

**Rolle der regulatorischen T Zellen in der Toleranzinduktion  
von B Zellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Janine Gotot

aus

Walsleben (Altmark)

Bonn 2012

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde an den Instituten für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie am Universitätsklinikum Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Percy Knolle  
Institut für Molekulare Medizin  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Kurts  
Institut für Experimentelle Immunologie  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Tag der Promotion: 20.02.2013

Erscheinungsjahr: 2013

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung vom 03.06.2011 im Zeitraum von Juli 2009 bis September 2012 von Herrn Prof. Dr. Knolle und Herrn Prof. Kurts betreut.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass

- die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,
- die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind,
- die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind, sowie eine Erklärung über frühere Promotionsversuche und deren Resultate,
- für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde sowie keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen

Bonn, den 17.09.2012

*Meiner Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Autoimmunerkrankungen .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 B Zellen .....</b>	<b>1</b>
1.2.1 Funktion und Aktivierung von B Zellen.....	1
1.2.2 Reifung von B Lymphozyten.....	4
1.2.3 Toleranzmechanismen gegen autoreaktive B Lymphozyten .....	5
<b>1.3 Regulatorische T Zellen .....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Phänotypische Charakterisierung und Funktion.....	7
1.3.2 Homöostase und Entwicklung von Tregs .....	8
1.3.3 Suppressionsmechanismen von regulatorischen T Zellen .....	11
<b>1.4 B Zell - Treg Interaktion .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 „Programmed Death 1“ .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Ziel der Arbeit .....</b>	<b>18</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>19</b>
3.1.1 Equipment .....	19
3.1.2 Software.....	20
3.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	20
3.1.4 Chemikalien und Reagenzien .....	21
3.1.5 Puffer, Medien und Lösungen .....	23
3.1.6 Antikörper .....	25
3.1.7 Mauslinien .....	28
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.2.1 Mausexperimente.....	29
3.2.2 Zellpräparation.....	29
3.2.3 Isolation von primären Mauszellen .....	30
3.2.4 <i>in vitro</i> Zellkultur .....	32
3.2.5 „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) .....	33
3.2.6 ELISPOT .....	34
3.2.7 FACS.....	35

3.2.8 Real-time reverse-transcription PCR.....	36
3.2.9 Statistik .....	37
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Induktion Treg vermittelter peripherer B Zelltoleranz gegen gewebespezifische Antigene .....</b>	<b>38</b>
4.1.1 Tregs supprimieren Antigen-spezifisch die Autoantikörperproduktion gegen glomeruläre Autoantigene .....	38
<b>4.2 PD-1 -- PDL-1/2 vermittelte Suppression von B Zellen durch Antigen-spezifische Tregs .....</b>	<b>40</b>
4.2.1 mRNA Expression inhibitorischer Rezeptoren auf antigenspezifischen B Zellen....	40
4.2.2 PD-1 Expressionssteigerung auf OVA spezifischen B Zellen .....	41
4.2.3 PD-1 Expressionssteigerung ist abhängig von der Interaktion mit antigenspezifischen Tregs .....	43
4.2.4 Antigen-spezifische Tregs unterdrücken kontaktabhängig die B Zellimmunantwort <i>in vitro</i> .....	44
4.2.5 PD-1 Blockade hebt die antigenspezifische Suppression auf.....	47
4.2.6 Stimulierende PD-1 Ligation induziert Apoptose <i>in vitro</i> .....	49
4.2.7 Periphere, antigenspezifische Toleranz ist abhängig vom PD-1 Signalweg <i>in vivo</i> .	50
4.2.8 IFN-gamma induzierte IgG Subtypen werden von PD-1 beeinflusst .....	51
4.2.9 PD-1 Expression auf B Zellen ist notwendig für die Suppression durch Antigen-spezifische Tregs.....	53
4.2.10 Induktion der antigenspezifischen Tregs erfolgt im drainierenden Lymphknoten .....	55
4.2.11 Steigerung der PDL-1/2 Expression auf Tregs durch Immunisierung.....	57
4.2.12 antigenspezifische Tregs sind notwendig und hinreichend zur B Zellsuppression .....	59
4.2.13 Blockade der PD-1 Liganden hebt die inhibitorische Wirkung der Tregs auf.....	61
<b>4.3 Direkte B Zellsuppression <i>in vivo</i> .....</b>	<b>62</b>
4.3.1 PD-1 Expression auf T Helferzellen bleibt nach Immunisierung unverändert .....	62
4.3.2 B Zellsuppression durch spezifische Tregs ist unabhängig von intermediären T Helferzellen .....	63
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1 Regulatorische T Zellen - ein zusätzlicher peripherer Toleranzmechanismus....</b>	<b>66</b>
<b>5.2 PD-1 vermittelte Suppression.....</b>	<b>67</b>
5.2.1 Einfluss des Aktivierungsstatus der Tregs auf die B Zellantwort .....	67

5.2.2 Kontaktabhängigkeit der Suppression.....	68
5.2.3 Granzym B, Perforin und Fas als potenzielle Effektormoleküle .....	69
5.2.4 PD-1 als Effektormolekül .....	70
<b>5.3 direkte Interaktion.....</b>	<b>73</b>
<b>5.4 Einfluss von PD-1 auf die Antikörpersubklassen.....</b>	<b>75</b>
<b>5.5 natürliche vs. induzierte Tregs.....</b>	<b>77</b>
<b>5.6 Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen.....</b>	<b>78</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>80</b>
<b>7. Referenzen .....</b>	<b>81</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>9. Abkürzungen.....</b>	<b>97</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>99</b>
<b>11. Appendix .....</b>	<b>100</b>

## **Abstract**

Autoantibodies mediate several types of autoimmune diseases. On the one hand, they cause systemic diseases like Systemic Lupus Erythematosus, and on the other hand they can affect just one organ like the kidney in certain forms of Glomerulonephritis. Controlling or eliminating autoreactive B cells is therefore of great importance for future therapeutic strategies. The aim of this study was to analyse B cell tolerance in the NOH mouse model and to identify the molecular mechanism behind it. Dr. Isis Ludwig-Portugall recently reported that regulatory T cells (Treg) suppress tissue-specific autoreactive B cells by initiating apoptosis, curbing proliferation and additionally controlling the isotype switch of produced antibodies. This suppression was antigen specific and contact-dependent.

Extending these studies, I demonstrated that Tregs are essential and sufficient to prevent autoreactive B cells from producing antibodies. Tregs induced PD-1 expression on B cells for suppression, whereas the expression of other inhibitory molecules like Fas or TGF- $\beta$ 2 receptor remained unchanged. The functional relevance of PD-1 on B cells was demonstrated by *in vitro* experiments using a stimulating PD-1 antibody fragment to induce apoptosis. Furthermore PD-1 deficient autoreactive B cells could no longer be suppressed by antigen specific Tregs *in vivo* compared to wildtype B cells, supporting the *in vitro* data. The PD-1 ligands PDL-1 and PDL-2 mediated the inhibitory effects of regulatory T cells, and PDL-1, but not PDL-2 was further upregulated after activation. Additional experiments showed that B cell suppression did not require intermediate PD-1+ cells like T helper cells. Blocking PD-1 and depleting regulatory T cells failed to reveal synergistic effects, supporting a model where T<sub>regs</sub> acted through PD-1 only. In summary, my results demonstrated direct *in vivo* suppression of autoreactive B cells through regulatory T cells via PD-1 – PDL-1/2 and describe a formerly unknown peripheral B cell tolerance mechanism against tissue specific autoantigens.

# 1. Einleitung

## 1.1 Autoimmunerkrankungen

Autoimmunität ist die Antwort des adaptiven Immunsystems gegen körpereigene Antigene bei Ausfall der immunologischen Selbst-Toleranz, was zur Entzündung und Zerstörung von körpereigenen Geweben führt. Man unterscheidet organspezifische und systemische Autoimmunerkrankungen. Die Hashimoto-Thyreoiditis, die Basedow-Krankheit sowie Diabetes mellitus Typ 1 sind Beispiele für organspezifische Erkrankungen, die die Schilddrüse, die Wirbelsäule bzw. den Pankreas betreffen. Beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder dem Sjögren-Syndrom werden Antigene erkannt, die ubiquitär exprimiert werden wie z.B. Chromatin. Die Mechanismen der Gewebeschädigung lassen sich in T und B Zell-abhängige Reaktionen einteilen. Die B Zell-medierte Immunreaktionen werden entweder über IgG/IgM Antworten gegen Autoantigene auf der Zelloberfläche bzw. in extrazellulärer Matrix (entspricht einer Typ II Hypersensibilitätsreaktion) oder über Immunkomplexe aus Autoantikörpern und löslichen Autoantigenen (entspricht einer Typ III Hypersensibilitätsreaktion) vermittelt. Daher spielen die B Zellen eine zentrale Rolle bei vielen autoimmuner Erkrankungen.<sup>1</sup>

## 1.2 B Zellen

### 1.2.1 Funktion und Aktivierung von B Zellen

Die Hauptfunktion der B Lymphozyten bei der Bekämpfung diverser Pathogene ist die Sekretion von Antikörpern (humorale Immunantwort). Darüber hinaus fungieren B Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (APC), die CD4 T Zellen *in vitro*<sup>2,3</sup> und *in vivo*<sup>4-6</sup> und CD8 T Zellen durch Kreuzpräsentation aktivieren<sup>7</sup>. B Lymphozyten werden in drei verschiedene Arten unterteilt: B1, B2 und Marginalzonen B Zellen. Die B2 „normalen“ B Zellen stellen den Hauptteil der B Zellen dar. Die B1 B Zellen sind vor allem in der Bauchhöhle lokalisiert und erkennen vorwiegend Kohlenhydratantigene. Im Unterschied zu B2 Lymphozyten sind B1 Zellen größer, durchlaufen weniger Hypermutation sowie Klassenwechsel<sup>8</sup> und STAT3 ist konstitutiv aktiviert<sup>9</sup>. Marginalzonen B Zellen entsprechen nur etwa 5% der B Lymphozyten in der Milz, sind aber ein wichtiger

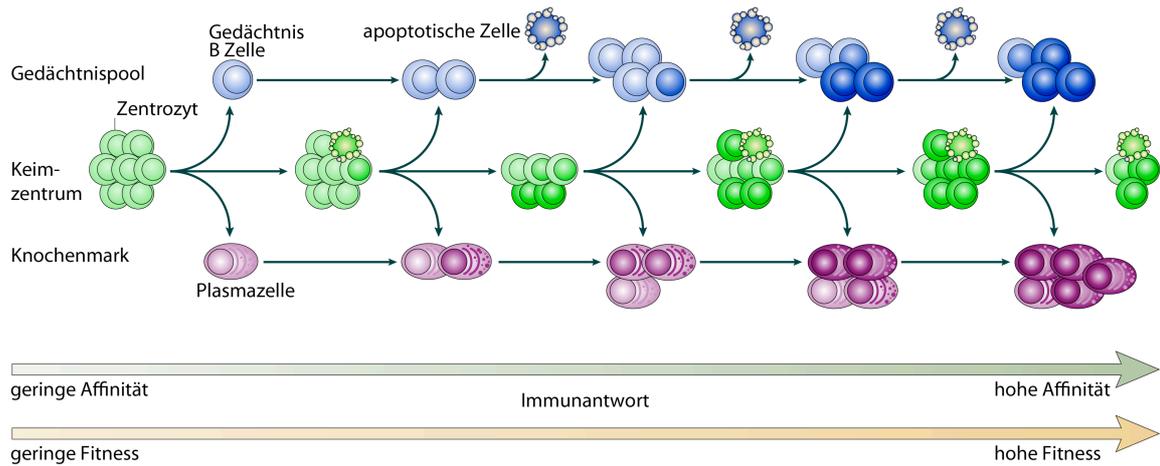
## Einleitung

Bestandteil der frühen Immunantwort gegen Krankheitserreger aus dem Blutstrom.<sup>10</sup> Die Antigenerkennung der B Lymphozyten erfolgt über membrangebundene Immunglobuline, den B Zellrezeptoren (BCR). Jede B Zelle exprimiert B Zellrezeptoren mit einer einzigen Spezifität, die nach Ausdifferenzierung zur Plasmazelle als Antikörper sezerniert werden<sup>11</sup>. Die Expression des B Zellrezeptors ist für die Entwicklung und das periphere Überleben der Zelle erforderlich.<sup>12</sup> Der B Zellrezeptor besteht aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Jede einzelne dieser Ketten besteht wiederum aus einer konstanten und einer variablen Region.<sup>13</sup> Bis vor kurzem ging man davon aus, dass zur Neutralisierung von Toxinen nur die Bindung an die variable Region benötigt wird. Allerdings konnten Abboud et al. zeigen, dass die konstante Region und damit einhergehend die Bindung an Fc $\gamma$  Rezeptoren von essentieller Bedeutung für die Toxinneutralisierung ist.<sup>14</sup> Die leichte Kette existiert in zwei Erscheinungsformen: der Lambda- und der Kappa-Kette, die funktionell jedoch keine Unterschiede aufweisen.<sup>1</sup> Antikörper besitzen eine duale Funktion: nach der spezifischen Bindung des Antigens über die variable Region erfolgt die Vermittlung von Effektorfunktionen durch die konstante Region. Das impliziert die Aktivierung von phagozytierenden Zellen, Molekülen des Komplementsystems und NK Zellen zur Eliminierung von Pathogenen, Opsonierung apoptotischer Zellen<sup>15</sup> und zur Antikörper abhängigen Zytotoxizität<sup>16</sup>. Die Immunglobuline (Ig) werden auf Grundlage ihrer schweren Ketten in fünf Isotypen unterteilt: IgM, IgG, IgA, IgD, IgE. Nach Sezernierung vermitteln sie unterschiedliche Funktionen: IgA Antikörper dienen der Neutralisierung von Toxinen und Mikroben in den mukosalen Lumen<sup>17</sup>, wohingegen die IgG Subklassen z.B. anti-Erythrozyten Immunreaktionen durch Aktivierung des Komplementsystems supprimieren.<sup>18</sup> Weiterhin können IgG Antikörper über Fc Rezeptoren Phagozytose vermitteln und sind plazentagängig. Im Gegensatz dazu spielen IgE Globuline eine große Rolle bei allergischen Reaktionen, indem sie durch die Bindung an hochaffine Fc $\epsilon$  Rezeptoren auf Mastzellen die Freigabe inflammatorischer Mediatoren wie z.B. Histamin initiieren.<sup>19</sup>

Das membrangebundene Immunglobulin hingegen fungiert als antigenspezifischer Rezeptor. Die Signaltransduktion erfolgt über ein Ig $\alpha$ -Ig $\beta$  Heterodimer<sup>20, 21</sup> mit subsequenter Aktivierung von LYN und SYK<sup>22</sup>, resultierend in einer veränderten Genexpression, die über das Überleben und Schicksal der Zelle entscheidet<sup>23</sup>. Nach Antigenerkennung wird der Protein-Rezeptorkomplex internalisiert, das Protein degradiert und auf MHC-II präsentiert. Die Aktivierung der B Zelle durch Antigenbindung an Toll-

like Rezeptoren (TLRs) und/oder an den B Zellrezeptor kann die direkte Umdifferenzierung der B Zelle in eine Plasmazelle bewirken (extrafollikuläre Antwort). Diese B Zellen sind kurzlebig und sekretieren IgM Antikörper mit geringer Affinität.<sup>24</sup> Alternativ besteht die Möglichkeit der Etablierung eines Keimzentrums, wenn follikuläre B Zellen sowohl mit dem kognaten Antigen als auch mit der T Zellhilfe in Berührung kommen.<sup>25, 26</sup> Die Rekrutierung von T Zellhilfe erfolgt über Chemokine. T Helferzellen vermitteln die zur vollständigen Aktivierung der B Zelle benötigten Kostimulatoren (Signal 2) und Zytokine (Signal 3) nach Bindung des T Zellrezeptors an den MHC-II-Peptide-Komplex (Signal 1). Die Interaktion über CD40L mit CD40 auf der B Zelle vermittelt neben dem Aktivierungsstimulus auch Überlebenssignale an die B Zelle.<sup>27</sup> Nach ausreichender Stimulation proliferieren und reifen die B Zellen in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe zu Plasmazellen. Hier findet sowohl die klonale Expansion, der Wechsel der Isotypen, als auch die Affinitätsreifung statt.<sup>11</sup> Unter der Affinitätsreifung versteht man die Erhöhung der Spezifität des Antikörpers für sein spezifisches Antigen.<sup>28</sup> Anschließend wandern die Plasmazellen ins Knochenmark, wo sie weitere überlebensnotwendige Signale, wie BAFF, APRIL und IL-6 von retikulären Stromazellen erhalten.<sup>29</sup> Ein anderer Teil der Zellen des Keimzentrums entwickelt sich zu langlebigen, persistierenden Gedächtniszellen.<sup>30</sup> Die sekundäre Immunantwort ist schneller, besitzt ein größeres Ausmaß und umfasst Antikörper mit einer gesteigerten Affinität.<sup>31</sup> Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der Entwicklung und des Überlebens der Gedächtniszellen ist weitgehend unbekannt.<sup>32</sup> Vor kurzem postulierte David Tarlinton ein Modell des kompetitiven Vorteils (Abbildung 1.2.1-1). In diesem haben Gedächtniszellen, die spät in der Immunantwort produziert wurden, einen Vorteil gegenüber denen, die früher heranreiften, weil sie durch die wiederholte Stimulation des B Zellrezeptors und CD40 anti-apoptische Moleküle hochregulieren, die sie befähigen die früh gereiften Gedächtniszellen zu ersetzen.

## Einleitung

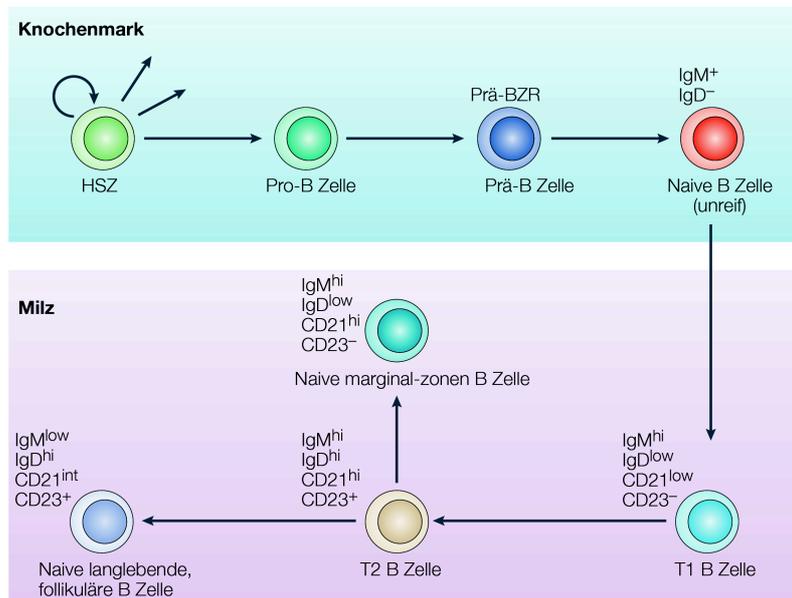


**Abbildung 1: 1.2.1-1 Modell zur Generation von Gedächtnis- und Plasmazellen im Keimzentrum während der primären Immunantwort**

modifiziert nach David Tarlinton (2006, nature reviews immunology)

## 1.2.2 Reifung von B Lymphozyten

In den letzten Jahren wurde die Entwicklung von B Zellen in Mäusen<sup>33</sup> und Menschen<sup>34</sup> intensiv studiert. Die stufenweise Entwicklung von hämatopoietischen Stammzellen über B Lymphozyten zu Plasmazellen verläuft in mehreren Organen (Abbildung 1.2.2-1).



**Abbildung 2: 1.2.2-1 Modell zur antigenunabhängigen Entwicklung von B Zellen**

modifiziert nach Shapiro-Shelef und Calame (2005, nature reviews immunology)

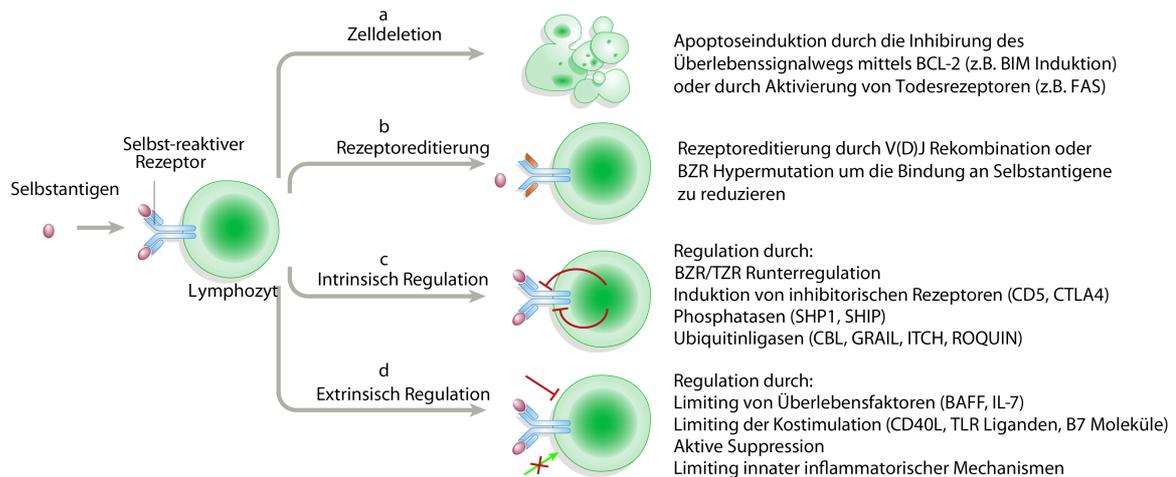
Zunächst differenzieren sich die hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark zu einer Pro-B Zelle um. In diesem Stadium beginnt die Rearrangierung des B Zellrezeptors

mit der Umlagerung der D-J (frühe Pro B Zelle) und anschließend V-DJ (späte Pro B Zelle) Gene der schweren Kette. Die B Zelle wechselt nun in das Stadium der Prä-B Zelle und wird auf ihre Funktionalität überprüft. Hierzu ersetzt die Keimbahn kodierte „surrogate light chain“, bestehend aus VpreB und lambda5, die konventionelle leichte Kette.<sup>35,36</sup> Nach produktiver Umlagerung und Expression des Prä-B Zellrezeptors auf der Oberfläche wird die Zellteilung induziert. Das von Stromazellen produzierte IL-7 ist essentiell für das Überleben und die Proliferation von Prä-B Zellen.<sup>37</sup> Es folgt das Stadium der kleinen, sich nicht mehr teilenden Prä B II Zelle. Die Prä B II Zellen repräsentieren 50-60% der Prä B Zellen im Knochenmark<sup>38</sup> und haben bereits das Rearrangement der V-J Gene der leichten Kette vollzogen.<sup>39,40</sup> Die Differenzierung zu unreifen B Zellen erfolgt im Knochenmark über die Oberflächenexpression des IgM B Zellrezeptors und dessen Funktionsprüfung. Täglich verlassen  $20 \times 10^6$  unreife B Zellen das Knochenmark und gelangen über den Blutstrom in die Milz. Nach Vollendung der transitionellen Stadien T1 (IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>, CD23<sup>-</sup>) und T2 (IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+/-</sup>, CD23<sup>+</sup>) sowie erneuter negativer Selektion entwickeln sich die B Zellen abschließend zu reifen, langlebigen follikulären Zellen.<sup>41</sup> Nur fünf bis zehn Prozent der B Zellen werden als reife B Zellen selektiert und besitzen dann eine Lebenserwartung von 15 Wochen.<sup>42</sup> Reife, naive B Zellen zirkulieren im Blut, den Geweben und in den Lymphen. Außerdem findet man sie auch im Knochenmark wieder.<sup>43</sup> Treffen B Zellen auf ihr spezifisches Antigen, werden sie aktiviert und differenzieren zu Prä-Plasmazellen in der Milz oder anderen sekundären peripheren Lymphgeweben. Die vollständige Umdifferenzierung zu Plasmazellen erfolgt im Knochenmark oder an mukosalen Oberflächen.<sup>45,46</sup>

### 1.2.3 Toleranzmechanismen gegen autoreaktive B Lymphozyten

Wie in 1.1 beschrieben, sind Autoantikörper die Ursache vieler Erkrankungen. Zwischen 20% und 50% der B Zellrezeptoren, die bei der V(D)J Rekombination generiert werden, binden mit einer potenziell gefährlichen Affinität Selbstantigene<sup>47</sup>, aber nur drei bis acht Prozent der Bevölkerung leiden an einer Autoimmunerkrankung<sup>48</sup>. Die Autoreaktivität des B Zellrezeptors stellt daher ein großes Risiko dar. Sie ist aber nicht nur negativ belastet, denn in den frühen B Zellstadien ist sie von entscheidender Wichtigkeit für eine korrekte B Zellentwicklung.<sup>49</sup> Zur Begrenzung der Anzahl an autoreaktiven B Zellen werden sie zentralen und peripheren Toleranzselektionsmechanismen unterzogen (Abbildung 1.2.3-1).

## Einleitung



**Abbildung 3: 1.2.3-1 Vier zelluläre Strategien zur Regulation von selbst reaktiven Rezeptoren**

modifiziert nach Goodnow et al. (2005, Insight Review)

Beginnend mit dem Rearrangieren der schweren Kette kann der Prä B II Rezeptorkomplex nur nach produktiver Genumlagerung exprimiert werden. Es ist bekannt, dass der Prä B II Rezeptorkomplex die erste Hürde der negativen Selektion ist seit Keenan et al. demonstrieren konnten, dass der prozentuale Anteil an autoreaktiven B Zellen und Antikörpern in Prä B Zellrezeptor defizienten Mäusen erhöht ist (Prä-BCR Zensierung).<sup>50</sup> Nach erfolgreicher Umordnung des Gens für die leichte Kette wird der IgM B Zellrezeptor exprimiert. Es erfolgt solange eine Umlagerung bis eine produktive Kette entsteht oder die J Region aufgebraucht ist, was zum Tod der Prä B Zelle führt. Der nächste Kontrollpunkt zum Schutz vor autoreaktiven B Zellen ist die Selektion auf Selbsttoleranz im Knochenmark. Bindet der B Zellrezeptor ein Selbstantigen mit zu starker Affinität, gibt es drei Strategien ihn unschädlich zu machen. Erstens können B Zellen, die multivalente Antigene erkennen, in den programmierten Zelltod geschickt werden (klonale Deletion).<sup>51-53</sup> Zweitens können B Zellen ihren selbst reaktiven Rezeptor durch eine weitere V(D)J Rekombination der leichten und seltener, der schweren Kette<sup>54</sup> editieren, sodass ein anderer B Zellrezeptor entsteht, der nicht selbst reaktiv ist.<sup>55-58</sup> Als dritte Möglichkeit induzieren kleine lösliche Autoantigene Veränderungen in biochemischen Prozessen und genetischen Expressionsprofilen, die die Sensibilität des B Zellrezeptor herabsetzten (Anergie).<sup>59-61</sup> Der Hauptanteil der Toleranzinduktion erfolgt über das Editieren des B Zellrezeptors.<sup>62, 63</sup> 70% der täglich produzierten Prä B Zellen werden durch diese positiven (Funktionsfähigkeit des Rezeptors) und negativen (Bindung von Selbstantigen) Selektionsvorgänge in die Apoptose geschickt.<sup>64, 65</sup> Die negative Selektion bei B Zellen ist nicht so stringent reguliert wie in T Zellen, daher gelangen autoreaktive B Zellen in die

Peripherie. In den sekundären lymphatischen Geweben werden sie durch intrinsische biochemische Veränderungen reguliert. Die Runterregulation des B Zellrezeptors auf der Oberfläche teilweise bis zu 99% durch gesteigerte Endozytose und durch den Block des Transfers neu synthetisierter Rezeptoren zur Oberfläche<sup>66</sup> bildet eine Möglichkeit. Andererseits kann auch der Schwellenwert des B Zellrezeptors zur Aktivierung durch Rekrutierung von SHP1 und SHIP gesteigert werden.<sup>59, 67</sup> Weiterhin induzieren selbst reaktive B Zellrezeptoren BIM, um den Zelltod zu fördern<sup>68</sup> und ERK, um eine Toll-like Rezeptor 9 vermittelte Differenzierung in Plasmazellen zu blockieren<sup>69</sup>. In der Peripherie arbeiten weitere Kontrollmechanismen, wie z.B. die Deletion von B Zellen, deren B Zellrezeptor während der Differenzierung zu reifen B Zellen kreuzvernetzt wird<sup>70, 71</sup> sowie die Limitierung von Wachstumsfaktoren oder Kostimulation wie CD40L.<sup>72</sup> BAFF, ein B Zellüberlebensfaktor, der über seinen Rezeptor auf B Zellen eine gesteigerte Aktivierung von NF- $\kappa$ B induziert<sup>73</sup>, wird primär in limitierenden Mengen von strahlungsresistenten lymphoiden Stromazellen produziert.<sup>74</sup> In dem großen Pool an zirkulierenden B Zellen erhalten autoreaktive B Lymphozyten nicht genügend BAFF und werden deletiert. „Das Überleben der Stärksten“ selektiert B Lymphozyten entsprechend ihrer Affinität gegenüber Selbstantigenen.<sup>75</sup> Als zusätzliche Variante kann das Autoantigen für die B Zellen ständig unerreichbar oder die T Zellhilfe unzugänglich sein, was zur Ignoranz der B Zelle über den SIAE/Siglec Signalweg führt<sup>76</sup>. Autoreaktive B Zellen in Keimzentren werden außerdem noch von regulatorischen T Zellen kontrolliert<sup>77</sup>, indem sie die Autoantikörperproduktion unterdrücken.<sup>78, 79</sup> Ob dieser Suppression eine direkte oder eine indirekte T Helferzell-vermittelte Interaktion zu Grunde liegt, ist noch weitgehend unbekannt.

### **1.3 Regulatorische T Zellen**

#### **1.3.1 Phänotypische Charakterisierung und Funktion**

Jahrzehnte lang lag das Augenmerk der Wissenschaftler hauptsächlich auf der Aufschlüsselung der Induktion einer Immunantwort, allerdings ist die Selbsttoleranz auch grundlegend von der Kontrolle bzw. dem Abschalten von Immunantworten abhängig. In den 70er Jahren postulierte Gershon die Existenz von T Zellen mit suppressorischer Aktivität („suppressor cells“).<sup>80</sup> Allerdings geriet dieses Konzept in die Kritik, denn es war ihm zu jener Zeit nicht möglich, die Zellen zu charakterisieren oder lösliche Mediatoren zu identifizieren. Erst 1995 hatten die Suppressor- oder nun regulatorische T Zellen ihr

Revival. Sakaguchi und Kollegen war es nun möglich autoreaktive T Zellen mit Hilfe von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen zu kontrollieren.<sup>81</sup> Die regulatorischen T Zellen entsprechen 5-10% der T Helferzellen und sind *in vitro* anergisch, aber mit suppressiven Eigenschaften ausgestattet.<sup>82, 83</sup> Die Inhibition der Proliferation anderer T Zellen erfolgt erst nach Aktivierung des T Zellrezeptors (TCR) der regulatorischen T Zelle<sup>84</sup>, aber anschließend antigenunspezifisch<sup>85</sup>. Regulatorische T Zellen weisen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* suppressive Eigenschaften auf,<sup>81, 86</sup> welche sich im Mechanismus unterscheiden. Die *in vitro* Suppression ist im Gegensatz zur *in vivo* Suppression kontaktabhängig und unabhängig von inhibitorischen Zytokinen.<sup>85, 87, 88</sup> Die Charakterisierung der regulatorischen T Zellen erfolgte zunächst nur über die kontinuierliche Expression von CD25 auf der Oberfläche. Jedoch besitzen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T Zellen ebenfalls suppressorische Aktivität, die allerdings geringer ist als bei ihren CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Gegenstücken.<sup>89, 90</sup> Die Lösung dieses Problems war die Entdeckung des Transkriptionsfaktors Foxp3, der zur „forkhead/winged-helix family“ gehört.<sup>91</sup> Die Familie ist hoch konserviert und Mutationen im humanen Foxp3 Gen verursachen das IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome), welches mit Organ spezifischen Autoimmunkrankungen wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (IBD = inflammatory bowel disease) und allergischer Dermatitis korreliert ist.<sup>92-94</sup> Des Weiteren exprimieren humane und/oder murine regulatorische T Zellen konstitutiv einige Oberflächenmarker wie GITR (glucocorticoid-induced TNFR)<sup>95</sup>, OX40 (CD134)<sup>96</sup>, L-Selectin (CD62L)<sup>97</sup>, oder intrazelluläres CTLA-4 (CD152 = cytotoxic T lymphocyte activation antigen).<sup>98, 99</sup> Darüber hinaus wird nach Aktivierung auch LAG3 (lymphocyte activation gen-3) hochreguliert<sup>100</sup>. Einige dieser Moleküle sind in die suppressorische Funktion der regulatorischen T Zellen involviert und können von der Aktivierung bis hin zur Effektorfunktion alle Immunreaktionen der Zielzellen unterdrücken.

