

„Analyse humaner regulatorischer T-Zellen
im humanisierten Mausmodell“

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Nadine Grebe

Geb. am 31.08.1981 in Marburg

Mainz, 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2013

Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Das Immunsystem	3
2.2	Entstehung der Immunzellen: Hämatopoese.....	4
2.3	T-Zellen: Entstehung, Homöostase und Funktion	5
2.4	T-Zell Toleranzmechanismen.....	8
2.5	Regulatorische T-Zellen: Entstehung und Funktion.....	9
2.6	Humanisierte Mäuse.....	12
3	Zielsetzung der Arbeit	13
4	Material und Methoden.....	14
4.1	Verbrauchsmaterialien	14
4.2	Tiere	14
4.3	Chemikalien.....	14
4.4	Kulturmedien und Puffer	14
4.5	Antikörper	17
4.5.1	Antikörper für die Durchflusszytometrie	17
4.6	Zellkultur	18
4.7	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	18
4.8	Isolation von PBMCs („Peripheral Blood Mononuclear Cells“) aus humanem Vollblut	19
4.9	Isolation von CD34 ⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSCs, „Hematopoietic Stem Cells“) aus Nabelschnurblut	19
4.10	Einfrieren von HSCs.....	20
4.11	Rekonstitution von NSG-Mäusen mit humanen hämatopoetischen Stammzellen ...	20
4.12	Blutentnahmen.....	20
4.13	Herstellung von Einzelzellsuspensionen	21

4.14	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen für die durchflusszytometrische Darstellung von dendritischen Zellen (DCs, „Dendritic Cells“)	21
4.15	Durchflusszytometrie	21
4.16	Isolation von humanen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie	23
4.17	Stimulation von humanen Zellen	23
4.18	Isolation der Gesamt-RNA	23
4.19	Umschreiben der mRNA in cDNA (Reverse Transkription)	24
4.20	Polymerase Kettenreaktion (PCR, „Polymerase Chain Reaction“)	24
4.21	Messung der Proliferation/ Suppression	25
4.22	Generierung von murinen dendritischen Zellen aus Knochenmark	26
4.23	Ko-kultur von T- Zellen aus humanisierten Mäusen mit verschiedenen in vitro aus Knochenmark generiert, allogenen dendritischen Zellen	26
4.24	DSS („Dextran Sulfate Sodium“, Natrium-Dextransulfat)-Kolitis	27
4.25	Tumormodell	27
4.26	Immunhistochemie	27
4.27	Statistik	27
5	Ergebnisse	28
5.1	Generierung von humanisierten Mäusen	28
5.1.1	Isolation humaner hämatopoetischer Stammzellen aus Nabelschnur-blut	28
5.1.2	Rekonstitution von NSG Mäusen mit humanen HSC	29
5.2	Analyse des humanen Immunsystems in der humanisierten Maus	30
5.2.1	Humanisierungsstatus des Blutes	30
5.2.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede des Humanisierungsstatus	31
5.2.3	Temporäre Veränderung des Humanisierungsstatus	32
5.2.4	Humanisierung in den zentralen und peripheren lymphoiden Organen	33
5.2.5	Anteil humaner Zellen in den lymphoiden Organen	34
5.2.6	Humane hämatopetische Zelltypen in der humanisierten Maus	35
5.2.7	Veränderung des prozentualen Anteiles von B- und T-Zellen mit der Zeit	37
5.3	T-Zell-Entstehung in der humanisierten Maus	38
5.3.1	Humane T-Zellen entstehen im murinen Thymus humanisierter Mäuse	38
5.3.2	T-Zell-Reifung im murinen Thymus humanisierter Mäuse	39

5.3.3	Expression von CD45RA und CD45RO im Thymus	40
5.4	Regulatorische T-Zellen (Treg) im Thymus	42
5.4.1	Helios Expression auf humanen regulatorischen T-Zellen im Thymus	43
5.4.2	Expression von CD45RA und CD45RO auf humanen regulatorischen T-Zellen im murinen Thymus humanisierter Mäuse	44
5.4.3	HLA-DR Expression auf humanen regulatorischen T-Zellen im Thymus humanisierter Mäuse	44
5.5	T-Zellen in der Peripherie der humanisierten Mäuse	45
5.5.1	Anteil von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in der humanisierten Maus	46
5.5.2	In den humanisierten Mäusen entstehen naive CD45RA ⁺ CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	48
5.5.3	Humane T-Zellen aus humanisierten Mäusen exprimieren nach Stimulation Interleukin 2	49
5.5.4	Gemischte Leukozytenreaktion MLR (Mixed Leukocyte Reaktion)	51
5.6	Regulatorische T-Zellen in der Peripherie humanisierter Mäuse	52
5.6.1	Helios Expression in peripheren humanen regulatorischen T-Zellen	54
5.6.2	Anteil HLA-DR exprimierender Tregs in der Peripherie humanäquivalenter Mäuse	54
5.6.3	Die Tregs in der Peripherie humanisierter Mäuse zeigten einen aktivierten/ Gedächtnis-CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ Phänotyp	56
5.6.4	Regulatorische T-Zellen exprimieren kein IL-2	58
5.6.5	Aktivierte Tregs aus der humanisierten Maus exprimierten GARP („Glycoprotein A Repetitions Predominant“)	58
5.7	In vitro Suppression durch humane regulatorische T-Zellen aus humanisierten Mäusen	59
5.8	In vivo Modelle	60
5.8.1	DSS-Kolitis	60
5.8.2	Die humanisierte Maus als Modell für das pleomorphe Sarkom	63
6	Diskussion	68
6.1	Generierung der humanisierten Mäuse und Charakterisierung ihres humanen Immunsystems	68
6.2	Humane T-Zellen in der humanisierten Maus	70
6.3	Humane regulatorische T-Zellen in der humanisierten Maus	73
6.4	Die humanisierte Maus als Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.	76
6.5	Die humanisierte Maus als Modell für das pleomorphe Sarkom	76

7	<i>Abkürzungen</i>	78
8	<i>Referenzen</i>	80
9	<i>Danksagung</i>	90
10	<i>Lebenslauf</i>	91

1 Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind essentiell für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Diese hocheffektiven Suppressorzellen verhindern hierbei einerseits Immunantworten gegen Autoantigene sowie harmlose Nahrungs- und Umweltantigene. Andererseits können diese bei chronischen Infekten Immunantworten reduzieren sowie effektive Antitumor-Immunantworten hemmen. Aufgrund ethischer Erwägungen ist die Erforschung regulatorischer T-Zellen und deren Rolle bei der Tumorentwicklung neben humane *in vitro/ex vivo* Analysen weitestgehend auf Mausmodelle beschränkt. Allerdings haben Daten, die mit Hilfe präklinischer Mausmodelle gewonnen wurden, oft nur eine beschränkte Aussagekraft hinsichtlich der betreffenden humanen Erkrankung^{1,2}. Um diese Limitationen zu überwinden und translationale immunologische Experimente zu ermöglichen, wurde hier ein humanisiertes Mausmodell verwendet. Hierfür wurden T- und B-zelldefiziente $\text{NOD-}\gamma\text{-scid IL2R}\gamma^{\text{null}}$ (NSG) Mäuse mit humanen CD34^+ hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) rekonstituiert. Aus diesen HSCs entstanden in den Tieren vielfältige humane Immunzellen. Unter anderem entwickelten sich antigenpräsentierende Zellen (dendritische Zellen, Monozyten/ Makrophagen und B-Zellen), welche eine wichtige Rolle bei Entstehung, Homöostase und Effektorfunktion von T-Zellen spielen. Im murinen Thymus der NSG Tiere entwickelten sich über ein intermediäres CD4^+ und CD8^+ doppelpositives Stadium CD4^+ sowie CD8^+ einzelpositive T-Zellen, welche als Effektorpopulationen in die Peripherie auswanderten. Die normale Funktionsfähigkeit dieser humanen CD4^+ T-Zellen zeigt sich dadurch, dass sie nicht nur polyklonal (CD3^+ / CD28^+), sondern auch antigenspezifisch unter Verwendung allogener DCs aktiviert werden konnten. Weiter waren die T-Zellen *in vivo* in der Lage, in transplantiertes Tumorgewebe sowie entzündete Darmareale einzuwandern. Dies ist für die Ausübung ihrer Effektorfunktionen essentiell. In den Mäusen zeigten nicht alle entstandenen T-Zellen einen naiven CD45RA^+ CD45RO^- Phänotyp. Ein deutlicher Anteil wies einen CD45RO^+ CD45RA^- Phänotyp bereits aktivierter T-Zellen auf. Diese entstanden vermutlich im Zuge der homöostatischen Expansion der Zellen auf Grund der in den Empfängermäusen herrschenden Lymphopenie. Humane Helios⁺ CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ CD127^- natürlich vorkommende Tregs entwickelten sich ebenfalls im murinen Thymus der Tiere und umfassten ca. 10% der humanen peripheren CD4^+ T-Zellen in den Mäusen. Induzierte Helios⁻ Tregs entstanden nicht in den Tieren. Die in den Mäusen entstandenen humanen Tregs zeigten vorwiegend einen aktivierten, hochsuppressiven HLA-DR⁺ CD45RO^+ Phänotyp. Nach *ex vivo* Aktivierung verhielten sich die regulatorischen T-Zellen typisch anergisch, sie zeigten keine Proliferation und keine Interleukin-2 (IL-2) Expression. Stattdessen exprimierten sie aber das für aktivierte regulatorische T-Zellen spezifische Oberflächenprotein GARP. *In vitro* bewiesen die humanen Tregs ihre Funktionalität durch die Inhibition der Proliferation von kokultivierten CD4^+ CD25^- T-Zellen. Subkutan injizierte

Tumorzellen eines humanen pleomorphen Sarkoms wurden in den humanisierten Mäusen nicht abgestoßen und der Tumor konnte, trotz Infiltration humaner Immunzellen, ungehindert wachsen. Als mögliche Ursache hierfür präsentierte sich die selektive Akkumulation von Tregs im Tumor. Zusammen mit dem erhöhten Anteil humaner Tregs in der Peripherie, wiesen diese Beobachtungen deutliche Parallelen mit Befunden aus humanen Patienten auf.

Durch die Entwicklung funktioneller humaner Tregs in diesem humanisierten Mausmodell werden die experimentellen Möglichkeiten hinsichtlich der Analyse solcher Tregs beträchtlich erweitert. Somit wird es ermöglicht, Entstehung und Funktion humaner regulatorischer T-Zellen *in vivo* zu analysieren, deren Bedeutung in klinisch relevanten Modellen zu charakterisieren und somit innovative Therapien zu etablieren.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Die wichtigste Aufgabe des Immunsystems ist es, den Körper vor Pathogenen zu schützen. Dabei vollbringt es die bemerkenswerte Leistung, vielfältigste Pathogene zu eliminieren und dabei gesundes, körpereigenes Gewebe zu verschonen.

Das Immunsystem kann in zwei Bereiche untergliedert werden, die engmaschig miteinander vernetzt sind: die angeborene und die adaptive Immunität. Nach Durchdringen der natürlichen Barrieren des Körpers (z.B. Haut, Schleimhäute) werden Pathogene von den Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten und dendritischen Zellen (DCs, „Dendritic Cells“), erkannt. Hierzu bedienen sich diese keimbahnkodierter Rezeptoren, zu denen beispielsweise die TLRs („Toll Like Rezeptoren“) gehören. Diese erkennen Strukturen, die klassischerweise nur bei Pathogenen zu finden sind. Durch Bindung dieser Rezeptoren werden die Zellen aktiviert und können ihre spezifischen Effektorfunktionen ausüben. Dazu zählen Phagozytose, die Produktion von Zytokinen und die Aktivierung der Zellen der adaptiven Immunität. Das adaptive Immunsystem ermöglicht im Vergleich zum angeboren Immunsystem eine deutlich spezifischere Reaktion, welche jedoch erst mit einer zeitlichen Verzögerung eintritt. Dies kommt zustande, da diese Zellen zunächst noch von den Zellen der angeborenen Immunität aktiviert werden müssen, um zu proliferieren und ihre Effektorfunktionen auszuüben. Hierbei bilden vor allem die dendritischen Zellen in ihrer Funktion als professionell antigenpräsentierende Zellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Die Effektor-Zellen des adaptiven Immunsystems, die B- und T-Zellen, besitzen Rezeptoren, die von Zelle zu Zelle variieren. Diese hohe Diversität an Rezeptoren entsteht durch einen nicht gerichteten Mechanismus im Thymus oder Knochenmark. Die hierdurch ermöglichte Erkennung vielfältigster Antigene birgt jedoch die Gefahr von „Selbst“-erkennenden Rezeptoren. Durch Zellen mit diesen autoreaktiven Rezeptoren können Immunreaktionen gegen körpereigene Strukturen ausgelöst werden. Eine möglichst breitgefächerte Erkennung von Pathogenen bei gleichzeitiger Protektion körpereigener Gewebe ist der Schlüssel zu einer effektiven adaptiven Immunreaktion.

2.2 Entstehung der Immunzellen: Hämatopoese

Die Zellen des Immunsystems entstehen, wie auch die Thrombozyten und Erythrozyten, aus den CD³⁴⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSCs, „Hematopoietic Stem Cells“). Diese sind postnatal vorwiegend in den entsprechenden Nischen des Knochenmarks zu finden (1-3% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark)³. Vereinzelt zirkulieren diese multipotenten CD34⁺ HSC im peripheren Blut sowie in einer höheren Frequenz (ca. 1 % der kernhaltigen Blutzellen) im Nabelschnurblut³. Damit aus den HSC-Vorläuferzellen und folgend distinkte hämatopoetische Zelllinien entstehen können, müssen diese verschiedene Mikroumgebungen durchwandern. Hier erhalten sie die für ihre Entwicklung essentiellen Stimuli. Die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie etwa Monozyten und Granulozyten, reifen unter Zytokineinwirkung und Interaktion mit Stromazellen im Knochenmark. Die B-Zellenentwicklung findet ebenfalls im Knochenmark statt. Von dort aus besiedeln diese als naive B-Zellen die Peripherie. Auch die T-Zell-Entwicklung beginnt im Knochenmark aus den identischen lymphoiden Vorläufern wie B-Zellen. T-Zell-Vorläufer wandern aus dem Knochenmark aus und vollenden ihre Entwicklung im Thymus (Abbildung 1). Von dort aus besiedeln die herangereiften, naiven, konventionellen T-Zellen sowie die regulatorischen T-Zellen (Tregs) den Körper.

^a Cluster of Differentiation

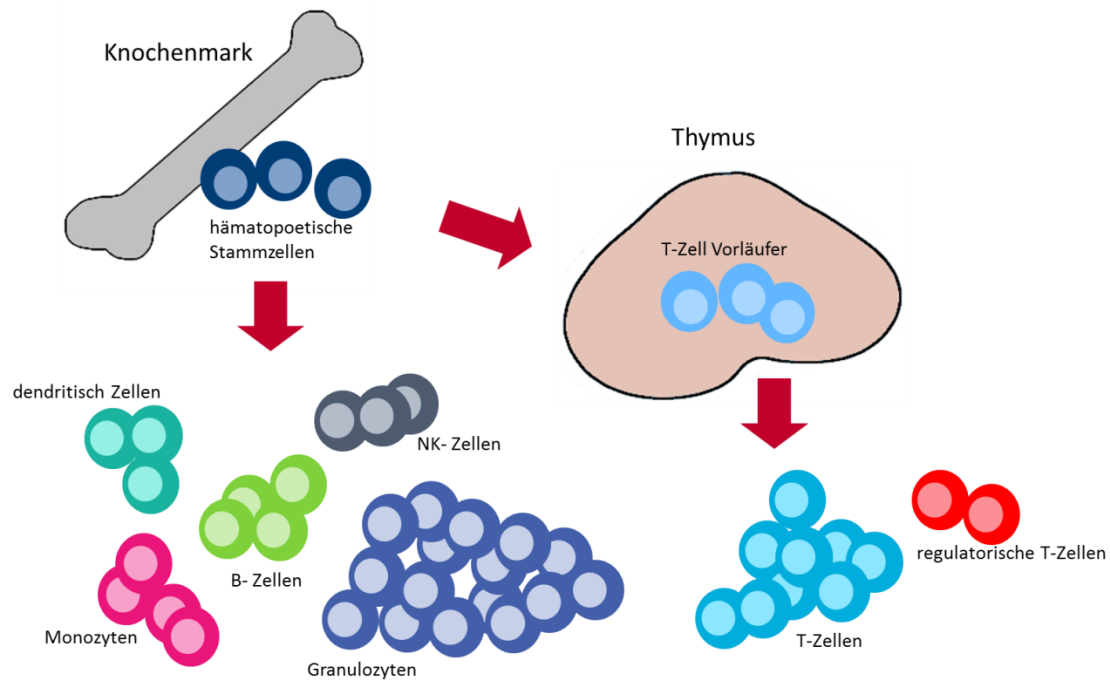


Abbildung 1: Hämatopoese. Aus den HSCs entstehen im Knochenmark die Zellen des angeborenen Immunsystems, zu denen z.B. die Monozyten gehören. Die B-Zell Entwicklung findet ebenfalls im Knochenmark statt. T-Zellen entwickeln sich im Thymus aus Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark eingewandert sind.

2.3 T-Zellen: Entstehung, Homöostase und Funktion

Eine zentrale Position im adaptiven Immunsystem nehmen die T-Zellen ein. Diese entwickeln sich, wie oben bereits erwähnt, im Thymus aus den dort aus dem Knochenmark eingewanderten Vorläufern. Die Zellen im Thymus besitzen kein selbsterneuerndes Potenzial. Somit ist die T-Zell-Entwicklung vom permanenten Einwandern von Vorläufern, sogenannten Prothymozyten, abhängig^{4,5}. Bis zur reifen CD4 oder CD8 einzelpositiven T-Zelle (“Single Positive” SP) durchlaufen die Vorläufer verschiedene Stadien, die mit dem Durchwandern von Thymusstrukturen einhergehen^{6,7,8}. Für die Entwicklung in Richtung T-Zelle ist eine enge Interaktion mit den Stromazellen des Thymus vonnöten. Hierdurch wird unter anderem das für die intrathymale T-Zell Differenzierung essentielle *Notch* Signal bereitgestellt⁹. Durch die Interaktionen der T-Zell-Vorläufer mit dem Thymusepithel reifen nicht nur die T-Zellen heran, diese Interaktion führt auch dazu, dass die Thymus-Stroma-Vorläufer zu fertigen Thymusepithelzellen heranreifen¹⁰. Die enge Interaktion von sich entwickelnden Thymozyten und Stromazellen führt somit zur Bereitstellung der notwendigen Mikroumgebung für die Förderung und Regulation der weiteren Thymozytenentwicklung^{11,8}. Den T-Zell-Vorläufern fehlen zunächst die charakteristischen Oberflächenmoleküle reifer T-Zellen (CD3, CD4, CD8). Die Vorläufer durchlaufen mehrere doppeltnegative (DN) Stadien¹². Hier beginnen die

Zellen mit der Rekombination der für die T-Zell Rezeptor^b-Ketten kodierenden Gene¹³. Nach erfolgreicher Rekombination der beta-Ketten-Gene proliferieren die Zellen und bilden folgend eine große Anzahl CD4⁺CD8⁺ doppelpositiver Zellen im Cortex des Thymus (Abbildung 3, DP (doppelpositiv))¹⁴. Dieser Übergang zu doppelpositiven T-Zellen kann nur dann stattfinden, wenn eine erfolgreiche VDJ-Rekombination der beta-Kette (Abbildung 2) stattgefunden hat¹⁵. So wird bei NSG-Mäusen (NOD-scid IL2Rgamma^{null}), deren T-Zell-Vorläufer auf Grund der SCID Mutation ihre T-Zell-Rezeptor-Ketten nicht rekombinieren können, die T-Zell-Entwicklung im DN3 Stadium abgebrochen^{16,17}.

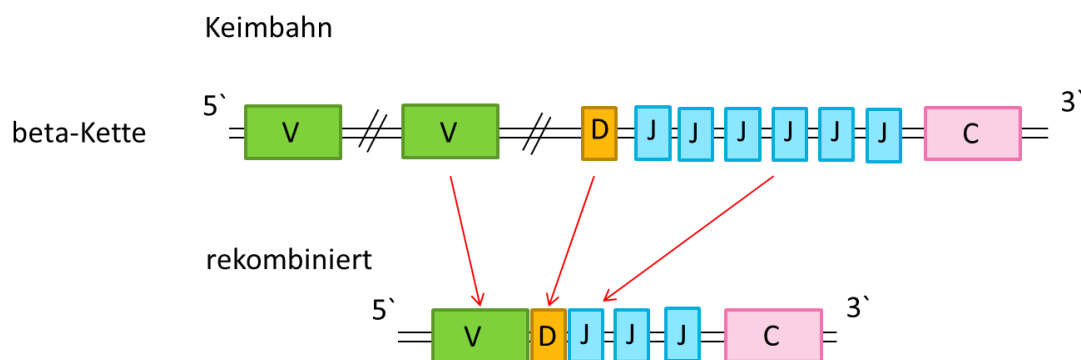


Abbildung 2: Rekombination der beta-Kette des T-Zell Rezeptor Gens. Damit ein funktioneller T-Zell Rezeptor entstehen kann, müssen zunächst die Gensegmente für die beta-Kette umgelagert werden. Hierbei kommt es zu einer zufälligen Kombination von VD und J Gensegmenten (C=Konstante Region). Bei der später stattfindenden Umlagerung der alpha-Ketten Gene werden nur V und J Segmente kombiniert. (Verändert nach: "Expression of T-cell receptor genes during early T-cell development"¹⁸)

Aufgrund der stattfindenden ungerichteten Umlagerung der T-Zell-Rezeptor (TZR) Gene besitzen die T-Zell-Vorläufer eine hohe Variabilität an TZR. Dieses T-Zell-Repertoire ist zunächst noch unselektiert^{19,20}. Im Zuge der T-Zell-Entwicklung im Thymus findet jedoch eine starke Selektion statt, wodurch letztendlich nur 1-3 % der Thymozyten als naive T-Zellen in die Peripherie auswandern^{21,22}. Durch niedrig-afide Interaktionen mit den MHC Molekülen der kortikalen Thymusepithelzellen (cTECs, „Cortical Thymusepithel Cell“) erhalten die doppelpositiven Zellen Signale zum Überleben und für ihre weitere Differenzierung. Diese sogenannte Positivselektion führt zu einer MHC-restringierten T-Zell Population¹⁹. Im Zuge dessen entscheidet sich auch, ob die Zellen CD4 oder CD8 einzelpositive T-Zellen werden¹⁹. Im Gegensatz zu den niedrig-afiden Interaktionen führen hoch-afide Interaktionen zur Apoptose der heranreifenden Thymozyten. Nur wenige T-Zellen erhalten hier Überlebenssignale über ihren T-Zell Rezeptor und ein Großteil der Zellen (95-98 %)

^bT-Zell Rezeptoren sind Dimere und besteht meist aus alpha- und beta-Kette (95 % αβ-T-Zellen).

stirbt ab²². Die selektierten doppelpositiven T-Zellen exprimieren die CD45RO Isoform des CD45 Antigens²³ und migrieren, angezogen durch Chemokine, in die Medulla des Thymus. Hier werden die potenziell autoreaktiven T-Zellen im Zuge der Negativselektion depletiert²⁴. Die T-Zellen, die diesen Prozess überleben, verlieren als finalen Reifungsschritt die CD45RO Expression²³. Reife CD4 oder CD8 einzelpositive T-Zellen wandern als naive ($CD45RA^+ CD45RO^-$) T-Zellen in die Peripherie aus (Abbildung 3)²³.

