:10.1073/pnas.1605195113
118. Grell M, Becke FM, Wajant H, Männel DN, Scheurich P. TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol*. 1998;28(1):257–63.
119. Kim EY, Teh HS. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J Immunol*. 2001;167(12):6812–20.
120. Gravano DM, Hoyer KK. Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells. *J Autoimmun*. 2013;4568–79. doi:10.1016/j.jaut.2013.06.004
121. Arroyo Hornero R, Georgiadis C, Hua P, Trzuppek D, He L-Z, Qasim W, Todd JA, Ferreira RC, Wood KJ, Issa F, Hester J. CD70 expression determines the therapeutic efficacy of expanded human regulatory T cells. *Commun Biol*. 2020;3(1):375. doi:10.1038/s42003-020-1097-8
122. Riegel C, Boeld TJ, Doser K, Huber E, Hoffmann P, Edinger M. Efficient treatment of murine acute GvHD by in vitro expanded donor regulatory T cells. *Leukemia*. 2020;34(3):895–908. doi:10.1038/s41375-019-0625-3
123. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltsis N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*. 2006;355(10):1018–28. doi:10.1056/NEJMoa063842

#### 7.4 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Frau Prof. Daniela Männel, Leiterin des Instituts für Immunologie der Universität Regensburg, bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen.

Besonderen Dank auch an Tobias Schmid und Dorothea Weber-Steffens für die gute Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Frau Dr. med. Stefanie Joos danke ich für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens und die liebevolle Unterstützung.