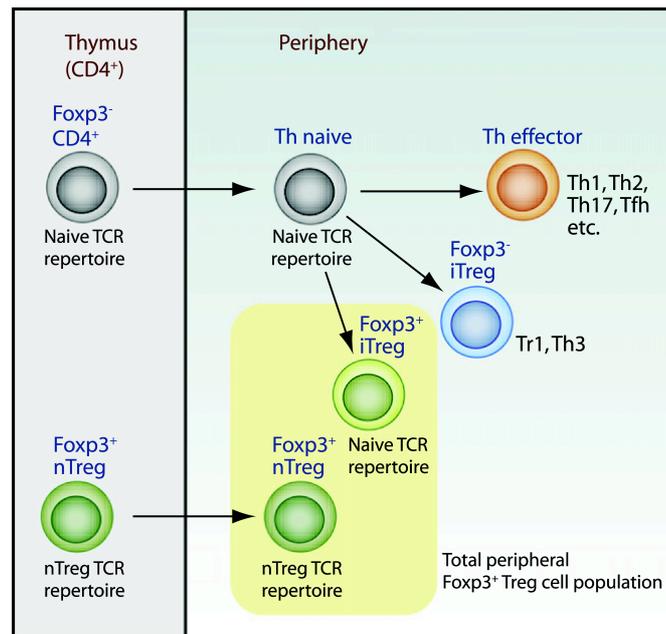
### 1.3.2 Homöostase und Entwicklung von Tregs

Regulatorische T Zellen werden in natürliche und induzierte/adaptive Tregs unterteilt (Abbildung 1.3.2-1). Natürlich auftretende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen werden im Thymus durch eine MHC-II-T Zellrezeptor abhängige Interaktion generiert.<sup>101</sup> In Korrelation mit diesen Befunden resultiert die Thymektomie innerhalb von zwei Tagen nach der Geburt in einer geringen Anzahl an peripheren Tregs.<sup>81</sup> Desweiteren wird eine CD28/B7-1 oder eine CD28/B7-2 vermittelte Kostimulation zur Stabilisierung der Foxp3 Expression benötigt.<sup>102, 103</sup> Bezüglich der Entwicklung und Funktion von regulatorischen T Zellen spielt der

Transkriptionsfaktor FoxP3 eine Schlüsselrolle.<sup>104-106</sup> Die „loss of function“ Mutation im Foxp3 Gen, die den „scurfy“ Phänotyp charakterisiert, induziert eine fatale lymphoproliferative Erkrankung.<sup>91</sup> Die stabile Foxp3 Expression ist eine Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung der suppressiven Aktivität in Tregs.<sup>107, 108</sup> Weiterführend konnte von Beyer und Kollegen gezeigt werden, dass Foxp3 auch Moleküle wie SATB1 direkt unterdrücken muss, um T Zelleffektorfunktionen zu unterdrücken.<sup>109</sup> Diese Ergebnisse skizzieren ein Modell, in dem die Effektor T Zellprogramme kontinuierlich und aktiv durch eine Foxp3 vermittelte Suppression in Tregs unterdrückt werden. Untermuert wird dieses Modell durch Studien an Eos<sup>110</sup>, dem Runx1-CBF $\beta$  Heterodimer<sup>111, 112</sup> sowie Foxo1 und Foxo3<sup>113</sup>. Neben Transkriptionsfaktoren beeinflussen auch Zytokine die Foxp3 Expression. Tregs besitzen ein ambivalentes Verhältnis zu IL-2, denn einerseits wird die IL-2 Gentranskription in natürlichen Tregs supprimiert und andererseits die CD25 Expression hochreguliert.<sup>104</sup> Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Tregs eine definierte homöostatische Nische besetzen, die über den Zugang zu IL-2 kontrolliert wird.<sup>105, 114</sup> Übereinstimmend initiiert auch die Blockade von IL-2 eine Reduktion der Proliferation sowie Effektorfunktion der Tregs.<sup>115</sup> Diese Daten unterstützen das Modell der parakrinen IL-2 Wirkung, die das Überleben der Tregs fördert. Dennoch weisen IL-2 oder CD25 defiziente Mäuse eine normale Frequenz und Anzahl peripherer Tregs auf.<sup>116, 117</sup> Die Ursache hierfür könnte IL-15 sein. IL-2 und IL-15 teilen sich die  $\gamma$  Kette des Rezeptors und könnten daher eine redundante Funktion besitzen. Erste Hinweise dafür lieferten die IL-2 und IL-15 doppelt defizienten Mäuse, in denen die Treg Entwicklung zum Erliegen kam.<sup>116, 117</sup> Diese duale Verbindung wird auch bei anderen Zytokinen beobachtet. Das Ausmaß und der Zusammenhang der Zytokinausschüttung entscheidet auch bei IFN- $\gamma$  und IL-6 über die sich entwickelnde Immunantwort. Die Stimulation von Tregs mit geringen Mengen an IFN- $\gamma$  oder IL-6 ist Grundlage für die Suppression, der über STAT1 bzw. STAT3 vermittelten, Th1 bzw. Th17 Antworten.<sup>118, 119</sup> Hingegen führt die exzessive Aktivierung der Rezeptoren zur Umdifferenzierung in die jeweiligen Effektorzellen.<sup>120-122</sup> Die Plastizität der CD4 T Zellen ist bidirektional, denn durch retrovirale Transduktion von Foxp3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T Zellen kann sowohl die suppressorische Funktion als auch der Phänotyp von Tregs induziert werden.<sup>98, 104, 105</sup> Erste Hinweise auf die Existenz einer peripheren Konversion von naiven, konventionellen CD4<sup>+</sup> T Zellen zu Foxp3<sup>+</sup> Tregs erbrachte der Transfer von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T Zellen in lymphopenische Mäuse, bzw. in Mäuse, die einen monoklonalen TCR besitzen.<sup>123, 124</sup>

## Einleitung

Seither sind viele Methoden entwickelt worden, antigenspezifische Tregs über suboptimale Dosen an Antigen z.B. über osmotische Pumpen, DEC-205 Antikörper oder auch orale Toleranz zu induzieren.<sup>125-127</sup> Andere Protokolle wie die Induktion über TGF- $\beta$ , Retinsäure und IL-2 sind unspezifisch.<sup>128-131</sup> Die Umwandlung in regulatorische T Zellen wird lokal spezifisch reguliert. In der Milz sind CD8<sup>+</sup>DEC205<sup>+</sup> und im Darm CD103<sup>+</sup> Dendritische Zellen verantwortlich.<sup>132, 133</sup> Die induzierten Tregs unterscheiden sich von natürlichen Tregs in ihrer Abhängigkeit von CTLA-4 zur Vermittlung ihrer suppressorischen Funktion.<sup>134</sup> Helios, ein Ikaros Transkriptionsfaktor, wurde zunächst als spezifischer Marker für natürliche Tregs gehandelt.<sup>135</sup> Die Entdeckung von Gottschalk et al., dass Helios auch in induzierten Tregs exprimiert werden kann, führt jetzt zu Kontroversen auf dem Gebiet.<sup>136</sup> Hingegen steht fest, dass die Entwicklung natürlich generierter Tregs im Gegensatz zur Induktion Adaptiver von CARMA1 abhängig ist.<sup>137</sup> Natürliche Tregs benötigen die Kostimulation über B7 Moleküle zur Konversion.<sup>138, 139</sup> Der periphere TCR induzierte Induktionsprozess hingegen verläuft nur effektiv mit naiven T Zellen, während voraktivierte T Zellen resistent sind.<sup>140</sup> Ein weiterer Unterschied besteht in der Stabilität der Foxp3 Expression zwischen natürlichen und induzierten Tregs. Der *in vivo* Konversionsprozess generiert langlebige Tregs, die Foxp3 stabil exprimieren. Die *in vitro* Induktion führt hingegen zu einer instabilen Foxp3 Expression, wenn die Zellen mit Antigen stimuliert werden.<sup>140</sup> In diesem Kontext korreliert die Stabilität der Foxp3 Expression mit dem Grad der Demethylierung von Foxp3.<sup>107, 141</sup> Die T Zellrezeptoraktivierung ist der Grundstein zu einer effektiven Aktivierung der Tregs. Induzierte Tregs besitzen per Definition das T Zellrezeptorrepertoire einer naiven CD4 T Zelle, welches sich stark von dem natürlich generierten Tregs unterscheidet, was die Regulation diverser Antigen ermöglicht.<sup>142, 143</sup>



**Abbildung 4: 1.3.2-1 Thymische und periphere Generation regulatorischer T Zellen**

modifiziert nach Curotto de Lafaille und Lafaille (2009, Immunity Reviews)

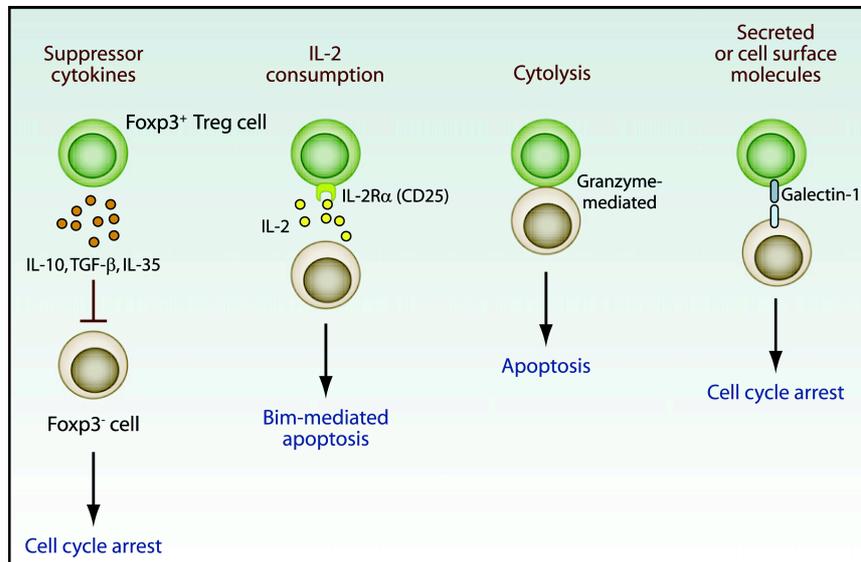
Neben den  $\text{Foxp3}^+$  Tregs existieren noch zwei weitere Subtypen, die ihre Effektorfunktion kontaktunabhängig durch lösliche Zytokine vermitteln. Diese sekundären suppressorischen T Zellen werden als Tr1 und Th3 Zellen definiert. Tr1 Zellen zeichnen sich durch die Produktion von großen Mengen an IL-10 und geringen Mengen an IL-2 und IL-4 aus.<sup>144</sup> Im Unterschied zu natürlichen Tregs exprimieren Tr1 Zellen nur geringe Level an Foxp3 und CD25.<sup>145, 146</sup> Die repetitive Stimulation mit unreifen DCs generiert Tr1 Zellen *in vivo*.<sup>147</sup> Die Th3 Zellen hingegen zeichnen sich durch ihre Produktion von TGF- $\beta$  aus und entwickeln sich nach oraler Antigenzufuhr.<sup>148</sup> Weiterhin sind sie in der Lage, die EAE Induktion zu inhibieren.<sup>149</sup> TGF- $\beta$  und IL-10 dienen jedoch nicht nur als Effektormoleküle, sondern sind auch an der Generation der Th3 und Tr1 Zellen beteiligt.<sup>150, 151</sup>

### 1.3.3 Suppressionsmechanismen von regulatorischen T Zellen

Regulatorische T Zellen kontrollieren eine Vielzahl unterschiedlicher Immunreaktionen von Selbsttoleranz über Infektionskrankheiten bis hin zu Antitumorantworten.<sup>152-154</sup> So heterogen wie das Betätigungsfeld der Tregs ist, so unterschiedlich sind auch ihre suppressiven Mechanismen. Die Mechanismen werden in zwei Gruppen unterteilt: jene, welche direkt T Zellen supprimieren und Mechanismen, die die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen herabsetzen.

## Einleitung

Die direkte Suppression der T Zellen erfolgt über vier Wirkungsweisen (Abbildung 1.3.3-1): Suppression durch inhibitorische Zytokine, Induktion eines Zellzyklusarrests, z.B. über Galectin-1, Suppression durch Zytolyse oder durch Apoptoseinduktion mittels IL-2 Entzug.



**Abbildung 5: 1.3.3-1 Hauptmechanismen der direkten Suppression von T Effektorzellen durch Tregs**  
modifiziert nach Shevach (2009, Immunity Review)

Die wohl am besten analysierte Methode ist die Regulierung des IL-2 Metabolismus. Die meisten Studien demonstrieren die Inhibition der Produktion von IL-2 mRNA in Effektorzellen durch Tregs.<sup>155, 156</sup> Der Treg vermittelte IL-2 Entzug wird hingegen kontrovers diskutiert. Einerseits konnte von Pandiyan und Kollegen gezeigt werden, dass Tregs mit Effektor T Zellen um IL-2 konkurrieren, es konsumieren und somit einen Bim induzierten Zelltod in den Helferzellen auslösen.<sup>157</sup> Andererseits hatte die Zugabe von Antikörpern, die die Bindung von IL-2 behindern, keinen Einfluss auf die Funktion von Tregs.<sup>158</sup> Dementgegen stehen die Befunde, dass eine IL-2 Defizienz, genetisch oder durch Applikation von Antikörpern erzeugt, zu einer Reduktion an regulatorischen T Zellen führt, die hinreichend ist, um Autoimmunität zu induzieren.<sup>115, 159</sup> Zusammenfassend deuten diese Befunde eher auf eine IL-2 Beteiligung an der Treg vermittelten Suppression hin. Der Transfer von cAMP über „gap junctions“ ist eine weitere Methode den Metabolitenhaushalt von T Effektorzellen zu unterbrechen und ihre Funktion zu limitieren.<sup>160</sup>

Zu den löslichen Zytokinen, die von regulatorischen T Zellen sezerniert werden können, zählen auch IL-10, TGF- $\beta$  und IL-35. IL-35 ist ein neues Mitglied der IL-12 heterodimeren Zytokinfamilie und entsteht durch Dimerisierung von Ebi3 (Epstein-Barr virus-induced

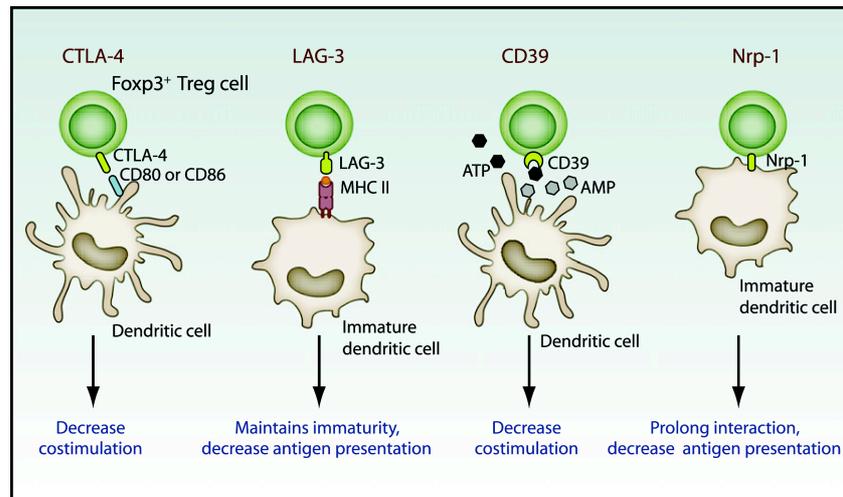
gene 3) und p35 (IL-12a). Es wird präferenziell in Tregs hochreguliert und unterdrückt die T Zellproliferation *in vitro*.<sup>161, 162</sup> Die Wirkung der inhibitorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  scheint vom Mikromillieu abhängig zu sein. *In vitro* Studien mit blockierenden Antikörpern oder defizienten T Zellen suggerieren, dass diese Zytokine nicht essentiell für eine Suppression sind.<sup>155, 156, 163</sup> Andererseits kontrolliert ein Tregs vermittelter, IL-10 und TGF- $\beta$  abhängiger Prozess asthmatische und allergische Erkrankungen *in vivo*.<sup>164</sup> Jedoch kann die IL-10 Produktion von regulatorischen T Zellen auch ein zweiseitiges Schwert sein. So dient sie einerseits der Prävention von Kolitis<sup>165</sup> sowie der Ausbreitung bakterieller und viraler Superantigene.<sup>166</sup> Andererseits blockiert sie aber auch die gegen einen Tumor gerichtete Immunantwort<sup>167</sup>. Die Relevanz von TGF- $\beta$  in der Suppression durch Tregs wurde zunächst angezweifelt, da der Gebrauch von neutralisierenden Antikörpern, sowie defizienten Tregs die inhibitorische Funktion nicht beeinträchtigte.<sup>156, 168</sup> Im Laufe der Jahre konnte allerdings eine Abhängigkeit von TGF- $\beta$  für die Suppression verschiedener Krankheitsmodelle, wie Diabetes oder follikuläre Lymphome, gezeigt werden.<sup>169, 170</sup> Um ihre maximale regulatorische Aktivität entfalten zu können, scheinen Tregs membrangebundenes TGF- $\beta$  zu benötigen.<sup>171</sup> Obwohl diese Zytokine alle inhibitorisch sind, scheint ihr Einsatz von bestimmten Pathogenen oder homöostatischen Bedingungen abhängig zu sein.<sup>172</sup>

Galektin-1 ist ein sekretorisches, homodimeres Molekül, das zur Familie der  $\beta$ -Galaktosid bindenden Proteine gehört. Nach Aktivierung wird Galektin-1 in Tregs hochreguliert und induziert nach Bindung an z.B. CD45 einen Zellzyklusarrest in den Zielzellen.<sup>173</sup>

Die Lyse von Zielzellen kann von Granzym A und/oder von Perforin vermittelt werden. Studien an humanen Tregs demonstrieren die Expression von Granzym A und belegen weiterhin das Granzym A und Perforin abhängige Abtöten von Zielzellen über die Bindung an CD18.<sup>174</sup> Im Kontrast hierzu regulieren murine regulatorische T Zellen hauptsächlich Granzym B hoch<sup>96</sup>, welches dann auch funktionell relevant ist<sup>88</sup>.

Die indirekte Suppression der Effektorzellen baut auf die Modulation antigenpräsentierender Zellen (APCs) auf. Die in Abbildung 1.3.3-2 dargestellten Hauptmechanismen sind bis jetzt beschrieben worden. CTLA-4 ist ein zentraler Kandidat, da der selektive Verlust von CTLA-4 in Tregs in den Mäusen eine systemische Autoimmunität nach 7 Wochen induziert.<sup>175</sup> Im Detail kann die suppressorische Funktion von CTLA-4 über zwei Wege vermittelt werden: erstens über die Runterregulation der kostimulatorischen Moleküle der Dendritischen Zellen<sup>176, 177</sup> und zweitens über die

Induktion der Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in den Dendritischen Zellen<sup>178</sup>.



**Abbildung 6: 1.3.3-2 Hauptmechanismen der indirekten Suppression von T Effektorzellen durch Tregs über antigenpräsentierende Zellen**

modifiziert nach Shevach (2009, Immunity Review)

Zusätzlich kann die Maturierung der DCs ebenfalls über CD223 („lymphocyte-activation gene 3“; LAG3) blockiert werden. LAG3 ist ein CD4 Homolog, dass mit sehr hoher Affinität an MHC-II Molekülen bindet und für die maximale Treg Suppression erforderlich ist.<sup>100, 179</sup> Die Bindung an MHC-II induziert eine ITAM vermittelte Suppression der DC Maturierung und somit ihrer immunostimulatorischen Kapazität.<sup>180</sup> Ein anderer von Tregs verwendeter anti-inflammatorischer Mechanismus ist die Hydrolyse von extrazellulärem ATP. ATP stimuliert die Expression von CD86 auf DCs und wird durch die Ektoenzyme CD39 und CD73 auf Tregs zu Adenosin umgebaut.<sup>181-183</sup> Ergänzend zu CTLA-4 und LAG3 reduziert rekombinantes FGL2 („fibrinogen-like protein 2“) dosisabhängig die Kostimulation Dendritischer Zellen.<sup>184</sup> Anknüpfend an diese Befunde konnte von Sarris und Kollegen dargelegt werden, dass über Neuropilin (Nrp-1) die Interaktion zwischen DCs und Tregs verlängert wird.<sup>185</sup> Die diversen Suppressionsmechanismen deuten daraufhin, dass der Hintergrund einer Erkrankung sowie der zu supprimierende Zelltyp, den adäquaten Inhibitionsmechanismus diktieren.<sup>172</sup>

### 1.4 B Zell - Treg Interaktion

Wie bereits beschrieben sind die Regulationsmechanismen von Tregs auf T Zellen und DCs intensiv erforscht worden. Die Kontrolle von B Zellen, speziell im Kontext von Autoimmunerkrankungen ist hingegen größtenteils unbekannt. Daher existieren nur wenige Informationen über die Interaktionen von Tregs mit B Zellen. Dass Tregs die

B Zellantwort indirekt über Begrenzung der T Helferzellen beeinflussen können,<sup>186, 187</sup> ist unbestritten, schließt aber eine potenzielle direkte Interaktion nicht aus. Die Interaktion der Zellen erfordert das Aufeinandertreffen dieser in sekundären lymphatischen Organen. Bereits 2005 konnte von Lim und Kollegen demonstriert werden, dass ein stabiler Kontakt zwischen Tregs und B Zellen an der T Zell- B Zellgrenze sowie in den Keimzentren ausgebildet werden kann.<sup>188</sup> Darüberhinaus konnte kürzlich bewiesen werden, dass der Eintritt der Tregs in die Keimzentren und damit die Suppression der B Zellantwort von CXCR5 abhängig ist.<sup>77, 189</sup> Diese Studien stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Bystry et al., die die Rekrutierung von Tregs über B Zell produziertes CCL4 nahe legen.<sup>78</sup> Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf Unterschiede zwischen dem *in vivo* und dem *in vitro* System zurückzuführen. Die Interaktion zwischen den Zellen ist bidirektional. Naive B Zellen sind in der Lage regulatorische T Zellen in Anwesenheit einer immunologischen Synapse zu generieren.<sup>190, 191</sup> Allerdings wird auch eine potenzielle Suppression von B Zellen durch die Beobachtungen begründet, dass in B Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen die Anzahl und/oder die Funktionalität der Tregs eingeschränkt ist, bzw. dass die Depletion von Tregs diese Krankheiten verschlimmert.<sup>79, 192</sup> Antikörperablagerungen sind eine große Gefahr bei der Zerstörung von Organen, daher hat die Unterdrückung ihrer Produktion höchste Priorität. Michelle Fields konnte *in vivo* darstellen, dass CD25<sup>+</sup> Tregs die Maturierung, aber nicht die Initiation der Antikörperantwort inhibieren.<sup>193</sup> Tregs unterdrücken den IgG Klassenwechsel<sup>186</sup> und induzieren IL-10 abhängig die IgG4 Sekretion in humanen B Zellen.<sup>194</sup> Um den Mechanismus einer direkten Suppression aufzuschlüsseln, wurden verschiedenste *in vitro* Systeme etabliert. Die Kokultur LPS aktivierter B Zellen mit Tregs einer T Zelllinie resultierte in der Lyse der B Zellen in einem Fas-Fas Ligand abhängigen Prozess.<sup>195</sup> Gegensätzliche Ergebnisse erzielten Kokulturen mit primären Tregs, hier ist die Lyse von B Zellen durch aktivierte Tregs Granzym B und Perforin abhängig.<sup>196, 197</sup> Im humanen System scheinen GITR, IL-10 und TGF- $\beta$  eine wichtige Rolle zu spielen.<sup>198</sup> Erste Erkenntnisse, dass eine direkte Interaktion *in vitro* auch unter Bedingungen einer systemisch, chronischen Immunantwort existiert, lieferten Iikuni und Kollegen durch Kokulturen mit Tregs von Lupus Patienten.<sup>197</sup> Ludwig-Portugall et al. konnte weiterführend in einem Gewebeantigen spezifischen Maussystem (ROH<sup>high</sup>) beweisen, dass eine Treg B Zellinteraktion auch an der peripheren Toleranz involviert ist. ROH<sup>high</sup> Mäuse tragen das Fusionsprotein von OVA und HEL in den  $\beta$ -Inselzellen des Pankreas. Nach

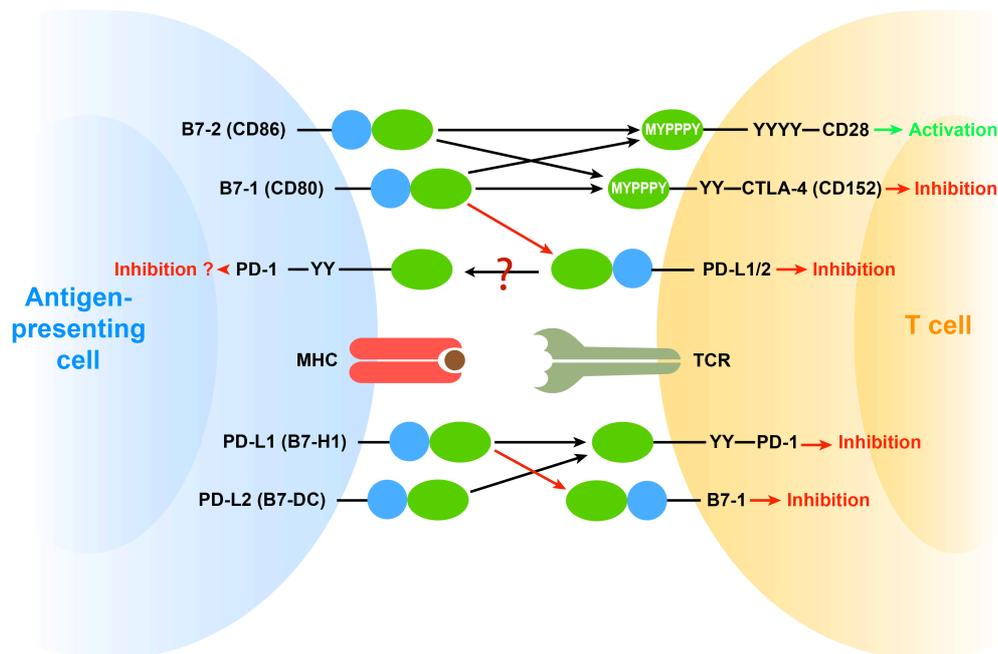
## Einleitung

Immunisierung mit OVA oder HEL produzieren die transgenen Mäuse weniger Autoantikörper als Wildtypmäuse.<sup>199</sup> Die Depletion von CD25<sup>+</sup> Zellen vor der Immunisierung führt zur Steigerung der Autoantikörperproduktion vergleichbar mit den Titern in den Wildtypmäusen. Die Suppression erfolgt im pankreatischen (drainierenden) Lymphknoten und in der Milz und umfasst sowohl die Prävention der Expansion der autoreaktiven B Zellen, eine Reduzierung der Antikörpergeneration pro B Zelle, als auch einen Isotypenwechsel. Weiterhin wird in der Milz und dem pankreatischen Lymphknoten Toleranz gegenüber autoantigen-spezifischen, transferierten B Zellen induziert.<sup>200</sup> Diese Toleranz wird durch Proliferationsinhibition sowie Apoptoseinduktion der B Zellen gewährleistet.

### 1.5 „Programmed Death 1“

PD-1 (Programmed death 1) wurde zunächst in einer T Zellhybridomlinie als ein Gen identifiziert, das auf sterbenden Zellen hochreguliert wird.<sup>201</sup> PD-1 ist ein Mitglied der Ig Superfamilie, verwandt mit CTLA-4 und CD28.<sup>201</sup> Es vermittelt seine Funktion als Monomer.<sup>202, 203</sup> PD-1 wird während der T Zellentwicklung im Thymus primär auf doppelt negativen Zellen exprimiert<sup>204</sup> und peripher nach Aktivierung auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen, B Zellen sowie Monozyten induziert<sup>205</sup>. Voraussetzung für die Transduktion inhibitorischer Signale, die in die Balance zwischen T Zellaktivierung, -toleranz und Immunpathologie involviert sind<sup>206</sup>, ist die Kreuzvernetzung von PD-1 mit dem BCR bzw. TCR. Diese resultiert in der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne mit anschließender Rekrutierung sowie Aktivierung von SHP-2 und subsequenter Inhibition der Signaltransduktionsmoleküle PI3K, PLC $\gamma$ 2 und ERK. Die Konsequenz der PD-1 Signalgebung ist eine verringerte Ca<sup>2+</sup> Mobilisierung, die zu einer Wachstumshemmung führt.<sup>207</sup> Die Ligandierung von PD-1 reduziert ebenfalls das TCR Signal, kann aber durch zusätzliche CD28 Kostimulation wieder aufgehoben werden.<sup>202</sup> Der PD-1 Rezeptor besitzt zwei Liganden: PDL-1 (B7-H1) und PDL-2 (B7-DC).<sup>208-210</sup> PDL-1 wird konstitutiv auf T und B Zellen, DCs, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen und Mastzellen, die sich aus dem Knochenmark entwickelt haben, exprimiert.<sup>211</sup> Die PDL-2 Expression ist stringenter als die PDL-1 Expression. PDL-2 wird nur auf DCs, Makrophagen und B1 sowie B Gedächtniszellen induziert.<sup>212</sup> Die Expression der Liganden wird durch das inflammatorische Mikromilieu reguliert. Zytokine wie Typ 1 und 2 Interferone, sind potente Stimuli für die PDL-1 und PDL-2 Expression.<sup>212</sup> B7-1, ein zusätzlicher

Bindungspartner für PDL-1, (Abbildung 1.5-1) bindet mit einer intermediären Affinität von 1,7 PM an PDL-1 und inhibiert T Zellantworten.<sup>213</sup> Tregs exprimieren sowohl PD-1 als auch PDL-1<sup>214</sup>, wobei letzteres die Entwicklung, Homöostase und Funktion induzierter Tregs reguliert<sup>215</sup>. PD-1 defiziente Mäuse entwickeln eine vergrößerte Milz. Ursache ist die gesteigerte Anzahl von myeloiden Zellen und B Zellen, die ebenfalls in einer erhöhten Produktion an IgG3, IgG2b und IgA einhergeht.<sup>216, 217</sup> Nach unspezifischer *in vitro* Stimulation proliferieren PD-1 defiziente B Zellen intensiver als wildtyp B Zellen. Vor kurzem konnte von Kawamoto und Kollegen demonstriert werden, dass PD-1 auch eine kritische Rolle bei der Regulation der Antikörpervielfalt zur Aufrechterhaltung der Darmmukosa spielt.<sup>218</sup> Diese Befunde weisen stark auf einen negativen Effekt von PD-1 auf die B Zellrezeptor vermittelte Aktivierung von B Zellen hin. Dem entgegen stehen die Befunde von Good-Jacobson und Kollegen, die beweisen, dass PD-1 auf follikulären T Helferzellen die Antikörperentstehung gegen fremde Antigene durch Begünstigung des Überlebens von B Zellen verbessern.<sup>219</sup> Daher sind die Rollen von PD-1 und PDL-1 auf B Zellen unklar und benötigen weitere Experimente zur Klärung.



**Abbildung 7: 1.5-1 PD-1 und seine Liganden**

modifiziert nach Keir et al. (2008, Annual Review Immunology)

## 2. Ziel der Arbeit

Autoantikörper verursachen diverse Autoimmunerkrankungen, wie z.B. SLE oder bestimmte Formen einer Glomerulonephritis. Die Depletion von B Zellen verbessert in einigen Systemen die Auswirkungen der Erkrankung. Allerdings wirkt sie nicht bei allen und ist mit einer starken Immunsuppression assoziiert. Daher werden bessere Therapien benötigt, um autoreaktive B Zellen zu kontrollieren. Der Schlüssel hierzu ist die Identifikation neuer antigenspezifischer, peripherer Kontrollmechanismen. Dr. Isis Ludwig-Portugall konnte bereits für ein pankreasspezifisches Gewebeantigen zeigen, dass transgene Tregs die B Zellantwort gegen dieses Antigene antigenspezifisch supprimieren.<sup>199, 200</sup> Ziel dieser Arbeit war es nun zu überprüfen, ob dieser periphere Toleranzmechanismus auch für nierenspezifische Gewebeantigene existiert und die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen zu klären. Eine Treg vermittelte Suppression kann durch zahlreiche Mechanismen erzeugt werden. Die seltenen *in vitro* Studien zur Suppression von B Zellen durch Tregs zeichnen ein artifizielles Bild. Es existieren große Unterschiede zwischen Tregs primären Ursprungs, die per Zytolyse die Apoptose induzieren<sup>196, 197</sup> oder aus einer T Zelllinie, die die B Zellen Rezeptor vermittelt über Fas abtöten<sup>195</sup>. Noch kontroverser wird das Bild unter Einbeziehung von Daten zu humanen Tregs, welche die B Zellapoptose über GITR und inhibitorische Zytokine initiieren<sup>198</sup>. Ob überhaupt einer dieser Mechanismen in der *in vivo* Situation relevant ist, muss noch geklärt werden. Im Unterschied zum *in vitro* System kann die Suppression *in vivo* indirekt über die Inhibition der T Zellhilfe<sup>186, 187</sup> oder direkt erfolgen. Die Existenz oder die Beteiligung einer direkten B Zellsuppression *in vivo* konnte bis jetzt noch nicht demonstriert werden und wirft somit viele Fragen auf, welche in dieser Arbeit beantwortet werden sollten.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Equipment

Equipment	Name und Firma
Autoklav	Belimed, Köln
Bechergläser	5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ml (Schott, Mainz)
Durchflusszytometer	FACS CantoII (BD Bioscience, Heidelberg)
Eismaschine	MF 26 (Scotsman, Sprockhoevel)
ELISA Reader	sunrise (Tecan, Männedorf)
ELISPOT Reader	UV/Immuno spot (CTL, Bonn)
Gefrierschrank (-20°C)	Siemens, München
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific®, Bonn
Gefriertransportbehälter	Nalge Nunc Cryo (Nunc, Langenselbold)
Heizblock	Thermomixer comfort (Eppendorf, Wesseling)
Inkubator	Sanyo, München
Kühlschrank (4°C)	Siemens, München
MACS Zellseparator Gladbach)	Mini und MidiMACS™ (Miltenyi, Bergisch)
Magnetrührer	IKA® Laboratory Equipment, Staufen
Messzylinder	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1l (Schott, Mainz)
Metallsiebe	Universität Bonn, Abteilung Feinmechanik
Mikroskop	IX71 (Olympus, Hamburg)
pH-Meter	Five easy (Mettler Toledo, Gießen)
Pipetierhilfe	Pipetus (Hirschmann Labortechnik, Eberstadt)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Präparationsbesteck	Labotec, Göttingen
Sterilwerkbank	MSC Advantage (Thermo Scientific, Bonn)

## Material und Methoden

Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellzählkammer	Neubauer (Brand, Wertheim)
Zentrifugen	centrifuge 5810R und 5430R (Eppendorf, Wesseling)

### 3.1.2 Software

Software	Firma
Cell F	Olympus, Hamburg
Corel Draw	Corel Corporation
FACS Diva V6.1.1	BD Biosciences Heidelberg
Flowjo V9.4.10	Tree star, Inc., USA
Illustrator CS5	Adobe, USA
Image J	NIH Bethesda, USA
Immunospot V5.0	C.T.L, Bonn
Magellan™ V6.6	Tecan, Männedorf
Microsoft Office 2011	Microsoft, USA
Prism5 für Macintosh	GraphPad Software, USA

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Name und Firma
Durchflusszytometerröhrchen	Polystyren, 12/75 mm (Sarstedt, Nümbrecht)
Einbettformen	VWR International, Darmstadt
ELISA Platten	Microlon, 96 Loch, Flachbodenplatte (Greiner Bio-one, Solingen)
Injektionsnadel	27G, 25G, 20G (BD Microlance, Heidelberg)
Kryoverschlussröhrchen	VWR International, Darmstadt
Mikrotiterplatten	96, 384 Loch, Rund- und Flachbodenplatten (Greiner Bio-one, Solingen)
Parafilm	Parafilm „M“® (American National Can TM, Greenwich, USA)

Pasteurpipette	150 mm und 230 mm (Roth, Karlsruhe)
Petrischalen	10 cm (Greiner Bio-one, Solingen)
PD-10 Säulen	Amersham, Uppsala
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl (Greiner Bio-one, Solingen)
Plastikpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (polypropylene)	steril, 15 ml, 50 ml (Greiner Bio-one, Solingen)
Schnappdeckelgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg)
Spritzen	1, 2, 5, 10, 20 ml (BD Bioscience, Heidelberg)
Sterilfilter	0,2 µm (Schleicher und Schuell)
Transwell-Kultursystem	0,4 µm, Polycarbonat (Corning, Kaiserslautern)
Zellkulturplatten	6, 12, 24, 48, 96-Loch (Sarstedt, Nümbrecht)

### 3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Firma
2-Methylbutan	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt
Annexin V	Biolegend, Fell
Annexin V Puffer	eBioscience, Frankfurt
Anti-CD40	eBioscience, Frankfurt
anti-PD-1	Prof. Yagita, Tokyo (Japan)
anti-PDL-2	Prof. Yagita, Tokyo (Japan)
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, München
Caspase 3 Kit	Immunochemistry (Biomol), Hamburg
CD3/CD28 Beads	Invitrogen, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Flüssigstickstoff	Linde, Wiesbaden
Foxp3 Intrazellulärfärbekit	eBioscience, Frankfurt

## Material und Methoden

Hoechst 33342	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Hühnereiweißlysozym	Sigma Aldrich, München
IFN-gamma ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IFN-gamma, rekombinant (Maus)	Biolegend, San Diego, USA
IgM-Fc Fragment	Dianova, Hamburg
Ionomycin	Sigma Aldrich, München
L-Glutamin (200 mM)	PAA, Cölbe
Milchpulver	Nestle, Osthofen
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
NH <sub>4</sub> Cl	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich, München
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich, München
o-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD)	Sigma Aldrich, München
Ovalbumin (OVA), Reinheit 5	Sigma Aldrich, München
Paraformaldehyd	Fluca, Buchs
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
Phorbol-12-mystrat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich, München
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Darmstadt
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Trinatriumcitratx2H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Triton-X	Sigma Aldrich, München
Trypanblau (0,4%)	Lonza, Köln
Tween20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
X-VIVO Medium	Lonza, Ratingen

### **3.1.5 Puffer, Medien und Lösungen**

#### **5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol**

178  $\mu$ l des 14,3 M  $\beta$ -Mercaptoethanol wurden auf 500 ml mit PBS aufgefüllt und bei 4°C unter sterilen Bedingungen gelagert.