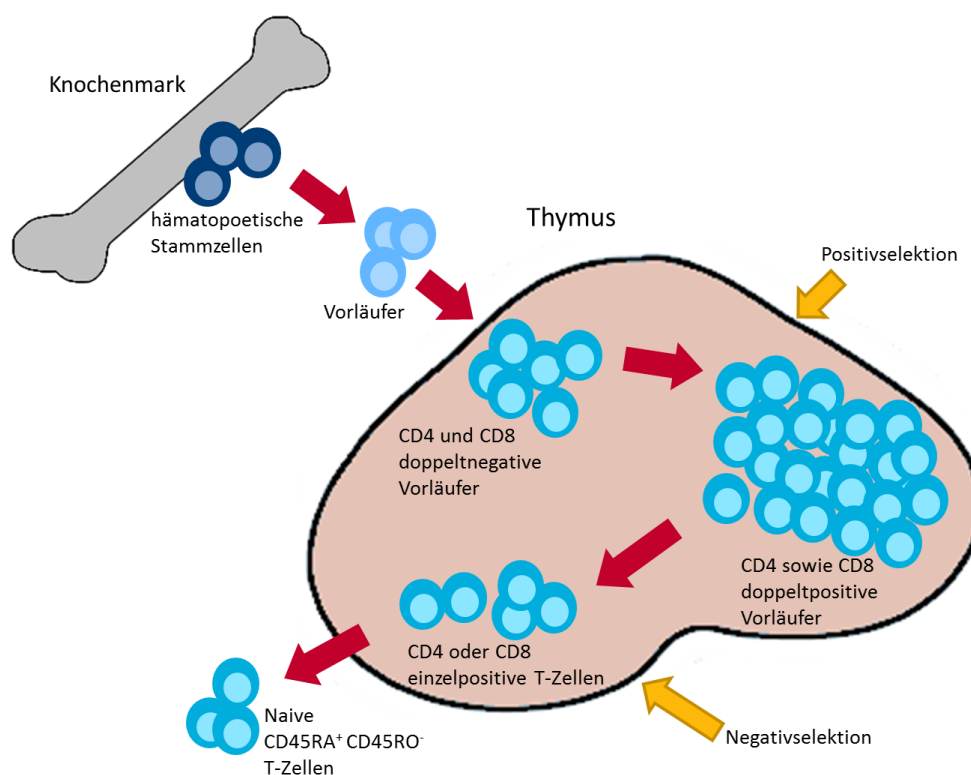


Abbildung 3: Entstehung des T-Zell Repertoires. Vorläufer wandern in den Thymus ein. Nach einigen doppelnegativen Stadien (DN) proliferieren diese stark und exprimieren dann sowohl CD4 als auch CD8 (DP, doppelpositiv). Nach der Positivselektion entstehen MHC restringierte einfachpositive (SP) Thymozyten, welche nach Negativselektion als $CD45RA^+$ naive T-Zellen in die Peripherie auswandern.

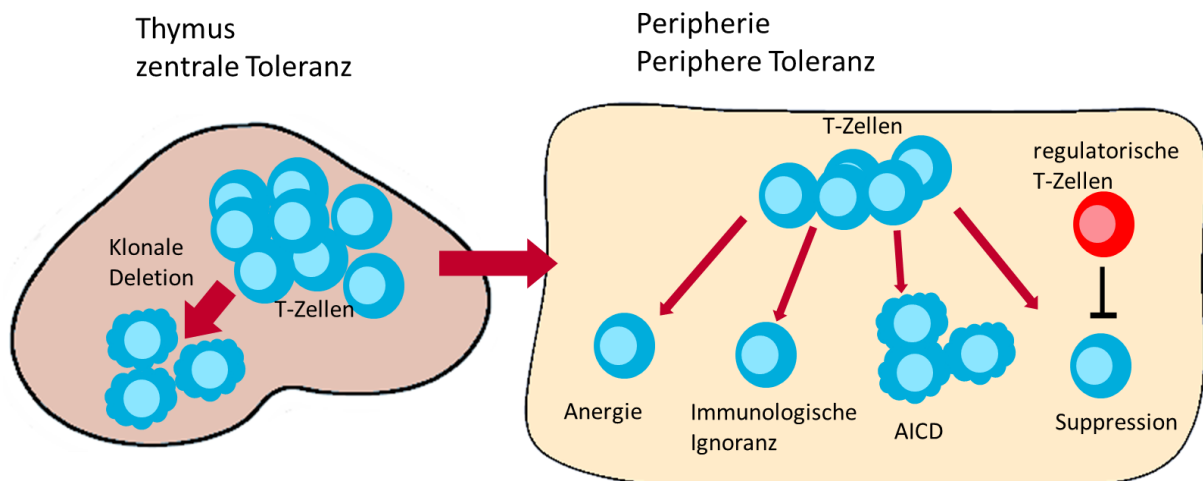
Die in die Peripherie entlassenen naiven T-Zellen zirkulieren durch die sekundären lymphoiden Organe. Sie behalten ihren $CD45RA^+ CD45RO^-$ naiven Phänotyp bis zu ihrer antigenspezifischen Aktivierung bei²⁵. Um in der Peripherie langfristig überleben zu können, benötigen diese Zellen Signale über ihren T-Zell Rezeptor²⁶. Naive $CD4^+$ T-Zellen erhalten hierbei Überlebenssignale durch die Interaktion mit MHC II Molekülen, welche Selbstpeptide präsentieren²⁷. Naive $CD8^+$ T-Zellen brauchen den Kontakt mit selbstpeptidpräsentierenden MHC I Molekülen für ihr Überleben²⁸. Treffen die naiven T-Zellen in den lymphoiden Organen auf aktivierte antigenpräsentierende Zellen, welche über MHC Moleküle passende Antigene präsentieren, können die T-Zellen aktiviert werden. Naive T-Zellen brauchen hierfür neben einem Stimulus über den T-Zell Rezeptor ein weiteres, durch die

antigenpräsentierende Zelle geliefertes, kostimulatorisches Signal²⁹. Die vermutlich wichtigste und bestcharakterisierte, jedoch nicht einzige, kostimulatorische Interaktion ist die von CD80/ CD86 auf dendritischen Zellen mit CD28 auf den T-Zellen³⁰. Durch die Aktivierung sezernieren CD4⁺ T-Zellen den autokrinen Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2) und können, in Abhängigkeit des Zytokinmilieus, zu verschiedenen Helferzellsubtypen differenzieren. Die aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen proliferieren und üben ihre spezifischen Effektorfunktionen aus. Weiter exprimieren die Zellen durch die Aktivierung zunächst CD45RO zusätzlich zu CD45RA, verlieren dann aber ihre CD45RA Expression komplett und zeigen einen CD45RO⁺ CD45RA⁻ aktivierten/ Gedächtnis-Phänotyp^{31,32}. Ein geringer Teil dieser expandierten, aktivierten T-Zellen bleibt später als CD45RO exprimierende Gedächtnis-T-Zell-Population erhalten. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen brauchen keine Interaktionen ihres TZR mit Selbstpeptid-präsentierenden MHC Molekülen mehr zum langfristigen Überleben^{33,34}.

2.4 T-Zell Toleranzmechanismen

Immunologische Toleranz ist eines der grundlegenden immunologischen Prinzipien. Die oben schon erwähnte Depletion selbstreaktiver T-Zellen im Zuge der Negativselektion im Thymus ist hierbei eines der zentralen Elemente. Bei der Negativselektion spielen sowohl die medullären Thymusepithelzellen (mTECs, „medulary Thymusepithel Cell“) als auch die thymusresidenten DCs und Makrophagen eine Rolle^{35,36}. Auch thymusresidente B-Zellen können an diesem Prozess beteiligt sein^{37,38}. Diese Zellen präsentieren den heranreifenden T-Zellen über ihre MHC Moleküle Autoantigene. Hochaffine/ -avide Interaktionen der T-Zell Rezeptoren (TZR) dieser heranreifenden T-Zellen mit den über MHC Moleküle präsentierten Selbstpeptiden führen zur Apoptose der T-Zellen (Abbildung 4)³⁹. In der Peripherie zirkulieren trotz dieses sehr effektiven Mechanismus potenzielle autoreaktive T-Zellen. Diese werden durch verschiedene periphere Toleranzmechanismen kontrolliert⁴⁰ (Abbildung 4). Die Depletion von T-Zellen mit potenziell autoreaktiven Rezeptorspezifitäten durch AICD („Activation Induced Cell Death“) ist ein effektiver Mechanismus der peripheren Toleranz. Dieser wird maßgeblich durch die Interaktion von Fas (CD95) auf der T-Zelle mit dessen Liganden (FasL/ CD95L) vermittelt⁴¹. Ein weiterer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz führt zu einem Zustand funktioneller Inaktivierung der T-Zellen, welcher als Anergie bezeichnet wird. Dieser Zustand wird durch ineffektive Stimulation ohne den für naive T-Zellen essentiellen Kostimulus herbeigeführt^{42,43}. Anergie kann ebenfalls durch die Interaktion von CD80/ CD86 auf den antigenpräsentierenden Zellen mit CTLA-4 („Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4“) ausgelöst werden^{44,45,46}. Der einfachste Mechanismus zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz ist die immunologische Ignoranz. Hierbei lösen Autoantigene, die an immunprivilegierten Orten

(beispielsweise die vordere Augenkammer, die Hoden oder die Placenta) oder in zu geringer Zahl präsentiert werden, keine Immunreaktion aus. Neben diesen passiven Mechanismen spielt die aktive Kontrolle autoreaktiver T-Zellen durch die Tregs bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz eine essentielle Rolle.



Zentrale Toleranz	Periphere Toleranz
Negative Selektion: klonale Deletion potentiell autoreaktiver T-Zellen im Thymus	Anergie: in Folge von Stimulation ohne Kostimmulus
	Ignoranz: zu geringe Menge an präsentiertem Antigen
	“Activation Induced Cell Death” (AICD): Apoptose in Folge starker Aktivierung
	Tregs: Suppression durch Tregs

Abbildung 4: Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz. Klonale Deletion im Thymus sowie Anergie, immunologische Ignoranz, AICD und Treg vermittelte Suppression in der Peripherie. (Abbildung nach: “The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery”⁴⁷)

2.5 Regulatorische T-Zellen: Entstehung und Funktion

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz essentiell. Defekte im Treg Kompartiment führen zu massiven Autoimmunreaktionen, wie z.B. bei der schweren Multiorgan-Autoimmunerkrankung IPEX („immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome“) beim Menschen^{48,49}. Primär können zwei Gruppen von Tregs unterschieden werden: im Thymus entstandene, natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nTregs) und in der Peripherie induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs). nTregs entstehen durch relativ hochaffine Interaktionen ihrer TZR mit den selbstpeptidpräsentierenden MHC Molekülen der mTecs und dendritischen Zellen in der Medulla des Thymus^{50,51} (Abbildung 5). Diese Zellen haben ein

T-Zell-Rezeptor-Repertoire, welches sich von dem konventioneller T-Zellen unterscheidet und vorzugsweise Autoantigene erkennt^{52,53}. Die nTregs wandern als reife, funktionell eigenständige Population in die Peripherie aus. Hier bilden sie die größte und wichtigste Gruppe der Tregs. Am 3. Lebenstag thymektomierte Mäuse zeigen schwerwiegende organspezifische Autoimmunreaktionen⁵⁴. Die natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen, welche erst nach Tag drei in ausreichender Zahl den Thymus verlassen und somit für dieses Phänomen verantwortlich sind, wurden Mitte der 90er Jahre als konstitutiv die IL-2 Rezeptor alpha Kette (CD25) exprimierende CD4⁺ T-Zellen beschrieben⁵⁵. CD25 wird allerdings in Folge von Aktivierung, ebenfalls auf konventionellen T-Zellen exprimiert. Human exprimieren ca. 30 % der T-Zellen CD25 verschieden stark⁵⁶, wovon nur die 1-3 % mit der höchsten CD25 Expression regulatorische Funktion aufweisen⁵⁷. Eine Schlüsselkomponente der Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen ist der Transkriptionsfaktor FoxP3 („forkhead box P3“)^{58,59}. Während murin FoxP3 nahezu ausschließlich in regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, kann es in aktivierten humanen T-Zellen transient exprimiert werden. Diese aktivierten humanen FoxP3⁺ T-Zellen zeigen keine suppressive Kapazität⁶⁰. FoxP3 ist ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor und eignet sich daher zur Identifikation, nicht aber zur Isolation lebender Zellen. Eine Alternative bietet hier die Expression des IL-7 Rezeptors CD127, welche invers mit der Foxp3 Expression und der Suppressivität der Tregs korreliert⁶¹.

Induzierte regulatorische T-Zellen entstehen aus naiven peripheren CD4⁺ T-Zellen in einer toleranzinduzierenden Umgebung⁶². Ihre Induktion erfolgt bei subimmunogener Antigenpräsentation, bei chronischen Entzündungsreaktionen, aber auch in der normalen Darmhomöostase. Letzteres wird als orale Toleranzinduktion bezeichnet und verhindert Immunreaktionen gegen harmlose Nahrungs- und Umweltantigene⁶³. Die nTregs unterscheiden sich von den iTregs anhand der dauerhaften Expression des Transkriptionsfaktors Helios⁶⁴ (Abbildung 5). Auch wenn in den iTregs Helios unter bestimmten Umständen transient exprimiert werden kann⁶⁵, ist Helios der zur Zeit beste verfügbare Marker für die Unterscheidung dieser beiden Treg-Subgruppen.

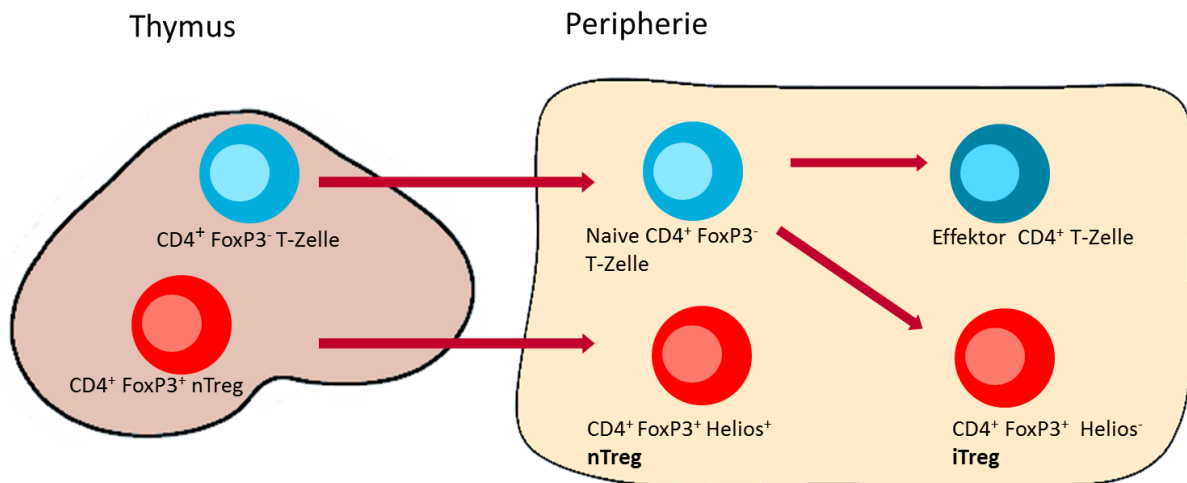


Abbildung 5: Regulatorische T-Zellen. Man unterscheidet zwischen nTregs, welche im Thymus entstehen und in der Peripherie aus naiven CD4 T-Zellen induzierten Tregs (iTregs).

Die CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs sind keine funktionell homogene Gruppe. Human kann man diese in CD45RA exprimierende naive und CD45RO exprimierende aktivierte/ Gedächtnis-Tregs unterteilen^{66,67,68,69}. Naive Tregs benötigen genau wie naive konventionelle T-Zellen Überlebenssignale über ihren TZR, um langfristig in der Peripherie bestehen zu bleiben⁷⁰. Nach antigenspezifischer Aktivierung verlieren sie ihre CD45RA Expression und werden zu funktionell differenzierten CD45RO⁺ Tregs. Diese machen bei älteren Erwachsenen im Blut einen Anteil von über 90 % der T-Zellen aus. Naive CD45RA⁺ CD45RO⁻ Tregs stellen die dominante Gruppe im Nabelschnurblut und *in utero* dar^{71,72,73}. Ein weiteres Unterscheidungskriterium funktionell distinkter humaner Tregs ist deren HLA-DR Expression. Diese charakterisiert eine terminal differenzierte Effektor-Treg Population, welche konventionelle T-Zellen mit höchster Effektivität supprimiert⁷⁴.

Einmal aktiviert, supprimieren regulatorische T-Zellen vielfältigste Effektorzellen wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, und dendritische Zellen (DCs) unabhängig von deren Spezifität^{75,76}. Nicht zuletzt aus diesem Grund muss die Anzahl der Tregs im Körper streng kontrolliert werden. Nur so kann eine maximale Immunreaktion gegen Pathogene hervorgerufen werden, gleichzeitig können aber Autoimmunitäten und überschießende Immunreaktionen verhindert werden. Selbst gut regulierte Treg Populationen können unerwünschte Funktionen ausüben. So können regulatorische T-Zellen beispielsweise eine effektive Antitumor-Immunantwort verhindern⁷⁷. Dazu gibt es erste klinische Versuche, in denen durch Depletion von Tregs effektive Antitumor-Immunantworten ausgelöst werden⁷⁸. Aber nicht nur bei Tumoren, sondern auch bei chronischen Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Allergien, immunologischen Schwangerschaftsproblemen und bei Transplantationen bieten sich potenzieller Behandlungsstrategien durch die Manipulation des Treg Kompartiments⁶⁹.

2.6 Humanisierte Mäuse

Untersuchungen in der Maus sind ein bewährtes immunologisches Modellsystem. Neben erstaunlich großen Übereinstimmungen zwischen Mensch und Maus, gibt es eine Vielzahl von Unterschieden zwischen den durch einige Millionen Jahre der Evolution getrennten Spezies. Die Forschung im humanen System beschränkt sich im Wesentlichen auf Analysen von *in vitro/ ex vivo* Systemen. Die Generierung eines humanen Immunsystems in immundefizienten Mäusen bietet die Möglichkeit, das humane Immunsystem *in vivo* zu studieren und zu manipulieren. Die ersten erfolgreichen Generierungen eines humanen hämato-lymphoiden Systems in Mäusen fanden Ende der 1980er Jahre nach Beschreibung der immundefizienten SCID Maus statt⁷⁹. In ersten Ansätzen wurden humane periphere mononukleäre Blutzellen oder humanes fötales Gewebe aus Leber, Thymus und Lymphknoten transplantiert^{80,81}. Ein Durchbruch in der Entstehung humanisierter Mäuse brachte die Generierung der NOD-scid IL2Rgamma^{null} (NSG) Mäuse, welche eine hohe Rekonstituierbarkeit mit humanen Zellen zulassen⁸². Mittlerweile gibt es vielfältigste Modelle, die sich in der Verwendung des Mausstammes, der Art und der Route der transferierten Zellen, dem Ursprung der Zellen sowie zusätzlich applizierter Zytokine unterscheiden⁸³. Die in dieser Arbeit verwendeten immundefizienten NSG-Mäuse haben neben einer defekten B- und T-Zellentwicklung schwere Defekte in der angeborenen Immunität. Das Fehlen natürlicher Killer-Zellen (NK-Zellen) verbessert die Rekonstitution mit humanen Blutzellen⁸². Weiter begünstigt der NOD Hintergrund die Besiedlung mit humanen Zellen. Auf Grund einer hier auftretenden natürlichen Variation im SIRPα Rezeptor kommt es zu einer verbesserten Interaktion mit CD47 auf den transplantierten humanen HSC. Dies führt zu weniger Phagozytose und einer besseren Rekonstitution mit humanen Zellen⁸⁴. Humanisierte Mausmodelle ermöglichen vielfältigste Untersuchungen des humanen Immunsystems *in vivo*. Es konnten erstmals humanspezifische Viruserkrankungen, wie z.B. Infektionen mit dem humanen Immunschwäche-Virus (HIV), *in vivo* untersucht werden⁸⁵. Trotz dieser vielversprechenden Möglichkeiten, weisen die Modelle immer noch Schwachstellen auf. Vor allem die nicht immer optimale Interaktion zwischen murinen Wachstumsfaktoren und humanen Zellen limitieren die Entwicklung sowie Homöostase einiger Zelltypen und machen Optimierungsstrategien notwendig⁸⁶.