#### **20% Natriumazid Stammlösung**

10 g Natriumazid wurden in 50 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde im Dunkeln bei 4°C gelagert.

#### **20% Paraformaldehyd (PFA)**

40 g PFA wurden in 200 ml 1xPBS bei 60°C im Wasserbad gelöst und auf pH 7,4 eingestellt. Aliquots wurden bei -20°C gelagert. Diese Stocklösung wurde auf 4% PFA mit 1xPBS als Gebrauchslösung verdünnt.

#### **20% Milchpulver**

10 g Milchpulver wurden in 50 ml Aqua dest. gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

#### **AEC Substratlösung**

Eine Tablette AEC Substrat wurde in 2,5 ml DMF gelöst. Anschließend wurden 525  $\mu$ l dieser Lösung mit 10 ml Na-Acetat Puffer gemischt, für min. 10 min gerührt und vor Gebrauch filtriert.

#### **Blockpuffer (PBS + 1% BSA)**

5 g BSA wurden in 500 ml 1xPBS gelöst und bei 4°C gelagert.

#### **B- und T-Zellkulturmedium**

X-VIVO Medium wurde mit 10% (V/V) FCS, 1% (V/V) Penicillin/Streptomycin und 1% (V/V)  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und bei 4°C unter sterilen Bedingungen gelagert.

## Material und Methoden

### **EDTA Stammlösung 0,5 M**

Für die Herstellung von 1 l EDTA wurden 186,1 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in 800 ml Aqua dest. gelöst und der pH auf 8,0 justiert. Anschließend wurde die Lösung auf 1 l mit Aqua dest. aufgefüllt und autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

### **ELISA Beschichtungspuffer**

50 mM NaHCO<sub>3</sub> (4,2 g) wurden in 500 ml Aqua dest. gelöst, auf pH 8,2 eingestellt und bei 4°C gelagert.

### **Erythrozytenlysepuffer (RCRB)**

In 2 l Aqua dest. wurden 146 mM (15,58 g) NH<sub>4</sub>Cl, 2mM (0,074 g) Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-dinatrium Salz und 10 mM (2,0 g)NaHCO<sub>3</sub> gelöst.

### **FACS Puffer**

1xPBS wurde mit 0,1% BSA (0,5 g) und 0,1% Natriumazid (NaN<sub>3</sub>; 2,5 ml aus 20%iger Stammlösung) versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

### **FCS**

FCS wurde bei 56°C für 30 min Hitze inaktiviert und als 50 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

### **MACS Puffer**

500 ml 1xPBS wurden mit 0,5% BSA (2,5 g) und 2 mM EDTA (2 ml 0,5 M EDTA) versetzt, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

### **Natriumacetatpuffer**

4,1 g Natriumacetat (Stock 0,1 M) wurden in 500 ml Aqua dest. gelöst. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

### **OPD Substrat**

Je 1 mg o-Phenylendiamin (OPD) wurde in 1 ml OPD Substratpuffer gelöst. Direkt vor dem Gebrauch wurde pro ml Lösung 1 µl Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hinzugefügt.

### **OPD Substratpuffer**

In 500 ml Aqua dest. wurden 15,6 g (0,1 M)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , sowie 14,7 g (50 mM) Trinatriumcitrat $\times 2\text{H}_2\text{O}$  gelöst und mit HCl auf pH 5,0 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

### **Permeabilisierungspuffer**

1xPBS wurde mit 0,025% (V/V) Triton-X100 versetzt.

### **„phosphate buffered saline“ (PBS)**

Für 1xPBS wurden 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 50 mM NaCl in Aqua dest. gelöst und auf pH 7,4 eingestellt. Der Puffer wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

### **Stopplösung ELISA**

Zur Herstellung von 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wurden auf 500 ml Aqua dest. 26,5 ml 98%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hinzugeben und bei 4°C aufbewahrt.

### **Waschpuffer**

500 ml 1xPBS wurden mit 0,5 ml (0,1%) Tween 20 versetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

## **3.1.6 Antikörper**

### **Zytokin-ELISA Antikörper**

Alle Antikörper, die in den Zytokine ELISAs verwendet wurden, wurden als Kit von eBioscience oder R&D Systems erstanden und in den vorgegebenen Konzentrationen eingesetzt.

### **Antikörper zur MACS® Aufreinigung (MACS®-Beads)**

Maus anti-CD19 Beads, das negativ B Zell- und das regulatorische T Zellisolutionskit wurden von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, bezogen.

**Antikörper für Durchflusszytometrische Analysen oder ELISA**

Die folgenden Antikörper wurden zur durchflusszytometrische Analysen von Mausproteinen auf der Zelloberfläche oder zur intrazelluläre Proteinexpressionanalyse, von den Firmen eBioscience, BD Biosciene oder Bioledgend, in der Konzentration von 0,2 mg/ml verwendet, wenn nicht anders ausgewiesen. Zum Ausschluss toter Zellen wurde der Farbstoff Hoechst33342 nach Herstellerangaben verwendet.

Antigen	Klon	Konjugat	Verwendung	Verdünnung
CD4	GK1.5	APC, PECy7,	FACS	1:400
		Pacific Blue	FACS	1:400
CD19	MCA1439	Al404	FACS	1:400
CD25	PC61.5	PE, APC, Bio	FACS	1:200
CD40	3/23	PE	FACS	1:200
CD44	IM7	PE, Pacific Blue	FACS	1:200
CD45R (B220)	RA3-6B2	PE, PEcy7	FACS	1:800
CD62L	MEL-14	PECy7, Bio	FACS	1:200
CD69	H1.2F3	PercpCy5.5, Bio	FACS	1:200
CD80	16-10A1	Bio, FITC	FACS	1:200
CD86	GL1	Bio, APC, FITC	FACS	1:200
CD95	15A7	PE	FACS	1:200
CD95L	MFL3	PE	FACS	1:200
CD152 (CTLA-4)	UC10-4B9	PE	FACS	1:200
CD223 (Lag3)	C9B7W	PE	FACS	1:200
CD273 (PDL-2)	TY25	PE	FACS	1:400
CD274 (PDL-1)	MIH5	PE	FACS	1:400
CD279 (PD-1)	J43	PE	FACS	1:400
CD357 (GITR)	DTA-1	FITC	FACS	1:200

Foxp3	FJK-16s	FITC, PE	FACS	1:200
HEL	-	Al647, Al488	FACS	1:400
Helios	22F6	Al647 (12µg/ml)	FACS	1:200
I-A <sup>b</sup> (MHC-II)	AF6-120.1	FITC (0,5 mg/ml)	FACS	1:200
IgM	R6-60.2	PercpCy5.5	FACS	1:400
IgM	B-9265	Bio (Sigma, 1mg/ml)	ELISA	1:5000
IgMa	DS-1	Bio (0,5 mg/ml)	FACS	1:200
IgMa	DS-1	Bio (0,5 mg/ml)	ELISA	1:500
IgG	11-40	FITC (0,5 mg/ml)	FACS	1:400
IgG	11-40	Bio (1 mg/ml)	ELISA	1:5000
IgG1	185-1	Bio (0,5 mg/ml)	ELISA	1:250
IgG2a	R19-15	Bio (0,5 mg/ml)	ELISA	1:250
IgG2b	R12-3	Bio (0,5 mg/ml)	ELISA	1:250
IgG3	R40-82	Bio (0,5 mg/ml)	ELISA	1:250
Ki67	-	Al647	FACS	1:200
DO11.10 TCR	KJ1-26	Bio, PE,	FACS	1:200
		PercpFluor®710	FACS	1:200
OVA	-	Al647, Al488	FACS	1:400
POX	-	Streptavidin	ELISA	1:5000
Streptavidin	-	Pacific Blue (1 mg/ml)	FACS	1:400
	-	PercpCy5.5 (1 mg/ml)	FACS	1:400
	-	PECy7 (1 mg/ml)	FACS	1:800

### 3.1.7 Mauslinien

Die C57BL/6 (H2K<sup>b</sup>) und BALB/c (H2<sup>d</sup>) Wildtyplinien wurden bei Janvier erstanden. Die Mäuse wurden unter speziellen pathogenfreien Konditionen in Übereinstimmung mit den Tierrichtlinien des Hauses für experimentelle Tierversuche (HET) verpaart und gepflegt.

8-12 Wochen alte Mäuse wurden für die Versuche eingesetzt. Die folgenden transgen oder knockout Linien wurden auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt.

Mauslinie	Beschreibung
IgHEL	Die B Zellen dieser Mauslinie besitzen einen HEL spezifischen B Zellrezeptor (IgMa) und können keinen Isotypenwechsel vollziehen. Die Linie wurde von C. Goodnow, Australien, zur Verfügung gestellt.
DEREG	Diese Mauslinie exprimiert unter dem Foxp3-Promotor ein Fusionskonstrukt aus eGFP und dem Diphtheriatoxinrezeptor. Die regulatorischen T Zellen können mit Diphtheriatoxin depletiert werden. Die Linie wurde von T.Sparwasser zur Verfügung gestellt.
DO11.10	Die CD4 T Zellen dieser Mauslinie exprimieren einen OVA spezifischen T Zellrezeptor (OVA <sub>323-339</sub> ) und befinden sich auf dem H2 <sup>d</sup> Hintergrund (BALB/c).
NOHB	Diese Mauslinie exprimiert ein membrangebundenes Fusionsprotein aus OVA und HEL unter dem Nephtrin-Promotor.
PD-1 ko	Diese Mauslinie ist defizient für den „Programmed Death“ Rezeptor PD-1.
PDL-1 ko	Diese Mauslinie ist defizient für den „Programmed Death“ Rezeptor Liganden PDL-1.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Mausexperimente**

#### **3.2.1.1 Injektion**

Zur Injektion in die Mäuse werden Zellen und Reagenzien in PBS aufgenommen. Zellen, die transferiert werden sollten, wurden in einem Volumen von 200 µl resuspendiert und intravenös injiziert. Reagenzien, wie blockierende Antikörper, wurden entsprechend ihrer Depletionseffizienz in maximal 300 µl aufgenommen und intraperitoneal verabreicht.

Zur Etablierung einer robusten Immunantwort wurden die Mäuse mit Ovalbumin (OVA, 10 µg pro Maus), Hühnereiweißlysozym (HEL, 10 µg pro Maus) oder β-Galaktosidase (β-Gal, 1 µg pro Maus) in einem Mischungsverhältnis von 1:1 mit Aluminiumhydroxid als Adjuvant immunisiert. Die Immunisierung erfolgte wöchentlich in einem Zeitraum von drei Wochen.

#### **3.2.1.2 Blutentnahme und –präparation**

Um Antikörpermengen im Serum bestimmen zu können, wurden die Mäuse entweder an der Schwanzvene geblutet oder das Herz punktiert. Zum Bluten aus der Schwanzvene mussten die Mäuse unter einer Rotlichtlampe erwärmt werden und anschließend wurde die Schwanzvene mit einem Skalpell punktiert. Circa 300-500 µl Blut wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Erfolgte die Blutgewinnung aus dem Herzen, wurde die Maus mit CO<sub>2</sub> getötet, der Brustkorb geöffnet und das Herz punktiert.

Zur Agglutination der Blutzellen wurde das Blut mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss musste der Blutkuchen mit einer Pinzette entfernt und das Serum durch Zentrifugation (6 min, 3000 g) abgetrennt werden. Die obere, durchsichtige Phase, das Serum, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### **3.2.2 Zellpräparation**

#### **3.2.2.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Milz**

Die Aufreinigung der Lymphozyten aus der Milz erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Mit Hilfe einer Spritze wurde die Milz durch ein Metallsieb gerieben, bis nur noch die

## Material und Methoden

Kapsel sichtbar war. Die hergestellte Zellsuspension wurde danach in 15 ml RPMI mit 2% FCS aufgenommen, über einen 100 µm Nylonfilter filtriert und abzentrifugiert (5 min bei 300 g und 4°C). Der Überstand wurde verworfen. Zur Erythrozytenlyse wurde das Pellet mit 1 ml RCRB pro Milz für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 5 ml RMPI Medium mit 2% FCS gestoppt und abzentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin in Zellkulturmedium aufgenommen, oder wenn eine weitere Separation erfolgen sollte, in MACS Puffer gewaschen.

### **3.2.2.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Lymphknoten**

Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wurden die Lymphknoten zwischen zwei Objektträgern steril zerrieben, filtriert (100 µm) und in Zellkulturmedium aufgenommen.

### **3.2.2.3 Zellzählung**

Zur Bestimmung der Zellzahl ist die Zellsuspension 1:20 (10 µl in 190 µl) mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt und 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen worden. Die Anzahl der ungefärbten, lebenden Zellen wurde in vier Großquadraten gezählt und die Gesamtzellzahl der Suspension folgendermaßen kalkuliert:

lebene Zellen/4\*Verdünnungsfaktor\*Volumen Zellsuspension (in ml)\*Kammerfaktor ( $10^4$ )

## **3.2.3 Isolation von primären Mauszellen**

### **3.2.3.1 Magnet-basierte Isolation von B Lymphozyten**

Die nach der Zellpräparation (3.2.2) erhaltene Suspension wurde mit MACS Puffer gewaschen und mit 20 µl pro Milz des Antikörpercocktails, des negative B-Zellisolutionskits von Miltenyi, für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl anti-Biotin Beads pro Milz hinzugefügt und erneut 15 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension mit 5 ml MACS Puffer gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 300 g bei 4°C). Das Pellet wurde in 3 ml MACS Puffer aufgenommen und über ein 50 µm Nylonsieb auf die MACS Säule (LS) filtriert. Die Säule ist zweimal mit 2 ml MACS Puffer gewaschen worden und der Durchfluss enthielt die B-Lymphozyten. Die Reinheit der Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (3.2.7.1) bestimmt.

### 3.2.3.2 Magnet-basierte Isolation von regulatorischen T Zellen

Die durch die Zellpräparation erhaltene Suspension wurde in MACS Puffer aufgenommen und abzentrifugiert (5 min, 300 g bei 4°C). Zuerst wurden die CD4 positiven Zellen mit Hilfe des „untouched“ Isolationskits aufgereinigt. Hierzu mussten die Zellen zunächst mit 20 µl des Antikörpercocktails pro Milz für 10 min bei 4°C inkubiert werden. Als nächstes mit 30 µl der anti-Biotin Beads unter den gleichen Bedingungen. Die Suspension wurden mit MACS Puffer gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 300 g bei °C), um ungebundene Beads zu entfernen. Die Zellen wurden in 3 ml MACS Puffer resuspendiert, filtriert und über die MACS Säule (LS) aufgereinigt. Dazu wurde die Säule mit 2x2 ml MACS Puffer gewaschen und der Durchfluss, der nun die CD4+ Zellen beinhaltet, abzentrifugiert (5 min, 300 g bei 4°C). Zur Isolation der CD25+ Zellen wurde die CD4+ Zellsuspension mit 20 µl CD25-PE für 10 min bei 4°C und im Anschluss mit 30 µl anti-PE Beads (15 min bei 4°C) inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (5 min, 300 g bei 4°C) wurde das Pellet in 2 ml aufgenommen, filtriert und auf die MACS Säule aufgetragen. Die Säule ist 3 mal mit MACS Puffer gewaschen worden, bevor die an der Säule magnetisch gebundenen CD25+ Zellen mit 2 ml MACS Puffer eluiert wurden. Dementsprechend war eine Trennung von CD4+CD25+ und CD4+ und CD25- möglich.

### 3.2.3.3 Durchflusszytometer-basierte Isolation von OVA spezifischen B Zellen

Die OVA spezifischen B Zellen der Milzzellsuspension wurden mit anti-B220 und OVA-Alexa647 markiert und durchflusszytometrisch aufgereinigt.

### 3.2.3.4 Durchflusszytometer-basierte Isolation von regulatorischen T Zellen

Die CD19 positiven Zellen der Einzelzellsuspension der Milz (3.2.2.1) ist mit Hilfe von anti-CD19 magnetischen Mikrobeads entfernt worden, bevor die Suspension mit fluoreszenzmarkierten AK anti-CD4 und anti-CD25 gefärbt wurde. Die regulatorischen T Zellen konnten dann durchflusszytometrisch auf Grund ihrer CD4, CD25 und Foxp3-GFP Expression isoliert werden.

### 3.2.3.5 Treg *in vivo* Induktion

Um die Induktion von regulatorischen T Zellen zu analysieren, wurden diese in DO11.10xDEREG Mäuse zunächst am Tag -2 und -1 mittels Diphtheriatoxin (40 ng/g Maus) depletiert. Die CD4 positiven T Zellen wurden am Tag 0 durch negative MACS-

## Material und Methoden

Aufreinigung isoliert und in WTxBalb/C oder NOHxBalb/C Mäuse transferiert. Nach drei Tagen erfolgte die Untersuchung Foxp3/GFP Induktion durchflusszytometrisch.

### 3.2.4 *in vitro* Zellkultur

#### 3.2.4.1 Beladung von B-Lymphozyten

Die MACS aufgereinigten HEL spezifischen B Lymphozyten (3.2.3.1; IgHEL) wurden mit 20 µg/ml HEL Protein oder alternativ 200 nM HEL Peptide beladen und 30 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (5 min, 300 g bei 4°C) und in 5 ml B Zellkulturmedium aufgenommen und gezählt.

#### 3.2.4.2 Kokultur von B Zellen und T Zellen

Die jeweiligen beladenen IgHEL B Zellsuspensionen (komplette Einzelzellsuspension oder negativ aufgereinigte reine B Zellen; 3.2.3.1 und 3.2.4.1) sind mit aufgereinigten Wildtypzellen (WT) oder transgenen NOH T Helferzellen oder regulatorische T Zellen (3.2.3.2) kokultiviert worden. Es wurden pro „Well“ (96-Lochrundbodenplatte)  $0,2 \times 10^6$  B Zellen zusammen mit  $0,3 \times 10^6$  T Zellen ausplattiert. Die Ansätze (Triplikate) wurden mit 100 µl Zellkulturmedium inklusive stimulierenden anti-CD40 AK (Endkonzentration 0,5 µg/ml) auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Die verschiedenen blockierenden Antikörper wurden in entsprechender Verdünnung direkt zum Kokulturmedium hinzugeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5%.

Zur Analyse der Apoptoseinduktion wurden die Zellen nach 18 Stunden geerntet und durchflusszytometrisch gefärbt.

Die Antikörperproduktion im Überstand wurde nach 6 Tagen der Kokultur gemessen. Während der Dauer der Kokultur ist jeden zweiten Tag die Hälfte des Mediums ausgewechselt worden.

#### 3.2.4.3 *in vitro* Transwellkultursystem

Die unteren „wells“ der Platte wurden mit aufgereinigten IgHEL B Zellen ( $0,2 \times 10^6$  Zellen in 50 µl) befüllt. Die B Zellen wurden mit 100 µl des Kulturmediums aktiviert, das zusätzlich noch 0,5 µg/ml des stimulierenden anti-CD40 Antikörpers enthielt. In die obere Kammer der Transwelleinlage wurden  $0,3 \times 10^6$  Tregs oder T Helferzellen in einem Volumen von 50 µl hinzugefügt, bzw. für die IgHEL Kontrolle nur 50 µl

B Zellkulturmedium. Die Transwelleinlage besitzt eine Porengröße von 0,4 µm, sodass nur Botenstoffe, keine Zellen in die untere Kammer diffundieren können. Jeden zweiten Tag wurde die Hälfte des Mediums aus der unteren Platte ausgetauscht, bis an Tag 6 das komplette Medium zur ELISA Analyse abgenommen werden konnte.

#### **3.2.4.4 *ex vivo* Restimulation**

Einzelzellsuspensionen der Milz (3.2.2.1) wurden mit 50 µg/ml OVA Protein über Nacht bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5% restimuliert.

### **3.2.5 „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)**

#### **3.2.5.1 IFN-gamma ELISA**

Die Zytokinproduktion von Milzzellen wurde in Zellkulturüberständen mit Hilfe eines IFN-gamma spezifischen „Sandwich“ ELISAs ermittelt. Hierzu wurde eine 96 Loch ELISA Mikrotiterplatte mit dem unkonjugierten, IFN-gamma spezifischen Primärantikörper (50 µl/Plattenvertiefung, 1:180 in Beschichtungspuffer) über Nacht bei 4°C beladen. Die Platte ist zweimal mit Waschpuffer gespült worden, bevor unspezifische Bindungen mit 150 µl Blockpuffer pro „well“ für eine Stunde bei Raumtemperatur abgepuffert wurden. Anschließend wurden die Proben und die Standardreihe in einem Volumen von 50 µl als Triplikate bzw. Duplikate aufgetragen. Die Standardreihe wurde jeweils 1:2 verdünnt, beginnend mit einer Konzentration von 8 ng/ml. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit 50 µl pro Vertiefung des biotinylierten Ziegen anti-Maus IFN-gamma Antikörper (1:180 in Blockpuffer) für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im stetigen Vorgang wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und für eine Stunde mit 50 µl pro Vertiefung mit der Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase (1:5000 in Blockpuffer) beladen. Nach dreimaligen Waschen wurde die Farbreaktion mit 100 µl pro „well“ des OPD Substrates (1 mg/ml) angesetzt mit OPD Puffer und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 µl/ml) gestartet. Bei Erreichen der Sättigung der Farbreaktion in den höchsten Konzentrationen der Standardreihe ist der Farbumschlag mit 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lösung gestoppt und abschließend die

Absorption mit Hilfe eines ELISA Readers bei einer Wellenlänge von 490 nm detektiert worden.

### 3.2.5.2 Antigen-ELISA

Zur Detektion von Antigen spezifischen Antikörpern wurde die ELISA Mikrotiterplatte mit 100 µl pro Vertiefung OVA (25 µg/ml), HEL (25 µg/ml) oder β-Gal (5 µg/ml) Protein in Beschichtungspuffer beladen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Unspezifische Bindungen sind mit 150 µl Blockpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur abgeschirmt worden. Die Mausseren wurden, abhängig von der Anzahl vorheriger Immunisierung, in Blockpuffer verdünnt und in einem Volumen von 100 µl pro Vertiefung aufgetragen. In der Platte ist eine Verdünnungsreihe mit einem Verhältnis von 1:2 erstellt und die Platte bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert worden. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und der jeweilige biotinylierte Detektionsantikörper (IgMa-1:500; IgG-1:5000; IgM-1:5000; IgG1-3-1:250) für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einem Volumen von 100 µl pro „well“ aufgetragen. Nach intensiven dreimaligem Waschen wurde die Platte mit 100 µl pro Vertiefung der Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase (1:5000 in Blockpuffer) beladen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen, bevor die Farbreaktion mit 100 µl pro Vertiefung, des mit OPD (1 mg/ml) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 µl/ml) versetzen, OPD Puffers gestartet wurde. Sobald die Farbumschlag nach gelb stattgefunden hat, wurde die Reaktion mit 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lösung gestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte unverzüglich am ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm.

### 3.2.6 ELISPOT

Zur Detektion von Antikörper produzierenden Zellen wurde die ELISPOT Mikrotiterplatte mit 50 µl pro Vertiefung OVA (20 µg/ml) oder HEL (20 µg/ml,) Protein in Beschichtungspuffer beladen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Unspezifische Bindungen sind mit Hilfe von 20%igem Milchpulver (150 µl pro Vertiefung) für eine Stunde bei 37°C blockiert worden. Danach wurde die Platte mit PBS einmal gewaschen. Die Milzzell- bzw. Lymphknotensuspensionen wurden auf eine Ausgangszellzahl von 1x10<sup>7</sup> Zellen pro ml eingestellt. Auf der Platte wurde eine Verdünnungsreihe mit Zellkulturmedium in Duplikaten beginnend mit 2x10<sup>6</sup> Zellen erstellt. Die Suspension wurde für vier Stunden bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5% inkubiert.

Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und der jeweilige biotinylierte Detektionsantikörper (IgMa-1:500; IgG-1:5000;) für eine Stunde bei 37°C in einem Volumen von 50 µl pro „well“ aufgetragen. Nach intensiven, dreimaligem Waschen, wurde die Platte mit 50 µl pro Vertiefung der Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase (1:5000 in Blockpuffer) beladen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen, bevor die Farbreaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 µl/ml) versetzter AEC Substratlösung (50 µl pro „well“), gestartet wurde. Sobald rote Punkte zu erkennen waren, wurde die Platte ausgeschlagen und unter dem Abzug getrocknet. Die Platte wurde nun am ELISPOT Reader eingelesen.

### **3.2.7 FACS**

#### **3.2.7.1 Oberflächenfärbung**

Zur Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen wurde die Einzelzellsuspension der Milzen oder Lymphknoten (3.2.2.1 bzw. 3.2.2.2) in 2 ml aufgenommen, 1/10 bzw. die Hälfte der Lösung wurde pro Färbung verwendet. Die Zellen wurden mit FACS Puffer gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 300 g bei 4°C). Die in Tabelle 3.1.6 aufgeführten Antikörper wurden entsprechend den Angaben in FACS Puffer verdünnt und für 20 min im Kühlschrank mit den Zellen inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 2 ml FACS Puffer und Abzentrifugation (5 min, 300 g bei 4°C) gestoppt. Falls biotinylierte Antikörper zum Einsatz kamen, wurde die Prozedur mit Fluorophor-gekoppelter Streptavidinperoxidase (0,625-1,25 mg/ml) wiederholt. Abschließend konnte das Pellet in FACS Puffer aufgenommen und mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert werden.

#### **3.2.7.2 Intrazelluläre Färbung**

Die Analyse von regulatorischen T Zellen erfordert die Bestimmung der intrazellulären Foxp3 Expression, hierzu wurde das Fixierungs- und Permeabilisierungskit von eBioscience verwendet. Nachdem die Oberflächenfärbung abgeschlossen war, wurden die Zellen in einem ml der Fixierlösung resuspendiert und bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit dem Permeabilisierungspuffer gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 450 g bei 4°C). Der Foxp3 oder Helios Antikörper wurde 1:200

in Permeabilisierungspuffer verdünnt und für 30 min auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, abzentrifugiert (5 min, 450 g bei 4°C) und in 300 µl zur Analyse aufgenommen.

### 3.2.8 Real-time reverse-transcription PCR

Die RNA wurde mittels des RNeasy Micro Kits (Qiagen) isoliert und anschließend mit Hilfe von randomisierten Hexamerprimern in cDNA umgeschrieben. Das ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) wurde für die Durchführung der RT-PCR mit folgenden Einstellungen herangezogen: Es liefen 40 Zyklen pro PCR mit jeweils 15 s bei 95°C zur Denaturierung und 1 min bei 60°C zum Primerannealing und zur Elongation.<sup>220</sup> Die RT-PCR wurde mit 1,5 µl cDNA plus 2,5 µl (0,9 µM) spezifische Primer und 12,5 µl der 2°-Platinum SYBR Green qPCR SuperMix Lösung (Invitrogen) durchgeführt. Folgende Primer wurden benutzt: GAPDH for (5-GGGAAGCCCATCACCATCTT-3) und GAPDH rev (5-GCCTCACCCATTTGATGTT-3), CTLA-4 for (5-TGGAGTCCTTCATAGTTAGG-3) und CTLA-4 rev (5-GCAAGATGGTGAGTGTGATGTT-3), Fas for (5-TCTGGTGCTTGCTGGCTCAC-3) und Fas rev (5-CCATAGGCGATTTCTGGGAC-3), IL-10R for (5-AACCCCTCTGTGATCGGA-3) und IL-10R rev (5-GCTGCCTTCAGACTCTTC-3), PD-1 for (5-AAGCTTATGTGGGTCCGGC-3) und PD-1 rev (5-GGATCCTCAAAGAGGCC-3), TGFβ2R for (5-AGCATCACGGCCATCTGTG-3) und TGFβ2R rev (5-TGGCAAACCGTCTCCAGAGT-3), FasL for (5-CGGTGGTATTTTTTCATGGTTCTGG-3) und FasL rev (5-CTTGTGGTTTAGGGGCTGGTTGTT-3), Granzym B for (5-GGGAAGATGAAGATCCTCCTGC-3) und Granzym B rev (5-TGATCTCCCCTGCCTTTGTC-3), PDL-1 for (5-TGCTTCTCAATGTGACC-3) und PDL-1 rev (5-GGAACAACAGGATGGAT-3), PDL-2 for (5-TGACCCTCTGAGTTGGATGGA-3) und PDL-2 rev (5-GCCGGGATGAAAGCATGA-3), Perforin for (5-CCCTAGGCCAGAGGCAAAC-3) und Perforin rev (5-AAAATTGGCTACCTTGGAGTGG-3)

Alle Proben wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse auf die Expression von GAPDH normalisiert.

### **3.2.9 Statistik**

Resultate wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt; \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des ANOVAs plus anschließenden Bonferroni Test, der Prism5 Software.

## 4. Ergebnisse

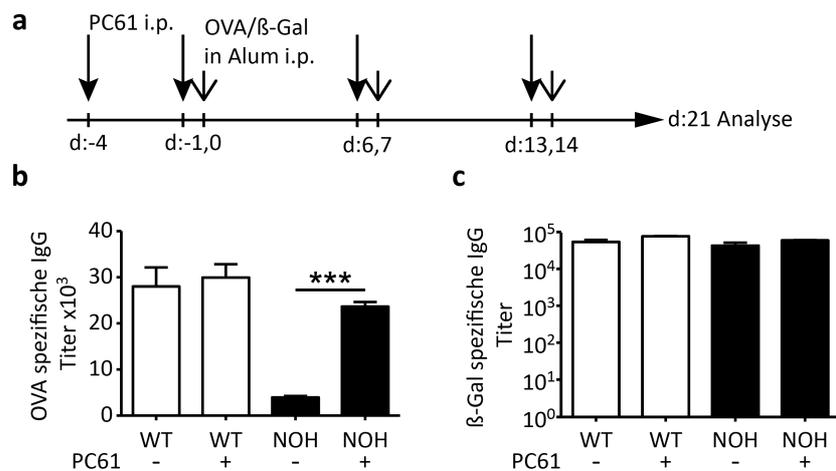
### 4.1 Induktion Treg vermittelter peripherer B Zelltoleranz gegen gewebespezifische Antigene

Das Feld der Autoimmunerkrankungen ist breit gefächert und speziell die B Zell-vermittelten Erkrankungen, wie z.B. Lupus Erythematosus und bestimmte Formen der Glomerulonephritiden, spielen in der Bevölkerung eine große Rolle. Regulatorische T Zellen (Tregs) sind essentiell für die Aufrechterhaltung peripherer Toleranz, zum Schutz vor Autoimmunerkrankungen und zur Begrenzung chronischer, inflammatorischer Erkrankungen<sup>172</sup> und rückten damit immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus. Tregs bieten hohes therapeutisches Potential, denn sie supprimieren autoreaktive CD4 und CD8 T Zellen.<sup>99, 221, 222</sup> Über die Interaktion von Tregs mit autoreaktiven B Zellen ist hingegen wenig bekannt. Seo et al. konnten zeigen, dass Tregs die Autoantikörperproduktion gegen Doppelstrang DNA unterdrücken können.<sup>79</sup> Weiterführend konnte von Ludwig-Portugall et al. nachgewiesen werden, dass die Depletion von Tregs in ROH<sup>high</sup> Mäusen die Autoantikörperproduktion gegen Pankreas-spezifische Autoantigene positiv beeinflusst.<sup>199, 200</sup> Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss von regulatorischen T Zellen auf autoreaktive B Zellen in einem peripheren Toleranzmodell der Niere zu untersuchen und den molekularen Mechanismus der putativen Suppression aufzuschlüsseln. Dazu wurde das NOH Mausmodell verwendet, welches sich durch die Expression des Fusionsproteins aus OVA und HEL unter dem Nephripromotor auszeichnet.<sup>220</sup>

#### 4.1.1 Tregs supprimieren Antigen-spezifisch die Autoantikörperproduktion gegen glomeruläre Autoantigene

Um den Einfluss regulatorischer T Zellen auf die periphere B Zelltoleranz zu untersuchen, wurden regulatorische T Zellen durch PC61 (einem selektiven CD25 Antikörper) in NOH und WT Mäusen depletiert und die Mäuse anschließend mit OVA/ $\beta$ -Gal in Aluminiumhydroxid (Alum) wöchentlich immunisiert (**Abb. 4.1-1 a**). NOH Mäuse zeigten eine stark reduzierte OVA spezifische IgG Serumantikörperproduktion im Vergleich zu WT Kontrollmäusen an Tag 21. Diese Suppression der Antikörpermengen in den NOH Mäusen war abhängig von der Präsenz regulatorischer T Zellen, denn Treg-depletierte Mäuse erzielten OVA spezifische Antikörperlevel vergleichbar mit WT Mäusen. Im

Gegensatz dazu hatte die Treg Depletion keinen weiteren Einfluss auf die Antikörperproduktion in WT Mäusen (**Abb. 4.1-1 b**). Die Immunisierung mit einem weiteren Modellantigen  $\beta$ -Gal führte hingegen zu einer identischen humoralen Immunantwort in NOH und WT Mäusen und auch die Treg Depletion mittels PC61 hatte keinen weiteren Effekt auf die Antikörperproduktion (**Abb. 4.1-1 c**). Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die Suppression der Antikörperantwort gegen gewebespezifische Antigene antigenspezifisch erfolgt.



**Abbildung 8: 4.1-1 Tregs verhindern die Produktion von Auto-Antikörpern in NOH Mäusen**

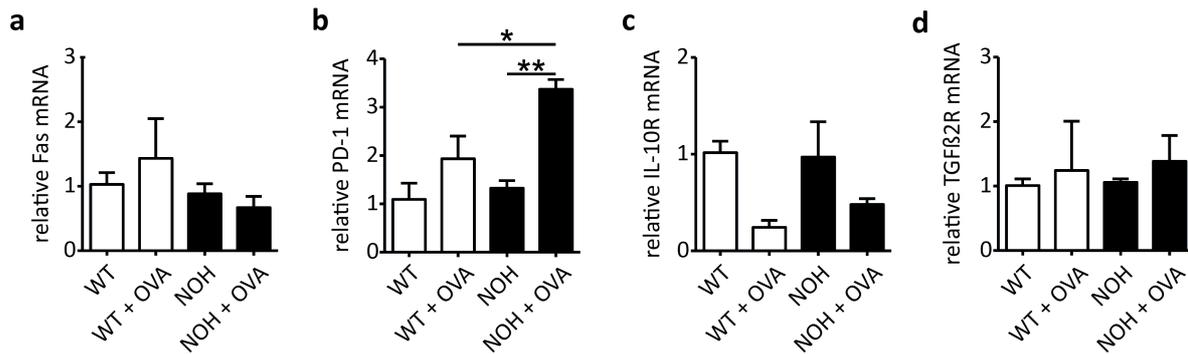
(a) Experimentelles Schema für B und C: Tregs wurden in NOH und WT Mäusen am Tag -4, -1, 6 und 13 mit PC61 depletiert. Die Immunisierung mit OVA bzw.  $\beta$ -Gal in Alum erfolgte an den Tagen 0, 7 und 14. (B und C) Messung der OVA-spezifischen (b) und  $\beta$ -Gal-spezifischen (c) IgG Titer an Tag 21 in NOH (schwarze Balken) und WT (weiße Balken) Mäusen. Die Ergebnisse repräsentieren 3 unabhängige Experimente mit 3 - 4 Mäusen pro Gruppe. \*\*\*  $P < 0,001$  (ANOVA plus Bonferroni)

## **4.2 PD-1 -- PDL-1/2 vermittelte Suppression von B Zellen durch Antigen-spezifische Tregs**

Regulatorische T Zellen können ihre suppressorische Funktion über diverse Mechanismen vermitteln, dazu zählen 1. die Sekretion von inhibitorischen Molekülen, 2. der Entzug von Überlebensfaktoren, 3. das Granzym B bzw. Perforin vermittelte Töten von Zielzellen oder 4. die Modulation von Antigen-präsentierenden Zellen durch die Ligandierung inhibitorischer T Zellrezeptoren.<sup>223, 224</sup> Welcher Mechanismus bei der B Zellsuppression *in vivo* eine Rolle spielt, ist unklar und sollte in diesem Projekt ermittelt werden.

### **4.2.1 mRNA Expression inhibitorischer Rezeptoren auf antigenspezifischen B Zellen**

Die unterdrückte B Zellimmunantwort, charakterisiert durch die reduzierte Antikörperproduktion, lässt vermuten, dass die Aktivierung inhibitorischer Rezeptoren die antigenspezifischen B Zellen beeinflusst. Um einen Hinweis auf einen potenziell involvierten Rezeptor zu erhalten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass jener Rezeptor nach Immunisierung in NOH Mäusen heraufreguliert werden würde. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden WT und NOH Mäuse wöchentlich für einen Zeitraum von 21 Tagen mit OVA in Alum immunisiert. OVA spezifische B Zellen (B220+, OVA+) wurden aus diesen und naiven WT und NOH Mäusen durchflusszytometrisch isoliert. Die RNA aus den OVA spezifischen Zellen wurde mittels Trizol aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR durchgeführt. Die Analyse der Apoptose induzierenden Rezeptoren ergab folgendes Bild: die Fas mRNA Expression (**Abb. 4.2-1 a**) veränderte sich zwischen den Gruppen nicht maßgeblich. Im Gegensatz dazu exprimierten OVA spezifische B Zellen aus immunisierten NOH Mäusen signifikant mehr PD-1 mRNA (**Abb. 4.2-1 b**) als die selben B Zellen aus unbehandelte NOH oder immunisierten WT Mäusen. Die Analyse der Expression von Zytokinrezeptoren (IL-10R und TGFβ2R) auf OVA spezifischen B Zellen, die in eine B Zellsuppression involviert sein können, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen B Zellen aus WT und NOH Mäusen, unabhängig von einer Immunisierung (**Abb. 4.2-1 c, d**). Auf Grund dieser Befunde wurde der PD-1 Rezeptor als potenzieller inhibitorischer Rezeptor der antigenspezifischen Suppression von B Zellen identifiziert und weiterführend analysiert.



**Abbildung 9: 4.2-1 Steigerung der PD-1 mRNA Expression in OVA spezifischen B Zellen nach Immunisierung**

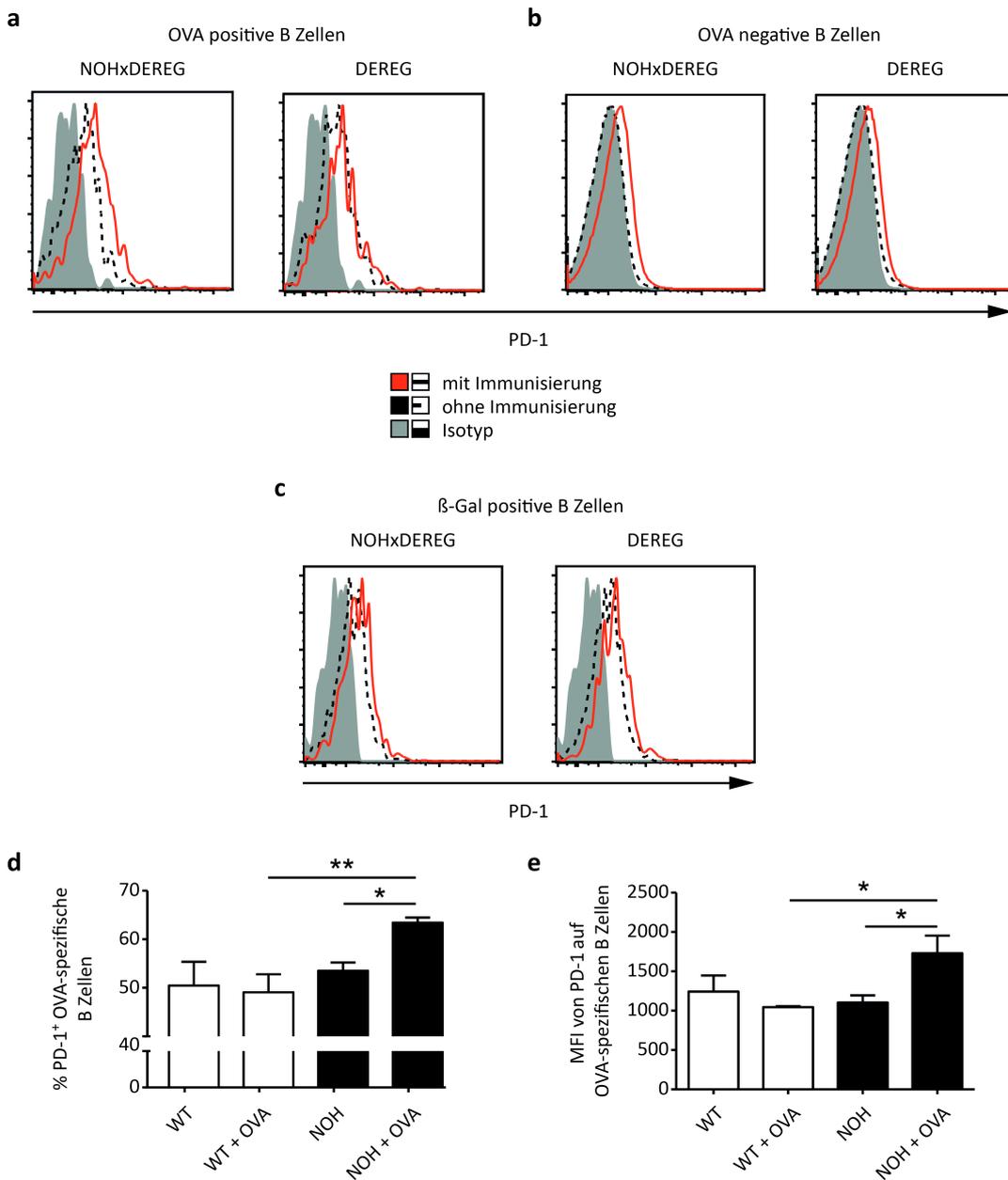
Fas (a), PD-1 (b), IL-10R (c) und TGFβ2R (d) mRNA Expression in OVA spezifischen B Zellen. NOH und WT Mäuse wurden in einem Intervall von einer Woche dreimal mit OVA in Alum immunisiert oder unbehandelt belassen. OVA spezifische B Zellen wurden durchflusszytometrisch aufgereinigt und in Trizol zur RNA Isolation aufgenommen. Die RNA wurde mittels RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse wurden relativ zur GAPDH Expression dargestellt. Die Ergebnisse stellen zwei individuelle Experimente mit 4 Mäusen pro Gruppe dar. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  (ANOVA plus Bonferroni)

#### 4.2.2 PD-1 Expressionssteigerung auf OVA spezifischen B Zellen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die gesteigerte mRNA Expression von PD-1 auch mit einer erhöhten Proteinexpression dieses Moleküls korreliert, denn verschiedene, intrazelluläre Mechanismen können die Translation hemmen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden NOHxDEREG und DEREK Kontrollmäuse einmal mit OVA/β-Gal in Alum immunisiert und nach 24 Stunden die Proteinexpression von PD-1 durchflusszytometrisch untersucht. DEREK Mäuse exprimieren unter dem Foxp3-Promotor ein Fusionskonstrukt aus eGFP und dem Diphtheriatoxinrezeptor, wodurch die Tregs selektiv depletiert werden können. OVA positive B Zellen (Abb. 4.2-2 a) aus immunisierten NOHxDEREG Mäusen (rote Linie) exprimierten mehr PD-1 auf ihrer Oberfläche als aus nicht-immunisierten Mäusen (schwarze Linie) oder die Isotypkontrolle (graue Fläche). Diese Expression war nicht in den DEREK Kontrollmäusen zu sehen. Um festzustellen, ob die Steigerung der PD-1 Expression antigenspezifisch ist, wurden zusätzlich OVA negative (Abb. 4.2-2 b) und β-Gal positive (Abb. 4.2-2 c) B Zellen auf ihre PD-1 Expression analysiert. Die Menge an PD-1 auf der Oberfläche von OVA negativen und β-Gal positiven B Zellen einer immunisierten NOHxDEREG Maus unterschied sich nur geringfügig von der nicht-immunisierten Referenzmaus. Weiterhin wurde dieser Effekt auch in den DEREK Kontrollmäusen beobachtet, was die Schlussfolgerung zulässt, dass es sich hierbei nicht um eine spezifische Veränderung handelt. Zusätzlich dazu ist in den Abbildungen 4.2-2 d und e zu erkennen, dass immunisierte NOH Mäuse nach 21 Tagen einen gesteigerten prozentualen Anteil an PD-1+

## Ergebnisse

OVA spezifischen B Zellen und eine erhöhte Menge an PD-1 pro B Zelle aufwiesen. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich die Erhöhung der PD-1 Expression selektiv nur auf OVA spezifischen B Zellen in NOH Mäusen detektieren lässt.



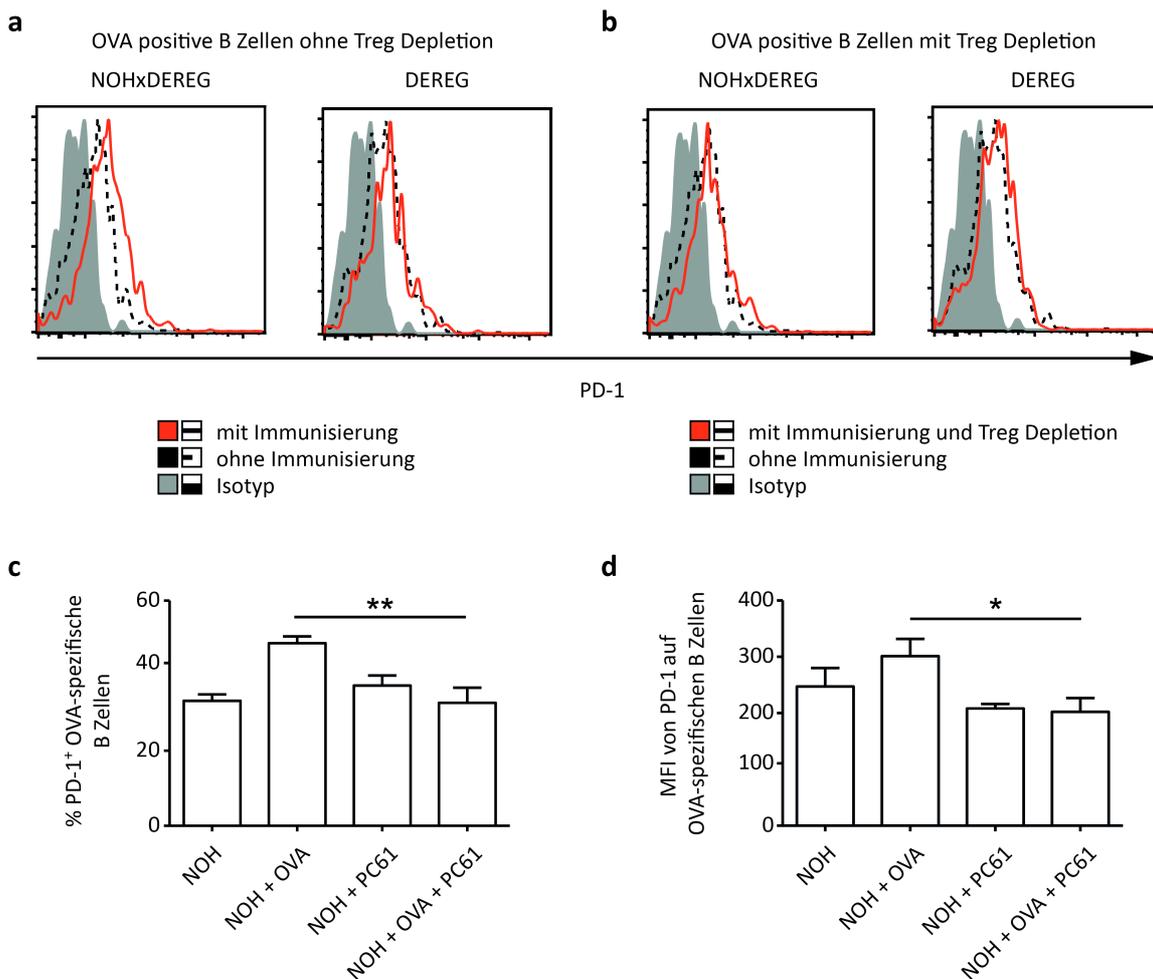
**Abbildung 10: 4.2-2 Gesteigerte Proteinexpression von PD-1 auf OVA spezifischen B Zellen**

(a-c) NOHxDEREG und DEREG Mäuse wurden einmal mit OVA/ $\beta$ -Gal in Alum i.p. immunisiert. Analyse der PD-1 Expression auf OVA spezifischen (a), nicht-OVA spezifischen (b) und  $\beta$ -Gal spezifischen (c) B Zellen mittels Durchflusszytometer. Abgebildet wurden repräsentative Histogramme, in denen nicht immunisierte Mäuse (schwarze, gestrichelte Linie) mit Isotypkontrollen (graue Fläche) und immunisierte Mäusen (rote Linie) verglichen wurden. (d, e) prozentuale Anteil an PD-1 exprimierenden OVA spezifischen B Zellen (d) und Expression von PD-1 pro OVA spezifische B Zelle (e) an Tag 21 nach dreimaliger Immunisierung mit OVA in Alum. Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente mit 2 - 4 Mäusen pro Gruppe. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  (ANOVA plus Bonferroni)

### **4.2.3 PD-1 Expressionssteigerung ist abhängig von der Interaktion mit antigenspezifischen Tregs**

Die selektiv induzierte PD-1 Expression auf OVA positiven B Zellen in NOH Mäusen wirft die Frage auf, ob es sich hierbei um eine artifizielle Veränderung handelt oder ob dieser Effekt Treg induziert ist. Um diese Frage zu klären, wurde die PD-1 Expression auf OVA spezifischen B Zellen aus einmal immunisierten NOHxDEREG Mäusen (**Abb. 4.2-3 a**, rote Linie) mit der aus Treg depletierten und immunisierten NOHxDEREG Mäusen (**Abb. 4.2-3 b**) verglichen. Die Depletion der regulatorischen T Zellen an den Tagen -4 und -1 in den NOHxDEREG Mäusen verringerte die PD-1 Expression auf den B Zellen auf das Level der nicht-immunisierten Kontrolle, allerdings hatte sie keinen Einfluss auf das PD-1 Expressionslevel in den DEREG Mäusen. Neben der Depletion regulatorischer T Zellen mit Hilfe von Diphteriatoxin (DT) konnte, mittels eines zweiten Verfahrens (PC61), nachgewiesen werden, dass die Entfernung von Tregs aus dem System zu einer Senkung der PD-1+ B Zellen führte, was auch mit einer reduzierten PD-1 Expression pro B Zelle einherging (**Abb. 4.2-3 c und d**). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine Verbindung zwischen der Treg vermittelten B Zellsuppression und PD-1 existiert.

## Ergebnisse



**Abbildung 11: 4.2-3 Tregs induzieren PD-1 auf OVA spezifischen B Zellen**

(a,b) PD-1 Expression auf immunisierten B Zellen (rote Linie) im Vergleich mit nicht-immunisierten B Zellen (schwarze, gestrichelte Linie) und Isotypkontrollen (graue Fläche) ohne (a) und mit (b) Treg Depletion mittels Diphtheriatoxin an den Tagen -4 und -1, repräsentative Histogramme wurden dargestellt. (c,d) Durchflusszytometrische Analyse des prozentualen Anteils an PD-1 exprimierender OVA spezifische B Zellen (c), sowie der Menge an PD-1 pro OVA spezifische B Zelle (d). Tregs wurden mit PC61 entfernt, die NOH Mäuse einmal mit OVA in Alum immunisiert und nach 24 h untersucht. Die Ergebnisse stellen zwei individuelle Experimente mit 3 Mäusen pro Gruppe dar. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 (ANOVA plus Bonferroni)

### 4.2.4 Antigen-spezifische Tregs unterdrücken kontaktabhängig die B

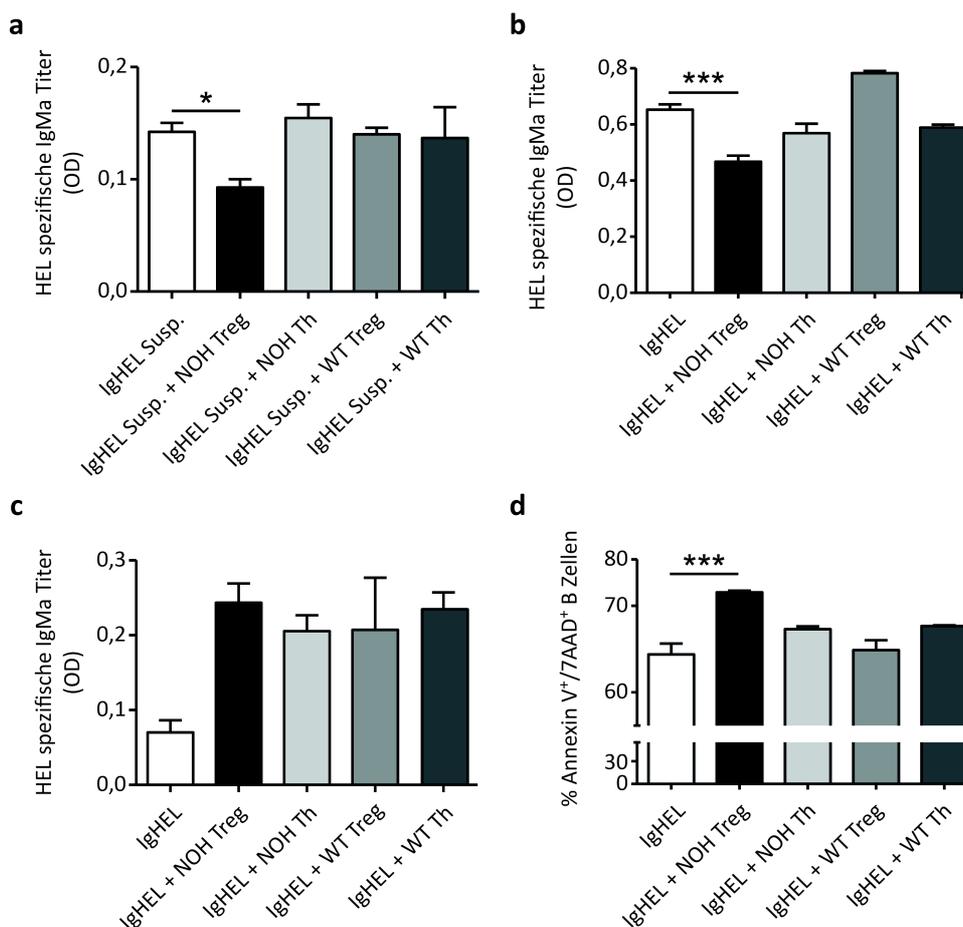
#### Zellimmunantwort *in vitro*

Zur Aufschlüsselung des Mechanismus, welcher der B Zellsuppression zu Grunde liegt und zur Analyse der Relevanz von PD-1 wurde ein *in vitro* Kokultursystem etabliert, das die Reduzierung der Antikörperproduktion *in vivo* widerspiegelt. Hierzu wurde eine Einzelzellsuspension aus Milzen der IgHEL Mäuse, die einen HEL-spezifischen B Zellrezeptor (IgMa) tragen und unfähig zum Isotypenwechsel sind, hergestellt und mit HEL Protein beladen. Anschließend wurde die Suspension mit Hilfe magnetischer Zellseparation aufgereinigter regulatorischer T Zellen oder T Helferzellen von NOH oder

WT Mäusen für 6 Tage kokultiviert. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und am 6. Tag wurde der komplette Überstand abgenommen. Zunächst wurde die Suppression der Antikörperproduktion der B Zellen mit Hilfe eines IgMa ELISAs analysiert. In der **Abbildung 4.2.-4 a** ist dargestellt, dass die IgHEL B Zellsuspension, die mit NOH Tregs (schwarzer Balken) kokultiviert wurde, eine verringerte Antikörperproduktion aufwies als die IgHEL B Zellsuspension, die allein kultiviert wurde (weißer Balken). Das Antikörperniveau der Kokultur mit WT Tregs (mittelgrauer Balken) stagnierte auf dem Level der IgHEL Kontrolle und auch die Zugabe weiterer T Helferzellen (sowohl NOH als auch WT Zellen) beeinflusste die Antikörperproduktion nicht signifikant. Daher spiegelt dieses Model die antigenspezifische, *in vivo* Suppression der B Zellen in den NOH Mäusen überzeugend wider. Zur Erforschung des molekularen Mechanismus der Inhibition von antigenspezifischen B Zellen wäre es von Vorteil, die Komplexität der Milzzellsuspension bezüglich ihrer Vielfalt von interagierenden Immunzellen einzugrenzen. Zu diesem Zweck wurden als nächstes B Zellen aus den Milzen von IgHEL Mäusen mittels negativer magnetischer Zellseparation aufgereinigt, beladen und in die Kultur gegeben. Weil primäre, unstimulierte B Zellen in Kultur sterben und keine Antikörper produzieren, ist die CD4 T Zellhilfe durch einen stimulierenden CD40 Antikörper ersetzt worden. Im Vergleich zu der IgHEL Kontrolle bewirkte die Zugabe der transgenen Tregs (schwarzer Balken) eine signifikante Suppression des Antikörperspiegels (**Abb. 4.2-4 b**). Im Gegensatz dazu wurde das Antikörperniveau durch den Zusatz von wildtyp Tregs oder T Helferzellen nicht bedeutend gesenkt. Dieses *in vitro* System, das durch die direkte Interaktion der Zellen charakterisiert ist, wurde für alle weiteren *in vitro* Analysen verwendet. Die Kontaktabhängigkeit der antigenspezifischen Suppression der B Zelle wurde mit Hilfe eines Transwellsystems bestimmt. In diesem System werden die Zellen durch eine semipermeable Membran voneinander separiert und es können nur Moleküle bis zur Größe von 0,4  $\mu\text{m}$  durchdiffundieren. In **Abbildung 4.2-4 c** ist deutlich zu erkennen, dass die reduzierte IgMa Antikörperproduktion in den Kokulturen von B Zellen mit NOH Tregs durch das Transwellsystem aufgehoben wurde. Die Antikörperlevel waren nun vergleichbar mit denen der WT Tregs. Die bisher untersuchte Suppression der Antikörpergeneration spiegelt nur einen Aspekt der B Zellinhibition wieder. Daher wurde nun weiterführend die Möglichkeit der Apoptoseinduktion in den B Zellen geprüft. Nach 18 Stunden der Kokultur wurden die B Zellen für Annexin V gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Annexin V dient der Markierung von

## Ergebnisse

Phosphatidylserinen, die nach Induktion des programmierten Zelltods auf die Außenseite der Zellmembran transloziert werden. Obwohl in allen Gruppen bereits ein sehr hohes Grundniveau von ca. 65% an apoptotischen B Zellen vorlag, vergrößerte sich der Anteil an Annexin V und 7-AAD doppelt positiven B Zellen in der Kokultur mit NOH Tregs noch auf 73% (**Abb. 4.2-4 d**). Im Gegensatz dazu induzierten weder NOH T Helferzellen noch WT Tregs eine zusätzliche Apoptose in den kokultivierten B Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Treg vermittelte Suppression kontaktabhängig ist und sowohl die Antikörperproduktion als auch das Überleben der B Zellen beeinflusst.



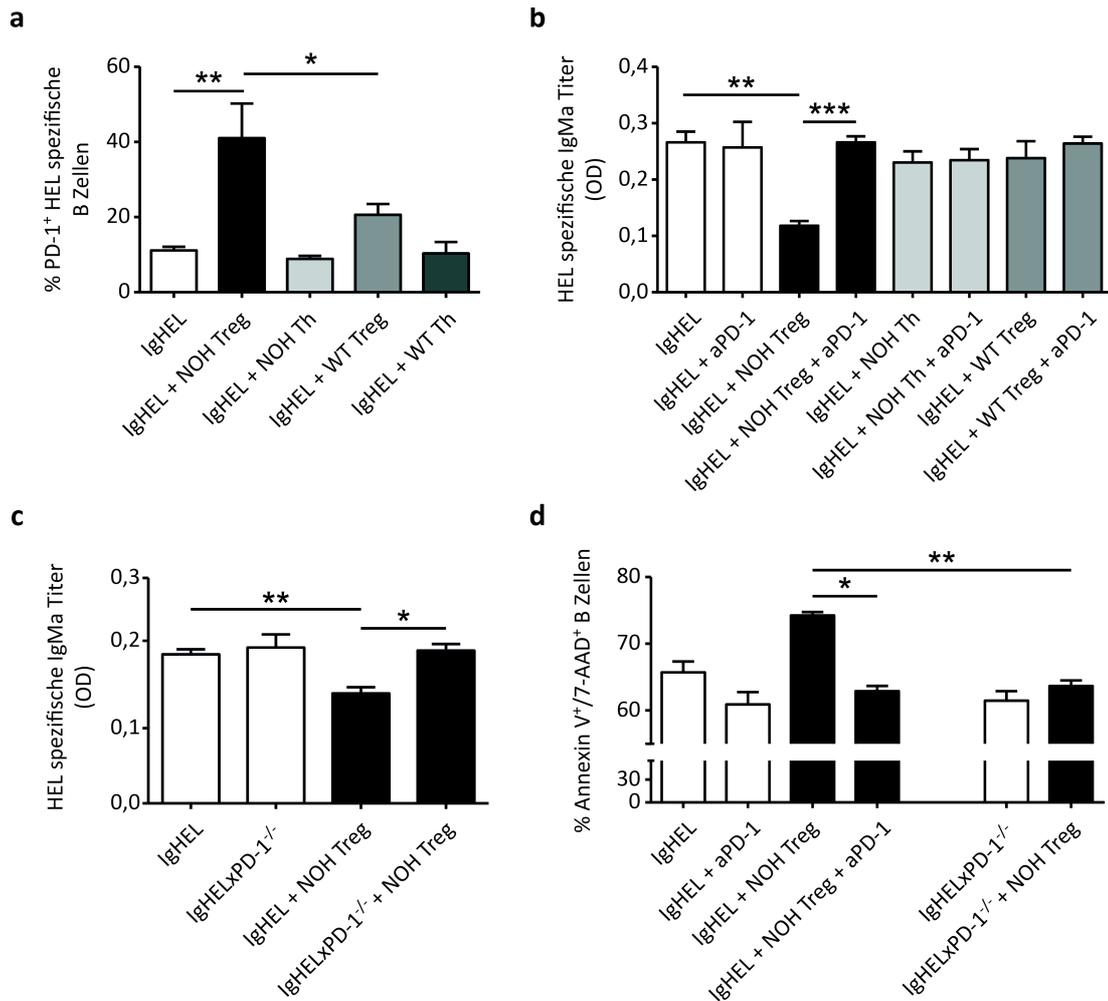
**Abbildung 12: 4.2-4 Kontaktabhängige Suppression von IgHEL B Zellen *in vitro***

(a) HEL spezifische Antikörper Titer dargestellt als OD im Zellkulturüberstand von kultivierten HEL Protein (20 µg/ml) beladenen IgHEL Milzzellsuspensionen allein (weißer Balken) oder mit NOH Tregs (schwarzer Balken), NOH T Helferzellen (hellgrauer Balken), WT Tregs (mittelgrauer Balken) sowie WT T Helferzellen (dunkelgrauer Balken). (b) Experimenteller Ansatz wie in (a), mit zusätzlicher MACS-Aufreinigung der IgHEL B Zellen und Substitution der T Zellhilfe durch einen stimulierenden aCD40 (0,5 µg/ml) Antikörper. (c) Die Zellen wurden wie in (b) aufgereinigt, aber die Kokultur wurde in einem Transwell System angesetzt. Dabei wurden B Zellen in die untere Kammer und T Zellen in die obere Kammer ausgesät. Die Kammern sind durch eine semipermeable Membran getrennt, die nur kleine Moleküle bis zur Größe von 0,4 µm durchdiffundieren lässt. Die IgMa Antikörpermengen wurden im Überstand der unteren Kammer bestimmt. (d) Bestimmung der Quote an apoptotischen B Zellen nach 18h der Kokultur. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente mit Triplikaten pro Gruppe. \* P < 0,05, \*\*\* P < 0,001 (ANOVA plus Bonferroni)

#### 4.2.5 PD-1 Blockade hebt die antigenspezifische Suppression auf

Um einen Einfluss von PD-1 auf die B Zellsuppression zu untersuchen, musste zunächst nachgewiesen werden, dass PD-1, entsprechend den *in vivo* Befunden, auch *in vitro* nach Antigen-spezifischen Kontakt mit regulatorischen T Zellen auf den B Zellen hochreguliert wird. Hierzu wurden die lebenden B Zellen nach 6 Tagen der Kokultur durchflusszytometrisch analysiert. IgHEL B Zellen, die aus der Kokultur mit NOH Tregs stammten (**Abb. 4.2-5 a**, schwarzer Balken), zeigten einen 2fach höheren Anstieg an PD-1 positiven B Zellen als die IgHEL Kontrolle (weißer Balken) oder die mit WT Treg kultivierten B Zellen (mittelgrauer Balken). T Helferzellen hatten keinen Einfluss auf die PD-1 Expression im Vergleich zur IgHEL Kontrolle. Nach dem Nachweis der gesteigerten PD-1 Proteinexpression auf HEL positiven B Zellen konnten nun die Auswirkungen einer PD-1 Inhibition analysiert werden. Die Zugabe eines blockierenden PD-1 Antikörpers (RMP1-14) zur Kokultur resultierte in einer wiederhergestellten Antikörperproduktion vergleichbar mit der IgHEL Kontrolle (**Abb. 4.2-5 b**). Da der blockierenden Antikörper keine Auswirkungen auf die Antikörperproduktion der IgHEL Kontrolle oder einer anderen Gruppe bewirkte, konnte ein unspezifischer Nebeneffekt als Ursache der Antikörperproduktionssteigerung ausgeschlossen werden. Im Einklang mit den Ergebnissen des blockierenden Antikörpers zeigte auch der direkte Vergleich von PD-1-defizienten mit kompetenten IgHEL B Zellen, die mit transgenen Tregs kultiviert wurden, eine erhöhte Antikörperproduktion von den defizienten B Zellen (**Abb. 3.2-5 c**). Die in der Kultur mit den NOH Tregs induzierte Apoptose der B Zellen wurde durch die Unterbrechung des PD-1 Signalwegs über den blockierenden Antikörper, als auch durch die PD-1 Defizienz der B Zellen aufgehoben (**Abb.4.2-5 d**). Demzufolge ist die *in vitro* Suppression der B Zellen mit all ihren Facetten PD-1 abhängig.

## Ergebnisse

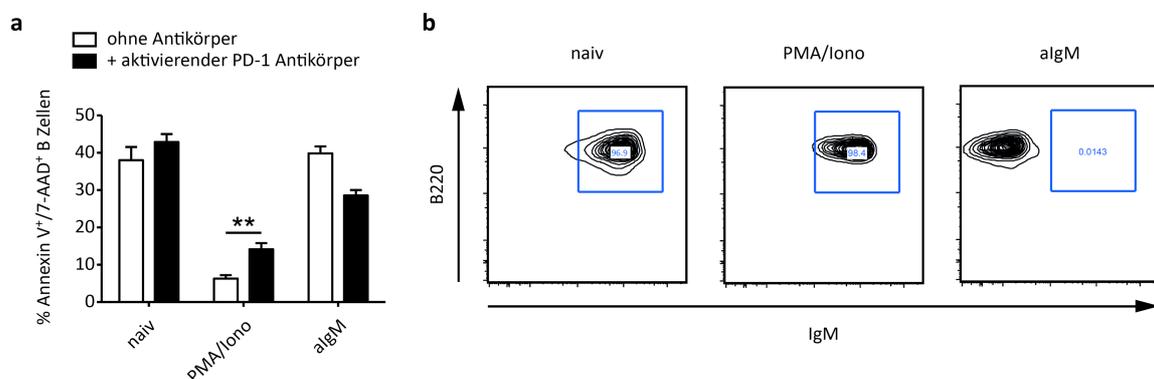


**Abbildung 13: 4.2-5 Die B Zellsuppression ist PD-1 abhängig**

(a) prozentualer Anteil an PD-1 exprimierenden IgHEL B Zellen nach 6 Tagen der Kokultur mit NOH Tregs (schwarzer Balken), NOH T Helferzellen (hellgrauer Balken), WT Treg (mittelgrauer Balken), WT T Helferzellen (dunkelgrauer Balken) oder allein (weißer Balken). (b) ELISA Analyse der HEL spezifischen IgMa Mengen (OD) in der Kokultur nach zusätzlicher Blockade von PD-1 mittels RMP1-14. (c) HEL-spezifische IgMa Titer in Kokulturen mit PD-1-defizienten IgHEL B Zellen. (d) Prozentualer Anteil an Annexin V und 7-AAD doppelt positiven IgHEL B Zellen nach 18h Kokultur mit PD-1 blockade oder PD-1 Defizienz. Die Ergebnisse stellen zwei unabhängige Experimente mit Triplikaten pro Gruppe dar. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 (ANOVA plus Bonferroni)

#### 4.2.6 Stimulierende PD-1 Ligation induziert Apoptose *in vitro*

Bisher konnte gezeigt werden, dass die PD-1 Blockade das Überleben der B Zellen positiv beeinflusst. Es fehlt aber der konkrete Beweis, dass die Stimulation des PD-1 Rezeptors das Absterben der B Zelle induziert. Um diesen Nachweis zu erbringen, musste zunächst die PD-1 Expression auf B Zellen über verschiedenen Stimuli (PMA/Ionomycin oder anti-IgM) forciert werden. Als Kontrolle dienten unbehandelte B Zellen. Nach 48 Stunden wurden die lebenden B Zellen mittels Dichtegradienten aufgereinigt und für weitere 18 Stunden mit dem stimulierenden PD-1 Antikörperfragment inkubiert. Wie erwartet zeigt die **Abbildung 4.2-6 a** deutlich, dass der PD-1 aktivierende Antikörper keinen Einfluss auf die Induktion des Zelltods bei naiven Zellen besitzt. Die Zugabe des stimulierenden PD-1 Antikörpers zu den PMA/Ionomycin vorstimulierten B Zellen führte zu einer gesteigerten Apoptoseinduktion im Vergleich zur Kontrolle ohne Antikörper. Im Gegensatz dazu zeigten die anti-IgM stimulierte B Zellen ein vermehrtes Überleben. Dies könnte mit der reduzierten Expression des B Zellrezeptors nach anti-IgM Stimulation auf der Zelloberfläche zusammenhängen (**Abb. 4.2-6 b**). Resümierend kann festgehalten werden, dass die PD-1 Ligation Apoptose in PMA/Ionomycin stimulierten B Zellen erzeugt.