3 Zielsetzung der Arbeit

Die Forschung an regulatorischen T-Zellen beschränkt sich aufgrund ethischer Erwägungen weitestgehend auf humane *in vitro/ ex vivo* Untersuchungen oder den Modellorganismus Maus. Die Daten, die mit Hilfe präklinischer Mausmodelle gewonnen wurden, haben allerdings oft nur eine beschränkte Aussagekraft hinsichtlich der betreffenden humanen Erkrankung^{1,2}. Humanisierte Mausmodelle können dazu beitragen diese Grenzen der Übertragbarkeit zu verringern. In dieser Arbeit sollte nun die Entstehung humaner regulatorischer T-Zellen in mit humanen hämatopoetischen Stammzellen transplantierten NSG-Mäusen analysiert werden. Hierbei sollte neben der Charakterisierung der Tregs im Thymus und der Peripherie der Mäuse auch deren Funktionalität überprüft werden.

4 Material und Methoden

4.1 Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben, stammen die verwendeten Plastik- und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Greiner-Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), VWR (Ismaning, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland). Alle Verbrauchsmaterialien wurden steril bezogen.

4.2 Tiere

Alle Versuchstiere wurden standardisiert in der zentralen Versuchstiereinrichtung Mainz unter SPF- (spezifisch pathogenfrei) Bedingungen gehalten.

Für die Humanisierung wurden Mäuse des Stammes NOD-scid IL2Rgamma^{null} (NSG)⁸² verwendet. Des Weiteren wurden Mäuse der Inzuchtstämme BALB/c, C3H/He und C57BL/6 genutzt.

4.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merk (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

4.4 Kulturmedien und Puffer

Alle Kulturmedien und Puffer wurden bei 4°C gelagert.

ACK-Puffer 0,1 mM EDTA

150 mM NH₄Cl

1 mM KHCO₃

In VE (vollentsalzt) Wasser

pH 7,3

DC Medium

Iscove's Medium (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)

1 %	Penicillin / Streptomycin
50 µM	β-Mercaptoethanol
1 %	Natrium-Pyruvat
1 %	L-Glutamin
5 %	FCS
2 %	GM-CSF ("Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor")

GM-CSF wurde aus der transgenen Zell-Linie X63/0⁸⁷ GM-CSF gewonnen und hat eine Konzentration zwischen 125-250 ng/ mL.

EDTA (Ethyldiamin-Tetraacetat)

Es wurde eine 0,5 M Stammlösung angesetzt. Der pH wurde auf 8 eingestellt. Die Lösung wurde abschließend autoklaviert und bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Einfriermedium für humane CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen

Für einen 250 ml Ansatz wurden 150 ml AIM5 Medium von Gibco (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) mit 100 ml Human-Albumin (CSL Behring, Hattersheim, Deutschland) und 500 µl Heparin (25000 u/ 5 ml) (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) supplementiert. Direkt vor Einfrieren der Zellen wurde 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) zugesetzt.

Fötales Kälberserum (FCS, „Fetal Calf Serum“)

Das verwendete FCS wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten bei 56°C im Wasserbad für 30 Minuten erhitzt. Das hitzeinaktivierte FCS wurde bei 4°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde das FCS 25 Minuten bei 800 x g zentrifugiert, um Partikel zu entfernen.

Gey's Lysepuffer

Um die Erythrozyten mittels osmotischem Schock zu lysieren, wurde eine 0,83 %ige Ammoniumchlorid-Lösung in VE- Wasser folgender Zusammensetzung verwendet:

8,29 g / L	NH ₄ Cl
1 g / L	KHCO ₃
0,037 g / L	EDTA

GM-Puffer (Großer MACS- Puffer)

0,5 %	BSA bzw. Human- Albumin
5 mM	EDTA
0,1 %	NaN ₃
In PBS	

Human-Albumin

20 %ig, salzarm (CSL Behring, Hattersheim, Deutschland)

Humanes Serum AB

Das humane männliches AB Serum wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Vor der Verwendung wurde das Serum für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert und bei 800 x g zentrifugiert, um Partikel zu entfernen.

Mäuse EDTA Puffer

30 mM	EDTA
0,01 %	Natrium- Acetat
In PBS	

PBS („Phosphate Buffered Saline“)

Es wurde eine 10x konzentrierte Lösung in VE Wasser angesetzt. Diese wurde vor Gebrauch auf eine Einfachlösung mit pH 7,2 verdünnt.

1,4 M	NaCl
0,1 M	NaH ₂ PO

Physiologische Trypanblaulösung

0,5 %	Trypanblau (Merck, Darmstadt, Deutschland)
0,02 %	Natrium-Acetat
In PBS	

Rinderserumalbumin (BSA)

Es wurde eine 10 %ige Lösung in PBS angesetzt und nach Sterilfiltrieren (0,2 µM) bei 4°C aufbewahrt.

T-Zell-Medium

Für die Kultur humaner T-Zellen wurde x-vivo 15 von Lonza (Basel, Schweiz) verwendet.

4.5 Antikörper

4.5.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper gegen humane Antigene

Antikörper	Klon	Fluorofor	Hersteller
Anti-CD3	OKT3	APC	eBioscience
Anti-CD4	OKT4	PerCP-Cy5.5	eBioscience
	L200	PerCP	BD Biosciences
Anti-CD8	RPA-T8	eFluor 450	eBioscience
Anti-CD11c	3.9	FITC	eBioscience
Anti-CD14	TÜK4	PerCP	Miltenyi Biotec
Anti-CD19	HIB19	FITC	eBioscience
Anti-CD25	BC96	PE-Cy7	eBioscience
	YTH906.9HL	FITC	Labgen
Anti-CD34	AC136	FITC	Miltenyi Biotec
Anti-CD45	2D1	eFluor 450	eBioscience
	5B1	PE	Miltenyi Biotec
Anti-CD45RA	HI100	FITC	eBioscience
Anti-CD45RO	UCHL1	PE	eBioscience
Anti-CD56	B159	APC	BD
Anti-CD123	6H6	PE-Cy7	eBioscience
Anti-CD127	eBioRDR5	FITC	eBioscience
Anti-CD303 (BDCA-2)	AC144	APC	Miltenyi Biotec
Anti-FoxP3	236A/E7 Set	APC	eBioscience
Anti-GARP	LRRC32	Alexa Fluor 647	eBioscience
Anti-Helios	22F6	PE	BioLegend
Anti-HLA-DR	LN3	PE	eBioscience

Anit-IL-2	MQ1-17H12	PE	BD
------------------	-----------	----	----

Antikörper gegen murine Antigene

Antikörper	Klon	Fluorofor	Hersteller
Anti-CD45.1	A20	PE	BioLegend

Antikörper zur Stimulation von humanen T-Zellen

Antikörper	Klon	Hersteller
Anti- CD3	OKT3	Eigene Herstellung
Anti- CD28	CD28.2	BD Pharmingen

4.6 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank mit sterilem Equipment durchgeführt. Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert.

4.7 Bestimmung der Lebendzellzahl

Der Vitalfarbstoff Trypanblau wurde zur Bestimmung der Lebendzellzahl verwendet. Trypanblau dringt in tote Zellen ein und färbt diese blau an. Somit konnte in einem Lichtmikroskop unter 10facher Vergrößerung die Zahl lebender Zellen bestimmt werden.

Die Zellsuspension wurde in physiologischer Trypanblaulösung verdünnt. Gezählt wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,1 mm (Kammerfaktor 10⁴). Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellen / ml} = \text{gezählte Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor } 10^4$$

4.8 Isolation von PBMCs („Peripheral Blood Mononuclear Cells“) aus humanem Vollblut

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Buffy-Coats von gesunden humanen Spendern 1:1 mit PBS verdünnt. Jeweils 35 mL Blut wurden mit 15 mL Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077 von PAA (Pasching, Linz) unterschichtet. Die durch die Zentrifugation bei 1200 x g (ohne Bremse) in der Interphase separierten PBMCs wurden abgenommen und dreimal mit PBS gewaschen.

4.9 Isolation von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSCs, „Hematopoietic Stem Cells“) aus Nabelschnurblut

Die Isolation von humanen CD34⁺ HSCs erfolgte aus Nabelschnurblut. Dieses wurde mit Einwilligung der Spenderinnen entnommen. Zuerst wurden die Lymphozyten des Blutes mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierfür wurde EDTA Nabelschnurblut 1:1 mit PBS verdünnt und mit dem Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077 von PAA (Pasching, Linz) unterschichtet. Anschließend wurde bei 600 x g und 4°C 25 Minuten (ohne Bremse) zentrifugiert. Folgend wurde die Interphase mit den Lymphozyten entnommen. Nach dreimaligem waschen mit PBS wurde die Lebendzellzahl bestimmt.

Die Anreicherung der HSC erfolgte mittels immunomagnetischer Separation (MACS, „Magnetic Cell Sorting“). Hierbei wurden die Zellen mit Hilfe paramagnetischer CD34-MicroBeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) markiert und durch einen starken Magneten von den übrigen Zellen abgetrennt. Zuerst wurden die aus dem Nabelschnurblut gewonnenen Zellen in 300 µL GM-Puffer (siehe Medien und Puffer) pro 1×10^8 Zellen aufgenommen und mit jeweils 50 µL FC Block und CD34-MicroBeads 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit GM-Puffer wurden diese in GM-Puffer auf 1×10^8 Zellen/ mL eingestellt und milliliterweise über eine equilibrierte, in einer Haltevorrichtung eines MACS Magneten befindlichen Separationssäule (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) gegeben. Nach Spülen der Säulen wurden die angereicherten CD34⁺ Zellen mittels zugehörigen Stempels eluiert. Anschließend wurde die Lebendzellzahl bestimmt.

Um eine Verunreinigung der HSCs durch T-Zellen, welche potenziell eine GVHD auslösen könnten, auszuschließen, wurden die noch verbliebenen T-Zellen mittels CD3-Dynabeads (Dyna, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers depletiert. Hierfür wurden die

Zellen in einem Milliliter PBS + 0,5% BSA im Verhältnis 1:1 mit CD3-Dynabeads 20 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 20% FCS in PBS abgestoppt. Das Röhrchen wurde für 2 Minuten in einen Dynal-Magneten gestellt und die T-Zell depletierten HSCs abgenommen. Hierbei verblieben die T-Zellen auf Grund der Markierung mit den magnetischen CD3-Dynabeads im Magneten. Die aufgereinigten HSCs wurden entnommen. Die Reinheit wurde exemplarisch mittels Durchflusszytometrie überprüft.

4.10 Einfrieren von HSCs

Es wurden jeweils 1×10^6 HSC in Einfriermedium (Kulturmedien und Puffer 4.4 ab S.14) aufgenommen und mittels Einfrierbox Cryo-Safe™ langsam auf -80°C abgekühlt. Für längeres Aufbewahren wurden die HSCs in flüssigen Stickstoff überführt.

4.11 Rekonstitution von NSG-Mäusen mit humanen hämatopoetischen Stammzellen

Um Platz in den Stammzellnischen des Knochenmarks zu schaffen, wurden 4-12 Wochen alte NSG-Mäuse mit 1 Gray bestrahlt. Diese subletale Bestrahlung erfolgte mittels einer Cäsium¹³⁷ Gammastrahlenanlage. Nach einer Ruhephase von 4-24 Stunden, die zu einer vermehrten Einwanderung von HSC ins Knochenmark durch die Ausschüttung chemo-attraktiver Substanzen von Stromazellen im Knochenmark führte, wurden den Mäusen 1×10^5 frisch aufgetaute HSC in 200 μL sterilfiltriertem PBS intravenös (i.v.) injiziert.

4.12 Blutentnahmen

Zur Analyse des Humanisierungsstatus wurde den Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten peripheres Blut durch Inzision der Schwanzvene entnommen. Für die Entnahme größerer Blutmengen wurden die Mäuse nach der CO_2 -Tötung retroorbital entblutet. Das Blut wurde, um dessen Gerinnung zu vermeiden, in ein mit Mäuse-EDTA Puffer (siehe 4.4 Kulturmedien und Puffer) gefülltes Reaktionsgefäß abgenommen. Die Erythrozyten, die den größten zellulären Bestandteil des Blutes (93-96 %) bilden, wurden anschließend lysiert. Hierfür wurde 1 ml EDTA Blut in 5 ml ACK-Puffer überführt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde zentrifugiert und mit PBS gewaschen.

4.13 Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Zur Analyse der zentralen und peripheren lymphoiden Organe wurden die Mäuse in einer CO₂ Kammer abgetötet. Anschließend wurden Milz, Thymus und Lymphknoten präpariert und mittels Stempel einer 1 mL Spritze durch ein 40 µM Zellsieb zerrieben. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurde der Femur entnommen und an beiden Enden eröffnet. Das Knochenmark wurde unter Zuhilfenahme einer 5 ml Spritze mit 24 Gauge (G) Kanüle mit PBS ausgespült. Folgend wurden die Erythrozyten der Milz- und Knochenmarkszellsuspension lysiert. Hierfür wurden die Zellen nach Zentrifugation in 5 ml kaltem ACK-Puffer aufgenommen. Nach zweiminütiger Inkubation wurden die Zellen bei 300 x g zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Final wurden alle Einzelzellsuspensionen bei 300 x g zentrifugiert, in 5 ml kaltem PBS aufgenommen und zur Entfernung von Knochensplintern sowie durch freigesetzte DNA entstandenen Zellaggregaten über ein 40 µm Zellsieb gegeben.

4.14 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen für die durchflusszytometrische Darstellung von dendritischen Zellen (DCs, „Dendritic Cells“)

Da durch einfaches Zerreiben ein hoher Verlust an dendritischen Zellen zu beobachten war, wurden die Organe enzymatisch verdaut. Hierfür wurde in eine 6-Well-Platte 4 mL x-vivo 15 mit 10% humanem AB Serum vorgelegt und mit 200 µl Kollagenase2 (1 mg/ mL) sowie DNase (0,1 mg/ml) supplementiert. Die Organe wurden in das Medium gelegt und mit einer Spritze wurde das Verdau-Medium in die Organe injiziert. Anschließend wurden diese grob in 5 mm große Stücke zerteilt und für 15-20 Minuten im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37° C inkubiert. Folgend wurde, um eine feinere Suspension zu erhalten, gut resuspendiert und für weitere 15-20 Minuten bei 5% CO₂ und 37° C inkubiert. Zum Verringern der Kontakte zwischen T-Zellen und DCs wurde EDTA (Endkonzentration 10 mM) zugegeben und 5 Minuten im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37° C inkubiert. Abschließend wurden die Erythrozyten mittels ACK-Puffer lysiert.

4.15 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Einzelzellen in Suspension anhand ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzmarkierungen zu unterscheiden. Hierbei werden die Zellen einzeln perlenschnurartig durch einen Laserstrahl geleitet. Größe und Granularität der zu analysierenden Zellen können durch das Vorwärtsstreulicht bzw. das Seitwärtsstreulicht unterschieden werden. Das

vom SSC („Side Scatter“) 90° zum ursprünglichen Laserstrahl detektierte Seitwärtsstreuung dient hierbei als Maß für die Granularität der Zelle. Das Vorwärtsstreuung, vom FSC („Forward Scatter“) in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls bestimmt, wird fungiert als Maß für die Größe einer Zelle. Weiter bietet die Fluoreszenzmarkierung von Oberflächen- oder intrazellulären Antigenen durch entsprechend markierte Antikörper je nach Anzahl der Laser und Detektoren des Durchflusszytometers eine große Unterscheidungsmöglichkeit vielfältigster Zelltypen.

Antikörperfärbung für die Durchflusszytometrie

Die zu analysierenden Einzelluspensionen wurden für die Färbung in eine 96-Well Spitzbodenplatte überführt. Gefärbt wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörperkombinationen in 25-50 µL PBS. Nach 10-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 4°C wurden die Zellen in der Platte bei 600 x g zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen für die Messung in 5 ml Rundboden-Röhrchen (BD, Franklin Lakes, USA) überführt.

Für die Färbung von intrazellulären Markern wurden die Zellen mittels FoxP3 Staining-Buffer Set (eBioscience) nach Anweisungen des Herstellers 30 Minuten fixiert und die Zellwände permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern für 30 Minuten in 50 µL 1x Permeabilisierungspuffer gefärbt. Nach Waschen mittels PBS wurden die Zellen in 5 ml Rundboden Röhrchen überführt und analysiert.

Zur Detektion intrazellulärer Zytokine wurden die Zellen mit Monensin Solution 1000x (BioLegend) behandelt. Bei der Detektion von Zytokinen nach Stimulation wurde der Zellkultur am Anfang der 4- bis 5-stündigen Stimulationsphase mit Ionomycin/ PMA Monensin zugegeben. Dieses Agens blockiert den Golgi-Apparat und verhindert somit, dass produzierte Zytokine sezerniert werden. Hierdurch kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation der Zytokine und diese können detektiert werden.

Messung

Für die Messung wurden die gefärbten Zellsuspensionen in PBS aufgenommen und in 5 ml Rundboden-Röhrchen (BD FALCON) überführt. Die Proben wurden mit einem FACS LSR II Durchflusszytometer der Firma BD (Franklyn Lakes, USA) analysiert. Nach Ausschluss der Dubletten wurden in der FSC/ SSC Darstellung tote Zellen und Zelltrümmer von der Analyse ausgeschlossen. Für die Auswertung der Daten wurde die FACS Diva Software verwendet.

4.16 Isolation von humanen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Es wurde eine Einzelzellsuspension aus Milzen humanisierter Mäuse nach oben (4.13) erläuterten Protokoll hergestellt. Konventionelle CD4⁺ T-Zellen und konventionelle CD8⁺ T-Zellen wurden über ihre CD4 und CD8 Expression isoliert. Regulatorische T-Zellen wurden anhand ihrer CD4 und CD25 Expression in Kombination mit einer niedrigen bis nicht vorhandenen CD127 Expression durchflusszytometrisch aufgereinigt.

4.17 Stimulation von humanen Zellen

CD4⁺ T-Zellen können *in vitro* durch Kreuzvernetzung der T-Zell-Rezeptoren (TCRs, T-Cell Receptor) mittels anti-CD3-Antikörper stimuliert werden. Für die Aktivierung naiver T-Zellen muss zusätzlich eine Kostimulation mittels anti-CD28 Antikörper erfolgen. Alternativ kann bei der Stimulation direkt in die TCR-Signalweiterleitung eingegriffen werden. Hierbei wurde durch Ionomycin (Iono) die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöht und zusätzlich mit Phorbol 12-Myristate 13-Acetat (PMA) die Proteinkinase C aktiviert. Die Stimulationen wurden versuchstypspezifisch variiert.

Versuchstyp	Stimulation
Proliferationstest, quantitative Realtime PCR,	anti-CD3 (0,5 µg/ mL) und anti-CD28 (1 µg/ mL)
Durchflusszytometrie (Zytokine und Transkriptionsfaktoren)	1 µM Ionomycin (Sigma) und 20 ng PMA (Sigma)

4.18 Isolation der Gesamt-RNA

Die Zellen wurden in 1 mL TRIzol (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen. Folgend wurden 200 µL Chloroform zugegeben, alles durch gründliches Vortexen durchmischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 15.000 x g und 4° C wurde die obere wässrige, durchsichtige Phase abgenommen und mit 1,5 µL Glykogen versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz mit 500 µL Isopropanol in p.a. Qualität versetzt und für weitere 10 Minuten inkubiert. Abschließend wurde bei 12 500 x g bei 4° C zentrifugiert und zweimal mit je 1 ml eiskaltem Ethanol (-20° C) gewaschen.

4.19 Umschreiben der mRNA in cDNA (Reverse Transkription)

Um die gesamte mRNA in cDNA umzuschreiben, wurden Oligo(dT)_n-Oligonukleotide („Primer“; Fermentas, Karlsruhe, Deutschland) in Kombination mit p(dN)₆-Oligonukleotide verwendet. Die Oligo(dT)_n-Oligonukleotide binden an den Poly(A)-Schwanz des mRNA-Moleküls und bilden dort einen Ausgangspunkt für die reverse Transkription. Die zusätzlich verwendeten Primer aus Hexanukleotiden aller theoretisch möglichen Sequenzen (p(dN)₆-Primern) führten zur Initiation der Einzelstrangsynthese an vielen Stellen der mRNA. Es wurde folgender Master-Mix angesetzt, von dem jeweils 19 µL zu dem ethanolfreien RNA-Pellet gegeben wurde.

11 µL	DEPC-H ₂ O
4 µL	5x Puffer
2 µL	dNTPs
1 µL	P(dN) ₆ (20 ng / µL)
1 µL	Oligo(dT) _n (100 ng / µL)

Zur Denaturierung der RNA wurde diese Mischung bei 56° C für 5 Minuten im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde 1 µl M-MLV RT (Reverse Transkriptase; Fermentas, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt und bei 37° C im Wasserbad eine Stunde inkubiert.

4.20 Polymerase Kettenreaktion (PCR, “Polymerase Chain Reaction”)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird durch Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation eine selektive Amplifikation der durch Oligonugleotide flankierten DNA-Sequenzen erreicht. Hierbei führt jeder Reaktionszyklus zu einer Verdopplung der Ausgangs-DNA.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich quantitative Realtime-PCRs (qRT-PCR) durchgeführt. Hierbei wurde in Triplikaten die mRNA von humanem IL-2 (Interleukin-2) unter Verwendung von SYBR Green in einem iCycler amplifiziert. Nach Normalisierung der erhaltenen Werte für IL-2 entsprechend der ermittelten Werte für das Haushalts-Gen EF1- α wurden die relativen Expressionen berechnet.

Ansatz für Triplikate (3,2-facher Ansatz)

28,8 µL	Autoklaviertes H ₂ O
40 µL	SYBR-Green (ABgene, Thermo, Karlsruhe, Deutschland)
8 µL	cDNA
3,2 µL	spezifische Oligonukleotide (Arbeitslösung 5 pM)

Oligonukleotide („Primer“)

Die Oligonukleotide zum Nachweis verschiedener cDNAs mittels qRT-PCR („Primer“) wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen und bei -20° C aufbewahrt. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 5 pM/ µL verwendet.

EF1α.for	5'-GATTACAGGGACATCTCAGGCTG-3'
EF1α.rev	5'-TATCTCTTCTGGCTGTAGGGTGG-3'
IL-2.for	5'- TTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCC -3'
IL-2.rev	5'- TTCTAGACACTGAAGCTGTTTCAGTTC -3'

4.21 Messung der Proliferation/ Suppression

Zur Darstellung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen bzw. deren Inhibition durch regulatorische T-Zellen wurden je 1-2 x 10⁴ humane CD4⁺ T-Zellen mit 0,5 µg/ mL anti-CD3-Antikörper sowie 1 µg/ mL anti-CD28 Antikörper in einer 96-Well-Rundboden-Platte in einem Gesamtvolumen von 200 µL x-vivo15 über 4 Tage stimuliert. Die Proliferation wurde über den Einbau von radioaktivem ³H-Thymidin in die DNA der sich teilenden Zellen bestimmt. Dazu wurde das Medium in den letzten 20 Stunden der Stimulation mit ³H-Thymidin versetzt. Anschließend wurde die 96-Well Platte eingefroren, um einen weiteren Einbau von ³H-Thymidin zu verhindern. Für die Messung der Proliferationsrate wurden die Platten aufgetaut und der Inhalt der einzelnen Wells wurde mittels eines Erntegerätes („Cell Harvester“) durch einen Glasfilter gesaugt, wobei die DNA auf dem Filter zurückgehalten wurde. Der Filter wurde für 2 Minuten in einer Mikrowelle bei 850 Watt getrocknet und zusammen mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit in einem Plastikbeutel eingeschweißt. Die vom radioaktiven Präparat ausgesandte beta-Strahlung wird über die Anregung von Lösungsmittelmolekülen auf einem primären Szintillator übertragen. Dieser gibt die Energie in Form

von elektromagnetischer Strahlung ab, welche von einem Szintillationszähler detektiert und als Impuls pro Minute (CPM, „counts Per Minute“) angegeben wird.

4.22 Generierung von murinen dendritischen Zellen aus Knochenmark

Der Femur der Mäuse wurde freipräpariert und an beiden Enden eröffnet. Das Knochenmark wurde unter Zuhilfenahme einer Spritze mit Kanüle in eine Petrischale mit PBS + 1 % FCS gespült und gut resuspendiert. Die Knochenmarkssuspension wurde in ein 50 mL Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 200 x g und Verwerfen des Überstandes wurden die Erythrozyten mit 1 mL 37° C warmem Gey's Lysepuffer pro Maus für 5 Minuten lysiert. Die Reaktion wurde anschließend mit mindestens der doppelten Menge PBS abgestoppt. Erneut wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden auf auf 3×10^6 Zellen pro mL in DC-Medium eingestellt, wovon jeweils 1 mL zu 3 mL reinem DC-Medium in eine 6-Well-Suspensionsplatte gegeben wurde. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch kreiselndes Schwenken gelöst und mit jeweils 3 mL des Mediums verworfen. Anschließend wurde 3 mL frisches, warmes DC-Medium vorsichtig zugegeben. Nach weiteren 48 Stunden wurde erneut 3 mL altes Medium durch frisches, warmes DC-Medium ersetzt. An Tag 6 wurden die dendritischen Zellen geerntet, bei 200 x g zentrifugiert und in entsprechendem Medium auf die benötigte Zellzahl eingestellt.

4.23 Ko-kultur von T- Zellen aus humanisierten Mäusen mit verschiedenen in vitro aus Knochenmark generiert, allogenen dendritischen Zellen

Aufgereinigte T-Zellen aus den humanisierten Mäusen wurden mit antigenpräsentierenden Zellen eines allogenen (im Bezug auf NSG) Mausstammes in einer gemischten Lymphozyten-Reaktion (MLR, „Mixed Lymphocyte Reaction“) kultiviert. Hierbei präsentieren die DCs ihre eigenen Antigene über MHC-Komplexe allogenen T-Zellen und stimulieren somit deren Proliferation, falls die Antigene von den T-Zellen als „fremd“ erkannt werden.

200.000 T-Zellen wurden zusammen mit 80.000 dendritischen Zellen in einer 96 Well Flachbodenplatte in x-vivo15 für 5 Tage kultiviert. Für die letzten 20 Stunden wurde dem Medium ³H-TdR zugegeben. Die Proliferation der T-Zellen wurde durch den Einbau des radioaktiv markierten ³H-TdR in die DNA der proliferierenden Zellen ermittelt.

4.24 DSS („Dextran Sulfate Sodium“, Natrium-Dextransulfat)-Kolitis

Zum Auslösen einer akuten DSS-Kolitis wurde dem Trinkwasser der Mäuse (autoklaviert) 2% DSS zugesetzt. Das Wasser wurde täglich ausgetauscht, um das Wachstum von Pilzen und Bakterien im Wasser zu vermeiden. Die Mäuse wurden über den gesamten Versuchszeitraum täglich kontrolliert. Das Gewicht wurde vor Versuchsstart ermittelt und während der Kolitis verfolgt.

Bei beginnender Gewichtsabnahme ($\geq 10\%$) und Einsetzen von teils blutigem Durchfall wurden die Mäuse endoskopisch untersucht und ein Kolitis-„Score“ ermittelt. Hierbei wurden jeweils Werte von 0-3 für die Kriterien Durchsichtigkeit der Darmwand, Stuhl, Granularität, Vaskularität und das Vorhandensein von Fibrin vergeben und ein Gesamtwert ermittelt. 0 steht in diesem Zusammenhang für ein unverändertes/ gesundes und 3 für stark verändertes Merkmal.

4.25 Tumormodell

Den humanisierten Mäusen wurden subkutan 1×10^6 Tumorzellen in 50 μ l PBS in die Flanken injiziert. Hierbei handelt es sich um Zellen eines primären Pleomorphen Sarkoms NOS („not other specified“) G3 (nach American Joint Committee on Cancer), die zuvor in Kultur gebracht wurden. Der Durchmesser des Tumors wurde fortlaufend gemessen.

4.26 Immunhistochemie

Nach Präparation der zu untersuchenden Organe wurden diese mit PBS gespült und zur Fixierung in ein 15 ml Röhrchen mit 4 % Histofix überführt. HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) sowie spezifische Antikörperfärbungen wurden von der Core Facility Histologie des FZI Mainz (Forschungszentrum Immunologie Mainz) der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

4.27 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte via T-Test mittel Prism (GraphPad für Mac). P-Werte über 0,05 wurden hierbei als nicht signifikant (ns), P-Werte kleiner oder gleich 0,05 als signifikant(*), P-Werte kleiner oder gleich 0,01 als signifikanter (**) und P-Werte kleiner oder gleich 0,001 als hochsignifikant (***) angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Generierung von humanisierten Mäusen

5.1.1 Isolation humaner hämatopoetischer Stammzellen aus Nabelschnurblut

Die für die Rekonstitution benötigten humanen hämatopoetischen Stammzellen (HSC: „Hematopoietic Stem Cell“) wurden aus Nabelschnurblut angereinigt. Der Anteil der HSCs an den mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes vor der Isolation (Abbildung 6A) sowie die Reinheit der isolierten HSCs (Abbildung 6B) wurden durchflusszytometrisch überprüft. Die HSCs wurden anhand der Expression des Oberflächen-Glykoproteins CD34 detektiert. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, dass keine Verunreinigung mit T-Zellen nachzuweisen war, da dies die Gefahr einer Graft versus Host Reaktion (GvHD: „Graft versus Host Disease“) birgt. T-Zellen wurden hierbei anhand der Expression von CD3 detektiert.

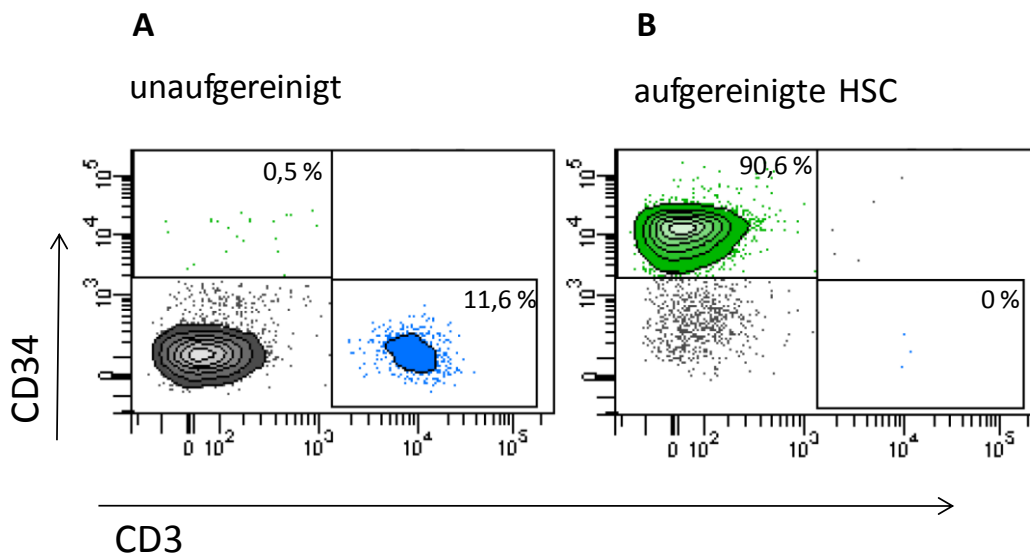


Abbildung 6: Isolation der HSCs. Der Anteil von HSCs vor und nach Isolation wurde mittels Durchflusszytometrie über die Expression von CD34 ermittelt. Eine Kontamination mit T- Zellen, die anhand ihrer CD3 Expression im Durchflusszytometer detektiert wurden, lag bei den isolierten HSCs nicht vor.

Vor der Isolation aus Nabelschnurblut lag der Anteil von CD34⁺ Zellen bei $\leq 1\%$ (Abbildung 6A) und erreichte nach der Isolation einen Wert $\geq 90\%$. Die isolierten HSCs waren frei von CD3⁺ T-Zellen (Abbildung 6B). Die HSCs wurden bis zu ihrer Verwendung tiefgefroren.

5.1.2 Rekonstitution von NSG Mäusen mit humanen HSC

Für die Generierung humanisierter Mäuse wurden 4-12 Wochen alte NSG Mäuse (NOD-scid IL2Rgamma^{null}) mit 1,0 Gray subletal bestrahlt. Nach einer Erholungsphase von 4-24 Stunden wurden die Mäuse mit 1×10^5 frisch aufgetauten HSCs rekonstituiert (Abbildung 7).

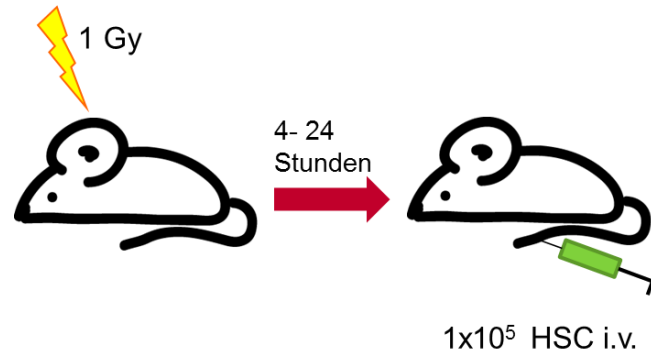


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung humanisierter Mäuse. NSG Mäuse wurden subletal bestrahlt. Nach einer 4-24stündigen Erholungsphase wurden 1×10^5 humane hämatopoetische Stammzellen intravenös appliziert.

Um nachzuvollziehen, ob die HSCs ihren Platz in den freigewordenen Nischen des Knochenmarks der bestrahlten NSG eingenommen hatten, wurde nach 16 Wochen das Knochenmark auf die Anwesenheit humaner $CD34^+$ Zellen hin untersucht. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass das CD34 Antigen auch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird.

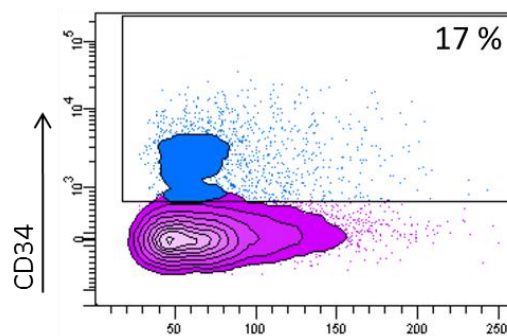


Abbildung 8: Humane $CD34^+$ Zellen konnten im Knochenmark HSC- transplantierter Mäuse detektiert werden. Aus dem Knochenmark des Femurs humanisierter Mäuse wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein des Oberflächenantigens CD34 hin untersucht. Dargestellt ist die CD34 Expression in humanen $CD45^+$ Zellen.

Aus Abbildung 8 wird ersichtlich, dass es sich bei etwa 17 % der humanen Zellen im Knochenmark um humane $CD34^+$ Zellen handelte.

5.2 Analyse des humanen Immunsystems in der humanisierten Maus

5.2.1 Humanisierungsstatus des Blutes

Das CD45-Antigen ist ein membranständiges Protein, das auf allen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme von Thrombozyten und Erythrozyten vorkommt⁸⁸. Es eignet sich daher gut als Marker für Leukozyten. Zur Überprüfung des Anteils humaner Leukozyten wurde den Mäusen an verschiedenen Zeitpunkten Blut aus der Schwanzvene entnommen und durchflusszytometrisch auf den Anteil von humanem im Vergleich zu murinem CD45 Antigen exprimierenden Zellen untersucht. Hierbei wurde der Humanisierungsgrad als Anteil von humanen CD45⁺ Zellen an den Gesamt-CD45⁺ Zellen (Maus + Human) im Mausblut bestimmt (Abbildung 9). Ungefärbte, nicht lysierte Erythrozyten und Thrombozyten wurden hierbei nicht berücksichtigt.

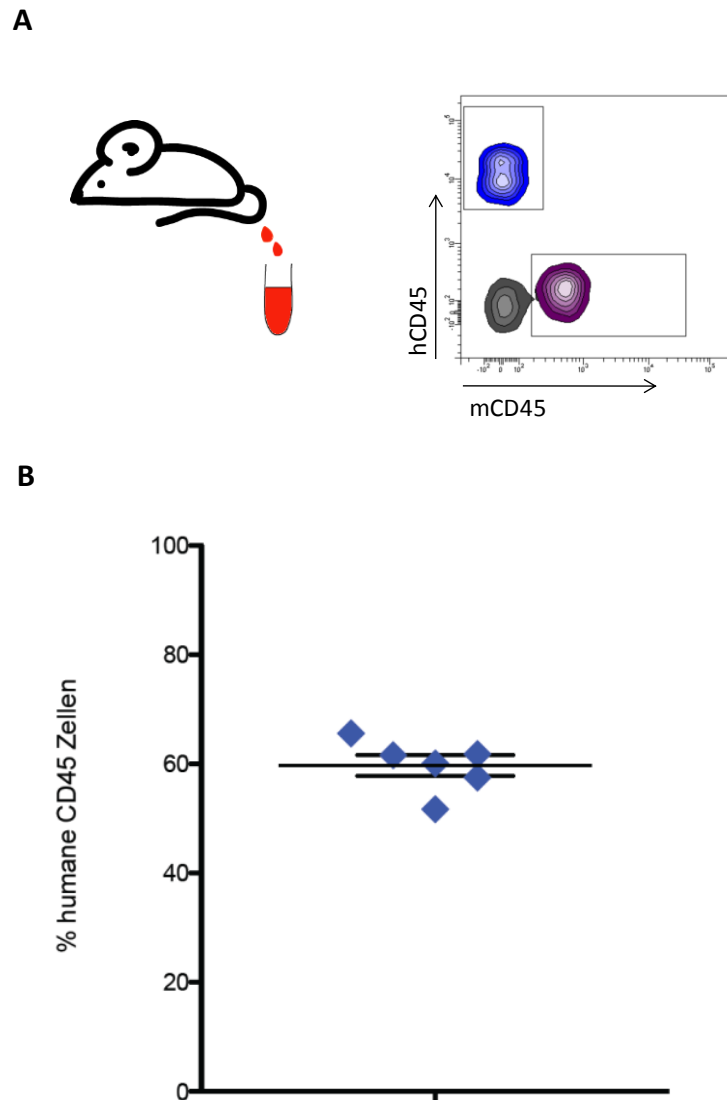


Abbildung 9: Bestimmung des Humanisierungsstatus. Blut humanisierter Mäuse wurde durchflusszytometrisch untersucht (A). Hierbei wurde der Anteil humaner Leukozyten über einen fluoreszenzgekoppelten, für humanes CD45 spezifischen Antikörper detektiert (hCD45). Murine Leukozyten wurden über fluoreszenzmarkierten CD45.1 Antikörper (mCD45) sichtbar gemacht. Bei den ungefärbten Zellen handelt es sich vorwiegend um nicht lysierte Erythrozyten. Abbildung B zeigt den Anteil humaner Zellen einer Gruppe weiblicher Tiere 27 Wochen nach Rekonstitution mit humanen HSCs. Der Anteil humaner CD45⁺ Zellen lag hier durchschnittlich bei 60%.

Der Anteil humaner Zellen an den Zellen des Blutes der Maus betrug 27 Wochen nach Rekonstitution mit humanen HSCs durchschnittlich 60% (Abbildung 9).

5.2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede des Humanisierungsstatus

Es ist bekannt, dass geschlechtsspezifische Faktoren einen Einfluss auf die Rekonstitution von Immunzellen in Mäusen haben können⁸⁹. Aufgrund dessen wurde im nächsten Schritt der Anteil

humaner Zellen von weiblichen und männlichen Tieren in einer Gruppe zum gleichen Zeitpunkt rekonstituierter Tiere untersucht.

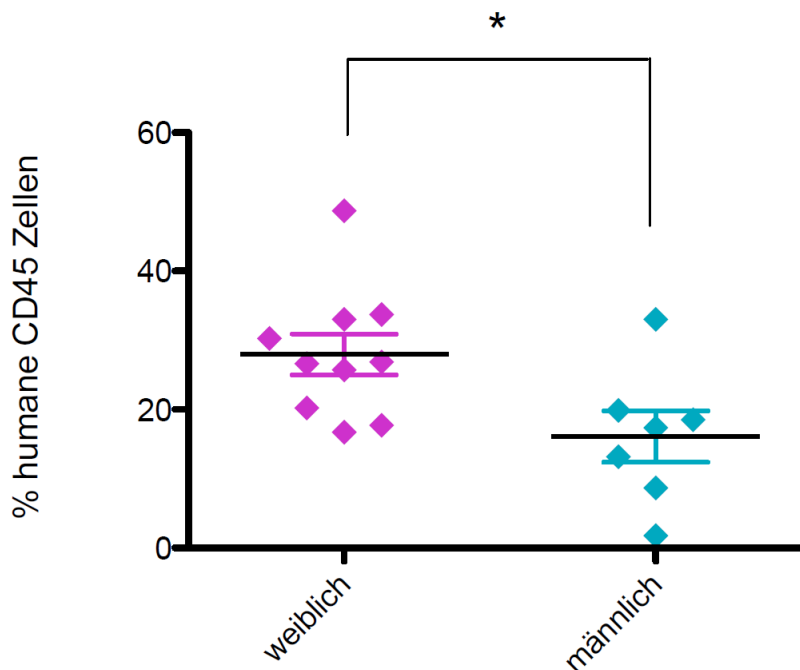


Abbildung 10: Signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied im Anteil humaner Zellen im peripheren Blut. Männlichen und weiblichen humanisierten Mäusen wurde venöses Blut entnommen und durchflusszytometrisch auf den Anteil humaner Zellen hin untersucht. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet. Der Anteil humaner Zellen lag bei den weiblichen Tieren signifikant höher als bei den männlichen Tieren.

Im direkten Vergleich zeigt sich ein signifikanter, geschlechtsspezifischer Unterschied. Weibliche Tiere wiesen 28 Wochen nach Rekonstitution einen 1,75fach höheren Anteil humaner Zellen im peripheren Blut auf. Aufgrund dieser Tatsachen wurden in anschließenden Experimenten vorzugsweise weibliche Tiere verwendet.

5.2.3 Temporäre Veränderung des Humanisierungsstatus

Als nächstes sollte der optimale Zeitpunkt zur Analyse des humanen Immunsystems bestimmt werden. Hierfür wurde den humanisierten Mäusen zu den indizierten Zeitpunkten Blut entnommen und daraus durchflusszytometrisch der Anteil humaner Leukozyten (hCD45⁺ Zellen) bestimmt.

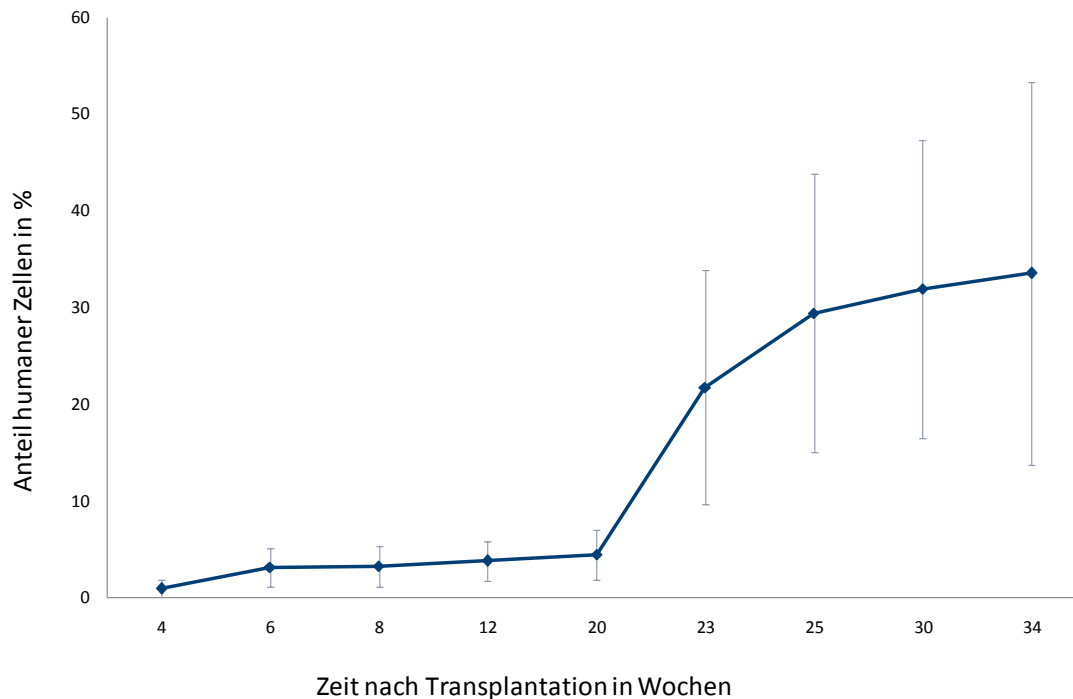


Abbildung 11: Zeitliche Veränderung des Anteils humaner Zellen im peripheren Blut. Humanisierten Mäusen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Rekonstitution mit humanen HSCs Blut aus der Schwanzvene entnommen und durchflusszytometrisch auf den Anteil von humanen CD45⁺ Zellen untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung (n=5).