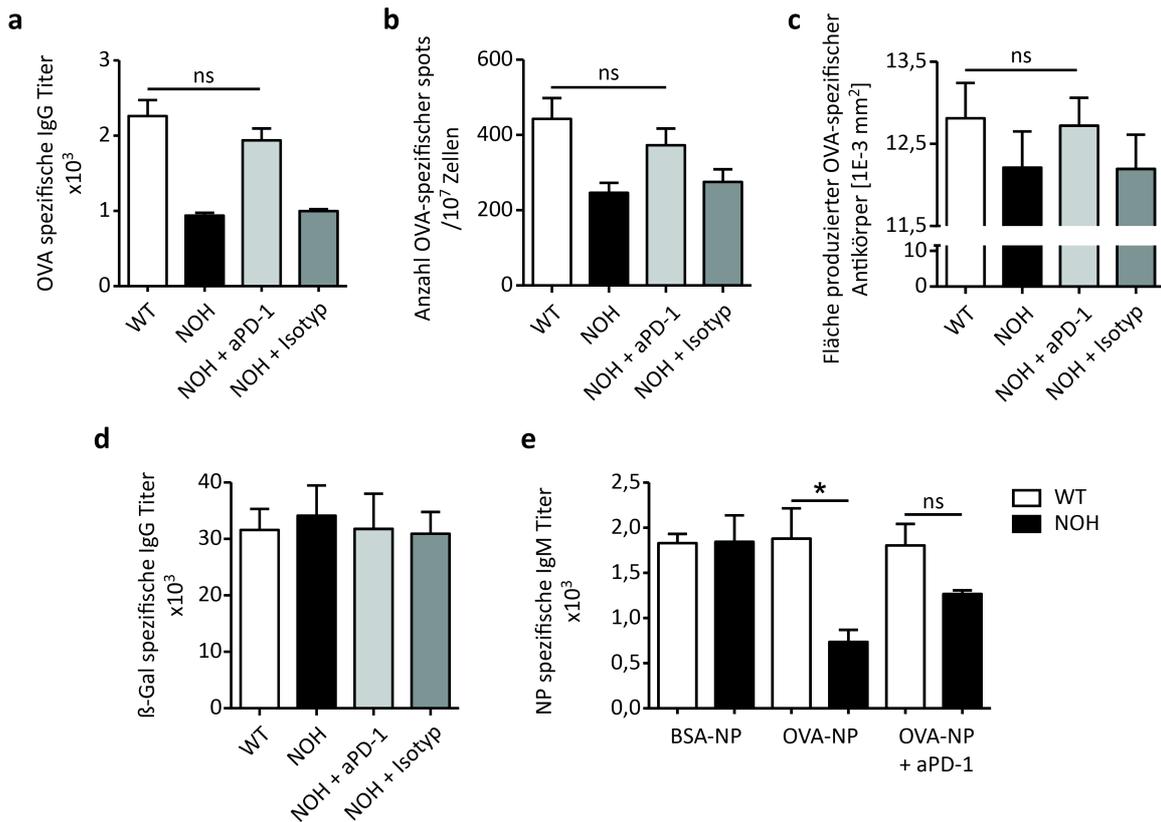


**Abbildung 14: 4.2-6 PD-1 Stimulation induziert Apoptose in aktivierten B Zellen**

(a + b) MACS-aufgereinigte B Zellen wurden für 48h unbehandelt oder mit Zugabe von PMA/Ionomycin bzw. mit anti-IgM (algM) Antikörpern kultiviert. Die überlebenden B Zellen wurden mittels Dichtegradient aufgereinigt und +/- stimulierenden PD-1 Antikörper kultiviert. (a) Quote an apoptotischen B Zellen wurde nach 18h der Kultur determiniert. (b) B Zellrezeptorexpression nach 48h der Stimulation. Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente mit Triplikaten pro Gruppe. \*\* P < 0,01 (ANOVA plus Bonferroni)

#### **4.2.7 Periphere, antigenspezifische Toleranz ist abhängig vom PD-1 Signalweg *in vivo***

Das *in vitro* System diente zur Festigung der Hypothese, dass PD-1 in die Suppression von B Zellen involviert ist. Um diese Verbindung *in vivo* zu erhärten, wurde der blockierende PD-1 Antikörper oder die Isotypkontrolle in NOH Mäuse injiziert, die mit OVA/ $\beta$ -Gal in Alum immunisiert wurden. Der blockierende PD-1 Antikörper erzeugte eine deutliche Steigerung der OVA spezifischen IgG Antikörperlevel in den injizierten NOH Mäusen (**Abb. 4.2-7 a**, hellgrauer Balken) im Vergleich zur Isotypkontrolle (dunkelgrauer Balken) oder den unbehandelten NOH Mäusen (schwarzer Balken). Das gesenkte Antikörpervilleau im Serum der NOH Mäuse kann durch eine verringerte Anzahl an OVA spezifischen B Zellen und/oder durch eine reduzierte Antikörperproduktion pro B Zelle verursacht sein. Die ELISPOT Analyse zeigte, dass sowohl die Anzahl der antikörperproduzierenden B Zellen (**Abb. 4.2-7 b**) als auch die Menge an Antikörper (**Abb. 4.2-7 c**) durch den blockierenden PD-1 Antikörper gesteigert wurde. Die Antikörperproduktion gegen das fremde Antigen  $\beta$ -Gal blieb trotz Zugabe des PD-1 blockierenden Antikörpers hingegen unverändert (**Abb. 4.2-7 d**), womit ein unspezifischer Effekt ausgeschlossen werden kann. OVA positive Zellen sind in NOH Mäusen autoreaktiv, daher ist es möglich, dass sie bereits durch zentrale Toleranzmechanismen funktionell beeinträchtigt worden sind. Um diesen Aspekt auszuschließen, wurden NOH bzw. WT Mäuse mit dem Hapten Nitrophenol (NP), das an OVA bzw. BSA gekoppelt wurde, immunisiert. Ein Hapten kann alleine keine Immunreaktion hervorrufen. Erst die Bindung an ein Antigen macht aus ihm ein vollwertiges immunogenes Antigen. Daher sind NP-spezifische B Zellen per se nicht autoreaktiv, können aber über OVA bzw. BSA spezifische T Helferzellen oder Tregs in ihrer Reifung kontrolliert werden. Die Immunisierung mit BSA-NP führte zu vergleichbaren NP-spezifischen Antikörpermengen im Serum von WT und NOH Mäusen (**Abb. 4.2-7 e**). Hingegen waren die NP-Antikörperlevel in NOH Mäusen nach der Immunisierung mit OVA-NP 2,8fach verringert im Vergleich zu WT Mäusen, konnten aber durch die Blockade des PD-1 Signalweges wieder erhöht werden. Daher ist auszuschließen, dass die zentrale Toleranz eine Rolle spielt.



**Abbildung 15: 4.2-7 Aufhebung der peripheren Toleranz durch PD-1 Blockade *in vivo***

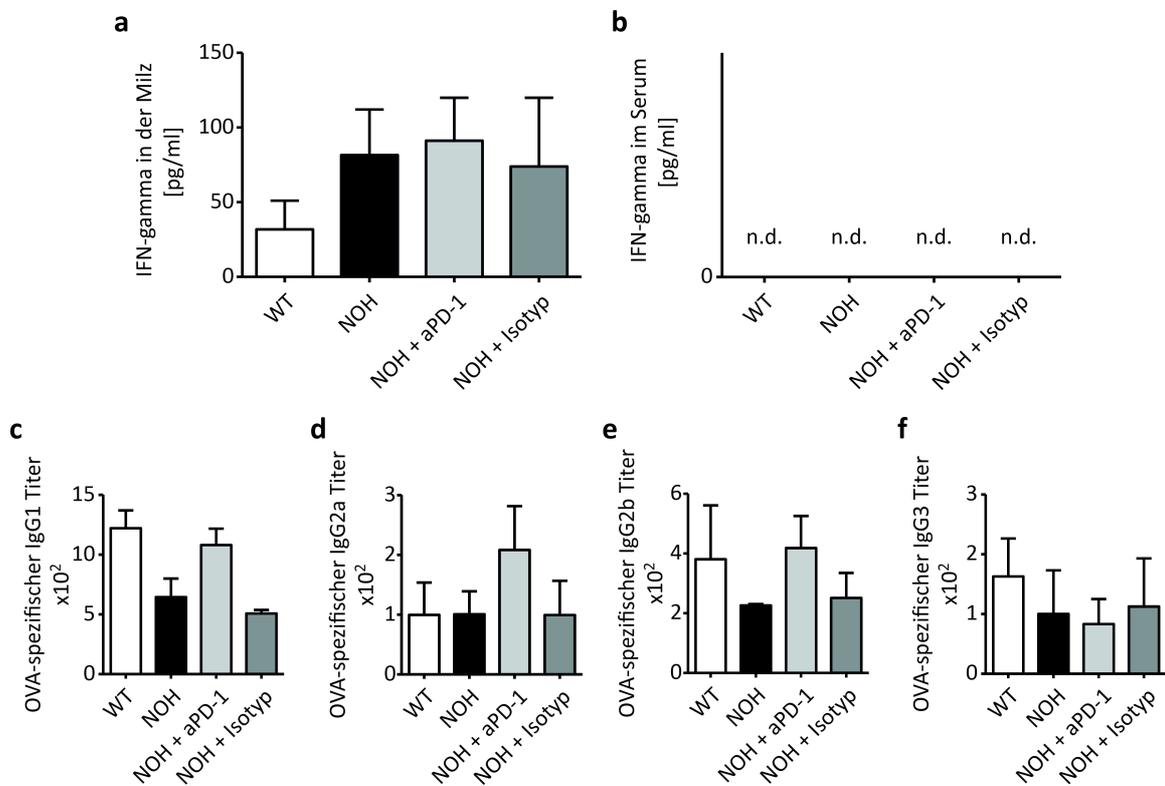
(a-d) NOH und WT Mäuse wurden an den Tagen 0, 7, 14 mit OVA/Alum immunisiert. An den selben Tagen, ca. 3h später, wurde entweder der blockierende PD-1 Antikörper (aPD-1) oder die Isotypkontrolle appliziert. (a) Anti-OVA Serum IgG Titer in WT Mäusen (weißer Balken), NOH Mäusen (schwarzer Balken), mit anti-PD-1 behandelten NOH Mäusen (hellgrauer Balken) und Isotypkontrollen (dunkelgrauer Balken) wurde an Tag 21 bestimmt. (b) Anzahl an B Zellen, die OVA-spezifische Antikörper produzieren, ermittelt durch ELISPOT. (c) Menge an OVA-spezifischen Antikörpern produziert pro B Zelle. (d)  $\beta$ -Gal spezifische Antikörper Titer am Tag 21. (e) NP-spezifische IgM Titer ermittelt in WT (weißer Balken) und NOH Mäusen (schwarzer Balken), die zweimal in einem wöchentlichen Intervall mit BSA-NP, OVA-NP oder mit OVA-NP und blockierenden PD-1 Antikörper immunisiert wurden. Die Ergebnisse stellen zwei unabhängige Experimente mit 3 - 4 Mäuse pro Gruppe dar. \* P < 0,05 (ANOVA plus Bonferroni)

#### 4.2.8 IFN-gamma induzierte IgG Subtypen werden von PD-1 beeinflusst

Bis jetzt konnte bereits gezeigt werden, dass die B Zelle durch den PD-1 Signalweg in ihrem Überleben und in der Fähigkeit Antikörper zu produzieren, beeinflusst wird. Ob ein zusätzlicher Einfluss auf den Isotypenwechsel besteht, ist noch ungeklärt. Grundlage hierfür ist die Charakterisierung der Immunantwort in den NOH Mäusen. Die Immunisierung mit OVA in Alum induziert normalerweise in WT Mäusen eine starke Th2 Immunantwort (IgG1 und IgE  $\uparrow$ ). In den vakzinierten NOH Mäusen hingegen wurde eine Th1 Antwort, die durch eine gesteigerte IFN-gamma Konzentration in der Milz gekennzeichnet war (Abb.4.2-8 a), detektiert. IFN-gamma konnte im Serum der Mäuse nicht detektiert werden (Abb. 4.2-8 b). Bereits 1987 wurde von Snapper et al. gezeigt, dass

## Ergebnisse

IFN-gamma einerseits die IgG1, IgG2b und IgG3 Produktion reduziert, aber andererseits auch die IgG2a Antikörperantwort induziert.<sup>225</sup> Verglichen mit den WT Mäusen existierte in den NOH Mäusen eine Senkung der IgG1 und IgG2b Antikörperlevel (**Abb. 4.2-8 c und e**). Diese konnte durch die PD-1 Blockade wieder aufgehoben werden. Die OVA-spezifischen IgG3 Titer waren ebenfalls supprimiert (**Abb. 4.2-8 f**), allerdings konnte dieser Titer durch den blockierenden PD-1 Antikörper nicht wieder hergestellt werden. Die Produktion an IgG2a war in den WT und NOH Mäusen vergleichbar (**Abb. 4.2-8 d**), konnte aber durch die Blockade des PD-1 noch weiter gesteigert werden. Schließlich lässt sich festhalten, dass in den NOH Mäusen ein Th1-mediierter Isotypenwechsel stattfindet, der in den meisten Fällen PD-1 vermittelt ist.



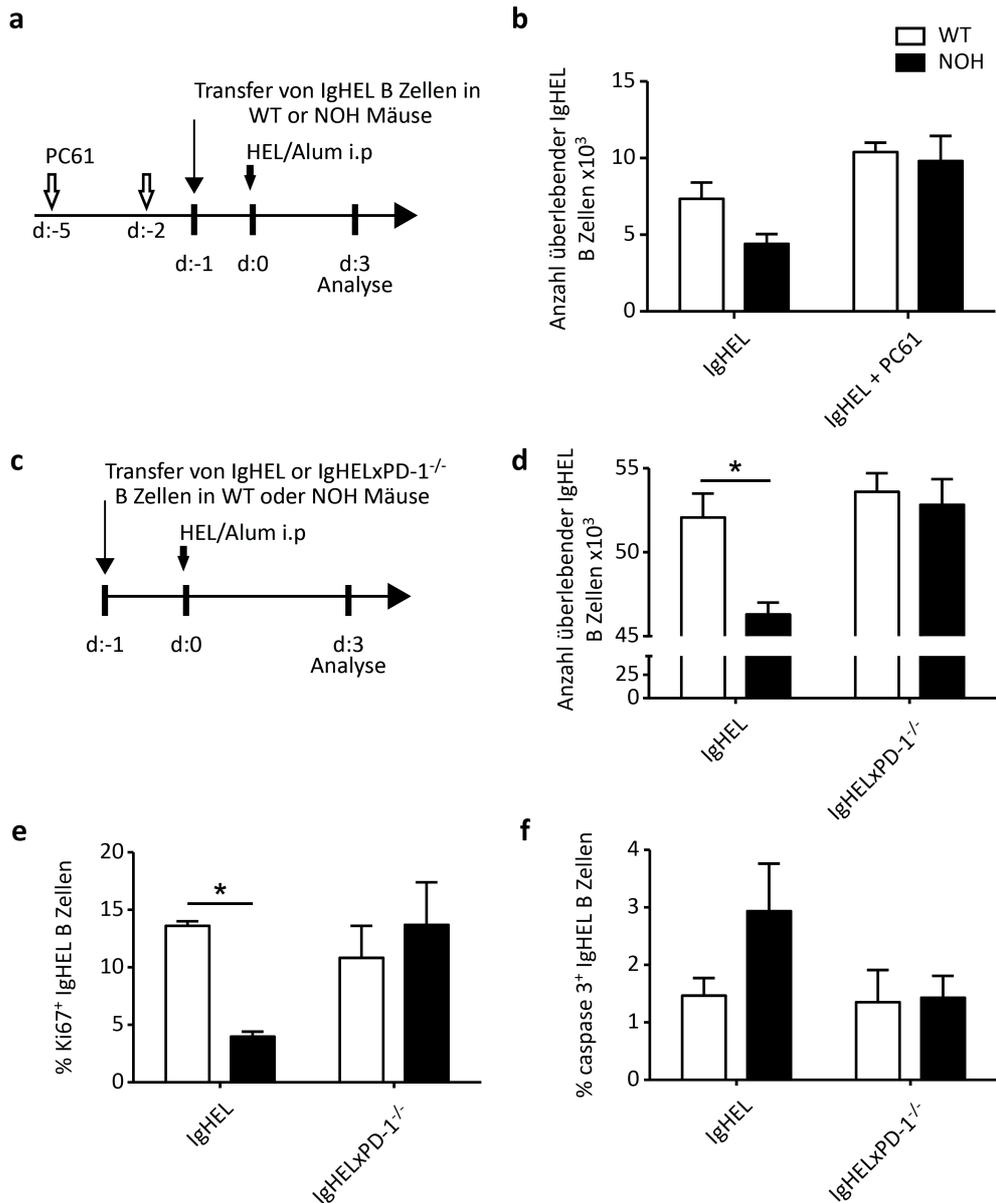
**Abbildung 16: 4.2-8 Lokale Erhöhung der IFN-gamma Konzentration korreliert mit IgG Subtypen in NOH Mäusen**

(a-d) NOH (schwarzer Balken) und WT Mäuse (weißer Balken) wurden dreimal wöchentlich mit OVA/Alum immunisiert. Der blockierende PD-1 Antikörper (hellgrauer Balken) und der Isotypantikörper (dunkelgrauer Balken) wurde den NOH Mäusen am selben Tag verabreicht. Konzentration an IFN-gamma in der Milz nach Restimulation mit OVA Protein (20  $\mu$ g/ml) für 24h (a) oder im Mausserum an Tag 21(b). OVA-spezifische IgG1 (c), IgG2a (d), IgG2b (e) und IgG3 (f) wurden am Tag 21 im Serum ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente mit 3 - 4 Mäusen pro Gruppe. n.d. nicht detektierbar

#### 4.2.9 PD-1 Expression auf B Zellen ist notwendig für die Suppression durch Antigen-spezifische Tregs

Wie bereits nachgewiesen, ist PD-1 in die Suppression antigenspezifischer B Zellen involviert. Um nun zu untersuchen, ob die PD-1 Expression exklusiv auf den B Zellen notwendig ist, musste eine Situation erzeugt werden, in der PD-1 selektiv auf diesen fehlt. Um dieses Ziel zu erreichen wurden IgHEL oder HEL spezifische PD-1-defiziente B Zellen in NOH oder WT Mäuse transferiert (**Abb. 4.2-9 c**). Die IgHEL B Zellen bringen den Vorteil, dass sie über ihren B Zellrezeptor des Subtyps a (IgMa) von den endogenen B Zellen unterschieden werden können. Anschließend wurden die Mäuse mit HEL in Alum immunisiert und nach drei Tagen die Anzahl überlebender IgHEL B Zellen determiniert. In NOH Mäusen überlebten signifikant weniger IgHEL B Zellen als in WT Mäusen (**Abb.4.2-9 d**), was auf die Suppression der antigenspezifischen Tregs zurückzuführen ist (**Abb. 4.2-9 a und b**). Dieser Prozess wurde bereits für ein anderes Mausmodell, den ROH Mäusen, beschrieben.<sup>200</sup> Der Transfer von PD-1-defizienten IgHEL B Zellen hingegen erzielte vergleichbare Resultate in NOH und WT Mäusen (**Abb.4.2-9 d**). Zwei Ursachen können der verringerten Anzahl überlebender IgHEL B Zellen in NOH Mäusen zu Grunde liegen: einerseits eine reduzierte Proliferation und/oder eine erhöhte Sterblichkeit der B Zellen. Die Abbildungen **4.2-9 e und f** zeigen, dass sowohl ein gesenkter Anteil an Ki67-positiven und somit weniger proliferierten B Zellen als auch ein gesteigerte Apoptoserate in den IgHEL B Zellen, die in NOH Mäuse transferiert wurden, vorlag. Im Gegensatz dazu teilten sich die IgHELxPD-1<sup>-/-</sup> B Zellen in einem ähnlichen Verhältnis in NOH und WT Mäusen und zeigten keinen Unterschied bei der Induktion der Apoptose. Zusammenfassend wurde untermauert, dass die Treg vermittelte B Zellsuppression von der Expression des PD-1 Moleküls auf der B Zelle abhängig ist und mit Veränderungen der Proliferation und Apoptose einhergeht.

## Ergebnisse



**Abbildung 17: 4.2-9 PD-1 Expression auf autoreaktiven B Zellen ist Grundlage für die Suppression**

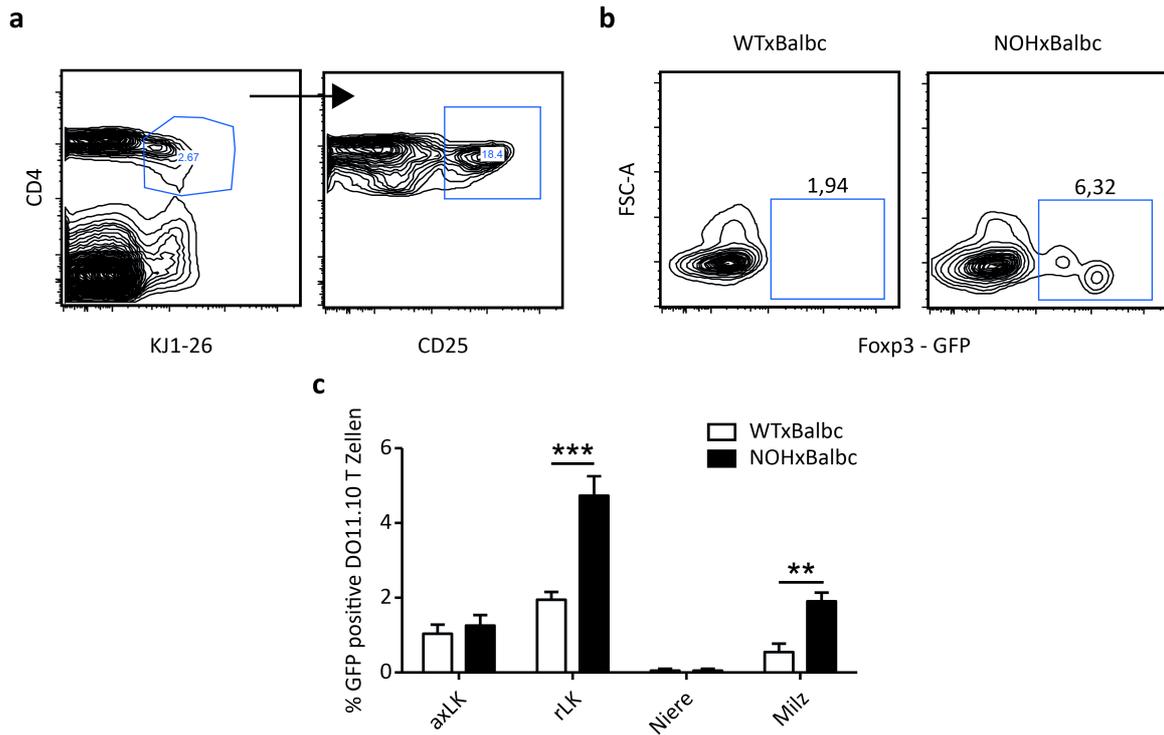
(a) Experimentelles Schema für b:  $5 \times 10^6$  IgHEL B Zellen wurden in unbehandelte bzw. Treg-depletierte WT (weißer Balken) oder NOH Mäuse (schwarzer Balken) transferiert, die am nächsten Tag mit HEL in Alum immunisiert wurden. (b) Absolute Anzahl an überlebenden IgHEL (IgMa<sup>+</sup>) B Zellen nach drei Tagen. (c) Experimentelles Schema für b-d:  $5 \times 10^6$  IgHEL oder PD-1 defiziente IgHEL B Zellen werden in WT (weißer Balken) oder NOH Mäuse (schwarzer Balken) transferiert, die einen Tag später mit HEL in Alum immunisiert wurden. (d) Absolute Anzahl an überlebenden IgHEL B Zellen (IgMa<sup>+</sup>) nach 3 Tagen. Prozentualer Anteil an proliferierenden (e) und apoptotischen (f) IgHEL B Zellen nach 72h. Die Ergebnisse stellen zwei unabhängige Experimente mit 3 - 4 Mäuse pro Gruppe dar. \*  $P < 0,05$  (ANOVA plus Bonferroni)

#### 4.2.10 Induktion der antigenspezifischen Tregs erfolgt im drainierenden

##### Lymphknoten

Die Voraussetzung zur PD-1-abhängigen, antigenspezifischen Suppression der B Zellen bildet die Induktion OVA-spezifischer regulatorischer T Zellen in den NOH im Vergleich zu WT Mäusen. Daher sollte mit Hilfe der OVA spezifischen DO11.10 T Zellen (Die CD4 T Zellen dieser Mauslinie exprimieren einen OVA spezifischen T Zellrezeptor (OVA<sub>323-339</sub>); KJ1-26<sup>+</sup>) analysiert werden in welchem Organ die Tregs induziert werden. Die DO11.10 Mäuse wurden mit DEREK Mäusen gekreuzt, damit die endogenen Tregs dieser Mäuse durch Diphetriatoxin depletiert werden konnten. Im Anschluss wurden die CD4 positiven T Zellen isoliert und in NOHxBalb/C bzw. WTxBalb/C Mäuse transferiert. Die DO11.10 Mäuse besitzen einen Balb/C Hintergrund, daher wurde die Rückkreuzung der NOH bzw. WT Tiere notwendig. Die Abbildung **4.2-10 a** stellt die Charakterisierung der DO11.10 T Zellen in den Empfänger-mäusen dar. Es wurden die CD4, KJ1-26 und CD25 positiven T Zellen auf ihre Induktion von Foxp3 mittels eGFP analysiert. Im renalen Lymphknoten von NOHxBalb/C Mäusen konnte in durchschnittlich 5% der OVA-spezifischen T Zellen GFP angeschaltet werden (**Abb. 4.2-10 b**), bei den WTxBalb/C Mäusen war das in nur durchschnittlich 1,6% der T Zellen der Fall. Dieses entsprach dem zu vernachlässigendem Schwellenwert in den meisten Organen. Wie in Abbildung **4.2-10 c** zu sehen ist, erfolgte im renalen Lymphknoten die Hauptinduktion. In der Niere und im Kontrolllymphknoten gab es keine Unterschiede zwischen den Mäusen. Der leicht erhöhte Anteil an Tregs in der Milz der NOHxBalb/C im Vergleich zu den WTxBalb/C Mäusen überschritt allerdings nicht das Level der unspezifischen Foxp3 Induktion. Daher bleibt festzuhalten, dass die Induktion der Antigen-spezifischen Tregs im drainierenden Lymphknoten erfolgt.

## Ergebnisse



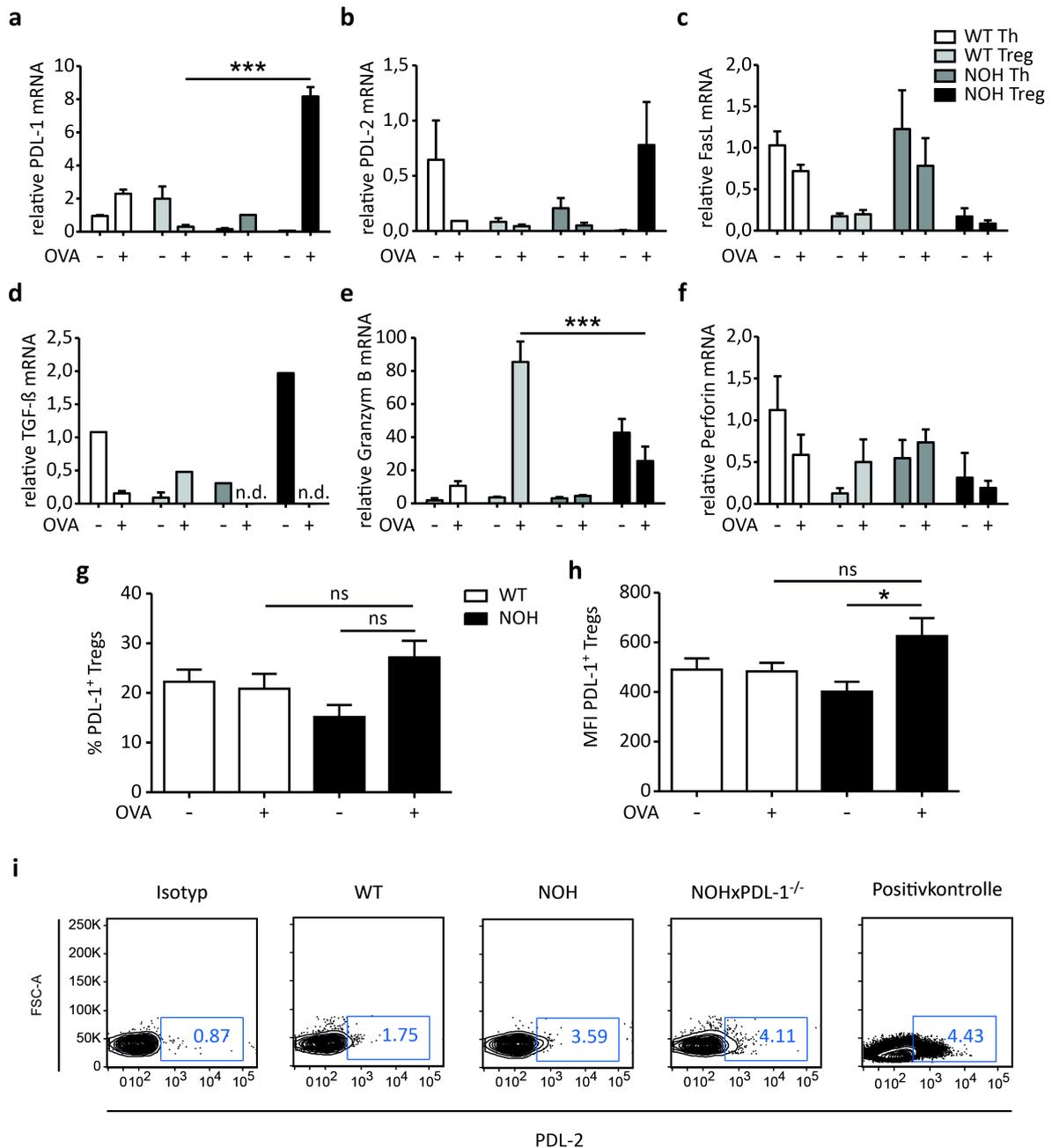
**Abbildung 18: 4.2-10 Induktion antigenspezifischer Tregs im renalen Lymphknoten**

(a-c) Tregs wurden in DO11.10xDEREG Mäusen durch Injektion von Diphteriatoxin (40 ng/g Maus) i.v. am Tag -4 und -1 eliminiert. Aus Milz und Lymphknoten wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen isoliert (MACS) und  $3,5 \times 10^6$  Zellen in WTxBalbc (weißer Balken) und NOHxBalbc (schwarzer Balken) Mäuse injiziert. Nach 3 Tagen wurden die Milz, die Niere, der renale Lymphknoten und der axiale Lymphknoten nach Foxp3 Induktion analysiert. (a) Identifizierung der DO11.10xDEREG CD4<sup>+</sup> T Zellen. (b) Repräsentative Dot Plots der Foxp3 (GFP) Induktion in den renalen Lymphknoten. (c) Überblick des Anteils an Foxp3 positiven T Zellen in den einzelnen Organen. Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente mit 3 - 4 Mäusen pro Gruppe. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 (ANOVA plus Bonferroni)

#### 4.2.11 Steigerung der PDL-1/2 Expression auf Tregs durch Immunisierung

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die antigenspezifischen Tregs die PD-1 Liganden (PDL-1 und/oder PDL-2) exprimieren, die den PD-1 Rezeptor auf den B Zellen stimulieren. Dazu wurde die RNA aus Tregs ( $CD4^+CD25^+GFP^+$ ) und Th Zellen ( $CD4^+CD25^+GFP^-$ ) aus NOHxDEREG bzw. DEREG Mäusen untersucht. Der Vorteil der DEREG Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen liegt in der Expression des Fusionskonstrukts aus dem Diphtheriatoxinrezeptors und eGFP unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors, wodurch alle regulatorischen T Zellen fluoreszenz markiert und depletierbar sind.<sup>226</sup> Nach Immunisierung wurde der PD-Ligand 1 verstärkt in NOH Tregs hochreguliert im Vergleich zu WT Tregs und der unimmunisierten NOH Treg Kontrolle (**Abb. 4.2-11 a**). Im Gegensatz dazu war die Steigerung der PDL-2 mRNA nur schwach ausgeprägt (**Abb 4.2-11 b**). Die mRNA Level anderer inhibitorischer Mediatoren, die mit einer Treg Suppression assoziiert werden, wie FasL (**Abb. 4.2-11 c**), TGF- $\beta$  (**Abb. 4.2-11 d**), Granzym B (**Abb. 4.2-11 e**) oder Perforin (**Abb.4.2-11 f**) blieben unverändert bzw. fielen ab im Vergleich zu den WT Kontrollmäusen. Die gesteigerte PDL-1 mRNA Expression auf den regulatorischen T Zellen der NOH Mäuse nach Immunisierung konnte auch auf Proteinlevel bestätigt werden, denn sowohl der prozentuale Anteil an PDL-1 positiven Tregs (**Abb. 4.2-11 g**) als auch die Menge an PDL-1 pro regulatorischer T Zelle (**Abb. 4.2-11 h**) war vergrößert. Die Expression von PDL-2 auf den regulatorischen T Zellen war sehr gering, konnte aber nach Immunisierung in den PDL-1 defizienten Mäusen im Vergleich zu der WT Kontrolle (**Abb. 4.2-11 i**) verstärkt werden. Die Ergebnisse suggerieren, dass entweder einer oder beide Liganden an der antigenspezifischen Suppression durch Tregs beteiligt sein könnten.