Der Anteil humaner Zellen im peripheren Blut nimmt mit der Zeit zu. Ab 4 Wochen nach Rekonstitution konnten die ersten humanen Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Mit Beginn der 20. Woche nach Humanisierung war ein deutlicher Anstieg der Population humaner Zellen im peripheren Blut feststellbar (Abbildung 11). Folgend blieb der prozentuale Anteil humaner Zellen konstant hoch. Ein Absinken des Anteiles humaner Zellen im Blut konnte bis zu einem Zeitpunkt von 34 Wochen nach Rekonstitution nicht beobachtet werden. Für weiterführende Analysen wurden aufgrund dieser Daten Mäuse zwischen 20 und 30 Wochen nach Rekonstitution mit humanen HSCs verwendet.

5.2.4 Humanisierung in den zentralen und peripheren lymphoiden Organen

5.2.4.1 Makroskopische Analyse der zentralen und peripheren lymphoiden Organe

Neben dem Anteil humaner Zellen im peripheren Blut der humanisierten Mäuse wurde auch der Anteil humaner Zellen in den lymphoiden Organen untersucht. Hierfür wurden Mäuse 20 bis 30 Wochen nach Rekonstitution abgetötet, Milz, Thymus und Lymphknoten entnommen und zunächst

die Größen der Organe in unrekonstituierten NSG, wildtypischen BALB/cJ und humanisierten NSG verglichen.

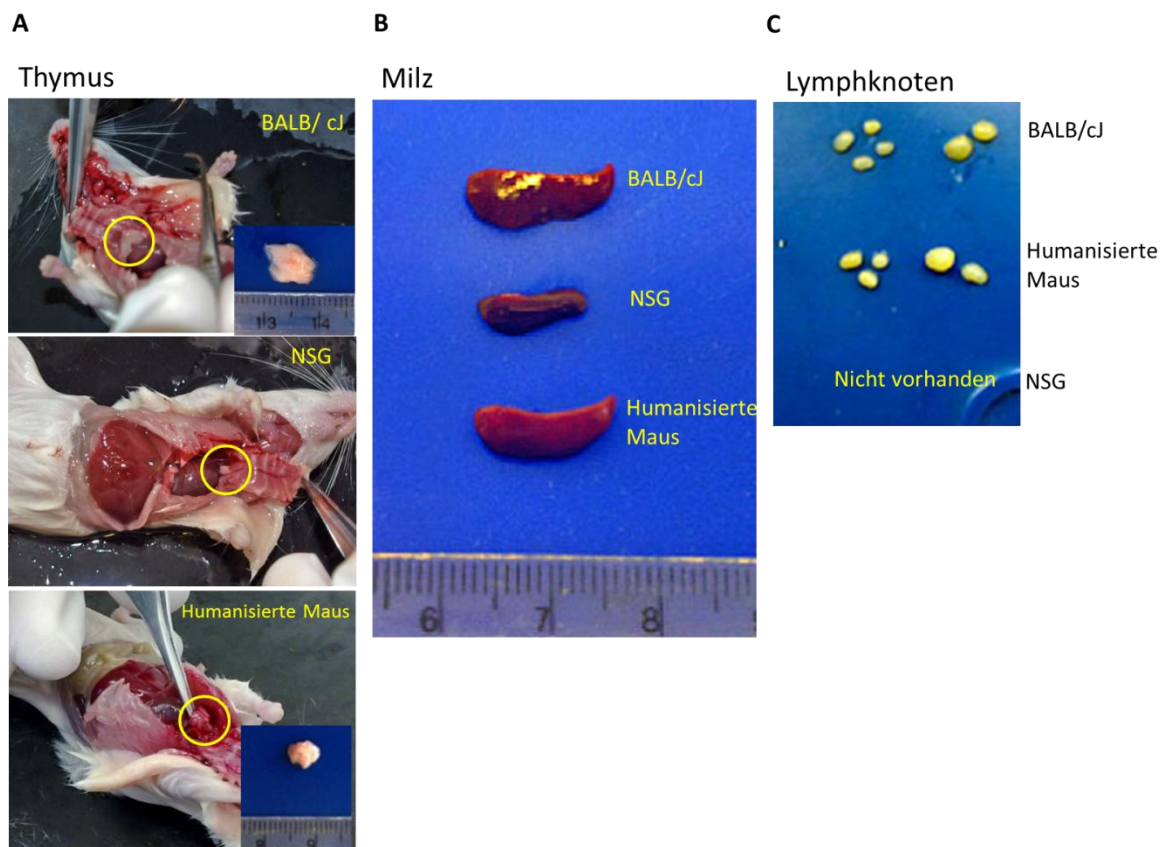


Abbildung 12: Humanisierung der zentralen und peripheren lymphoiden Organe. 4 Wochen alte BALB/cJ Mäuse, 8 Wochen alte unrekonstituierte NSG-Mäuse und humanisierte Mäuse 20-30 Wochen nach Rekonstitution wurden abgetötet und deren lymphoide Organe entnommen. Es zeigte sich eine deutliche Größenzunahme von Thymus (A), Milz (B) und Lymphknoten (C) nach der Rekonstitution.

Alle untersuchten Organe zeigten deutliche Größenzunahmen in Folge der HSC-Transplantation (Abbildung 12). Lymphknoten konnten in NSG-Mäusen nicht bzw. nur rudimentär detektiert werden. Nach erfolgreicher Rekonstitution zeigte sich die Größe der Lymphknoten (Abbildung 12C) vergleichbar mit der wildtypischer BALB/cJ Mäuse. Auch der vor der Humanisierung nur rudimentär entwickelte Thymus nahm nach Rekonstitution deutlich an Größe zu (Abbildung 12A), blieb aber dennoch hinter der Größe eines BALB/cJ Thymus zurück. Die Milzen der humanisierten Mäuse wuchsen annähernd auf die Größe von BALB/cJ Milzen an (Abbildung 12B).

5.2.5 Anteil humaner Zellen in den lymphoiden Organen

Weiter wurden der Anteil humaner Zellen hämatopoetischen Ursprungs in Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark bestimmt. Hierfür wurden Einzelzellsuspensionen der jeweiligen

Organe hergestellt. Diese wurden durchflusszytometrisch auf den Anteil humaner und muriner CD45⁺ Zellen untersucht.

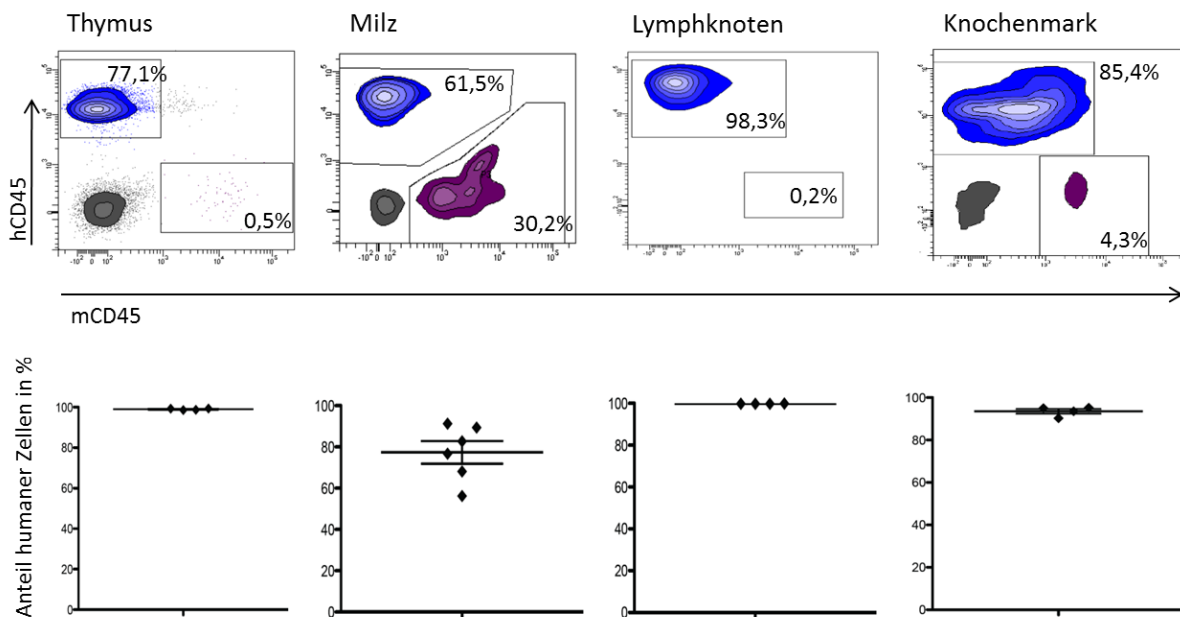


Abbildung 13: Humane Zellen in zentralen und peripheren lymphoiden Organen. Die Mäuse wurden 26 Wochen nach der Rekonstitution mit humanen HSCs abgetötet und Einzelzellsuspensionen aus Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark hergestellt. Mittels fluoreszenzmarkierten humanem CD45 (hCD45) und murinem CD45.1-Antikörpern (mCD45) wurde durchflusszytometrisch der Anteil humaner Zellen hämatopoetischen Ursprungs an der Gesamtheit hämatopoetischer Zellen in den entsprechenden Organen bestimmt.

Die lymphoiden Organe (Thymus, Knochenmark, Milz und Lymphknoten) weisen aufgrund der Rekonstitution einen sehr hohen Anteil humaner Zellen auf. Konkret zeigten Thymus und Lymphknoten einen Anteil von ca. 99% humaner Zellen auf. Dies wurde bereits durch die massive Größenzunahme in Folge der Transplantation humaner HSCs impliziert (Abbildung 12). Milz und Knochenmark enthielten ebenfalls einen hohen Anteil humaner Zellen (Milz: ca. 80%, Knochenmark: ca. 95%), jedoch auch einen Anteil an murinen Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Der Humanisierungsstatus ist somit abhängig vom betrachteten Organ.

5.2.6 Humane hämatopoetische Zelltypen in der humanisierten Maus

Neben dem allgemeinen Vorhandensein humaner CD45⁺ Zellen in den mit humanen HSCs rekonstituierten Mäusen, waren die entstehenden hämatopoetischen Zelltypen in diesem Humanisierungsansatz von besonderem Interesse. Da für eine Immunreaktion Interaktionen verschiedener Immunzellen stattfinden müssen, wurden auch Interaktionspartner von T-Zellen, wie

die B-Zellen und DCs, aber auch Zellen des angeborenen Immunsystems untersucht. Hierfür wurde entweder peripheres Blut entnommen oder Einzelzellsuspensionen von Milz, Thymus, Lymphknoten und Knochenmark hergestellt. Die einzelnen Zelltypen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern identifiziert (Abbildung 14).

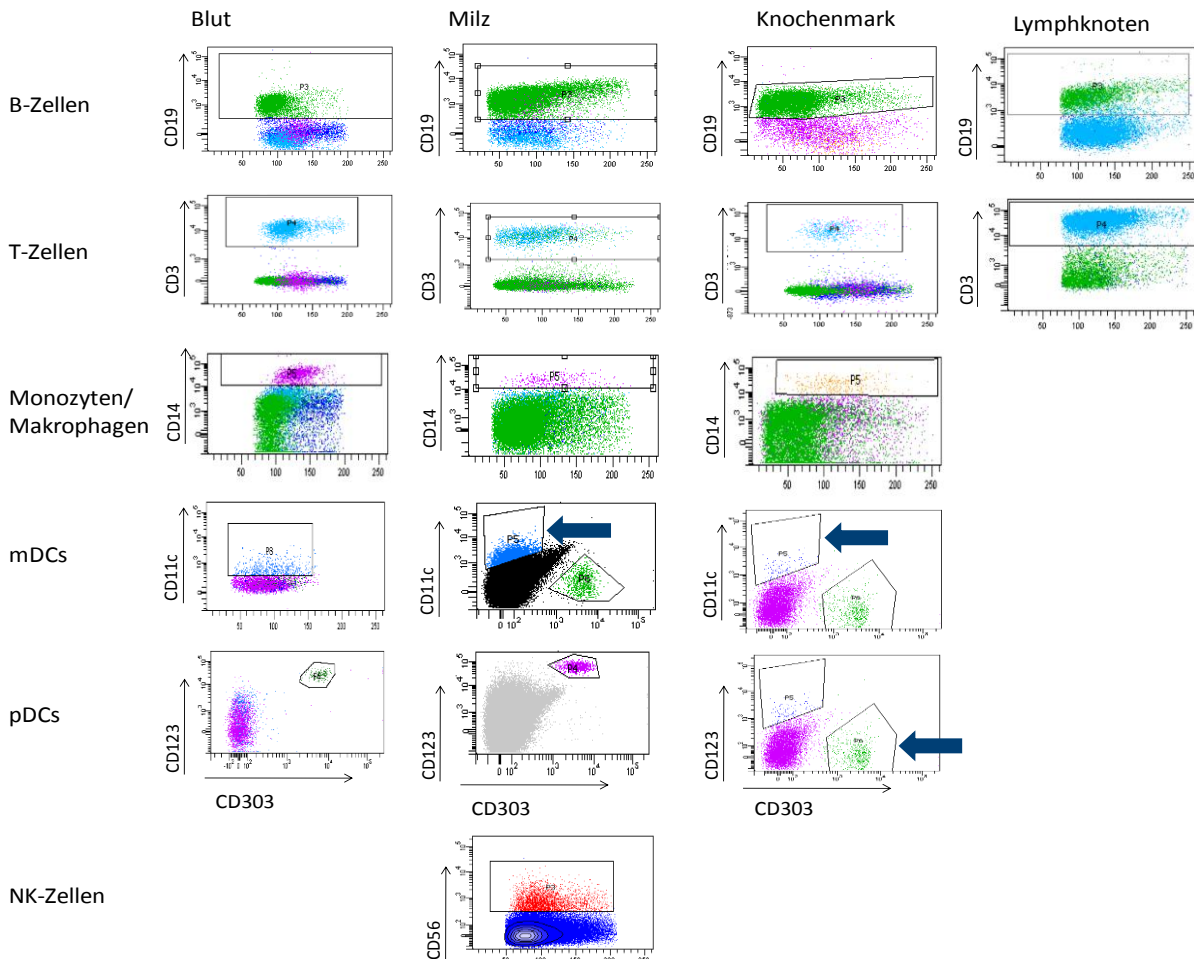


Abbildung 14: Nachweis verschiedener Zelltypen im Blut und in den lymphoiden Organen. Humanisierte Mäuse wurden 20-30 Wochen nach Rekonstitution abgetötet und Blut, Milz, Knochenmark und Lymphknoten entnommen und jeweils Einzelzellsuspensionen hergestellt. Anschließend wurden verschiedene Zellpopulationen durchflusszytometrisch nachgewiesen. Hierbei wurde der Anteil der jeweiligen Population an den humanen CD45⁺ Zellen dargestellt. Die Abbildung zeigt jeweils eine repräsentative Färbung pro Zelltyp und Organ. B-Zellen wurden über CD19, T-Zellen über CD3, Monozyten/ Makrophagen über CD14, mDCs über CD11c kombiniert mit HLA-DR, pDCs über CD123 mit CD303 und NK-Zellen über CD56 Expression detektiert.

In humanisierten Mäusen entwickelt sich eine Vielzahl verschiedener Immunzellen aus den transplantierten humanen HSCs. Diese waren sowohl im peripheren Blut als auch in den lymphoiden Organen nachweisbar (Abbildung 14), so dass von keiner Beeinträchtigung des „Homings“ ausgegangen werden kann. B-Zellen, die über CD19 detektiert wurden, waren im Blut, in den Lymphknoten, der Milz und im Knochenmark vorhanden. CD3⁺ T-Zellen, die im Folgenden im Fokus

standen, waren ebenfalls im Blut und in allen hier untersuchten Organen zu finden. Weiter konnte das Vorhandensein von Monozyten/ Makrophagen über deren CD14 Expression gezeigt werden. Das Vorhandensein myeloider dendritischer Zellen (mDCs) wurde anhand ihrer CD11c Expression detektiert und durch Ko-Expression von HLA-DR verifiziert. Plasmazytoide dendritische Zellen konnten über eine Kombination von CD123 mit CD303 in den peripheren lymphoiden Organen sowie im Blut nachgewiesen werden. Auch die Entstehung humaner NK-Zellen konnte anhand der CD56 Expression in der Milz humanisierter Mäuse dargestellt werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl humaner Immunzellen, sowohl der adaptiven als auch der angeborenen Immunität zugehörige, in dem humanisierten Mausmodell entstehen.

5.2.7 Veränderung des prozentualen Anteiles von B- und T-Zellen mit der Zeit

Da im Zuge dieser Arbeit vor allem T-Zellen, speziell regulatorische T-Zellen, in diesem Humanisierungsmodell untersucht werden sollten, wurde die Entwicklung des T-Zell-Anteils im peripheren Blut über einen Zeitraum von 34 Wochen untersucht. Dieser wurde mit dem Anteil der B-Zellen sowie Monozyten, die zusammen den größten Anteil der humanen Blutzellen in der humanisierten Maus bilden, verglichen. Hierfür wurde den Mäusen zu den in Abbildung 15 indizierten Zeitpunkten peripheres Blut entnommen und durchflusszytometrisch untersucht.

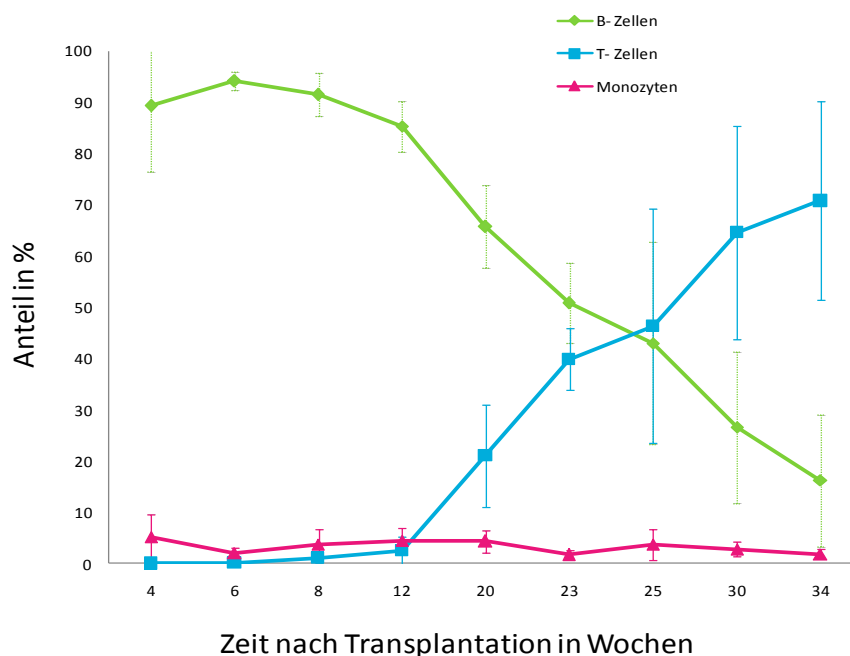


Abbildung 15: Veränderung des prozentualen Anteils von B- und T-Zellen im peripheren Blut. Mäusen wurde zwischen 4 und 34 Wochen nach Rekonstitution mit humanen HSCs Blut aus der Schwanzvene entnommen und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD3⁺ T-Zellen (blau), der CD19⁺ B-Zellen (grün) und der CD14⁺ Monozyten (magenta) im peripheren Blut zu den angegebenen Zeitpunkten. Abgebildet sind die jeweiligen Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung (n=5).

Ab 4 Wochen nach Rekonstitution konnten die ersten humanen CD45⁺ Zellen im Blut detektiert werden. Hierbei handelte es sich neben den Monozyten (Abbildung 15, magenta) zum überwiegenden Teil um CD19⁺ B-Zellen (Abbildung 15, grün) ($\geq 90\%$ der humanen CD45⁺ Zellen). T-Zellen (Abbildung 15, blau) konnten 4 Wochen nach der Transplantation der HSC nicht detektiert werden. Der Anteil der Monozyten/ Makrophagen blieb über den untersuchten Zeitraum konstant bei unter 10%. Deutliche Unterschiede zeigen sich bei der Betrachtung der Anteile an B- und T-Zellen zwischen frühen (≤ 12 Wochen) und späten (≥ 30 Wochen) Zeitpunkten nach Rekonstitution. Die B-Zellen waren unter den ersten vorhandenen humanen Zellen im peripheren Blut und bildeten bis zu 23 Wochen nach Transplantation den Großteil humaner Leukozyten. Die ersten T-Zellen zeigten sich ab 12 Wochen nach Rekonstitution. Betrachtet man den gesamten Zeitraum, dann nahm der prozentuale Anteil der T-Zellen an den humanen CD45⁺ Zellen kontinuierlich zu, während der Anteil der B-Zellen stetig abnahm. 25 Wochen nach Rekonstitution waren in den humanisierten Mäusen äquivalente T- und B-Zell-Anteile vorhanden. Nach 34 Wochen überwog der Anteil humaner T-Zellen deutlich. Für die weitere Analyse humaner T-Zellen wurden hierauf basierend Mäuse ab 23 Wochen nach Rekonstitution verwendet.

5.3 T-Zell-Entstehung in der humanisierten Maus

5.3.1 Humane T-Zellen entstehen im murinen Thymus humanisierter Mäuse

Um die T-Zellen der humanisierten Maus genauer zu charakterisieren, wurde zunächst ihre Entwicklung im Thymus untersucht. Da NSG-Mäuse keine eigenen reifen T-Zellen haben, sind alle aus dem Thymus auswandernden T-Zellen humanen Ursprungs. Dass humane T-Zellen in den humanisierten Mäusen prinzipiell existierten, konnte bereits durch Analysen der Peripherie gezeigt werden (Abbildung 14 und Abbildung 15). Auch dass die Thymi einen hohen Anteil humaner Zellen enthalten, wurde gezeigt (Abbildung 12). Diese humanen Zellen wurden folgend durchflusszytometrisch in Thymuseinzelzellsuspensionen untersucht. Der Anteil von Zellen, welche den T-Zell Rezeptor (CD3) exprimieren wurde, bestimmt. Weiter wurde der Anteil anderer, möglicherweise bei den Selektionsprozessen im Thymus beteiligter hämatopoetischer Zellen analysiert.

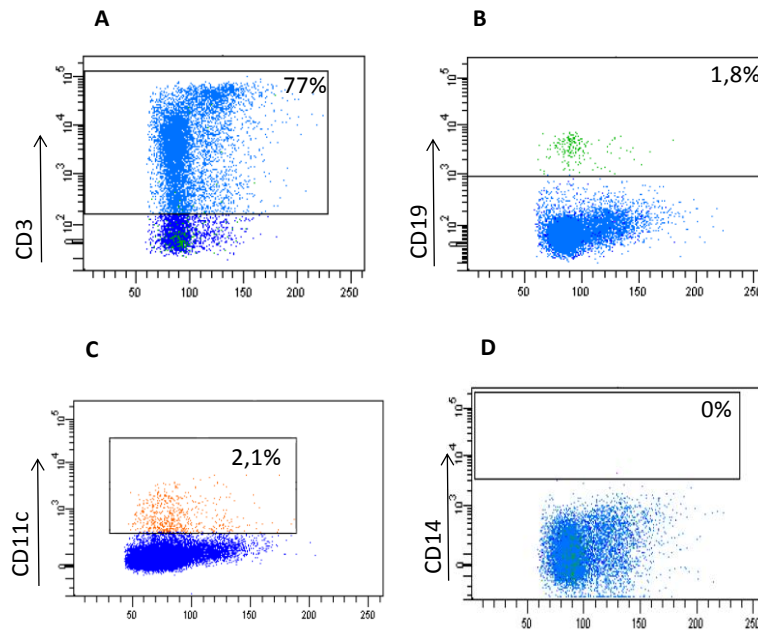


Abbildung 16: humane Zellpopulationen im Thymus. Die Mäuse wurden 25-30 Wochen nach Rekonstitution abgetötet und Einzelzellsuspensionen der Thymi hergestellt. Diese wurden durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Färbung. Der Anteil von T-Zellen an den humanen Zellen im Thymus wurde mittels CD3 Expression ermittelt. Der B-Zell-Anteil wurde über die Expression des CD19 Antigens und der Anteil myeloider dendritischer Zellen über deren CD11c Expression detektiert. Monozyten bzw. Makrophagen wurden über die CD14 Expression detektiert.

Der größte Teil der humanen Zellen im Thymus (70%) exprimiert verschieden stark den für T-Zellen charakteristischen Oberflächenmarker CD3 (Abbildung 16 A). Zu den nicht CD3 exprimierenden Thymus-Zell-Populationen humanen Ursprungs gehören neben den CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T-Zell-Vorläufern auch B-Zellen (Abbildung 16 B) und CD11c⁺ mDCs (Abbildung 16 C). CD14⁺ Monozyten/ Makrophagen konnten nicht detektiert werden (Abbildung 16 D).

5.3.2 T-Zell-Reifung im murinen Thymus humanisierter Mäuse

Für den humanen Thymus ist bekannt, dass der größte Anteil der CD3⁺ Zellen zur CD4⁺CD8⁺ doppelpositiven (DP) Population gehört und diese somit den mit Abstand größten Teil der heranreifenden T-Zellen bilden. Die im murinen Thymus entstandenen humanen T-Zellen wurden auf den Anteil CD4⁺ und CD8⁺ einzelpositiver Zellen bzw. den Anteil CD4⁺CD8⁺ doppelpositiver T-Zellen (DP) hin untersucht, um eine Aussage über die Entwicklung der humanen T-Zellen im Thymus treffen zu können.

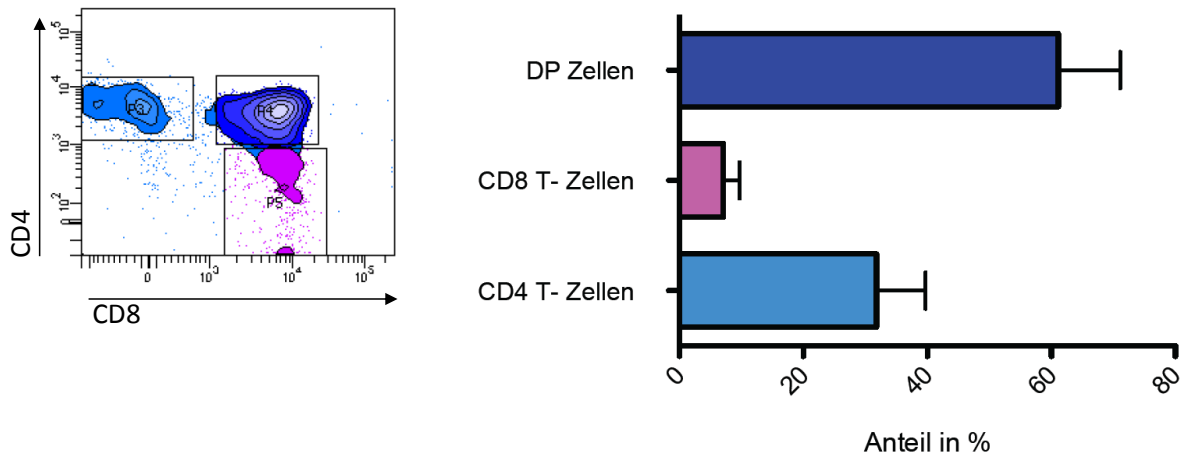


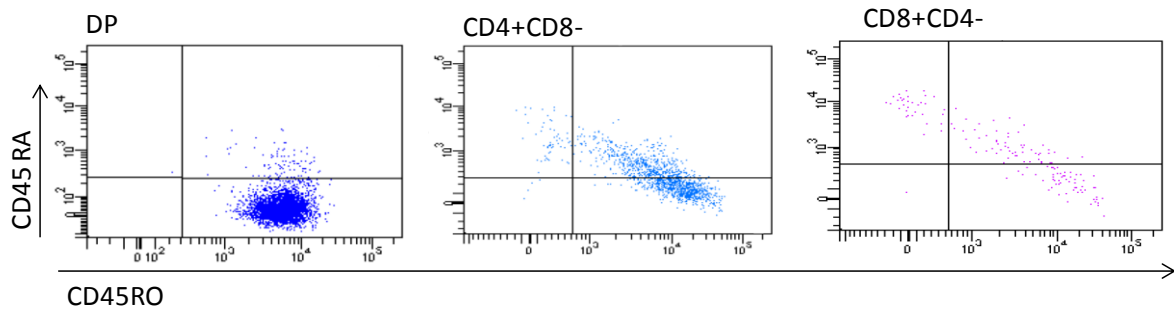
Abbildung 17: Verteilung der T-Zellen im Thymus humanisierter Mäuse. Einzelzellsuspensionen von Thymi humanisierter Mäuse wurden hergestellt und mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gefärbt. Dargestellt ist die Färbung von CD4 gegen CD8. 68,1% der humanen CD3⁺ Zellen im Thymus waren CD4 CD8 doppelt positiv. CD4 einzelpositive T-Zellen waren 3,5x mehr als CD8 einzelpositive T-Zellen im Thymus vertreten.

Ähnlich wie für den gesunden humanen Thymus beschrieben, war der größte Teil ($\geq 60\%$) der humanen CD3⁺ Thymozyten CD4 und CD8 doppelt positiv (Abbildung 17). CD4⁺CD8⁻ und CD8⁺CD4⁻ einzelpositive T-Zellen konnten ebenfalls detektiert werden. Der Anteil der CD4⁺CD8⁻ T-Zellen lag mit $\geq 25\%$ höher als der der CD8⁺ CD4⁻ T-Zellen (≥ 7). Verglichen mit den für den humanen Thymus bekannten Werten, liegt im murinen Thymus der humanisierten Mäuse ein höherer Anteil CD4 und CD8 einzelpositiver Zellen vor. Der Anteil doppelt negativer Thymozyten lag bei unter 1%.

5.3.3 Expression von CD45RA und CD45RO im Thymus

Verschiedene Spliceformen des CD45 Antigens werden auf hämatopoetischen Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Differenzierung und Aktivierung exprimiert. T-Zellen zeigen nach ihrer Positiv-Selektion im Thymus zunächst einen aktivierten/ Gedächtnis-Phänotyp (CD45RO⁺ CD45RA⁻). Erst unmittelbar vor Verlassen des Thymus verlieren sie diesen und migrieren aus dem Thymus als CD45RA⁺ naive T-Zellen²³. Um diese Entwicklung bei den in den humanisierten Mäusen entstehenden T-Zellen nachzuvollziehen, wurden die CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁺ Thymozyten der humanisierten Mäuse auf die Expression der CD45RA und CD45RO Isoformen hin untersucht.

A



B

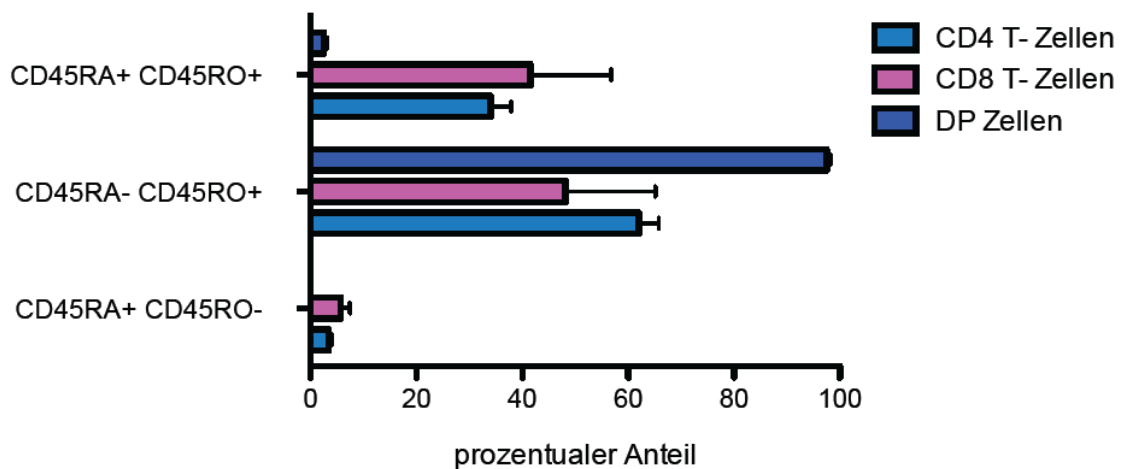


Abbildung 18: Expression von CD45RA und CD45RO im Thymus. Es wurden Einzelzellsuspensionen von Thymi humanisierter Mäuse hergestellt und durchflusszytometrisch $CD4^+CD8^+$, $CD4^+CD8^-$ und $CD4^-CD8^+$ Thymozyten auf die Expression verschiedener CD45 Isoformen hin untersucht. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Färbung (Abbildung A) und der durchschnittliche prozentuale Anteil der jeweiligen Zellen mit entsprechender Standardabweichung (Abbildung B).

Die doppelpositiven ($CD4^+CD8^+$) T-Zellen im Thymus humanisierter Mäuse zeigten überwiegend einen Gedächtnis-Phänotyp ($CD45RA^-CD45RO^+$). Bei den einzelpositiven ($CD4^+CD8^-$ und $CD8^+CD4^-$) T-Zellen wurde teilweise auch die $CD45RA^+$ Isoform exprimiert. 97,5% der $CD4^+CD8^+$ T-Zellen zeigten sich $CD45RA^-CD45RO^+$ (aktivierten/ Gedächtnis-Phänotyp). Ein geringer Anteil der doppelpositiven Zellen im Thymus präsentierte sich als $CD45RO^+CD45RA^+$ (2,5%). $CD45RO^-CD45RA^+$ (naiver Phänotyp) T-Zellen konnten in dieser Population nicht detektiert werden. Bei den $CD4^+CD8^-$ und $CD4^-CD8^+$ einzelpositiven T-Zellen im Thymus dominiert ebenfalls die Expression der $CD45RO$ Isoform. Der größere Anteil dieser Zellen zeigte einen $CD45RO^+CD45RA^-$ Gedächtnis-Phänotyp. Ein Anteil von $CD45RO^+CD45RA^+$ T-Zellen konnte im Thymus der humanisierten Mäuse bei beiden einfachpositiven Populationen detektiert werden. Anders als bei den doppelpositiven T-Zell-Vorläufern wurde hier jeweils auch ein Anteil naiver $CD45RO^-CD45RA^+$ Zellen festgestellt. Dieser Anteil lag bei den $CD8$ einzelpositiven Zellen bei 5,7 % und bei den $CD4$ einzelpositiven Zellen bei 3,5 %.

5.4 Regulatorische T-Zellen (Treg) im Thymus

Der größte und wichtigste Teil der regulatorischen T-Zellen, die natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (nTregs), entstehen im Thymus. Folgend wurden im Thymus humanisierter Mäuse humane regulatorische T-Zellen analysiert. Untersucht wurde der Anteil regulatorischer T-Zellen an den CD4⁺CD8⁻ T-Zellen. Die Tregs wurden anhand der Expression der IL-2 Rezeptor α -Kette in Kombination mit dem Transkriptionsfaktor FOXP3 detektiert (Abbildung 19 A). Um Tregs sicher von CD25 exprimierenden T-Zellen unterscheiden zu können, wurde zusätzlich die Expression der IL-7 Rezeptor α -Kette, CD127, betrachtet (Abbildung 19 B). Hierbei exprimieren regulatorische T-Zellen kein oder nur in sehr geringem Ausmaß CD127.

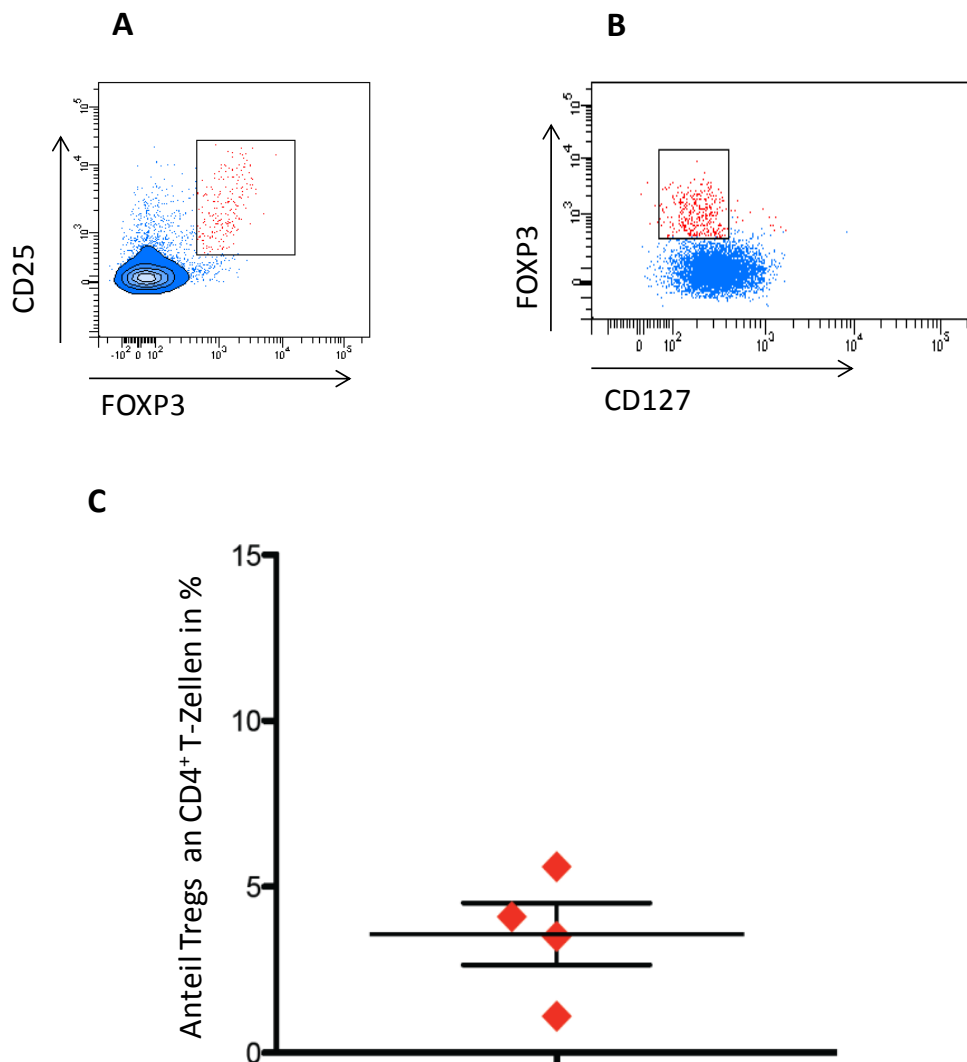


Abbildung 19: Humane regulatorische T-Zellen im Thymus humanisierter Mäuse. Thymi humanisierter Mäuse wurden präpariert. Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt und mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern (CD4, CD8, CD25, FoxP3, CD127) markiert. Regulatorische T-Zellen wurden mittels CD25 und FOXP3 Expression in den CD4⁺ einzelpositiven Zellen detektiert (A) und mittels niedriger CD127 Expression verifiziert (B).

Im Thymus humanisierter Mäuse sind regulatorische T-Zellen vorhanden. Der Anteil der humanen $CD4^+ FOXP3^+ CD127^-$ Tregs an den $CD4^+ CD8^-$ T-Zellen im Thymus der humanisierten Mäuse lag durchschnittlich bei 3,5 %.

5.4.1 Helios Expression auf humanen regulatorischen T-Zellen im Thymus

Die humanen regulatorischen T-Zellen setzen sich aus zwei Hauptgruppen zusammen, den im Thymus entstandenen Helios exprimierenden nTregs und den in der Peripherie induzierten Helios⁻ iTregs. Obwohl neuere Publikationen eine transiente Helios Expression in induzierten Tregs beschreiben⁶⁵, ist Helios der zur Zeit beste verfügbare Marker für die Unterscheidung zwischen diesen beiden Treg-Subgruppen. Aufgrund dessen wurden folgend die im Thymus entstandenen natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (nTreg) anhand der Expression des Transkriptionsfaktors Helios identifiziert.

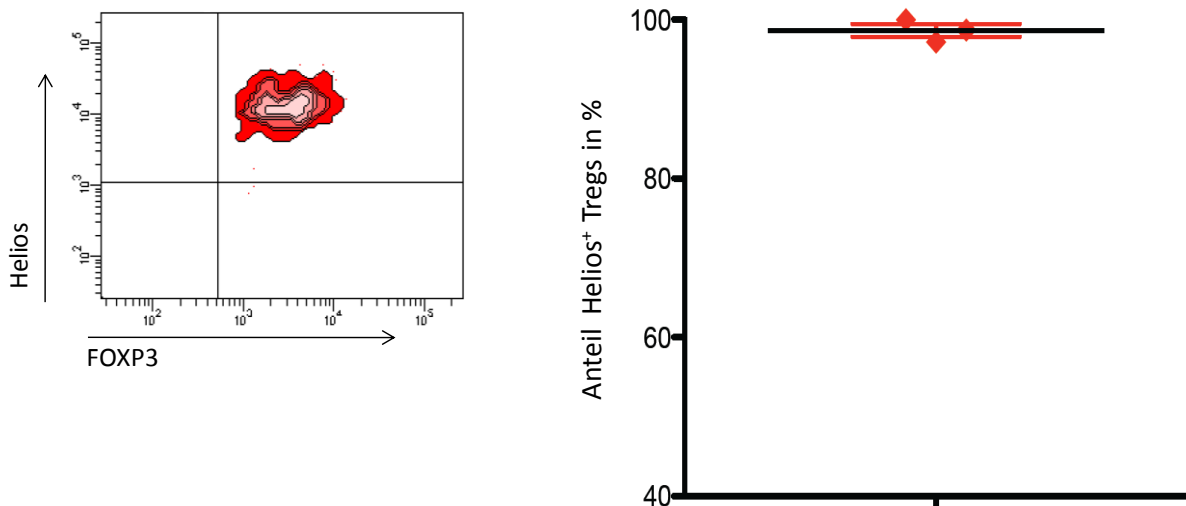


Abbildung 20: Regulatorische T-Zellen im Thymus exprimieren den für nTregs charakteristischen Transkriptionsfaktor Helios. In Thymus-Einzelzellsupensionen humanisierter Mäuse wurden regulatorische T-Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression des Transkriptionsfaktors Helios hin untersucht. Gezeigt ist der Anteil Helios⁺ Tregs an den Gesamt-Tregs im Thymus humanisierter Mäuse, wobei ein exemplarischer Durchflusszytometrie-Plot und die eine Gruppe von Tieren mit Mittelwert und Standardabweichung (n=3) dargestellt ist.

Die im Thymus humanisierter Mäuse vorhandenen regulatorischen T-Zellen exprimieren zu annähernd 100% den Transkriptionsfaktor Helios (Abbildung 20). Die im Thymus humanisierter Mäuse vorkommenden Tregs sind nTregs.