# Ergebnisse



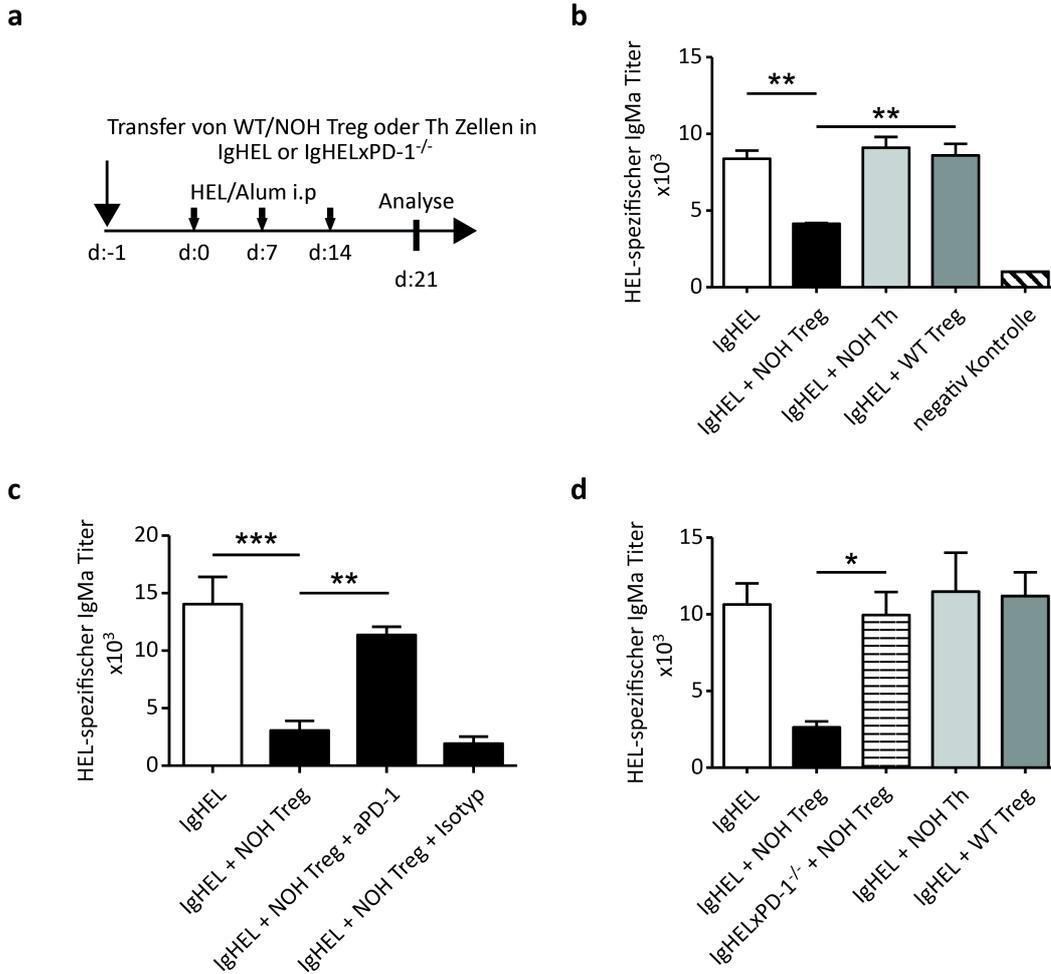
**Abbildung 19: 4.2-11 Spezifische Hochregulation der PD-1 Liganden auf den Tregs nach Immunisierung**

(a-f) NOHxDEREG und DEREG Mäuse wurden mit OVA in Alum an den Tagen 0,7 und 14 immunisiert. Durchflusszytometrisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (GFP<sup>+</sup>) Tregs wurden auf die Expression von PDL-1 (a), PDL-2 (b), FasL (c), TGF-β (d), Granzym B (e) und Perforin (f) relativ zur GAPDH Expression analysiert. (g) Prozent PDL-1 positive Tregs in unbehandelten oder immunisierten WT (weißer Balken) oder NOH Mäusen (schwarzer Balken). (h) Menge an PDL-1 Proteinexpression pro Treg. (i) PDL-2 Expression in den verschiedenen Mäusen nach Immunisierung. Als Positivkontrolle dienen PMA/Ionomycin stimulierte T Helferzellen. Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente mit 3 - 4 Mäusen pro Gruppe. \* P < 0,05; \*\*\* P < 0,001 (ANOVA plus Bonferroni)

#### **4.2.12 antigenspezifische Tregs sind notwendig und hinreichend zur B Zellsuppression**

Basierend auf diesen Daten sollte untersucht werden, welcher PD-1 Ligand auf der regulatorischen T Zelle funktionell relevant ist. Um diese Frage beantworten zu können, musste ein Szenario erschaffen werden, in dem Tregs selektiv transferiert werden konnten um B Zellen zu supprimieren. Dazu wurden regulatorische T Zellen sowie T Helferzellen aus NOH und WT Mäusen durch magnetische Zellseparation aufgereinigt und in IgHEL Mäuse transferiert (**Abb. 4.2-12 a**). Die Immunisierung mit HEL in Alum erzeugte eine robuste Antikörperantwort in der IgHEL Kontrolle, die durch den Transfer von transgenen Tregs unterdrückt wurde (**Abb. 4.2-12 b**). Weder die WT Tregs noch die T Helferzellen der NOH Maus waren dazu in der Lage. Dass die Suppression der B Zellen PD-1 vermittelt ist, wurde sowohl in diesem Modell mit Hilfe des blockierenden Antikörpers (**Abb. 4.2-12 c**), als auch in PD-1-defizienten IgHEL Mäusen (**Abb. 4.2-12 d**) nachgewiesen. Jede der beiden Methoden der PD-1 Blockade erhöhte die Produktion der HEL spezifischen IgMa Antikörper in den IgHEL Mäusen auf ein Level vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Somit sind antigenspezifischen Tregs hinreichend zur Suppression von B Zellen *in vivo*. Der suppressorische Mechanismus in den IgHEL Mäusen unterscheidet sich nicht von dem endogener B Zellen in NOH Mäusen. Daher ist dieses Modell adäquat, um die funktionelle Relevanz der PD-1 Liganden zu studieren.

# Ergebnisse

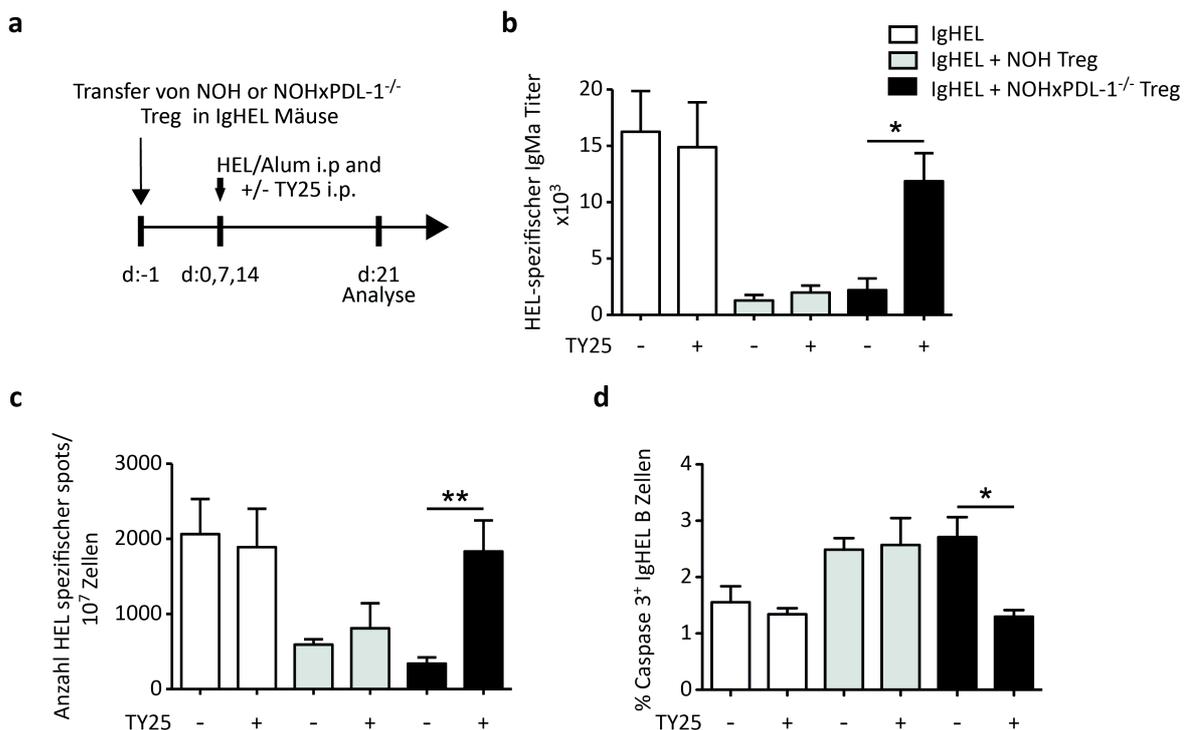


**Abbildung 20: 4.2-12 Zur B Zellsuppression sind Tregs notwendig und hinreichend**

(a) Experimentelles Schema für b-d:  $1 \times 10^6$  MACS-isolierte Tregs bzw. T Helferzellen (Th) wurden entweder in IgHEL oder IgHELxPD-1<sup>-/-</sup> Mäuse transferiert. Die Mäuse wurden dreimal in einem wöchentlichen Intervall mit HEL in Alum immunisiert. (b) HEL spezifische IgMa Seruntiter am Tag 21. (c) HEL spezifische IgMa Titer nach Applikation des blockierenden PD-1 Antikörpers. (d) HEL spezifische Antikörpertiter in IgHEL versus IgHELxPD-1<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Ergebnisse stellen zwei unabhängige Experimente mit 3 - 4 Mäuse pro Gruppe dar. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 (ANOVA plus Bonferroni)

#### 4.2.13 Blockade der PD-1 Liganden hebt die inhibitorische Wirkung der Tregs auf

Nach der Etablierung des Transfermodells konnten nun PDL-1-defiziente Tregs transferiert werden, um die funktionelle Relevanz dieses Liganden zu untersuchen (**Abb. 4.2-13 a**). Der PDL-2 Signalweg wurde mittels eines blockierenden Antikörpers (TY25) unterdrückt. PDL-1-defiziente Tregs supprimierten weiterhin die Immunantwort in IgHEL Mäusen (**Abb. 4.2-13 b**). Ebenso führte die Injektion des PDL-2 blockierenden Antikörpers allein nicht zu einer Veränderung der Antikörperantwort. Erst die Kombination der Blockade von PDL-1 und -2 führte in den IgHEL Mäusen zur Produktion von Antikörpermengen vergleichbar mit der IgHEL Kontrolle. Der Mangel an beiden Liganden war mechanistisch durch eine erhöhte Anzahl an antikörperproduzierenden B Zellen (**Abb. 4.2-13 c**) und einer reduzierten Apoptoseinduktion (**Abb. 4.2-13 d**) gekennzeichnet. Diese Daten sind konsistent mit den Analysen der endogenen B Zellen und belegen, dass für die Suppression der B Zellen die Expression der PD-1 Liganden auf den antigenspezifischen Tregs erforderlich ist.



**Abbildung 21: 4.3-13 PDL-1/2 Expression auf Tregs ist Voraussetzung zur B Zellsuppression**

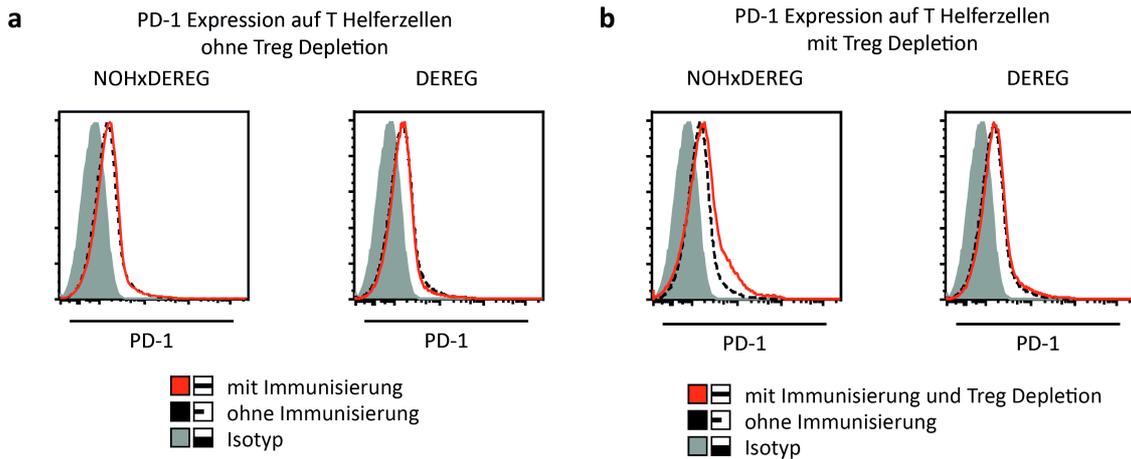
(a) Experimentelles Schema für b-d: Am Tag -1 wurden  $1 \times 10^6$  Tregs aus Milzen und renalen Lymphknoten von NOH und NOHxPDL-1<sup>-/-</sup> Mäusen in IgHEL Mäuse transferiert. Die Immunisierung mit HEL in Alum sowie die Applikation des anti-PDL-2 Antikörpers erfolgte i.p. an den Tagen 0, 7 und 14. (b) HEL-spezifische Serum IgMa Titer an Tag 21. (c) Anzahl an anti-HEL IgMa Antikörper produzierende B Zellen bestimmt mittels ELISPOT. (d) Anteil an Caspase 3 positiven IgHEL B Zellen. Die Ergebnisse stellen zwei unabhängige Experimente mit 4 Mäusen pro Gruppe dar. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 (ANOVA plus Bonferroni)

### 4.3 Direkte B Zellsuppression *in vivo*

Durch die Entschlüsselung des Mechanismus der peripheren B Zelltoleranzinduktion in unserem System eröffnet sich nun die Möglichkeit, eine für lange Zeit offene Frage zu klären: Existiert eine direkte Suppression der B Zellen durch Tregs *in vivo*? Zahlreiche Veröffentlichungen haben bereits bewiesen, dass regulatorische T Zellen B Zellen durch die Suppression von T Helferzellen, die für die Antikörperproduktion unabdingbar sind, beeinflussen.<sup>186, 193</sup> Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen *in vitro* Kultursystemen B Zellen direkt von Tregs abgetötet werden können,<sup>195-197</sup> was die Frage nach der Möglichkeit und dem Anteil einer direkten *in vivo* Suppression aufwirft. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde das folgende *in vivo* Modell etabliert.

#### 4.3.1 PD-1 Expression auf T Helferzellen bleibt nach Immunisierung unverändert

Die bereits präsentierten Daten haben bewiesen, dass B Zellen PD-1 und Tregs PD-1 Liganden für eine funktionelle Inhibition exprimieren müssen. Außerdem war in den gezeigten *in vitro* Kulturen ausschließlich eine direkte Interaktion zwischen Tregs und B Zellen möglich. In unserem *in vivo* Modell existiert allerdings die Möglichkeit einer indirekten Suppression vermittelt durch T Helferzellen. Theoretisch könnten Tregs PD-1+ T Helferzellen mittels PDL-1/2 unterdrücken, die dann wiederum selber PDL-1/2 hochregulieren, um B Zellen zu inhibieren. Um diese Frage experimentell zu adressieren, wurde zunächst bestimmt, ob T Helferzellen PD-1 nach Immunisierung hochregulieren. Weder die Immunisierung mit OVA in Alum (**Abb. 4.3-1 a**, rote Linie), noch die Depletion der regulatorischen T Zellen (**Abb. 4.3-1 b**, rote Linie) bewirkte eine Veränderung der PD-1 Expression auf den T Helferzellen im Vergleich zu den nicht-immunisierten Kontrollen. Die PD-1 Expression wird auf den T Helferzellen durch den Antigenstimulus zwar nicht hochreguliert, allerdings exprimieren die T Helferzellen ein Grundniveau an PD-1. Daher sind weitere Experimente notwendig, um eine Involvierung von T Helferzellen bei der B Zellsuppression ausschließen zu können.

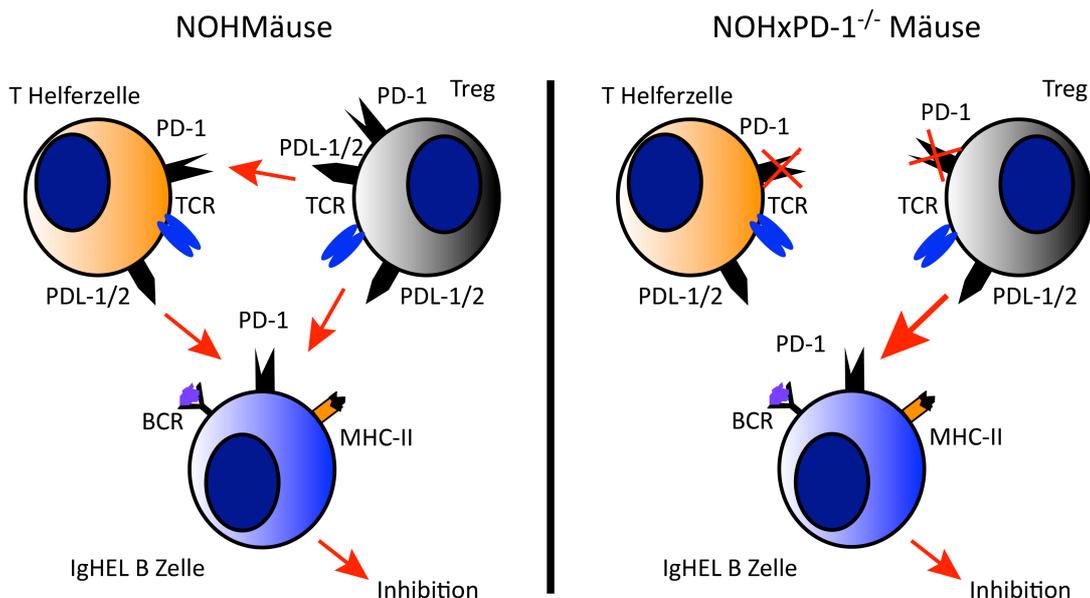


**Abbildung 22: 4.3-1 PD-1 Expression auf T Helferzellen wird nicht von Tregs oder einer Immunisierung beeinflusst**

(a,b) PD-1 Expression auf immunisierten T Helferzellen (rote Linie) im Vergleich mit nicht-immunisierten Helferzellen (schwarze, gestrichelte Linie) und Isotypkontrollen (graue Fläche) mit (b) und ohne (a) Treg Depletion mittels Diphtheriatoxin an den Tagen -4 und -1, repräsentative Histogramme wurden dargestellt. Die Ergebnisse stellen zwei individuelle Experimente mit 3 Mäusen pro Gruppe dar. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 (ANOVA plus Bonferroni)

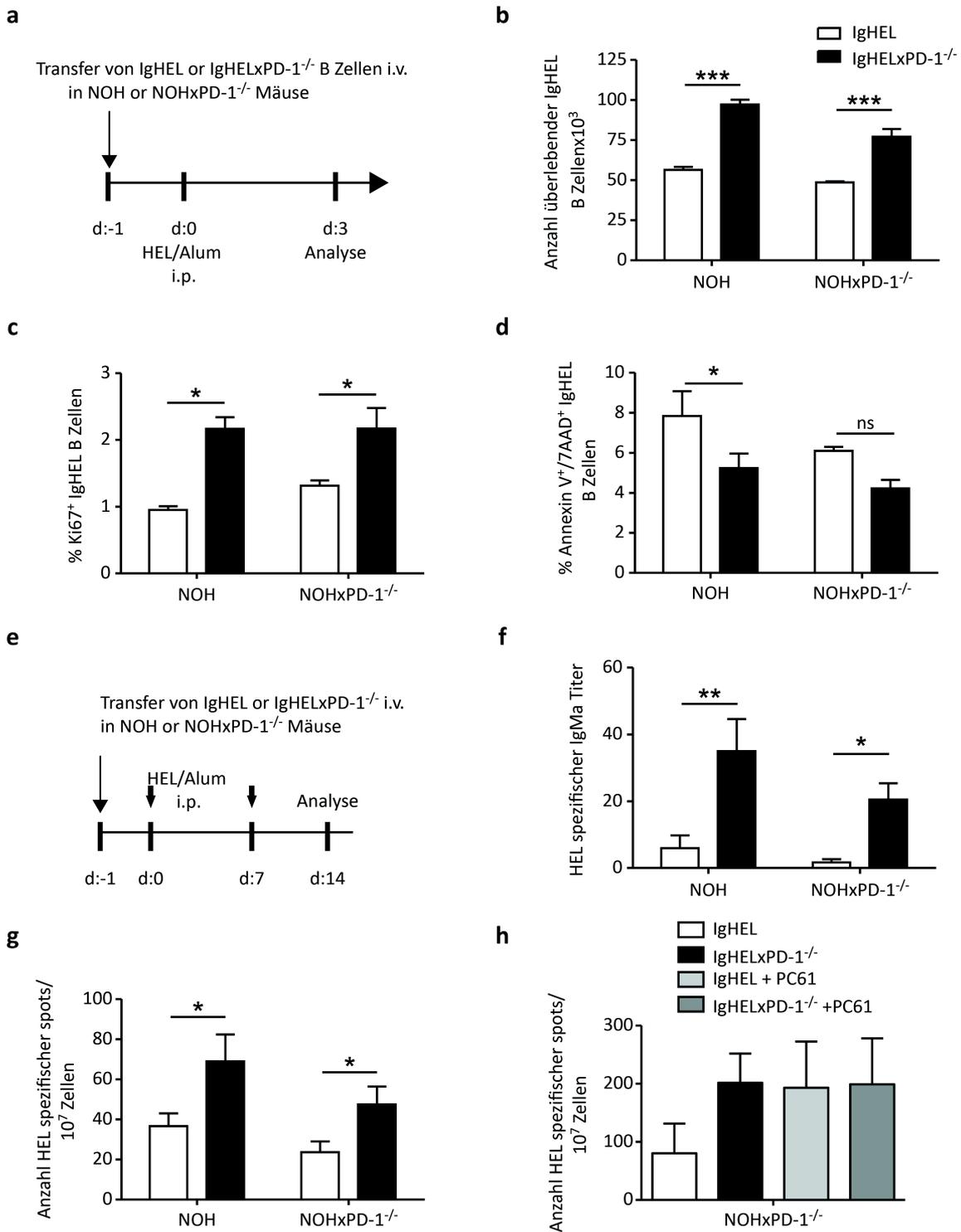
### 4.3.2 B Zellsuppression durch spezifische Tregs ist unabhängig von intermediären T Helferzellen

Die funktionelle Relevanz der PD-1 Expression auf T Helferzellen und somit die Möglichkeit einer indirekten Suppression, sollte nun in NOHxPD-1<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht werden (Abb. 4.3-2, Abb. 4.3.3 a).



**Abbildung 23: 4.3-2 Schematisches Modell der indirekten vs der direkten Suppression in NOH und NOHxPD-1<sup>-/-</sup> Mäusen**

IgHEL B Zellen, die in NOHxPD-1<sup>-/-</sup> Mäuse transferiert werden, können nur direkt von Tregs supprimiert werden, da die indirekte Interaktion durch die PD-1 Defizienz der T Helferzellen versperrt ist. Die **Abbildung 4.3-3 b** zeigt deutlich, dass weiterhin die Anzahl an IgHEL B Zellen in den NOHxPD-1<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant reduziert wurde im Vergleich zu den PD-1-defizienten IgHEL B Zellen. Weiterhin unterschied sich die Gesamtanzahl überlebender IgHEL B Zellen auch nicht zwischen NOH und NOHxPD-1<sup>-/-</sup> Mäusen. Nach drei Tagen konnte zusätzlich eine reduzierte Proliferation (**Abb. 4.3-3 c**) und eine gesteigerte Apoptoseinduktion (**Abb. 4.3-3 d**) in den PD-1 kompetenten IgHEL B Zellen sowohl in NOH als auch in NOHxPD-1<sup>-/-</sup> Mäusen nachgewiesen werden, welche die Verringerung der Gesamtanzahl erklärte. Als abschließender Beweis der direkten B Zellsuppression wurde sowohl die IgMa Antikörperproduktion als auch die Anzahl an antikörperproduzierenden B Zellen nach 14 Tagen in den Mäusen ermittelt (**Abb. 4.3-3 e**). Die anti-HEL IgMa Antikörperproduktion in PD-1 defizienten NOH Mäusen, in die IgHELxPD-1<sup>-/-</sup> B Zellen transferiert wurden, war 10fach höher als in den WT B Zellempfängermäusen (**Abb. 4.3-3 f**). Im Einklang mit der Antikörperproduktion war auch die Anzahl an antikörperproduzierenden IgHEL B Zellen nur in der PD-1 kompetenten (weißer Balken) im Vergleich mit der defizienten IgHEL Gruppe (schwarzer Balken) gesenkt (**Abb. 4.3-3 g**). Ferner sollte abschließend ein möglicher synergistischer Effekt der PD-1 Defizienz und der Treg Depletion untersucht werden. In PD-1 defizienten NOH Mäusen steigerte die PD-1 Defizienz in IgHEL B Zellen (schwarzer Balken) das Überleben der B Zellen im gleichen Maß wie die Depletion der Tregs (hellgrauer Balken, **Abb. 4.3-3 h**). Die Kombination der beiden war nicht synergistisch (dunkelgrauer Balken). Diese Experimente zeigen, dass die PD-1 Expression auf allen Zellen, außer den B Zellen vernachlässigbar ist. Es handelt sich hierbei um eine direkte Treg-vermittelte *in vivo* Suppression der B Zellen.



**Abbildung 24: 4.3-3 Direkte in vivo Suppression der B Zellen durch Tregs**

(a) Experimentelles Schema für b-d: 5x10<sup>6</sup> IgHEL (weißer Balken) oder IgHELxPD-1<sup>-/-</sup> (schwarzer Balken) B Zellen wurden in PD-1-kompetente NOH oder nicht-kompetente NOH Mäuse transferiert, die am nächsten Tag mit HEL in Alum immunisiert wurden. (b) Absolute Anzahl an überlebenden IgHEL B Zellen nach 3 Tagen. Prozentuale Anteil an Ki67 positiven (c) und apoptotischen (d) IgHEL B Zellen. (e) Experimentelles Schema für f-h: selbes Schema wie in a, nur dass zweimal in einem wöchentlichen Intervall immunisiert wurde. (f) HEL-spezifische IgMa Titer am Tag 14. (g) Anzahl an B Zellen, die anti-HEL IgMa Antikörper produzieren ermittelt durch ELISPOT. (h) Menge an Antikörper produzierenden B Zellen nach Treg Depletion in NOH bzw. NOHxPD-1<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente mit 3 - 5 Mäusen pro Gruppe. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 (ANOVA plus Bonferroni)

## 5. Diskussion

### 5.1 Regulatorische T Zellen - ein zusätzlicher peripherer Toleranzmechanismus

Autoantikörper spielen sowohl bei systemischen als auch bei organspezifischen Autoimmunerkrankungen eine zentrale Rolle. Sie vermitteln die Gewebsschädigung direkt oder über Immunkomplexe. Die Existenz autoreaktiver B Zellen wird im Knochenmark über verschiedene zentrale Toleranzmechanismen kontrolliert<sup>72</sup>. Die negative Selektion bei B Zellen ist jedoch nicht so stringent wie bei T Zellen, daher werden jeden Tag autoreaktive B Zellen in die Peripherie entlassen. Ob sich eine Autoimmunerkrankung etabliert, ist von der Funktionalität peripherer Toleranzmechanismen abhängig. Diese reichen von intrinsischen biochemischen Veränderungen<sup>66, 68, 69</sup> bis zur Begrenzung von Überlebenssignalen wie BAFF<sup>75</sup>. Kürzlich konnte von Bystry und Kollegen gezeigt werden, dass Tregs die T Zell-unabhängige Proliferation von B Zellen *in vitro* sowie die Produktion von Antikörpern *in vivo* hemmen können.<sup>78</sup> Weiterführend konnte von Ludwig-Portugall et al. demonstriert werden, dass antigenspezifische Suppression von B Zellen durch Tregs ein peripherer Toleranzmechanismus ist.<sup>199, 200</sup> Bestimmte Formen der Glomerulonephritis werden durch Autoantikörper induziert. In der vorliegenden Arbeit haben wir neue, periphere Toleranzmechanismen entschlüsselt, die in der Krankheitssituation dysreguliert sind, um ein besseres Verständnis für diese Erkrankungen zu bekommen und um anschließend therapeutisch dagegen vorzugehen.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass vergleichbar zum pankreasspezifischen Gewebeantigen Mausmodell ROH<sup>high</sup><sup>199</sup>, die Autoantikörperproduktion auch in den Nieren-spezifischen NOH Mäusen durch regulatorische T Zellen supprimiert wird. Die Applikation eines hemmenden anti-CD25 Antikörpers in NOH Mäusen vor Immunisierung resultierte in einer gesteigerten Antikörperantwort, die vergleichbar ist mit der von WT Mäusen. Die Funktionsweise des anti-CD25 Antikörpers wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es ist nicht eindeutig geklärt, ob dieser nun deletierend<sup>227</sup> oder nur blockierend<sup>228</sup> wirkt. Was einerseits die Anzahl CD4+CD25+ Tregs reduziert, aber die Gesamtanzahl CD4+Foxp3+ Tregs nicht beeinflusst. In unseren Händen wirkt dieser Antikörper depletierend.<sup>229</sup> Um die

Abhängigkeit der Suppression von Tregs weiter zu untermauern, wurden die Expressionsstudien auch in NOHxDEREG Mäusen durchgeführt. In diesen Mäusen können die Tregs selektiv durch Gabe von Diphtheriatoxin (DT) aus dem System entfernt werden. Die Resultate nach Zufuhr von DT korrelieren mit denen vom anti-CD25 Antikörper. Den abschließenden Beweis erbrachte der Transfer von antigenspezifischen regulatorischen T Zellen in IgHEL Mäuse. Dieser reduzierte die Antikörperproduktion im Durchschnitt um 60% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit konnte bewiesen werden, dass antigenspezifische Tregs nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend sind, um die B Zellimmunantwort zu unterdrücken.

Die Antigenpezifität dieser Reaktion konnte durch eine Immunisierung der NOH Mäuse mit einem fremden Antigen, wie z.B.  $\beta$ -Galaktosidase begründet werden. Im Gegensatz zu einer Immunisierung mit OVA führt jene mit  $\beta$ -Gal zu keiner Suppression. Zhao et al. haben bereits beschrieben, dass antigenspezifische Tregs nach ihrer Aktivierung eine Restimulation über ihren T Zellrezeptor benötigen, um inhibitorisch auf B Zellen einzuwirken,<sup>196</sup> was die Daten unterstützt. Diese Ergebnisse könnten noch durch zusätzliche Experimente in MHC-II-defizienten NOH Mäusen erhärtet werden, in denen die Abhängigkeit von der Proteinpräsentation demonstriert werden könnte. Allerdings kann eine einmal aktivierte regulatorische T Zelle die Aktivierung von T Effektorzellen auch antigenunspezifisch supprimieren („bystander suppression“).<sup>85</sup> Ob dieser Mechanismus auch für B Zellen zutrifft, muss noch geklärt werden.

## **5.2 PD-1 vermittelte Suppression**

Die Demonstration der Abhängigkeit der antigenspezifischen Suppression von B Zellen durch Tregs wirft die Frage auf, durch welchen Mechanismus diese vermittelt wird. Tregs besitzen ein großes Repertoire an inhibitorischen Molekülen und Rezeptoren mit denen sie unterschiedlichste Zelltypen supprimieren.

### **5.2.1 Einfluss des Aktivierungsstatus der Tregs auf die B Zellantwort**

Bevor der Suppressionsmechanismus analysiert werden konnte, musste zunächst geklärt werden, ob der Unterschied zwischen den WT und den NOH Tregs, bezüglich ihrer inhibitorischen Fähigkeiten, auf Unterschiede in der Aktivierung zurückzuführen sind. Für die Suppressionsassays wurden die Tregs parallel aus unimmunisierten Mäusen mittels magnetischer Aufreinigung gewonnen. Da die Aufreinigung in manchen Fällen eine

Aktivierung der Zellen, speziell wenn sie über ihren Rezeptor isoliert werden, bewirken kann, wurde eine negative Isolationsmethode verwendet. Des Weiteren wurden beide Gruppen gleich behandelt, so dass hier keine Unterschiede entstehen können. Daher bliebe nur die Möglichkeit, dass Tregs schon in den jeweiligen Mäusen verschiedene Aktivierungszustände aufweisen. 2009 konnte von Ludwig-Portugall et al. bereits gezeigt werden, dass im drainierenden Lymphknoten die antigenspezifischen Tregs im ROH<sup>high</sup> Modell einen aktivierteren (CD44<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>) Phänotyp besitzen als in den Referenzmäusen.<sup>199</sup> Um auszuschließen, dass die beobachtete Suppression nicht aktivierungsabhängig erfolgt, wurden die Tregs vor der Kokultur 3 Tage unspezifisch mit anti-CD3/CD28 voraktiviert. Diese Aktivierung von WT Tregs induzierte keine Suppression der B Zellen (Daten nicht gezeigt) und hatte somit keinen Einfluss auf die suppressorischen Fähigkeiten der Tregs.

### 5.2.2 Kontaktabhängigkeit der Suppression

Die Antigenpezifität suggeriert weiterhin einen Kontakt zwischen der regulatorischen T Zelle und der B Zelle. Um diese Beobachtung zu untermauern und lösliche Mediatoren als Suppressionsmechanismus auszuschließen, wurden die B Zellen in einem Transwellsystem untersucht. Die räumliche Trennung von antigenspezifischen Tregs und B Zellen erhöhte die Antikörperproduktion der B Zellen auf das Niveau der Kontrolle, was eine Kontaktabhängigkeit der Suppression vermuten lässt. Allerdings ist die Funktion von inhibitorischen Zytokinen auch gradientenabhängig und benötigt daher die Nähe zwischen Suppressor- und Empfängerzelle, was Zytokine nicht komplett als potenziellen Suppressionsmechanismus ausschließt. IL-10 und TGF- $\beta$  sind die am besten beschriebenen inhibitorischen Zytokine und kontrollieren Erkrankungen wie Asthma oder Allergien.<sup>164</sup> Um eine Beteiligung dieser Moleküle an der Suppression auszuschließen, wurde die Expression ihrer Rezeptoren auf den B Zellen untersucht. Der IL-10 Rezeptor wird auf den B Zellen nach Immunisierung sowohl in WT als auch in NOH Mäusen herunterreguliert, daher ist eine Involvierung eher unwahrscheinlich. TGF- $\beta$  beeinflusst die Entwicklung von B Zellen in allen Stadien vom Wachstum bis zur Maturierung.<sup>230</sup> Für den TGF- $\beta$  II Rezeptor ist bereits beschrieben, dass er in die Initiation von Antikörperantworten involviert ist.<sup>231</sup> Allerdings bleibt TGF- $\beta$ IIIR mRNA unverändert nach Stimulation sowohl in WT als auch in NOH Mäusen, was eine Beteiligung an der Suppression eher verneint. Ein neuer potenzieller Kandidat, der zumindest an der Suppression von Effektor-T-Zellen vermittelt, ist IL-35.<sup>161</sup> Um jedoch diese Zytokine definitiv ausschließen zu können,

werden Experimente mit IL-10, IL-35 bzw. TGF- $\beta$ -defizienten Tregs, bzw. blockierenden Antikörpern benötigt, was über den Rahmen der vorgelegten Studie weit hinausgehen würde.