5.4.2 Expression von CD45RA und CD45RO auf humanen regulatorischen T-Zellen im murinen Thymus humanisierter Mäuse

Folgend wurden die im Thymus entstandenen nTregs genauer charakterisiert. Bei den regulatorischen T-Zellen unterscheidet man ebenfalls zwischen CD45RA exprimierenden naiven Tregs und CD45RO exprimierenden aktivierten/ Gedächtnis-Tregs. Daher wurden folgend die regulatorischen T-Zellen im Thymus auf die Expression von CD45RA versus CD45RO untersucht.

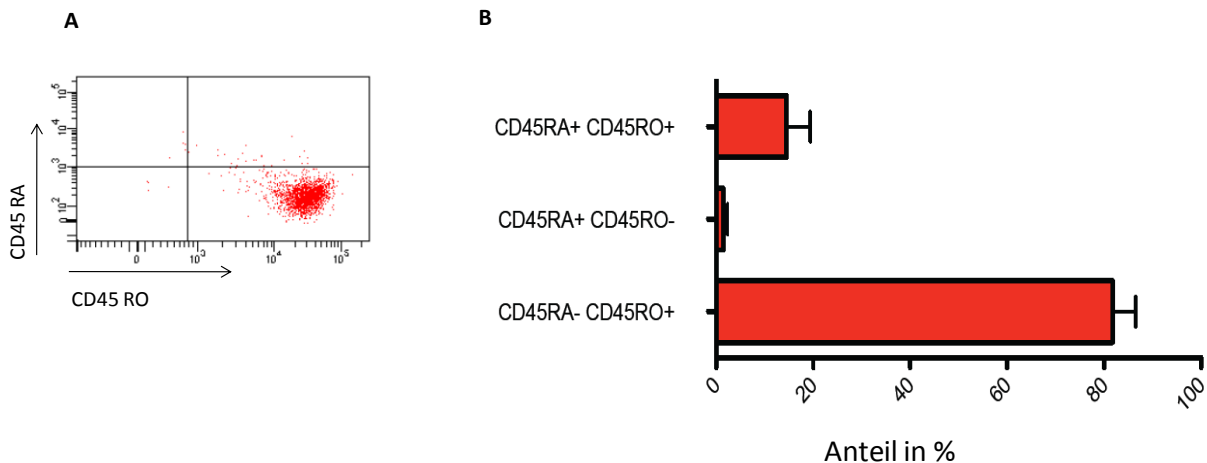


Abbildung 21: Expression der CD45RA und CD45RO Isoformen auf regulatorischen T-Zellen im Thymus. Die Expression der CD45RA und CD45RO Isoform auf humanen CD4⁺ CD8⁻ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen im Thymus wurde mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper untersucht (A). Die Mittelwerte wurden berechnet und mit den jeweiligen Standardabweichungen dargestellt (n=4) (B).

Die humanen regulatorischen T-Zellen, die im Thymus der humanisierten Mäuse entstanden sind, zeigten überwiegend einen aktivierten/ Gedächtnis-Phänotyp (CD45RA⁻ CD45RO⁺). Naive CD45RO⁻ CD45RA⁺ nTregs konnten im Thymus der humanisierten Mäuse nicht ($\leq 1\%$) detektiert werden.

5.4.3 HLA-DR Expression auf humanen regulatorischen T-Zellen im Thymus humanisierter Mäuse

Humane regulatorische T-Zellen sind, im Vergleich zu murinen regulatorischen T-Zellen, keine homogene Gruppe. Eine Unterteilung in funktionell unterschiedliche Treg Populationen wird auf Grund der MHCII Expression vorgenommen. In der Literatur wurden die HLA-DR (Humanes Leukozyten-Antigen) positiven als am stärksten suppressive Population beschrieben⁷⁴. Folgend wurde mittels Durchflusszytometrie zwischen drei Treg Populationen unterschieden: HLA-DR⁺ CD45RA⁻, HLA-DR⁻ CD45RA⁻ und HLA-DR⁻ CD45RA⁺.

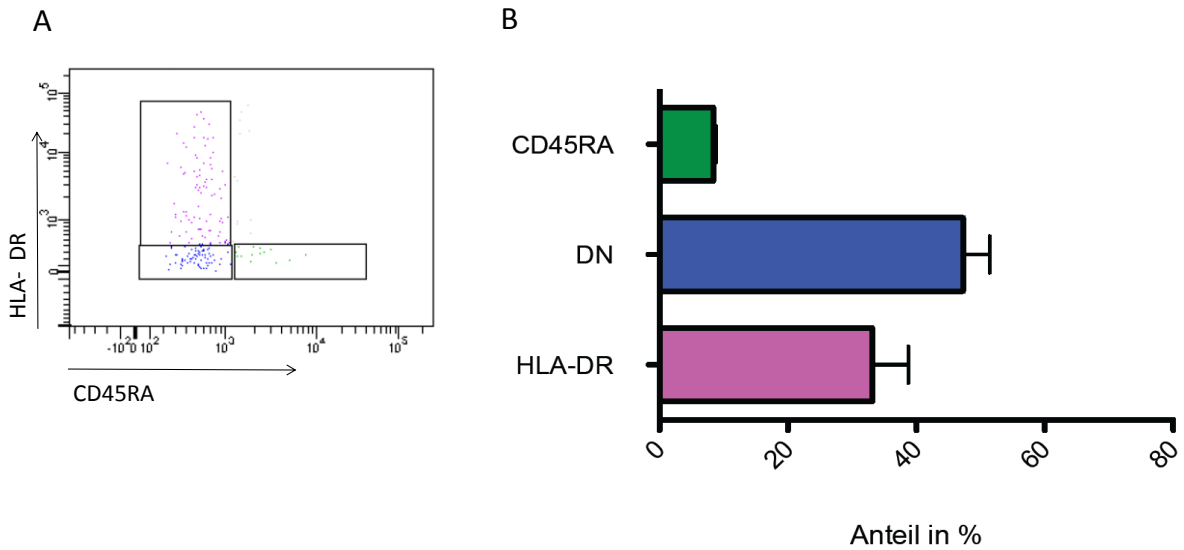


Abbildung 22: HLA-DR und CD45RA Expression auf humanen regulatorischen T-Zellen im murinen Thymus. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Thymus-Einzelzellsuspensionen von Mäusen ≥ 20 Wochen nach Rekonstitution hergestellt. Es wurde die Expression von HLA-DR und CD45RA auf humanen CD4⁺ CD8⁻ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen untersucht. Gezeigt ist eine exemplarische Analyse (A) sowie die Mittelwerte einer Gruppe zum gleichen Zeitpunkt humanisierter Mäuse mit entsprechenden Standardabweichungen (n=4)(B).

Die durchflusszytometrische Analyse der humanen nTregs im Maus-Thymus zeigte eine klassische L-förmige Verteilung (Abbildung 22 A). Der Großteil der regulatorischen T-Zellen im Thymus humanisierter Mäuse exprimierte weder CD45RA noch HLA-DR (47%). Der Anteil der am stärksten suppressiven HLA-DR⁺ Tregs erreichte 33%. Nur ein geringer Anteil regulatorischer T-Zellen exprimierte CD45RA alleine (Abbildung 22 B).

5.5 T-Zellen in der Peripherie der humanisierten Mäuse

Als nächster Schritt sollten die T-Zellen in der Peripherie der humanisierten Mäuse untersucht werden. Da ein Unterschied im Anteil von humanen Zellen zwischen männlichen und weiblichen Tier festgestellt werden konnte (Abbildung 10), wurden die Tiere auf geschlechtsspezifische Unterschiede im Anteil humaner T-Zellen hin untersucht.

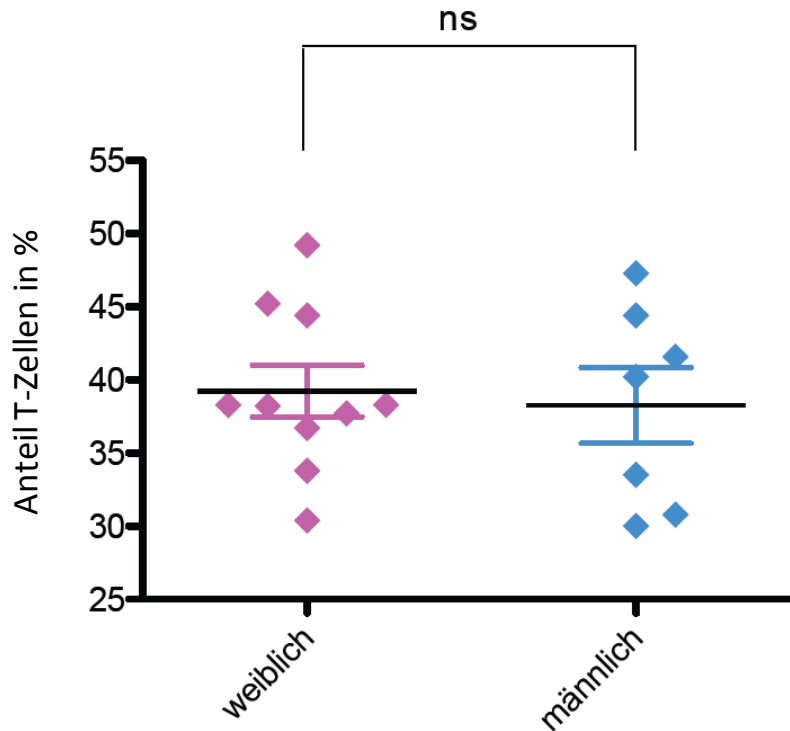


Abbildung 23: Keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Anteil der CD3⁺ T-Zellen an der Gesamtheit humaner Zellen. Männlichen und weiblichen humanisierten Mäusen (≥ 20 Wochen nach Rekonstitution) wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und durchflusszytometrisch auf den Anteil humaner CD3⁺ T-Zellen untersucht. Die Daten wurden mittels t-Test statistisch ausgewertet (n=17)

Männliche und weibliche Tiere zeigten keinen Unterschied im Anteil der T-Zellen an den humanen CD45⁺ Zellen. Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Anteil humaner T-Zellen in der Peripherie festgestellt werden.

5.5.1 Anteil von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der humanisierten Maus

Um die T-Zellen weiter zu charakterisieren, wurden diese folgend auf die Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei wurden sowohl der Anteil und das Vorhandensein von CD4- und CD8-einzelpositiven T-Zellen überprüft als auch die jeweiligen Anteile der CD4⁻CD8⁻ sowie der CD4⁺CD8⁺ T-Zellen. Die Verhältnisse in den humanisierten Mäusen wurden mit denen in humanem Blut verglichen.

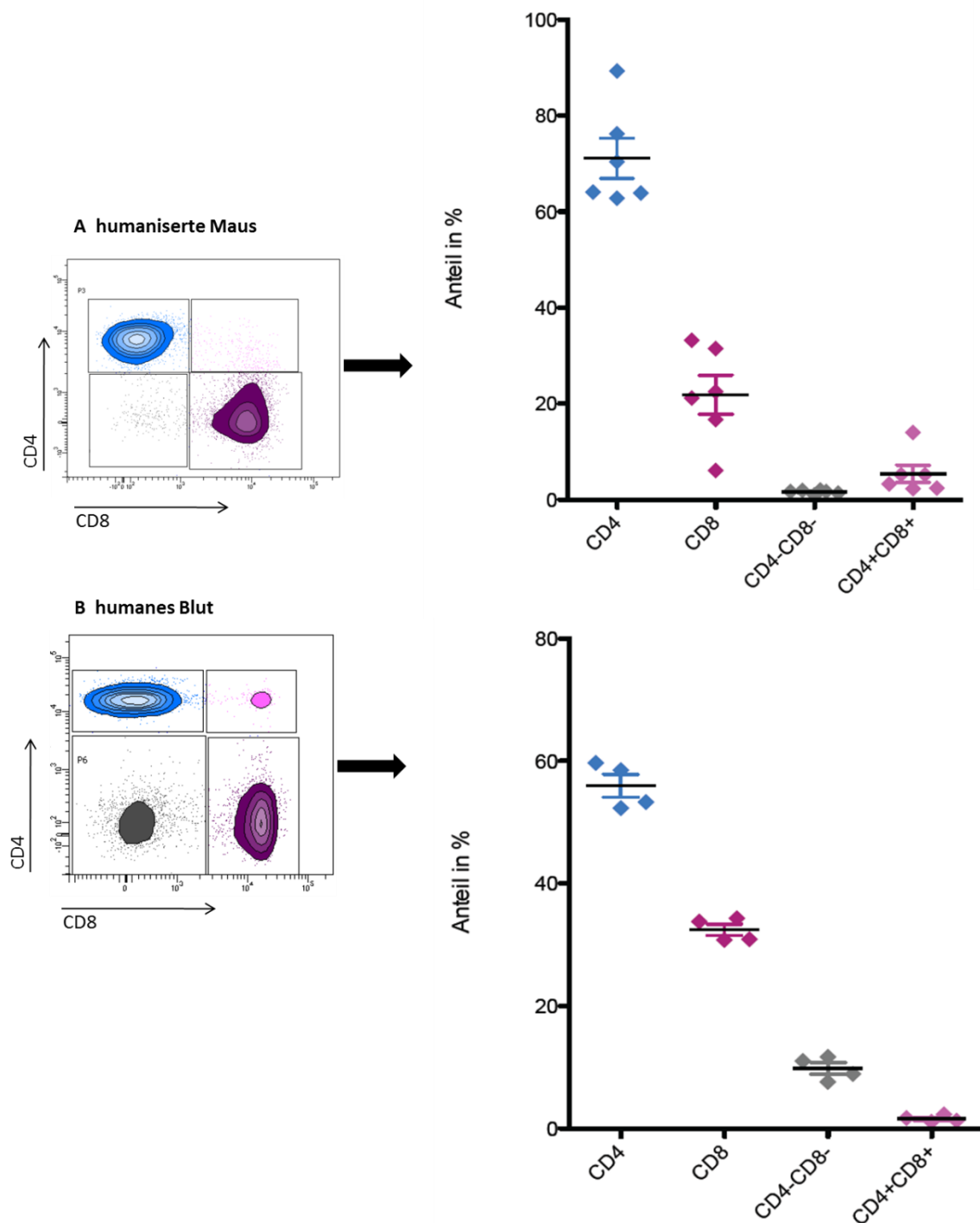


Abbildung 24: Anteil der CD4⁺CD8⁻ T-Zellen, der CD4⁻CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ T-Zellen sowie der CD4⁻CD8⁻ T-Zellen in der Peripherie der humanisierten Mäuse im Vergleich zu humanem Spenderblut. Blut humanisierter Mäuse wurde mittels Durchflusszytometrie auf den Anteil von CD4⁺CD8⁻ und CD8⁺CD4⁻ einzelpositiven, sowie doppelpositiven CD4⁺CD8⁺ und doppelnegativen CD4⁻CD8⁻ T-Zellen untersucht (A). Vergleichend wurden aus humanem Blut mononukleäre Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und analysiert (B). Dargestellt sind jeweils eine repräsentative Färbung sowie der jeweilige Anteil der Populationen mit Mittelwert und Standardabweichung.

In der Peripherie der humanisierten Mäuse waren $CD4^+ CD8^-$ und $CD8^+ CD4^-$ einzelpositive, $CD4^+ CD8^+$ doppelpositive sowie $CD4^- CD8^-$ doppelnegative T-Zellen vorhanden. Hierbei zeigte sich eine dem humanen Blut sehr ähnliche Verteilung (Abbildung 24). Die $CD4^+$ T-Zellen machen mit durchschnittlich 71 % den größten Teil der T-Zellen im Blut humanisierter Mäuse aus. In humanem Blut bildeten die $CD4^+$ T-Zellen ebenfalls den größten Teil der Blut-T-Zellen. Deren Anteil lag mit 56 % geringfügig niedriger. Bei den $CD8^+$ Zellen lag der Anteil bei den humanisierten Mäusen mit 22% etwas niedriger wie in humanem Blut (33%). $CD4^- CD8^-$ doppelpositive T-Zellen machten in den humanisierten Mäusen einen geringeren Anteil als im humanen Blut aus (1,6% zu 9,8%). Der Anteil $CD4^+ CD8^+$ doppelpositiver T-Zellen war gegenüber dem in humanem Blut leicht erhöht (5,4% zu 1,6%)

5.5.2 In den humanisierten Mäusen entstehen naive $CD45RA^+CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen

In der Peripherie können naive T-Zellen von aktivierten/ Gedächtnis-Typ T-Zellen anhand der Expression verschiedener Splicevarianten des CD45 Antigens unterschieden werden. Hierbei exprimieren naive T-Zellen CD45RA, während T-Zellen nach Antigenkontakt CD45RO exprimieren. Da gezeigt werden konnte, dass im Thymus der humanisierten Mäuse naive T-Zellen entstehen, wurde folgend der Aktivierungsstatus der T-Zellen in der humanisierten Maus untersucht. Hierfür wurde die Expression von CD45RA und CD45RO auf $CD4$ und $CD8$ einzelpositiven T-Zellen durchflusszytometrisch im peripheren Blut untersucht.

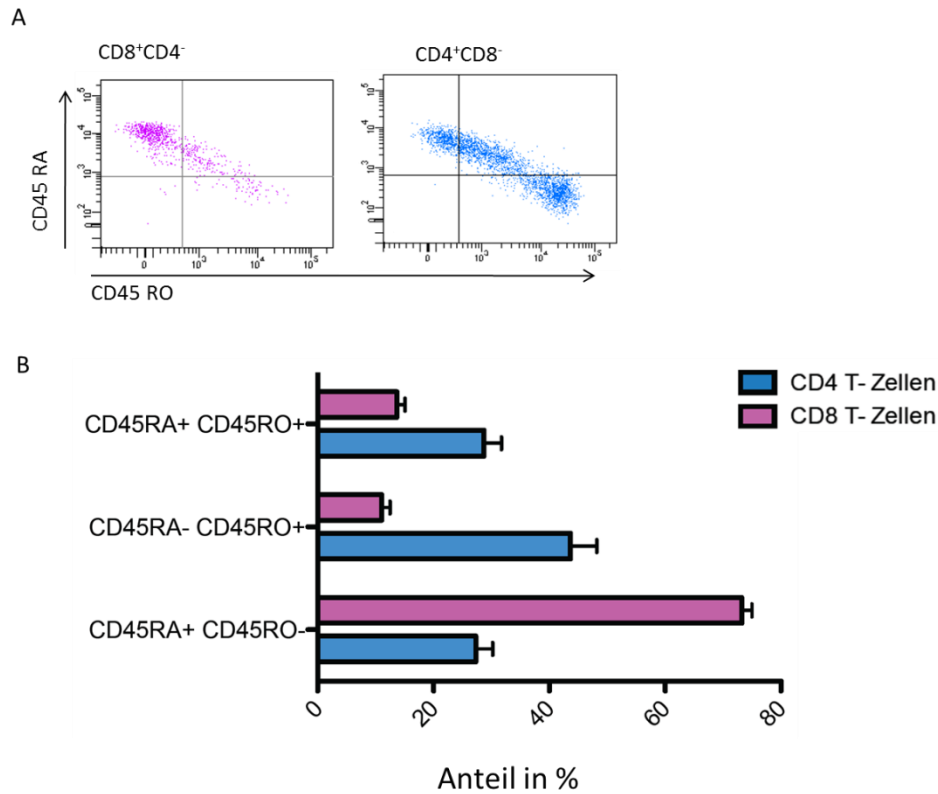


Abbildung 25: Expression von CD45RA und CD45RO auf peripheren T-Zellen in humanisierten Mäusen. Mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper wurden via Durchflusszytometrie die humanen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen im Blut auf die Expression von CD45RA und CD45RO untersucht. Unterschieden wurden jeweils 3 Gruppen: $CD45RA^+CD45RO^+$, der $CD45RA^-CD45RO^+$ und $CD45RA^+CD45RO^-$. Dargestellt sind exemplarische Durchflusszytometrie-Plots (A) sowie die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen ($n=6$).

Zusammenfassend zeigte sich, dass im peripheren Blut humanisierter Mäuse sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ naive $CD45RA^+CD45RO^-$ T-Zellen vorhanden waren. Bei den $CD8^+$ T-Zellen machten diese mit 73% den größten Anteil aus. Die $CD4^+$ T-Zellen wiesen einen geringeren Anteil (24 %) an naiven Zellen auf. Der Großteil der $CD4^+$ T-Zellen exprimiert CD45RO. 34% zeigen hierbei einen aktivierten/ Gedächtnis-Phänotyp $CD45RA^-CD45RO^+$ und 25% exprimieren sowohl CD45RA als auch CD45RO. Bei den $CD8^+$ T-Zellen waren diese Anteile jeweils deutlich geringer (11% $CD45RA^-CD45RO^+$, 14% $CD45RA^+CD45RO^+$)

5.5.3 Humane T-Zellen aus humanisierten Mäusen exprimieren nach Stimulation Interleukin 2

Um die Funktionalität der humanen T-Zellen, die in den humanisierten Mäusen entstanden waren, zu testen, wurde in einem ersten Schritt die Zytokinproduktion in Antwort auf Stimulation über den T-Zell Rezeptor untersucht. Sowohl humane als auch murine aktivierte $CD4^+$ T-Zellen exprimieren zuvorderst das Zytokin Interleukin 2 (IL-2), welches den Zellen als wichtiger autokriner

Wachstumsfaktor dient. Aus diesem Grund wurde die IL-2 Expression humaner, aus humanisierten Mäusen isolierter T-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden $CD4^+$ T-Zellen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper durchflusszytometrisch aus der Milz humanisierter Mäuse aufgereinigt und für den Nachweis auf mRNA Ebene, *via* quantitativer Realtime-PCR (qRT-PCR) mittels $\alpha CD3$ und $\alpha CD28$ für 48 Stunden stimuliert. Hierbei bietet $\alpha CD3$ das Signal für den T-Zell Rezeptor, während $\alpha CD28$ den benötigten Kostimulus liefert. Der Nachweis von IL-2 wurde auf mRNA Ebene *via* qRT-PCR durchgeführt. Isolierte T-Zellen wurden zusätzlich für den durchflusszytometrischen Nachweis von IL-2 5 Stunden durch Ionomycin in Kombination mit PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetat) stimuliert. Hierbei wird direkt in die T-Zell-Rezeptor-Signalweiterleitung eingegriffen. Ionomycin (Iono) erhöht die intrazellulären Calcium-Konzentrationen, während PMA die Proteinkinase C aktiviert. Mittels Monensin wurde für die durchflusszytometrische Detektierbarkeit die Sekretion der produzierten Zytokine unterbunden.