### 5.2.3 Granzym B, Perforin und Fas als potenzielle Effektormoleküle

Um einen Anhaltspunkt über einen potenziellen Suppressionsmechanismus zu erlangen, wurden in der vorliegenden Studie B Zellen und Tregs auf die Regulation diverser inhibitorischer Moleküle analysiert. Dabei standen diejenigen im Vordergrund, die einen B Zelltod initiieren können. Diese Moleküle waren von Interesse, weil antigenspezifische Tregs in der Milz und im drainierenden Lymphknoten einerseits die Proliferation inhibieren und andererseits die Apoptose in B Zellen induzieren können.<sup>200</sup> Die Analyse der RNA Daten ergab, dass die *in vivo* Suppression der B Zellen unabhängig von der Induktion einer Fas Fas-Ligand Interaktion ist. Dieses Resultat steht im Widerspruch zu den Daten von Janssens et al., der zeigen konnte, dass Tregs sowohl antigenpräsentierende B Zelllinien als auch polyklonale B Zellen über einen Fas Fas-Ligand abhängigen Mechanismus töten können.<sup>195</sup> Dieser Diskrepanz der Daten könnten zwei Ursachen zu Grunde liegen. Erstens könnte der Unterschied im Mechanismus durch den Vergleich eines *in vivo* mit einem *in vitro* System verursacht werden. In dem *in vitro* System von Janssens et al. wurden die voraktivierten B Zellen mit Hilfe von Tregs aus einer T Zelllinie supprimiert. Diese entarteten Zellen verhalten sich anders als primäre Mauszellen. Daher war es bis jetzt auch nicht möglich, eine *in vivo* Relevanz für diesen Mechanismus zu demonstrieren. Und zweitens könnten diese Ergebnisse von der eingesetzten Antigenosis abhängig sein. Ise und Kollegen zeigten bereits, dass die Antigenmenge über die Funktion und den Phänotyp von CD4 T Zellen entscheidet.<sup>232</sup> Kleine Antigenosen fördern die CD40L Expression auf der CD4 T Zelle und die IgM Produktion, wohingegen große Mengen den B Zelltod über Fas initiieren. Dementsprechend könnte die in dieser Studie verwendete Antigenosis von 10  $\mu$ g OVA je Maus zu gering gewesen sein, um diese Fas Expression zu induzieren.

Ein zweiter in der Literatur beschriebener Mechanismus der B Zellsuppression durch Tregs ist die Granzym B und Perforin abhängige Lyse von B Zellen.<sup>196</sup> Jedoch ergab die Analyse der RNA Daten, dass *in vivo* Granzym B und Perforin in diesem System nicht induziert werden, da die Transkription dieser Moleküle nach Immunisierung stagniert bzw. sinkt. Eine gesteigerte Proteinexpression ist allerdings nicht immer Voraussetzung für eine

Beteiligung an der Suppression, denn wie im Fall von Perforin kann das Molekül schon präformiert in Granula vorliegen und muss nach Aktivierung nur noch ausgeschleust werden. Eine andere Erklärung der Differenzen beruht auf der unterschiedlichen Art und Weise der B Zellaktivierung. Im vorgestellten *in vivo* System werden die B Zellen antigenspezifisch aktiviert, wohingegen die B Zellen der Kokultur antigenunspezifisch mittels LPS stimuliert werden. In hier nicht aufgeführten *in vitro* Versuchen konnte verdeutlicht werden, dass eine T Zell-unabhängige Stimulation (z.B. über LPS) zu keiner Suppression der Antikörperantwort durch antigenspezifische Tregs in dem hier etablierten *in vitro* System führt. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Daten von Agata et al. und Yamazaki et al., die bereits zeigen konnten, dass LPS die PD-1 Expression auf B Zellen nicht beeinflusst.<sup>205, 211</sup> Um eine endgültige Aussage zu treffen, sind weitere Analysen in Perforin bzw. Granzym B defizienten Mäusen unabdingbar.

### 5.2.4 PD-1 als Effektormolekül

Neben den bereits beschriebenen Suppressionsmechanismen ist in der vorliegenden Studie ebenfalls noch die mRNA Expression von PD-1 bzw. seinen Liganden untersucht worden. Defekte in diesen Molekülen sind mit verschiedensten Autoimmunerkrankungen verknüpft<sup>206</sup> und besitzen daher eine potenzielle funktionelle Relevanz. Für PD-1 und PDL-1 konnte eine starke Induktion der mRNA bzw. Proteinmenge nach Aktivierung gezeigt werden, was mit der Literatur einhergeht.<sup>205, 214</sup> PDL-1 limitiert nicht nur die Expansion oder das Überleben von CD8 T Zellen, sondern auch die Immunantwort von autoreaktiven CD4 T Zellen und ist damit ein zentraler Bestandteil der T Zelltoleranz.<sup>233</sup> PDL-2 wurde auf mRNA Ebene nach Immunisierung nur geringfügig hochreguliert, allerdings exprimieren PDL-1-defiziente NOH Mäuse vermehrt PDL-2 nach Stimulation. Eine PDL-2 Expression wurde bisher hauptsächlich bei Makrophagen, DCs und Endothelzellen beschrieben<sup>211</sup>, was im Widerspruch zu der hier beschriebenen Expression auf antigenspezifischen Tregs steht. Dies führte zur Annahme, dass die Interaktion von PD-1 mit seinen Liganden PDL-1 und PDL-2 einen möglichen Mechanismus der B Zellsuppression bzw. Apoptoseinduktion durch Tregs darstellt. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die *in vitro* Kokulturen von transgenen Tregs mit IgHEL B Zellen. Diese wiesen eine verringerte Antikörperproduktion bei gleichzeitiger Apoptoseinduktion, vermittelt über eine PD-1 Expressionssteigerung, der B Zelle auf. Diese Befunde korrelieren mit denen von Okazaki et al., die zeigten, dass die PD-1 Blockade in einer B Zelllymphomlinie den B Zellrezeptor vermittelten Signalweg durch die

Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne inhibiert.<sup>207</sup> Ob dieser molekulare Signalweg auch in unserem Versuchsansatz aktiv ist, muss noch durch „Ca<sup>2+</sup> release assays“ geklärt werden. Dass die Interaktion zwischen B Zellrezeptor und PD-1 essentiell ist, deuten auch die Experimente zu dem stimulierenden Antikörper an. Die Zugabe des stimulierenden Antikörpers zu PMA/Ionomycin aktivierten B Zellen resultiert in einer signifikanten Apoptoseinduktion, wohingegen alle mit anti-IgM vorstimulierten B Zellen überleben. Dieser Kontrast kann zwei Phänomene zur Ursache haben. Einerseits kann die anti-IgM Stimulation zu keiner PD-1 Hochregulation führen, was durch hier nicht gezeigte Daten ausgeschlossen werden konnte. Oder aber es konnte keine Kreuzvernetzung zwischen dem B Zellrezeptor und PD-1 erfolgen, was durch die fehlende Oberflächenexpression des BCRs dokumentiert wurde. Die funktionelle Bedeutung von PD-1 für die Antikörpersuppression wurde durch Applikation des blockierenden Antikörpers nachgewiesen. Dieser erhöhte die Antikörperausschüttung durch eine gesteigerte Anzahl Antikörper produzierender B Zellen sowie einer verstärkten Produktion von Antikörpern pro B Zelle, auf das Niveau der WT Kontrolle. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Phänotyp PD-1 defizienter Mäuse, die eine vergrößerte Milz sowie erhöhte Serumlevel an IgG2b und IgG3 besitzen.<sup>216</sup> Im Gegensatz dazu kann die PD-1 Blockade auch einen schützenden Effekt haben. Durch diese wird z.B. die Funktionalität suppressorischer CD8 T Zellen im Modell der „New Zealand“ Mäuse verbessert, was wiederum zu einem Schutz vor Lupus führt.<sup>234</sup> Ähnlich gelagert ist auch die Beobachtung, dass PD-1 auf folliculären T Helferzellen die Antikörperproduktion und das Überleben von B Zellen gegen fremde Antigen fördert.<sup>219</sup> Dies ist kein Widerspruch zu den hier präsentierten Daten, da in unserem peripheren Toleranzmodell die regulatorischen T Zellen gegen ein Selbstantigen und nicht gegen ein Fremdes gerichtet sind.

Mit der Verabreichung des PD-1 blockierenden Antikörpers ist die funktionelle Relevanz dargelegt. Dass es sich hierbei nicht um einen unspezifischen Effekt handelt, wurde mit Hilfe der Isotypkontrolle bewiesen. Allerdings wirkt der Antikörper auf diese Weise systemisch, so dass keine Rückschlüsse auf die beeinflusste Zellpopulation gemacht werden konnten. Erste Hinweise gaben die *in vitro* Experimente, denn das Fehlen von PD-1 auf der B Zelle hob die Suppression der B Zellantwort wieder auf. Aber erst der Transfer von PD-1 kompetenten bzw. nicht kompetenten B Zellen in NOH Mäuse erbrachte den *in vivo* Beweis, dass PD-1 auf den B Zellen essentiell ist. Die hier gezeigten Daten demonstrieren die Wichtigkeit von PD-1 auf B Zellen für eine organspezifische

## Diskussion

Toleranz, ob dieser Mechanismus auch bei systemischen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielt, soll mit Hilfe von Knochenmarkchimären untersucht werden. Hierfür werden letal bestrahlte Mäuse mit einem Gemisch aus WT und JHT (B Zell defizienten) oder einem Gemisch aus PD-1<sup>-/-</sup> und JHT Knochenmarkszellen rekonstituiert. In den mit PD-1<sup>-/-</sup> und JHT Knochenmark rekonstituierten Mäusen sind alle T Zellen sowohl als PD1<sup>-/-</sup> Variante, als auch als WT Zellen vorhanden, während B Zellen nur vom PD1 defizienten Knochenmark abstammen können. WT/JHT Mäuse dienen als Kontrolle, dass die gesamte Prozedur keinen Einfluss auf den Experimentausgang hat. Diese Mäuse werden dann auf die Anfälligkeit gegenüber B Zell vermittelter Autoimmunerkrankungen untersucht und miteinander verglichen.

Als letzter Punkt in der Beweiskette musste nun noch sichergestellt werden, dass die PD-1 Liganden auf den Tregs zur B Zellsuppression benötigt werden. Dieses wurde mit dem Transfer von PDL-1 defizienten Tregs und der zusätzlichen Blockade von PDL-2 gewährleistet. Obwohl vor kurzem von Francisco und Kollegen dokumentiert wurde, dass PDL-1 die Entwicklung und die Funktion von Tregs beeinflusst,<sup>215</sup> wiesen die Tregs in dem vorliegenden etablierten Transfersystem keine Funktionsdefekte auf, da sie die B Zellantwort im gleichen Umfang, wie PDL-1 kompetente Zellen supprimieren. Erst die zusätzliche PDL-2 Blockade führte zu einer Antikörperantwort vergleichbar mit der Kontrolle. Dieses Ergebnis wird durch die Daten von Latchman et al. unterstützt, die besagen, dass beide Liganden alleine hinreichend sind, um PD-1 zu aktivieren.<sup>235</sup> Eine Beteiligung von endogenen Zellen der IgHEL Maus konnte durch die Einzelapplikation des blockierenden Antikörpers ausgeschlossen werden. Ebenso konnte die abwegige Erklärung, dass endogene Zellen PDL-2 benutzen, um die transferierten Tregs in einen suppressiven Zustand zu versetzen, durch die PDL-2 Blockade in Kombination mit dem Transfer von PDL1/2 kompetenten Tregs ausgeschlossen werden. Diese wären in so einem Szenario ebenfalls deaktiviert worden, was die unterdrückte Antikörperproduktion widerlegt. PDL-2 wird auf PDL-1 kompetenten Tregs in nur geringen Mengen exprimiert, aber auf PDL-1-defizienten Tregs hochreguliert. Da PDL-2 eine höhere Affinität zu PD-1 hat als PDL-1<sup>236</sup>, sind geringere Mengen an PDL-2 für eine Suppression ausreichend. Diese Daten deuten darauf hin, dass PDL-2 PDL-1 substituieren kann, wenn Bedarf besteht.

### 5.3 direkte Interaktion

Mit dem Nachweis, dass PD-1 auf den B Zellen und die Liganden auf den Tregs für die Suppression essentiell sind, konnte noch nicht aufgeschlüsselt werden, auf welcher Ebene diese Interaktion stattfindet. So könnte der Suppression eine direkte B Zell Treg Interaktion zu Grunde liegen oder die B Zellen werden über die Reduzierung einer möglichen T Zellhilfe ausgehungert. CD4 Hilfe ist eine Grundvoraussetzung für die Stimulation der Antikörperantwort,<sup>237, 238</sup> was *in vitro* durch die Zugabe von stimulierenden anti-CD40 gewährleistet wurde. Daher ist die Interaktion im *in vitro* System klar als eine direkte Suppression definiert. In den letzten Jahren konnte in den verschiedensten *in vitro* Systemen entweder die direkte Lyse oder ein direkt vermittelter Effekt auf die Antikörpergeneration gezeigt werden.<sup>186, 195, 196</sup> Allerdings blieben die Fragen, ob diese Inhibition auch *in vivo* existiert und welcher Anteil ihr an der gesamten Suppression zukommt, lange Zeit ungeklärt. Es war schwierig ein Szenario zu entwickeln, in dem Tregs B Zellen, aber nicht T Helferzellen supprimieren können. Dies wurde erst jetzt durch die Identifizierung der Beteiligung von PD-1 möglich. Der Transfer von IgHEL B Zellen in PD-1 defiziente NOH Mäuse ermöglichte die Analyse einer direkten Interaktion. Hier ist die indirekte Suppression außer Gefecht gesetzt, weil die T Helferzellen kein PD -1 Ligand-abhängiges Signal von den Tregs empfangen können, da sie PD-1 defizient sind. Auf diese Weise wurde in dieser Studie gezeigt, dass im Vergleich zu den IgHELxPD-1<sup>-/-</sup> B Zellen die Immunantwort der kompetenten IgHEL B Zellen beginnend mit dem Überleben bis hin zur Antikörperantwort direkt unterdrückt wurde.

Ein Stolperstein, der in die Interpretation mit einbezogen werden muss, ist die Tatsache, dass PD-1<sup>-/-</sup> Mäuse einen hyperproliferativen Phänotyp aufweisen.<sup>216</sup> Der Vergleich beider IgHELxPD-1<sup>-/-</sup> Empfängergruppen sollte daher zu einer gleichen Anzahl überlebender B Zellen führen, was jedoch nicht der Fall ist. Der Transfer in NOH Mäuse resultiert in einer leicht erhöhten Anzahl überlebender B Zellen im Vergleich zu PD-1 defizienten NOH Mäusen. Diese Beobachtung verhindert allerdings nicht unsere Schlussfolgerung, dass die PD-1 vermittelte Suppression CD4 T Zell-unabhängig ist. Ganz im Gegenteil, denn wenn die CD4<sup>+</sup> T Zellen in die PD-1 abhängige Suppression involviert wären, müsste die Anzahl überlebender IgHELxPD-1<sup>-/-</sup> B Zellen in der Gruppe, die in NOHxPD-1<sup>-/-</sup> Mäuse transferiert wurde, erhöht sein und nicht in der NOH Gruppe. Daher ist diese Suppression direkt vermittelt, PD-1 abhängig und reduzierte die Antikörperproduktion um bis zu 70% (Abb. 5.3-1). Verglichen mit der Gesamtsuppression,

die durch Tregs vermittelt wird, umfasst der PD-1-abhängige Anteil ca. 65%. Der PD-1-unabhängige Anteil der Suppression wird wahrscheinlich indirekt vermittelt und damit stehen diese Ergebnisse auch nicht im Widerspruch zu den vorangegangenen Studien, die einen Einfluss der Tregs auf die T Zellhilfe demonstrieren.<sup>193, 239</sup>

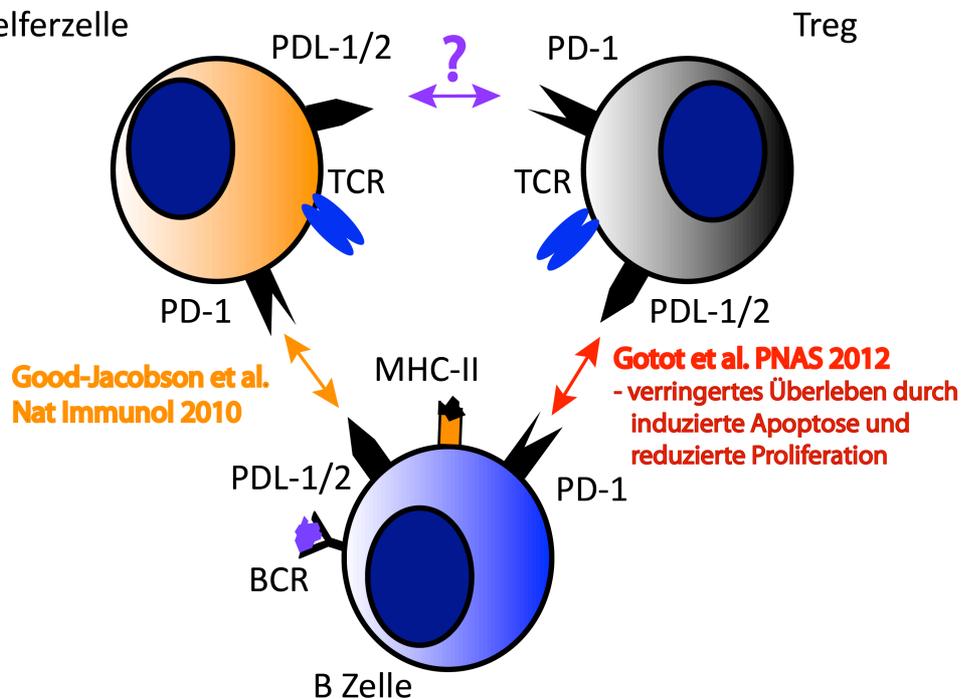


Abbildung 25: 5.3-1 Schematische Darstellung der direkten Suppression

Die direkte Suppression ist kein Artefakt in NOHxPD-1<sup>-/-</sup> Mäusen, denn weitere hier nicht dargestellte Transferexperimente, bei denen IgHEL B Zellen und transgene Tregs in PD-1<sup>-/-</sup> Mäuse transferiert wurden, ergaben die gleichen Resultate.

Die Daten der direkten Suppression werden von Lim und Kollegen unterstützt, die bereits 2005 eine Interaktion zwischen Tregs und B Zellen sowohl an der Grenze der T Zell-B Zellzone als auch innerhalb der Keimzentren aufdecken konnten.<sup>186</sup> Kürzlich wurde CXCR5 als Chemokinrezeptor identifiziert, der Tregs den Eintritt in die Keimzentren ermöglicht.<sup>77, 189</sup> Diese Beobachtung konnte auch von Dr. Isis Ludwig-Portugall in unserem Transfersystem in IgHEL Mäuse durch NOHxCXCR5<sup>-/-</sup> Tregs bestätigt werden (unveröffentlichte Daten). Jedoch sind weitere Experimente mit fluoreszenzmarkierten, aufgereinigten antigenspezifischen Tregs notwendig, um den Ort der direkten Interaktion in unserem Modell zu charakterisieren.

In diesem Zusammenhang soll auch die Frage geklärt werden, an welchem Ort die Induktion der Apoptose in den B Zellen stattfindet. Die Apoptoseinduktion war während

der gesamten *in vivo* Studie nicht so markant, wie z.B. das Überleben der B Zellen. Dies ist wahrscheinlich auf das schnelle Abräumen der toten Zellen in gesunden Individuen zurückzuführen,<sup>240</sup> was vor der Akkumulation großer Mengen toten Materials schützt, welche eine inflammatorische Reaktion induzieren könnte. Da Selbstantigene immer präsent sind, kann auch eine langsame Apoptoseinduktion ausreichend sein, um die periphere Toleranz aufrechtzuerhalten. Im Gegensatz zu der *in vivo* Apoptose, ist die Induktion des programmierten Zelltods *in vitro* durch einen hohen Hintergrund (60%) charakterisiert. Primäre B Lymphozyten sterben *in vitro* schneller als T Zellen<sup>241</sup> und die apoptotischen Debris verbleiben in der Kulturschale. Daher können die *in vitro* Analysen nur einen Hinweis erbringen, in welchen Kokulturen eine zusätzliche Apoptoseinduktion (ab 60%) stattfindet. Dieser Hintergrund könnte durch Zugabe von Überlebensfaktoren wie BAFF oder Zytokine wie IL-2 gesenkt werden. Diese können allerdings den Ausgang der Kokultur beeinflussen, denn für IL-2 ist bereits gezeigt, dass es die Effekte des PD-1 Signalwegs außer Kraft setzen kann<sup>242</sup>, wodurch das *in vitro* System dann nicht mehr auswertbar wäre.

#### **5.4 Einfluss von PD-1 auf die Antikörpersubklassen**

Bei der Entscheidung, ob PD-1 einen Einfluss auf die Antikörpersubklassen besitzt, müssen zwei unterschiedliche Ebenen analysiert werden. Erstens hat PD-1 einen Einfluss auf das Mikromilieu in der Milz, das durch die Zytokinausschüttung der T Helferzellen reguliert wird. Und zweitens beeinflusst PD-1 die Reaktion der B Zellen auf ihr Umfeld. Die Immunisierung mit OVA in Alum induziert in WT Mäusen eine starke Th2 Immunantwort, die durch eine IL-4 vermittelte Steigerung von IgG1 und IgE gekennzeichnet ist. In den vakzinierten NOH Mäusen hingegen wurde eine gesteigerte IFN-gamma Konzentration in der Milz detektiert. Die Produktion von IFN-gamma durch T Helferzellen in NOH Mäusen trotz PD-1 Blockade kann auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein. Tregs könnten das durch die T Helferzellen induzierte Mikromilieu nicht beeinflussen, was mit den Erkenntnissen von Fields et al. übereinstimmt, dass Tregs die Reifung, aber nicht die Initiation der B Zellantwort inhibieren. Dem entgegen stehen die Befunde von Stassen et al., dass voraktivierte Tregs die Entwicklung und die Zytokinproduktion von Th2 Zellen unterdrücken.<sup>243</sup> In unserem System ist durch die NOHxPD-1<sup>-/-</sup> klargestellt worden, dass die direkte Suppression unabhängig von PD-1

exprimierenden T Helferzellen ist. Daher ist es folgerichtig, dass auch die PD-1 Blockade keinen Einfluss auf die CD4 T Zellen ausübt. Bereits 1987 wurde von Snapper et al. gezeigt, dass IFN-gamma einerseits die IgG1, IgG2b und IgG3 Produktion reduziert, aber andererseits auch die IgG2a Antikörperantwort induziert,<sup>225</sup> wodurch eine Th1 Immunantwort beschrieben wird. Die charakteristische Hemmung der IgG1, IgG2b und IgG3 Produktion kann entsprechend des IFN-gamma Milieus auch in den NOH Mäusen beobachtet werden. Zusätzlich sollte die Th1 Antwort von einer gesteigerten IgG2a Antikörpergeneration flankiert werden, dies ist jedoch in der vorgelegten Studie nicht der Fall. Sie befindet sich auf dem Niveau der WT Kontrolle. Allerdings bleibt anzumerken, dass die Antikörperlevel in einem immunsupprimierten Milieu detektiert werden, daher ist ein vergleichbares Niveau zur WT Kontrolle einer Steigerung gleichzusetzen. In den letzten Jahren wurden Hinweise auf eine Verwicklung von PD-1 bei der Entscheidung über Antikörpersubklassen publiziert. So liegt in PD-1-defizienten Mäusen eine erhöhte Produktion an IgG3, IgG2b und IgA<sup>216, 217</sup> vor. Vor kurzem konnte PD-1 eine kritische Rolle bei der Regulation der Antikörpervielfalt zur Aufrechterhaltung der Darmmukosa zugeteilt werden.<sup>218</sup> In dem hier etablierten System können die autoreaktiven B Zellen, nach Zerstörung der peripheren Toleranz durch Treg Depletion, Antikörperablagerungen im Glomeruli induzieren, die dann eine Nierenfunktionsstörung nach sich ziehen (unveröffentlichte Daten von Dr. Isis Ludwig-Portugall). Daher ist es wichtig, den Antikörpersubtyp zu identifizieren, der die Antikörperablagerungen verursacht und zu analysieren, ob dieser durch PD-1 reguliert wird. Für den Menschen ist kürzlich beschrieben worden, dass IgG3 mit der membranoproliferativen Glomerulonephritis und IgG1 mit der membranösen Nephropathie assoziiert sind.<sup>244</sup> IgG1 genauso wie IgG2a und IgG2b werden nach PD-1 Blockade und der damit verbundenen Unterbrechung der peripheren Toleranz hochreguliert, was ein erster Hinweis auf eine Beteiligung an der antikörpervermittelten Zerstörung der Niere sein kann. Untersuchungen von Nimmerjahn und Kollegen legen eine Beteiligung von IgG2b nahe, denn IgG2b ist der Subtyp, der eine nephrotoxische Nephritis induziert und durch Ausschalten des FcγR der Unterklasse IV inhibiert werden kann.<sup>245</sup> Weitere Untersuchungen wie die Immunhistologie der Subklassen in Treg depletierten oder PD-1 defizienten NOH Nieren sind notwendig, um eine konkrete Aussage über die Beteiligung der einzelnen Subtypen zu treffen. Ein weiterer Aspekt, der noch einer Erklärung bedarf, ist die Rolle von IFN-gamma bei der Induktion von PD-1 bzw. seinen Liganden. In der vorliegenden Studie konnte noch nicht definiert werden, durch welchen Stimulus PD-1 bzw. PDL-1/2 auf den jeweiligen Zellen

hochreguliert wird. PD-1 kann einerseits auf B Zellen nach Interaktion mit T Zellen als kostimulatorisches Molekül hochreguliert werden. Andererseits besitzt IFN-gamma ebenfalls einen Einfluss auf die PD-1 Expression. Dieser ist u.a. durch eine gesteigerte IFN-gamma Produktion in PD-1<sup>-/-</sup> Mäusen charakterisiert.<sup>246</sup> Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass INF-gamma die PD-1 und die PDL-1 Expression auf T Zellen reguliert.<sup>247, 248</sup> Daher soll untersucht werden, ob durch den Zusatz von IFN-gamma B Zellen zur Expression von PD-1 und Tregs zur Expression von PDL-1/2 angeregt werden können, bzw. ob blockierende IFN-gamma Antikörper die Suppression aufheben.

## 5.5 natürliche vs. induzierte Tregs

Eine zentrale Frage, die experimentell in der vorliegenden Arbeit kaum angegangen wurde, ist: Welcher Typ von regulatorischen T Zellen vermittelt die Suppression? Erste Analysen von Heymann et al. demonstrierten, dass keine Anhaltspunkte für eine Expression des Transgens im Thymus der NOH Mäuse existieren.<sup>220</sup> Weiterhin konnte von Ludwig-Portugall et al. gezeigt werden, dass OVA spezifische CD4 und CD8 T Zellen im drainierenden Lymphknoten proliferieren.<sup>200</sup> Grundlage der Proliferation ist die Expression von Ova durch antigenpräsentierende Zellen. DCs sind in der Lage adaptive Tregs zu induzieren. Ob solch eine Induktion in dem hier präsentierten *in vivo* Modell zum tragen kommt, sollte mit Hilfe der Treg depletierten DO11.10xDEREG CD4 T Zellen untersucht werden. OVA spezifische (KJ12-6<sup>+</sup>) Foxp3<sup>+</sup> (GFP<sup>+</sup>) T Zellen konnten nur im drainierenden Lymphknoten detektiert werden, daher ist eine periphere Induktion der antigenspezifischen Tregs wahrscheinlich. Die Depletion der Tregs mittels Diphtheriatoxin besaß eine Effizienz von bis zu 95%. Dennoch ist es immer noch möglich, dass die Foxp3<sup>+</sup> Tregs nicht induziert wurden sondern dass die restlichen 5% der regulatorischen T Zellen proliferierten und im Lymphknoten akkumulierten. Zusätzlich ist in den *in vitro* Studien noch die Expression von Helios in den Tregs untersucht worden. Der Großteil der PDL-1<sup>+</sup> und somit supprimierenden Tregs war Helios negativ (Daten nicht dargestellt), was gegen natürliche Tregs als Suppressoren sprach. Allerdings wird Helios als Marker für natürliche Tregs mittlerweile kontrovers diskutiert, seit Gottschalk und Kollegen seine Expression auch in induzierten Tregs nachweisen konnten.<sup>136</sup> Daher fehlt der formale Beweis, dass die antigenspezifischen Tregs nicht im Thymus sondern im drainierenden Lymphknoten entstehen. Hierzu würden NOHxCARMA1<sup>-/-</sup> Mäuse benötigt, denn CARMA1 ist ein

Transkriptionsfaktor, der nur in natürlichen Tregs während der Differenzierung im Thymus angeschaltet wird.<sup>137</sup> Anschließend könnte dann auch der Mechanismus der peripheren Induktion mit seinen beteiligten Zellen, Zytokinen und Rezeptoren über die entsprechenden „knock out“ Mäuse näher untersucht werden.

## 5.6 Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen

PD-1, das über das PDCD1 Gen beim Menschen kodiert ist, scheint auch hier einen Einfluss auf die Ausbildung antikörpervermittelter Autoimmunerkrankungen zu besitzen. Dokumentiert wird dies durch einen Einzelnukleotid-Polymorphismus, welcher zu einem Funktionsverlust von PD-1 führt, der arthritische und Lupus verwandte Symptome auslöst.<sup>249</sup> Unter Einbeziehung der erhobenen Daten sind diese Symptome auf eine fehlende PD-1 vermittelte Treg Suppression zurückzuführen. Diese These ist nur durch *in vitro* Experimente mit Patienten B Zellen zu untermauern. Da dieser Polymorphismus jedoch sehr selten vorkommt, wären statistische Auswertungen sehr schwierig.

Der hier beschriebene Mechanismus der PD-1 abhängigen, direkten Suppression von B Zellen bedingt auch Komplikationen für die anlaufenden Studien zu blockierenden PD-1 Antikörpern in Tumor- oder AIDS-Erkrankungen.<sup>250, 251</sup> Hier könnte der hauptsächliche Effekt, die Regulation supprimierter T Zellantworten, durch den unerwünschten Nebeneffekt der unkontrollierten Autoantikörperproduktion überschattet werden. In der SIV Studie konnte bereits eine kleine Steigerung der Autoantikörperproduktion nachgewiesen werden.<sup>251</sup> Es ist nicht auszuschließen, dass diese über einen längeren Zeitraum der Gabe des blockierenden Antikörpers noch verstärkt wird, weil die PD-1 unabhängigen Treg vermittelten Kontrollmechanismen auf langer Sicht nicht in der Lage sind, große Mengen autoreaktiver B Zellen in Schach zu halten.

In Bezug auf antikörpervermittelte Autoimmunerkrankungen, die momentan noch durch eine B Zell depletierende Antikörpertherapie behandelt werden, wäre eine Therapie mit PDL-1 exprimierenden antigenspezifischen Tregs eine bessere Lösung. Entsprechend dem hier demonstrierten *in vivo* Modell wäre der Transfer PDL-1 exprimierender antigenspezifischer Tregs mit deutlich weniger Nebeneffekten assoziiert. Eine Therapie mit antigenspezifischen Treg setzt voraus, dass die Antigene, die eine Autoimmunerkrankung verursachen, bekannt sind, was leider noch nicht bei all diesen Erkrankungen der Fall ist. Weiterhin müssten die Tregs funktionsfähiges PDL-1 stabil und unabhängig von Umgebungseinflüssen exprimieren. Jenes kann bis zum aktuellen

Zeitpunkt nur über genetische Veränderungen erzielt werden kann. Somit würde dieses Verfahren in einer individualisierten Therapie enden. Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie einen wichtigen Toleranzmechanismus aufzeigen, der für zukünftige Therapien von Bedeutung ist.

## 6. Zusammenfassung

Autoantikörper vermitteln verschiedene heterogene Autoimmunerkrankungen. Einerseits spielen sie eine Rolle bei systemischen Erkrankungen wie Systemischer Lupus Erythematosus (SLE). Sie können aber auch selektiv einzelne Organe betreffen wie z.B. die Niere bei bestimmten Formen der Glomerulonephritis. Für zukünftige Therapieansätze wäre es wünschenswert, die autoreaktiven B Zellen gezielt kontrollieren bzw. eliminieren zu können. Daher war es Ziel dieser Arbeit in dem NOH Mausmodell die B Zelltoleranz zu analysieren und den zu Grunde liegenden molekularen Mechanismus aufzuschlüsseln. Regulatorische T Zellen supprimierten gewebespezifische, autoreaktive B Zellen, indem sie deren Apoptose initiieren, deren Proliferation hemmen und zusätzlich den Isotypenwechsel der produzierten Antikörper kontrollieren. Diese Suppression erfolgte antigenspezifisch und kontaktabhängig. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass regulatorische T Zellen notwendig und hinreichend sind, um die Autoantikörperproduktion von B Zellen zu hemmen. Hierzu induzierten Tregs die Expression von PD-1 auf B Zellen, wohingegen die Expression anderer inhibitorischer Moleküle wie Fas oder der TGF- $\beta$ 2 Rezeptor unbeeinflusst blieb. Die funktionelle Relevanz von PD-1 auf aktivierten B Zellen konnte *in vitro* durch die Apoptoseinduktion nach Stimulation von PD-1 über ein Antikörperfragment nachgewiesen werden. Unterstützend wurde *in vivo* demonstriert, dass PD-1-defiziente im Vergleich zu -kompetenten autoreaktiven B Zellen der Suppression durch Tregs entgingen. Die Vermittlung des inhibitorischen Signals erfolgte auf den regulatorischen T Zellen über die PD-1 Liganden PDL-1 oder ersatzweise PDL-2, wobei PDL-1 nach Aktivierung induziert wurde. Abschließend konnte dargestellt werden, dass für die PD-1 vermittelte Suppression der B Zellen keine intermediären PD-1<sup>+</sup> Zellen, wie z.B. T Helferzellen benötigt werden. Außerdem konnte über die Blockade von PD-1 und die Depletion der regulatorischen T Zellen bewiesen werden, dass es sich hierbei nicht um zwei parallel operierende Mechanismen handelt, da keine Synergie auftrat. Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse eine direkte *in vivo* Suppression von autoreaktiven B Zellen durch Tregs über PD-1 - PDL-1/2 und beschreiben damit die Existenz eines vorher unbekanntem peripheren B Zelltoleranzmechanismus gegen gewebebeständige Autoantigene.

## 7. Referenzen

1. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M.J. *Immunologie*, Vol. 5. Auflage. (Gustav Fischer, Spektrum Akademischer Verlag; 2002).
2. Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P. & Bottomly, K. B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4<sup>+</sup> T cells to protein antigens in vivo. *J Immunol* **155**, 3734-3741 (1995).
3. Cassell, D.J. & Schwartz, R.H. A quantitative analysis of antigen-presenting cell function: activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation. *J Exp Med* **180**, 1829-1840 (1994).
4. Yan, J., Wolff, M.J., Unternaehrer, J., Mellman, I. & Mamula, M.J. Targeting antigen to CD19 on B cells efficiently activates T cells. *Int Immunol* **17**, 869-877 (2005).
5. Morris, S.C., Lees, A. & Finkelman, F.D. In vivo activation of naive T cells by antigen-presenting B cells. *J Immunol* **152**, 3777-3785 (1994).
6. Constant, S.L. B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4<sup>+</sup> T cell priming in vivo. *J Immunol* **162**, 5695-5703 (1999).
7. Ke, Y. & Kapp, J.A. Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med* **184**, 1179-1184 (1996).
8. Berland, R. & Wortis, H.H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* **20**, 253-300 (2002).
9. Karras, J.G. *et al.* Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) is constitutively activated in normal, self-renewing B-1 cells but only inducibly expressed in conventional B lymphocytes. *J Exp Med* **185**, 1035-1042 (1997).
10. Lopes-Carvalho, T. & Kearney, J.F. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunological reviews* **197**, 192-205 (2004).
11. LeBien, T.W. & Tedder, T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570-1580 (2008).
12. Lam, K.P., Kuhn, R. & Rajewsky, K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**, 1073-1083 (1997).
13. Neuberger, M.S. *et al.* The mouse B-cell antigen receptor: definition and assembly of the core receptor of the five immunoglobulin isotypes. *Immunological reviews* **132**, 147-161 (1993).
14. Abboud, N. *et al.* A requirement for FcγR in antibody-mediated bacterial toxin neutralization. *J Exp Med* **207**, 2395-2405 (2010).
15. Ogden, C.A., Kowalewski, R., Peng, Y., Montenegro, V. & Elkon, K.B. IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity* **38**, 259-264 (2005).
16. Titus, J.A., Perez, P., Kaubisch, A., Garrido, M.A. & Segal, D.M. Human K/natural killer cells targeted with hetero-cross-linked antibodies specifically lyse tumor cells in vitro and prevent tumor growth in vivo. *J Immunol* **139**, 3153-3158 (1987).
17. Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.E. & Brandtzaeg, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal immunology* **1**, 11-22 (2008).
18. Bruggemann, M. & Rajewsky, K. Regulation of the antibody response against haptent-coupled erythrocytes by monoclonal antihapten antibodies of various isotypes. *Cellular immunology* **71**, 365-373 (1982).

## Referenzen

19. Pawankar, R. & Ra, C. IgE-Fc epsilonRI-mast cell axis in the allergic cycle. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **28 Suppl 3**, 6-14 (1998).
20. Papavasiliou, F., Jankovic, M., Suh, H. & Nussenzweig, M.C. The cytoplasmic domains of immunoglobulin (Ig) alpha and Ig beta can independently induce the precursor B cell transition and allelic exclusion. *J Exp Med* **182**, 1389-1394 (1995).
21. Teh, Y.M. & Neuberger, M.S. The immunoglobulin (Ig)alpha and Igbeta cytoplasmic domains are independently sufficient to signal B cell maturation and activation in transgenic mice. *J Exp Med* **185**, 1753-1758 (1997).
22. Saijo, K. *et al.* Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat Immunol* **4**, 274-279 (2003).
23. Niiro, H. & Clark, E.A. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature reviews. Immunology* **2**, 945-956 (2002).
24. Smith, K.G., Hewitson, T.D., Nossal, G.J. & Tarlinton, D.M. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol* **26**, 444-448 (1996).
25. McHeyzer-Williams, L.J., Driver, D.J. & McHeyzer-Williams, M.G. Germinal center reaction. *Current opinion in hematology* **8**, 52-59 (2001).
26. McHeyzer-Williams, M.G. B cells as effectors. *Curr Opin Immunol* **15**, 354-361 (2003).
27. Carlring, J. *et al.* CD154-CD40 interactions in the control of murine B cell hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology* **89**, 697-706 (2011).
28. Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* **354**, 389-392 (1991).
29. Chu, V.T., Beller, A., Nguyen, T.T., Steinhauser, G. & Berek, C. The long-term survival of plasma cells. *Scandinavian journal of immunology* **73**, 508-511 (2011).
30. Gray, D. & Skarvall, H. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* **336**, 70-73 (1988).
31. Tarlinton, D. B-cell memory: are subsets necessary? *Nature reviews. Immunology* **6**, 785-790 (2006).
32. Vikstrom, I. & Tarlinton, D.M. B cell memory and the role of apoptosis in its formation. *Molecular immunology* **48**, 1301-1306 (2011).
33. Hardy, R.R., Kincade, P.W. & Dorshkind, K. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* **26**, 703-714 (2007).
34. LeBien, T.W. Fates of human B-cell precursors. *Blood* **96**, 9-23 (2000).
35. Lassoued, K. *et al.* Expression of surrogate light chain receptors is restricted to a late stage in pre-B cell differentiation. *Cell* **73**, 73-86 (1993).
36. Nishimoto, N. *et al.* Normal pre-B cells express a receptor complex of mu heavy chains and surrogate light-chain proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6284-6288 (1991).
37. Milne, C.D. & Paige, C.J. IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Seminars in immunology* **18**, 20-30 (2006).
38. Ghia, P., ten Boekel, E., Rolink, A.G. & Melchers, F. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunology today* **19**, 480-485 (1998).
39. Karasuyama, H. *et al.* The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell* **77**, 133-143 (1994).
40. Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T.H., Karasuyama, H. & Melchers, F. IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int Immunol* **6**, 1257-1264 (1994).

41. Chung, J.B., Silverman, M. & Monroe, J.G. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in immunology* **24**, 343-349 (2003).
42. Forster, I. & Rajewsky, K. The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4781-4784 (1990).
43. Howard, J.C., Hunt, S.V. & Gowans, J.L. Identification of marrow-derived and thymus-derived small lymphocytes in the lymphoid tissue and thoracic duct lymph of normal rats. *J Exp Med* **135**, 200-219 (1972).
44. Nieuwenhuis, P. & Ford, W.L. Comparative migration of B- and T-Lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. *Cellular immunology* **23**, 254-267 (1976).
45. Hargreaves, D.C. *et al.* A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* **194**, 45-56 (2001).
46. Youngman, K.R. *et al.* Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J Immunol* **168**, 2173-2181 (2002).
47. Wardemann, H. *et al.* Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* **301**, 1374-1377 (2003).
48. Jacobson, D.L., Gange, S.J., Rose, N.R. & Graham, N.M. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clinical immunology and immunopathology* **84**, 223-243 (1997).
49. Herzog, S. & Jumaa, H. Self-recognition and clonal selection: autoreactivity drives the generation of B cells. *Curr Opin Immunol* **24**, 166-172 (2012).
50. Keenan, R.A. *et al.* Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science* **321**, 696-699 (2008).
51. Hartley, S.B. *et al.* Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* **353**, 765-769 (1991).
52. Murakami, M. *et al.* Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice. *Nature* **357**, 77-80 (1992).
53. Nemazee, D.A. & Burki, K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* **337**, 562-566 (1989).
54. Chen, C., Nagy, Z., Prak, E.L. & Weigert, M. Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing. *Immunity* **3**, 747-755 (1995).
55. Tiegs, S.L., Russell, D.M. & Nemazee, D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* **177**, 1009-1020 (1993).
56. Nemazee, D. & Hogquist, K.A. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* **15**, 182-189 (2003).
57. Hertz, M. & Nemazee, D. Receptor editing and commitment in B lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **10**, 208-213 (1998).
58. Sandel, P.C. & Monroe, J.G. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* **10**, 289-299 (1999).
59. Healy, J.I. & Goodnow, C.C. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* **16**, 645-670 (1998).
60. Erikson, J. *et al.* Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature* **349**, 331-334 (1991).
61. Goodnow, C.C. *et al.* Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676-682 (1988).
62. Retter, M.W. & Nemazee, D. Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J Exp Med* **188**, 1231-1238 (1998).

## Referenzen

63. Halverson, R., Torres, R.M. & Pelanda, R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol* **5**, 645-650 (2004).
64. Osmond, D.G. The turnover of B-cell populations. *Immunology today* **14**, 34-37 (1993).
65. Deenen, G.J., Van Balen, I. & Opstelten, D. In rat B lymphocyte genesis sixty percent is lost from the bone marrow at the transition of nondividing pre-B cell to sIgM+ B lymphocyte, the stage of Ig light chain gene expression. *Eur J Immunol* **20**, 557-564 (1990).
66. Bell, S.E. & Goodnow, C.C. A selective defect in IgM antigen receptor synthesis and transport causes loss of cell surface IgM expression on tolerant B lymphocytes. *The EMBO journal* **13**, 816-826 (1994).
67. Ravetch, J.V. & Lanier, L.L. Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84-89 (2000).
68. Lesley, R. *et al.* Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity* **20**, 441-453 (2004).
69. Rui, L., Vinuesa, C.G., Blasioli, J. & Goodnow, C.C. Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling. *Nat Immunol* **4**, 594-600 (2003).
70. Carsetti, R., Kohler, G. & Lamers, M.C. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* **181**, 2129-2140 (1995).
71. Norvell, A. & Monroe, J.G. Acquisition of surface IgD fails to protect from tolerance-induction. Both surface IgM- and surface IgD-mediated signals induce apoptosis of immature murine B lymphocytes. *J Immunol* **156**, 1328-1332 (1996).
72. Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C.G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590-597 (2005).
73. Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H. & Siebenlist, U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* **3**, 958-965 (2002).
74. Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P. & Browning, J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* **21**, 231-264 (2003).
75. Thien, M. *et al.* Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* **20**, 785-798 (2004).
76. Pillai, S., Mattoo, H. & Cariappa, A. B cells and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **23**, 721-731 (2011).
77. Chung, Y. *et al.* Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nature medicine* **17**, 983-988 (2011).
78. Bystry, R.S., Aluvihare, V., Welch, K.A., Kallikourdis, M. & Betz, A.G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol* **2**, 1126-1132 (2001).
79. Seo, S.J. *et al.* The impact of T helper and T regulatory cells on the regulation of anti-double-stranded DNA B cells. *Immunity* **16**, 535-546 (2002).
80. Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R. & Lieber, S.A. Suppressor T cells. *J Immunol* **108**, 586-590 (1972).
81. 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* **155**, 1151-1164 (1995).

82. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* **192**, 303-310 (2000).
83. Thornton, A.M., Piccirillo, C.A. & Shevach, E.M. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol* **34**, 366-376 (2004).
84. Shevach, E.M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature reviews. Immunology* **2**, 389-400 (2002).
85. Thornton, A.M. & Shevach, E.M. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* **164**, 183-190 (2000).
86. Sakaguchi, S. *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews* **182**, 18-32 (2001).
87. Jonuleit, H. *et al.* Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *Journal of Experimental Medicine* **193**, 1285-1294 (2001).
88. Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S. & Noelle, R.J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* **174**, 1783-1786 (2005).
89. Olivares-Villagomez, D., Wensky, A.K., Wang, Y. & Lafaille, J.J. Repertoire requirements of CD4+ T cells that prevent spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **164**, 5499-5507 (2000).
90. Beissert, S., Schwarz, A. & Schwarz, T. Regulatory T cells. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 15-24 (2006).
91. Brunkow, M.E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics* **27**, 68-73 (2001).
92. Chatila, T.A. *et al.* JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *The Journal of clinical investigation* **106**, R75-81 (2000).
93. Wildin, R.S. *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics* **27**, 18-20 (2001).
94. Bennett, C.L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* **27**, 20-21 (2001).
95. Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. & Sakaguchi, S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* **3**, 135-142 (2002).
96. McHugh, R.S. *et al.* CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**, 311-323 (2002).
97. Lepault, F. & Gagnerault, M.C. Characterization of peripheral regulatory CD4+ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J Immunol* **164**, 240-247 (2000).
98. Read, S., Malmstrom, 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. *J Exp Med* **192**, 295-302 (2000).

## Referenzen

99. Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431-440 (2000).
100. Huang, C.T. *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* **21**, 503-513 (2004).
101. Bensinger, S.J., Bandeira, A., Jordan, M.S., Caton, A.J. & Laufer, T.M. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)/25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* **194**, 427-438 (2001).
102. Loser, K. *et al.* An important role of CD80/CD86-CTLA-4 signaling during photocarcinogenesis in mice. *J Immunol* **174**, 5298-5305 (2005).
103. Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L. & Singer, A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* **6**, 152-162 (2005).
104. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
105. Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-336 (2003).
106. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A. & Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* **4**, 337-342 (2003).
107. Floess, S. *et al.* Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS biology* **5**, e38 (2007).
108. Huehn, J., Polansky, J.K. & Hamann, A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature reviews. Immunology* **9**, 83-89 (2009).
109. Beyer, M. *et al.* Repression of the genome organizer SATB1 in regulatory T cells is required for suppressive function and inhibition of effector differentiation. *Nat Immunol* **12**, 898-907 (2011).
110. Pan, F. *et al.* Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science* **325**, 1142-1146 (2009).
111. Kitoh, A. *et al.* Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunity* **31**, 609-620 (2009).
112. Rudra, D. *et al.* Runx-CBFBeta complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat Immunol* **10**, 1170-1177 (2009).
113. Ouyang, W. *et al.* Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **11**, 618-627 (2010).
114. Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* **6**, 1142-1151 (2005).
115. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* **201**, 723-735 (2005).
116. Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R. & Farrar, M.A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* **178**, 280-290 (2007).
117. Soper, D.M., Kasprovicz, D.J. & Ziegler, S.F. IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol* **37**, 1817-1826 (2007).

118. Koch, M.A. *et al.* The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* **10**, 595-602 (2009).
119. Chaudhry, A. *et al.* CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* **326**, 986-991 (2009).
120. Lu, L.F. *et al.* Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* **142**, 914-929 (2010).
121. Zheng, S.G., Wang, J. & Horwitz, D.A. Cutting edge: Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol* **180**, 7112-7116 (2008).
122. Xu, L., Kitani, A., Fuss, I. & Strober, W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* **178**, 6725-6729 (2007).
123. Curotto de Lafaille, M.A., Lino, A.C., Kutchukhidze, N. & Lafaille, J.J. CD25<sup>-</sup> T cells generate CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* **173**, 7259-7268 (2004).
124. Furtado, G.C., Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N. & Lafaille, J.J. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* **196**, 851-857 (2002).
125. Apostolou, I. & von Boehmer, H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* **199**, 1401-1408 (2004).
126. Kretschmer, K. *et al.* Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* **6**, 1219-1227 (2005).
127. Mucida, D. *et al.* Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1923-1933 (2005).
128. Sun, C.M. *et al.* Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* **204**, 1775-1785 (2007).
129. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**, 1875-1886 (2003).
130. Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D. & Horwitz, D.A. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* **178**, 2018-2027 (2007).
131. Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M. & Noelle, R.J. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* **204**, 1765-1774 (2007).
132. Yamazaki, S. *et al.* CD8<sup>+</sup> CD205<sup>+</sup> splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* **181**, 6923-6933 (2008).
133. Coombes, J.L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* **204**, 1757-1764 (2007).
134. Zheng, S.G. *et al.* TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells. *J Immunol* **176**, 3321-3329 (2006).
135. Thornton, A.M. *et al.* Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol* **184**, 3433-3441 (2010).
136. Gottschalk, R.A., Corse, E. & Allison, J.P. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* **188**, 976-980 (2012).

## Referenzen

137. Barnes, M.J. *et al.* Commitment to the regulatory T cell lineage requires CARMA1 in the thymus but not in the periphery. *PLoS biology* **7**, e51 (2009).
138. Lohr, J., Knoechel, B., Kahn, E.C. & Abbas, A.K. Role of B7 in T cell tolerance. *J Immunol* **173**, 5028-5035 (2004).
139. Liang, S. *et al.* Conversion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> cells into CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med* **201**, 127-137 (2005).
140. Apostolou, I. *et al.* Peripherally induced Treg: mode, stability, and role in specific tolerance. *Journal of clinical immunology* **28**, 619-624 (2008).
141. Polansky, J.K. *et al.* DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* **38**, 1654-1663 (2008).
142. Hsieh, C.S. *et al.* Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cell receptors. *Immunity* **21**, 267-277 (2004).
143. Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kraj, P. & Ignatowicz, L. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Immunity* **25**, 249-259 (2006).
144. Groux, H. *et al.* A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742 (1997).
145. Foussat, A. *et al.* A comparative study between T regulatory type 1 and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the control of inflammation. *J Immunol* **171**, 5018-5026 (2003).
146. Bacchetta, R., Gregori, S. & Roncarolo, M.G. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmunity reviews* **4**, 491-496 (2005).
147. Levings, M.K. *et al.* Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tr cells. *Blood* **105**, 1162-1169 (2005).
148. Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A. & Weiner, H.L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**, 1237-1240 (1994).
149. Fukaura, H. *et al.* Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *The Journal of clinical investigation* **98**, 70-77 (1996).
150. Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S. & Levings, M.K. Type 1 T regulatory cells. *Immunological reviews* **182**, 68-79 (2001).
151. Weiner, H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews* **182**, 207-214 (2001).
152. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* **22**, 531-562 (2004).
153. Belkaid, Y. & Rouse, B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* **6**, 353-360 (2005).
154. Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Seminars in cancer biology* **16**, 115-123 (2006).
155. Thornton, A.M. & Shevach, E.M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* **188**, 287-296 (1998).
156. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* **10**, 1969-1980 (1998).

157. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M.J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* **8**, 1353-1362 (2007).
158. Tran, D.Q. *et al.* Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* **113**, 5125-5133 (2009).
159. Antony, P.A. *et al.* Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *J Immunol* **176**, 5255-5266 (2006).
160. Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* **204**, 1303-1310 (2007).
161. Collison, L.W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566-569 (2007).
162. Gavin, M.A. *et al.* Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* **445**, 771-775 (2007).
163. Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T. & Schuler, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* **193**, 1303-1310 (2001).
164. Joetham, A. *et al.* Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* **178**, 1433-1442 (2007).
165. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L. & Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* **190**, 995-1004 (1999).
166. Ivars, F. T cell subset-specific expression of antigen receptor beta chains in alpha chain-transgenic mice. *Eur J Immunol* **22**, 635-639 (1992).
167. Loser, K. *et al.* IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *J Immunol* **179**, 365-371 (2007).
168. Piccirillo, C.A. *et al.* CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* **196**, 237-246 (2002).
169. Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H. & Flavell, R.A. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10878-10883 (2003).
170. Hilchey, S.P., De, A., Rimsza, L.M., Bankert, R.B. & Bernstein, S.H. Follicular lymphoma intratumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells. *J Immunol* **178**, 4051-4061 (2007).
171. Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* **194**, 629-644 (2001).
172. Vignali, D.A., Collison, L.W. & Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nature reviews* **8**, 523-532 (2008).
173. Garin, M.I. *et al.* Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* **109**, 2058-2065 (2007).
174. Grossman, W.J. *et al.* Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* **104**, 2840-2848 (2004).
175. Wing, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271-275 (2008).

## Referenzen

176. Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M. & Ivars, F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* **118**, 240-249 (2006).
177. Serra, P. *et al.* CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity* **19**, 877-889 (2003).
178. Fallarino, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 1206-1212 (2003).
179. Workman, C.J. & Vignali, D.A. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol* **174**, 688-695 (2005).
180. Liang, B. *et al.* Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* **180**, 5916-5926 (2008).
181. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* **204**, 1257-1265 (2007).
182. Borsellino, G. *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**, 1225-1232 (2007).
183. Kobie, J.J. *et al.* T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* **177**, 6780-6786 (2006).
184. Shalev, I. *et al.* Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis. *J Immunol* **180**, 249-260 (2008).
185. Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L. & Betz, A.G. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* **28**, 402-413 (2008).
186. Lim, H.W., Hillsamer, P., Banham, A.H. & Kim, C.H. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* **175**, 4180-4183 (2005).
187. Hondowicz, B.D., Batheja, A.O., Metzgar, M.H., Caton, A.J. & Erikson, J. ICOS expression by effector T cells influences the ability of regulatory T cells to inhibit anti-chromatin B cell responses in recipient mice. *Journal of autoimmunity* **34**, 460-468 (2010).
188. Lim, H.W., Hillsamer, P. & Kim, C.H. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *Journal of Clinical Investigation* **114**, 1640-1649 (2004).
189. Linterman, M.A. *et al.* Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nature medicine* **17**, 975-982 (2011).
190. Reichardt, P. *et al.* Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood* **110**, 1519-1529 (2007).
191. Mizoguchi, A. & Bhan, A.K. A case for regulatory B cells. *J Immunol* **176**, 705-710 (2006).
192. Curotto de Lafaille, M.A. & Lafaille, J.J. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol* **14**, 771-778 (2002).
193. Fields, M.L. *et al.* CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit the maturation but not the initiation of an autoantibody response. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* **175**, 4255-4264 (2005).
194. Satoguina, J.S., Weyand, E., Larbi, J. & Hoerauf, A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol* **174**, 4718-4726 (2005).

195. Janssens, W. *et al.* CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* **171**, 4604-4612 (2003).
196. Zhao, D.M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J. & Shevach, E.M. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* **107**, 3925-3932 (2006).
197. Iikuni, N., Lourenco, E.V., Hahn, B.H. & La Cava, A. Cutting edge: Regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* **183**, 1518-1522 (2009).
198. Satoguina, J.S. *et al.* Tr1 and naturally occurring regulatory T cells induce IgG4 in B cells through GITR/GITR-L interaction, IL-10 and TGF-beta. *Eur J Immunol* **38**, 3101-3113 (2008).
199. Ludwig-Portugall, I., Hamilton-Williams, E.E., Gotot, J. & Kurts, C. CD25+ T(reg) specifically suppress auto-Ab generation against pancreatic tissue autoantigens. *Eur J Immunol* **39**, 225-233 (2009).
200. Ludwig-Portugall, I., Hamilton-Williams, E.E., Gottschalk, C. & Kurts, C. Cutting Edge: CD25+ regulatory T cells prevent expansion and induce apoptosis of B cells specific for tissue autoantigens. *J Immunol* **181**, 4447-4451 (2008).
201. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal* **11**, 3887-3895 (1992).
202. Freeman, G.J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* **192**, 1027-1034 (2000).
203. Zhang, X. *et al.* Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity* **20**, 337-347 (2004).
204. Nishimura, H., Honjo, T. & Minato, N. Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 891-898 (2000).
205. Agata, Y. *et al.* Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology* **8**, 765-772 (1996).
206. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J. & Sharpe, A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* **26**, 677-704 (2008).
207. Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T. & Honjo, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13866-13871 (2001).
208. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine* **5**, 1365-1369 (1999).
209. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* **2**, 261-268 (2001).
210. Tseng, S.Y. *et al.* B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* **193**, 839-846 (2001).
211. Yamazaki, T. *et al.* Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* **169**, 5538-5545 (2002).
212. Francisco, L.M., Sage, P.T. & Sharpe, A.H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological reviews* **236**, 219-242.
213. Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H. & Freeman, G.J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* **27**, 111-122 (2007).

## Referenzen

214. Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J. & Hafler, D.A. CD4+CD25+ regulatory cells from human peripheral blood express very high levels of CD25 ex vivo. *Novartis Foundation symposium* **252**, 67-88; discussion 88-91, 106-114 (2003).
215. Francisco, L.M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* **206**, 3015-3029 (2009).
216. Nishimura, H., Minato, N., Nakano, T. & Honjo, T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *International immunology* **10**, 1563-1572 (1998).
217. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141-151 (1999).
218. Kawamoto, S. *et al.* The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* **336**, 485-489 (2012).
219. Good-Jacobson, K.L. *et al.* PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* **11**, 535-542 (2010).
220. Heymann, F. *et al.* Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1286-1297 (2009).
221. Frey, O. *et al.* The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis research & therapy* **7**, R291-301 (2005).
222. Reddy, J. *et al.* Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15434-15439 (2004).
223. Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P. & Yamaguchi, T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International immunology* **21**, 1105-1111 (2009).
224. Shevach, E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* **30**, 636-645 (2009).
225. Snapper, C.M. & Paul, W.E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**, 944-947 (1987).
226. Lahl, K. *et al.* Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* **204**, 57-63 (2007).
227. Stephens, L.A., Gray, D. & Anderton, S.M. CD4+CD25+ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17418-17423 (2005).
228. Kohm, A.P. *et al.* Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* **176**, 3301-3305 (2006).
229. Gotot, J. *et al.* Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 10468-10473 (2012).
230. Leberman, D.A. & Edmiston, J.S. The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **1**, 1297-1304 (1999).
231. Cazac, B.B. & Roes, J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* **13**, 443-451 (2000).

232. Ise, W. *et al.* Naive CD4<sup>+</sup> T cells exhibit distinct expression patterns of cytokines and cell surface molecules on their primary responses to varying doses of antigen. *J Immunol* **168**, 3242-3250 (2002).
233. Latchman, Y.E. *et al.* PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10691-10696 (2004).
234. Wong, M., La Cava, A., Singh, R.P. & Hahn, B.H. Blockade of programmed death-1 in young (New Zealand black x New Zealand white)F1 mice promotes the activity of suppressive CD8<sup>+</sup> T cells that protect from lupus-like disease. *J Immunol* **185**, 6563-6571 (2010).
235. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology* **2**, 261-268 (2001).
236. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J. & Sharpe, A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology* **26**, 677-704 (2008).
237. Breitfeld, D. *et al.* Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* **192**, 1545-1552 (2000).
238. Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B. & Mackay, C.R. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* **5**, 853-865 (2005).
239. Guay, H.M., Larkin, J., 3rd, Picca, C.C., Panarey, L. & Caton, A.J. Spontaneous autoreactive memory B cell formation driven by a high frequency of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **178**, 4793-4802 (2007).
240. Munoz, L.E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A.A. & Herrmann, M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nature reviews. Rheumatology* **6**, 280-289 (2010).
241. Vermes, I. *et al.* Apoptosis and secondary necrosis of lymphocytes in culture. *Acta haematologica* **98**, 8-13 (1997).
242. Carter, L. *et al.* PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* **32**, 634-643 (2002).
243. Stassen, M. *et al.* Differential regulatory capacity of CD25<sup>+</sup> T regulatory cells and preactivated CD25<sup>+</sup> T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells. *J Immunol* **173**, 267-274 (2004).
244. Guiard, E. *et al.* Patterns of noncryoglobulinemic glomerulonephritis with monoclonal Ig deposits: correlation with IgG subclass and response to rituximab. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **6**, 1609-1616 (2011).
245. Nimmerjahn, F. *et al.* FcγRIV deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19396-19401 (2010).
246. Blazar, B.R. *et al.* Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-γ-dependent mechanism. *J Immunol* **171**, 1272-1277 (2003).
247. Alderson, K.L. *et al.* Regulatory and conventional CD4<sup>+</sup> T cells show differential effects correlating with PD-1 and B7-H1 expression after immunotherapy. *J Immunol* **180**, 2981-2988 (2008).
248. Zhang, J. Yin and yang interplay of IFN-γ in inflammation and autoimmune disease. *The Journal of clinical investigation* **117**, 871-873 (2007).
249. Prokunina, L. *et al.* The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism* **50**, 327-328 (2004).

## Referenzen

250. Stagg, J. *et al.* Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7142-7147 (2011).
251. Velu, V. *et al.* Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* **458**, 206-210 (2009).

## 8. Abbildungsverzeichnis

### Einleitung

Abbildung 1: 1.2.1-1 Modell zur Generation von Gedächtnis- und Plasmazellen im Keimzentrum während der primäre Immunantwort .....	4
Abbildung 2: 1.2.2-1 Modell zur antigenunabhängigen Entwicklung von B Zellen .....	4
Abbildung 3: 1.2.3-1 Vier zelluläre Strategien zur Regulation von selbst reaktiven Rezeptoren .....	6
Abbildung 4: 1.3.2-1 Thymische und periphere Generation regulatorischer T Zellen .....	11
Abbildung 5: 1.3.3-1 Hauptmechanismen der direkten Suppression von T Effektorzellen durch Tregs .....	12
Abbildung 6: 1.3.3-2 Hauptmechanismen der indirekten Suppression von T Effektorzellen durch Tregs über antigenpräsentierende Zellen.....	14
Abbildung 7: 1.5-1 PD-1 und seine Liganden.....	17

### Ergebnisse

Abbildung 8: 4.1-1 Tregs verhindern die Produktion von Auto-Antikörpern in NOH Mäusen.....	39
Abbildung 9: 4.2-1 Steigerung der PD-1 mRNA Expression in OVA spezifischen B Zellen nach Immunisierung .....	41
Abbildung 10: 4.2-2 Gesteigerte Proteinexpression von PD-1 auf OVA spezifischen B Zellen .....	42
Abbildung 11: 4.2-3 Tregs induzieren PD-1 auf OVA spezifischen B Zellen.....	44
Abbildung 12: 4.2-4 Kontaktabhängige Suppression von IgHEL B Zellen <i>in vitro</i> .....	46
Abbildung 13: 4.2-5 Die B Zellsuppression ist PD-1 abhängig.....	48
Abbildung 14: 4.2-6 PD-1 Stimulation induziert Apoptose in aktivierten B Zellen.....	49
Abbildung 15: 4.2-7 Aufhebung der peripheren Toleranz durch PD-1 Blockade <i>in vivo</i> ...	51
Abbildung 16: 4.2-8 Lokale Erhöhung der IFN-gamma Konzentration korreliert mit IgG Subtypen in NOH Mäusen.....	52

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 17: 4.2-9 PD-1 Expression auf autoreaktiven B Zellen ist Grundlage für die Suppression.....	54
Abbildung 18: 4.2-10 Induktion antigenspezifischer Tregs im renalen Lymphknoten.....	56
Abbildung 19: 4.2-11 Spezifische Hochregulation der PD-1 Liganden auf den Tregs nach Immunisierung.....	58
Abbildung 20: 4.2-12 Zur B Zellsuppression sind Tregs notwendig und hinreichend .....	60
Abbildung 21: 4.3-13 PDL-1/2 Expression auf Tregs ist Voraussetzung zur B Zellsuppression.....	61
Abbildung 22: 4.3-1 PD-1 Expression auf T Helferzellen wird nicht von Tregs oder einer Immunisierung beeinflusst .....	63
Abbildung 23: 4.3-2 Schematisches Modell der indirekten vs der direkten Suppression in NOH und NOHxPD-1 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	63
Abbildung 24: 4.3-3 Direkte <i>in vivo</i> Suppression der B Zellen durch Tregs .....	65

## **Diskussion**

Abbildung 25: 5.3-1 Schematische Darstellung der direkten Suppression .....	74
---	----

## 9. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APC	antigen-präsentierende Zelle (engl. antigen presenting cell), Allophycocyanin
APRIL	engl. a proliferation-inducing ligand (APRIL)
β-Gal	β-Galaktosidase
BAFF	engl. B cell activating factor belonging to the TNF family
BCR	B Zell-Rezeptor (engl. B cell receptor)
bio	Biotin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Zelloberflächenmarker (engl. cluster of differentiation)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
d.h.	dass heißt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl. fluorescence activated cell sorting)
Fc	konstante Region eines Immunglobulins
FCS	Fötale Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	engl. forward scatter
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (engl. green fluorescent protein)
h	Stunde, engl. hour
HEL	Hühnerlysozym, engl. hen egg lysozym
HRP	Meerrettich Peroxidase (engl. horseradish peroxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
m	milli, Meter, messenger

## Abkürzungen

μ	mikro
MACS	Magnetische Zellsortierung (engl. magnetic activated cell sorter)
MFI	engl. mean fluorescence intensity
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
min	Minute
n	nano
NOH	engl. nephrin OVA-HEL mice
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PD-1	engl. Programmed death 1
PDL	Ligand für PD-1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SSC	engl. sideward scatter
TCR	T Zell-Rezeptor (engl. T cell receptor)
Treg	regulatorische T Zelle
V/V	Verhältnis Volumen zu Volumen (engl. volume to volume)
W/V	Verhältnis Masse zu Volumen (engl. weight to volume)
WT	wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 10. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben.

Beginnend möchte ich Herrn Prof. Dr. Christian Kurts für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen, aber auch für die vielen konstruktiven Besprechungen, Hilfestellungen und Anleitungen zum zielorientierten Arbeiten. Das IMMEI bietet ein sehr stimulierendes Umfeld mit höchstem wissenschaftlichen Input, was die Weiterentwicklung junger Wissenschaftler fördert.

Ein spezieller Dank geht an Frau Dr. Isis Ludwig-Portugall, die mich während meiner Doktorarbeit in jeder Hinsicht betreut, unterstützt und motiviert hat.

Bei Prof. Percy Knolle, Prof. Irmgard Förster und Prof. Michael Pankratz möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Mein besonderer Dank gilt natürlich der gesamten AG Kurts für zahlreiche amüsante, aber auch kreative Stunden im Labor sowie für die hilfreiche Unterstützung in theoretischen und praktischen Fragen. Namentlich danke ich Catherine Gottschalk, Sonny Leopold, Melanie Eichler und Chrystel Llanto für die Mitarbeit an diesem Projekt.

Insbesondere danke den Mitarbeitern der Core-Facility des IMMEI für ihre technische Unterstützung. In allen Verwaltungsangelegenheiten stand mir Frau Lucie Delforge immer hilfreich beiseite. Ein großer Dank geht auch an die Tierpfleger im IMMEI und im HET sowie den Mitarbeitern der Spülküche.

Vor allem möchte ich meinen Eltern, Großeltern, meiner Schwester und meinen Schwiegereltern in spe danke sagen. Ihr habt mich immer unterstützt, gefördert und nie an mir gezweifelt. Ihr seid meine größten Vorbilder.

Remo, dein Vertrauen und deine Unterstützung haben mich dieses Ziel erreichen lassen.

Liebe ist eine Kombination aus Miteinander, Füreinander und absolutem Glück!

## 11. Appendix

### **Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteil folgender Publikation und Kongressbeiträge:**

#### **Publikation**

Janine Gotot, Catherine Gottschalk, Sonny Leopold, Percy A. Knolle, Hideo Yagita, Christian Kurts und Isis Ludwig-Portugall

“Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo” Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jun 26;109(26):10468-73.

#### **Wissenschaftliche Konferenzen**

- |      |   |
|------|---|
| 2009 | Posterpräsentation auf dem „ World Immune Regulation Meeting-III“ in Davos<br><br>Titel: „CD25 <sup>+</sup> regulatory T cells specifically suppress auto-antibody generation against pancreatic tissue autoantigens“   |
| 2009 | Posterpräsentation auf dem „2nd European Congress of Immunology (ECI)“ in Berlin<br>Titel: „CD25 <sup>+</sup> regulatory T cells specifically suppress auto-antibody generation against pancreatic tissue autoantigens“ |
| 2010 | Teilnahme am Symposium „Regulators of adaptive Immunity“ in Erlangen  |
| 2011 | Vortrag beim IRTG Retreat in<br><br>Titel: „Direct PD-1-mediated suppression of autoreactive B cells by regulatory T cells“   |
| 2012 | Vortrag auf dem „Immune Tolerance and Autoimmune Disease“ Meeting in Cambridge<br><br>Titel: „Direct PD-1-mediated suppression of autoreactive B cells by regulatory T cells“   |
| 2012 | Teilnahme am Henry Kunkel Society and IMPAM Meeting<br>„Immunological Memory in Health and Disease“   |

**Weitere Publikationen**

Isis Ludwig-Portugall, Emma E. Hamilton-Williams, **Janine Gotot** und Christian Kurts

„CD25+ Treg specifically suppress auto-Ab generation against pancreatic tissue autoantigens“ Eur J Immunol. 2009 Jan;39(1):225-33.