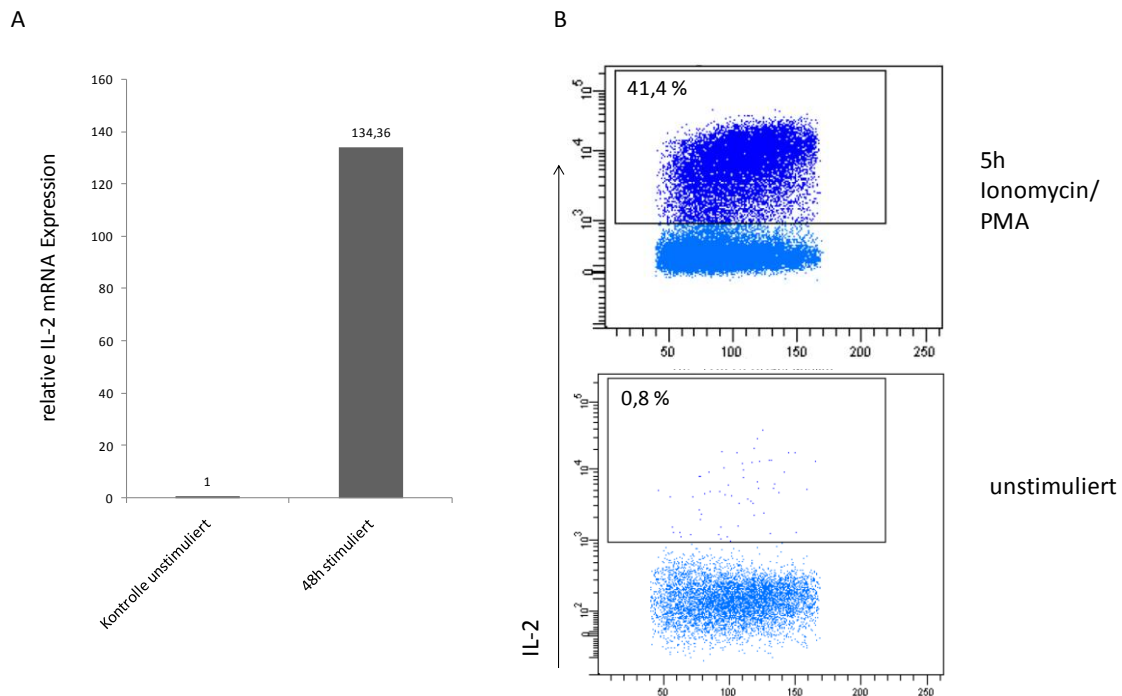


Abbildung 26: Humane $CD4^+$ T-Zellen aus humanisierten Mäusen exprimieren IL-2 nach Stimulation. $CD4^+$ T-Zellen wurden aus der Milz humanisierter Mäuse isoliert. Für die Analyse auf mRNA Ebene über qRT-PCR (A) wurden die Zellen für 48 Stunden mittels $\alpha CD3$ und $\alpha CD28$ stimuliert. Nach RNA-Extraktion und reverser Transkription wurde die IL-2 mRNA Expression ermittelt und auf die Expression des Haushalts-Gens $EF1\alpha$ normalisiert. Für die durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären IL-2 Produktion (B) wurden die $CD4^+$ T-Zellen für 4 Stunden mit einer Kombination aus Ionomycin und PMA stimuliert. Währenddessen wurde die Zytokinsekretion durch die Zugabe von Monensin inhibiert.

Die humanen T-Zellen aus den humanisierten Mäusen zeigten eine starke IL-2 Produktion nach Stimulation. In der qRT-PCR (Abbildung 26A) konnte nach 48 Stunden eine um mehr als das 100fache gesteigerte IL-2 mRNA Synthese nachgewiesen werden. Dies wurde durch die Ergebnisse der

Durchflusszytometrie auf Proteinebene (Abbildung 26B) verifiziert. Hier zeigten sich nach 5 Stunden 41 % der T-Zellen als IL-2-Produzenten.

5.5.4 Gemischte Leukozytenreaktion MLR (Mixed Leukocyte Reaktion)

Die T-Zellen humanisierter Mäuse werden im Thymus der Mäuse vorwiegend an den MHC-Molekülen (MHC-I/ II) muriner Thymusepithelzellen selektiert. Um die Reaktivität der T-Zellen aus humanisierten Mäusen auf „allogene“ (vom NOD Inzucht Stamm abweichender MHC Haplotyp, siehe Tabelle 1) Zellen zu testen, wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus humanisierten Mäusen mittels Durchflusszytometrie isoliert. Anschließend wurden diese mit verschiedenen murinen dendritischen Zellen, die in vitro aus Knochenmark „allogener“ Mäuse generiert wurden, kokultiviert. T-Zellen, welche die MHC Moleküle als „fremd“ erkennen, proliferieren. Die Proliferation wurde über den Einbau radioaktiv markiertem Thymidin nachgewiesen.

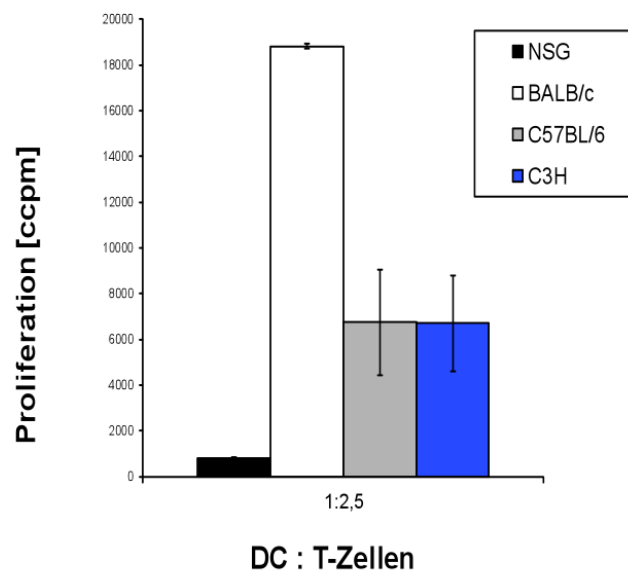


Abbildung 27: T-Zellen aus humanisierten Mäusen proliferieren in Kokultur mit allogenen DCs während sie keine Proliferation mit NSG DCs zeigten. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) mit entsprechenden Standardabweichungen. Die T-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:2,5 zu den dendritischen Zellen eingesetzt.

Tabelle 1: MHC Haplotypen der Mäuse aus denen die DCs generiert wurden.

Mausstamm	MHC H2 Haplotypen
NSG	<i>g⁷</i>
BALB/c	<i>d</i>
C3H	<i>k</i>
C57BL/6	<i>b</i>

Die humanen T-Zellen aus den humanisierten Mäusen reagierten auf „allogene“ DCs, zeigten aber keine Proliferation bei Kokultur mit NSG-DCs. Die stärkste Allo-Reaktion zeigten die T-Zellen aus humanisierten Mäusen bei dendritischen Zellen aus BALB/ cJ Mäusen. Bei der Kokultur mit allogenen DCs aus C3H/ He und C57BL/ 6 Mäusen reagierten die in den NSG Thymi selektierten T-Zellen ebenfalls, jedoch mit schwächerer Proliferation.

5.6 Regulatorische T-Zellen in der Peripherie humanisierter Mäuse

Die Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus konnte oben bereits gezeigt werden (Abbildung 19 und Abbildung 20). Folgend wurde das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen in der Peripherie der humanisierten Mäuse untersucht und mit peripherem Blut gesunder, humaner Spender verglichen. Für den Nachweis humaner regulatorischer T-Zellen in den humanisierten Mäusen wurden CD4⁺ T-Zellen in peripherem Blut und Milz- und Lymphknoteneinzelsuspensionen auf die Expression von CD25 und Foxp3 untersucht. Um sicherzustellen, dass es sich um Tregs und nicht etwa um aktivierte T-Zellen, die im humanen System sowohl CD25 als auch FoxP3 exprimieren können, handelt, wurde zusätzlich die IL-7 Rezeptor Expression (CD127) betrachtet. Die CD127 Expression korreliert invers mit der Foxp3 Expression und der Suppressivität der regulatorischen T-Zellen⁶¹.

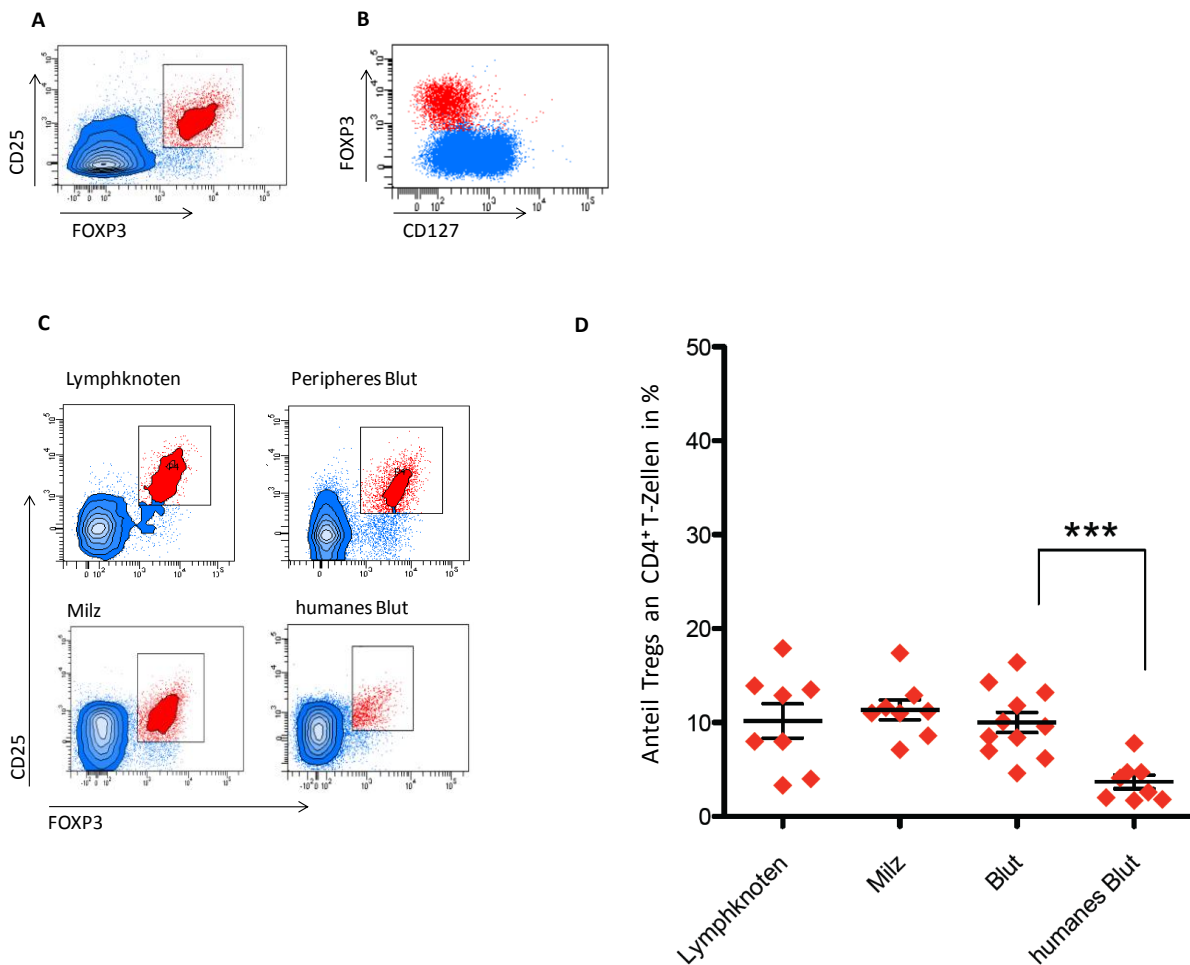


Abbildung 28: Nachweis humaner regulatorischer T-Zellen in der Peripherie humanisierter Mäuse. Für die Detektion von humanen regulatorischen T-Zellen in den humanisierten Mäusen wurde entweder Blut entnommen, oder Milz- und Lymphknoten-Einzelzellsuspensionen hergestellt. Der Anteil CD25⁺ FOXP3⁺ Zellen an den humanen CD4⁺ T-Zellen (A) wurde durchflusszytometrisch ermittelt und über die niedrige CD127 Expression verifiziert (B). Folgend dargestellt sind exemplarische Durchflusszytometrie-Plots, in denen die Tregs als Anteil an den CD4⁺ T-Zellen abgebildet sind (C), sowie der Mittelwert des prozentualen Anteils der Tregs (n=7) an den CD4⁺ T-Zellen mit den entsprechenden Standardabweichungen (D).

Regulatorische CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻ T-Zellen waren in der Peripherie humanisierter Mäuse vorhanden. Sie konnten in allen untersuchten Organen sowie im Blut nachgewiesen werden (Abbildung 28 C). Die regulatorischen T-Zellen bildeten in den durchflusszytometrischen Analysen humanisierter Mäuse eine distinkte, deutlich abgegrenzte Population. Der durchschnittliche Anteil humaner regulatorischer T-Zellen an den CD4⁺ T-Zellen lag im peripheren Blut humanisierter Mäuse bei 10 %, in den Milzen bei 11,35 % und in den Lymphknoten etwas niedriger bei 7%. Der Anteil regulatorischer T-Zellen in Blut humaner Spender lag mit 3% signifikant (P ≤ 0,001) niedriger als im Blut der humanisierten Mäuse.

5.6.1 Helios Expression in peripheren humanen regulatorischen T-Zellen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Thymus der humanisierten Mäuse nTregs entstehen. Folgend sollten nun via Durchflusszytometrie untersucht werden, ob neben den thymusgenerierten nTregs in der Peripherie induzierte iTregs in den Tieren vorhanden waren.

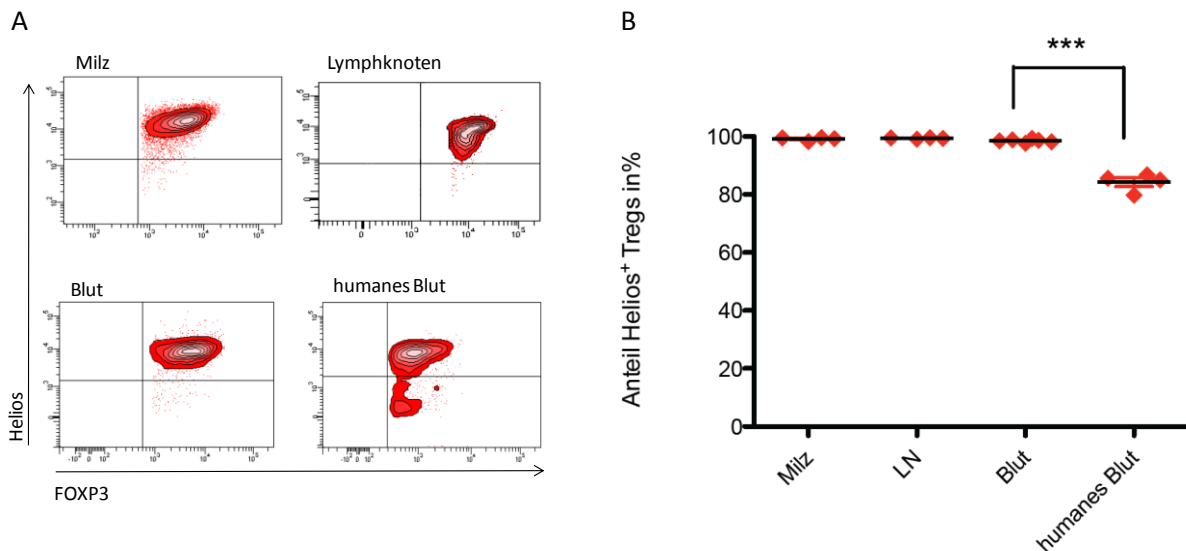


Abbildung 29: Helios Expression in den peripheren regulatorischen T-Zellen humanisierter Mäuse. Peripheres Blut sowie Milz- und Lymphknoten-Einzelzellsuspensionen wurden durchflusszytometrisch untersucht und mit humanem Blut verglichen. Regulatorische T-Zellen wurden anhand der Koexpression von CD25 und FoxP3 dargestellt. Diese wurden mittels spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper auf die Expression von Helios untersucht. Gezeigt sind repräsentative Durchflusszytometrie-Plots, in denen die Helios Expression in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen dargestellt ist (A). Abbildung B zeigt Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen einer Gruppe von Tieren (n=4) verglichen mit humanem Blut.

Die regulatorischen T-Zellen in den humanisierten Mäusen sind Helios⁺ nTregs. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Tregs im peripheren Blut der humanisierten Mäuse und denen der lymphoiden Organe. Verglichen mit dem prozentualen Anteil von Tregs aus humanem Blut, wurde ein signifikanter Unterschied deutlich. Die Tregs aus dem Blut humaner Spender wiesen einen Anteil von 80 % Helios⁺ T-Zellen auf, während die Tregs aus den humanisierten Mäusen nahezu komplett Helios⁺ waren.

5.6.2 Anteil HLA-DR exprimierender Tregs in der Peripherie humanäquivalenter Mäuse

Die humanen regulatorischen T-Zellen bilden keine homogene Gruppe. Sie lassen sich in Subtypen mit variierender Suppressivität untergliedern. Ein Unterscheidungsmerkmal ist hierbei die Expression von HLA-DR, welches den Treg-Typ mit der höchsten Suppressivität kennzeichnet⁷⁴. Folgend wurden, wie schon bei den Tregs im Thymus, drei Populationen unterschieden: HLA-DR⁺

CD45RA⁻, HLA-DR⁻ CD45RA⁺ und HLA-DR⁻ CD45RA⁻ Tregs. Vergleichend wurde eine identische Analyse bei humanem Blut gesunder Spender durchgeführt.

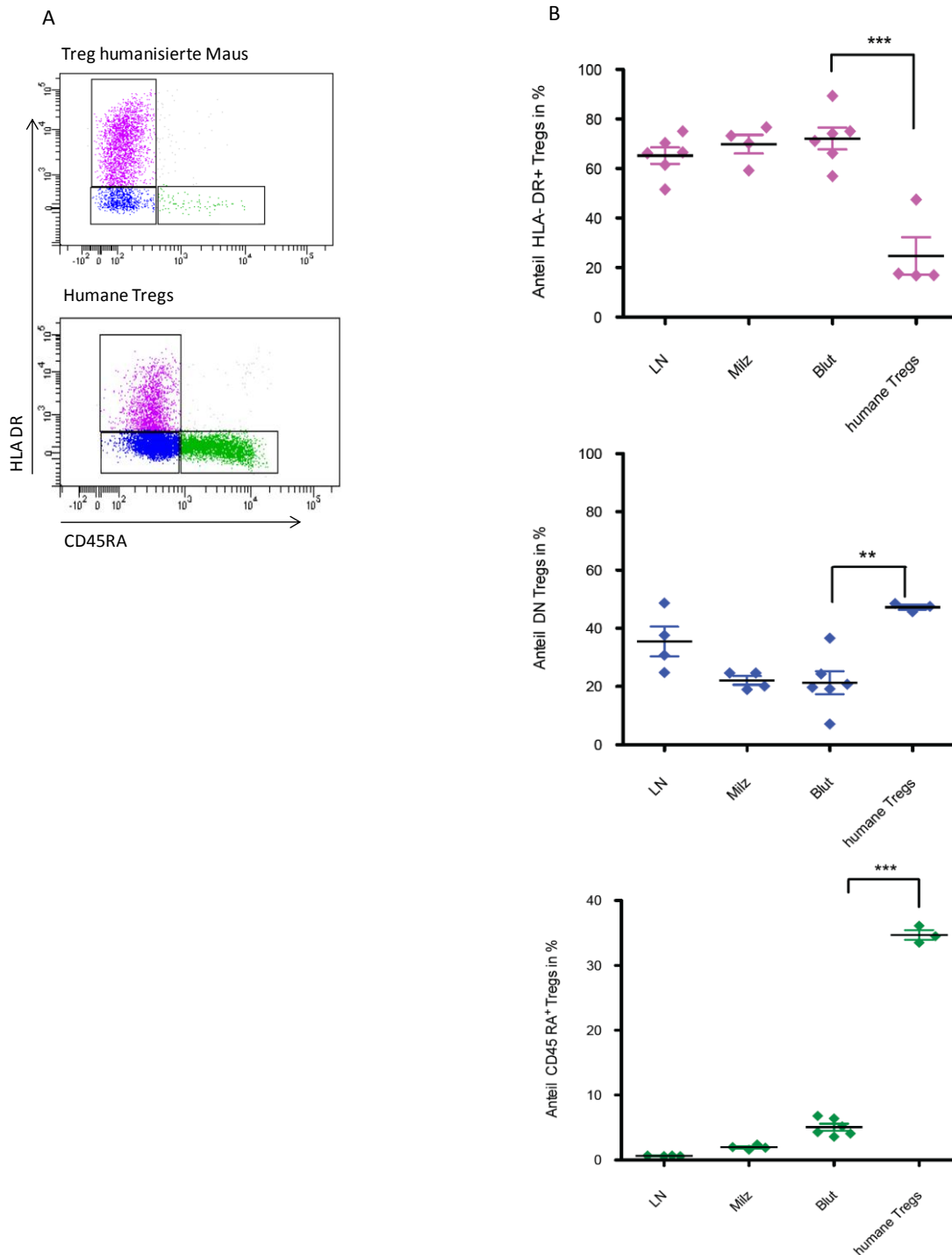


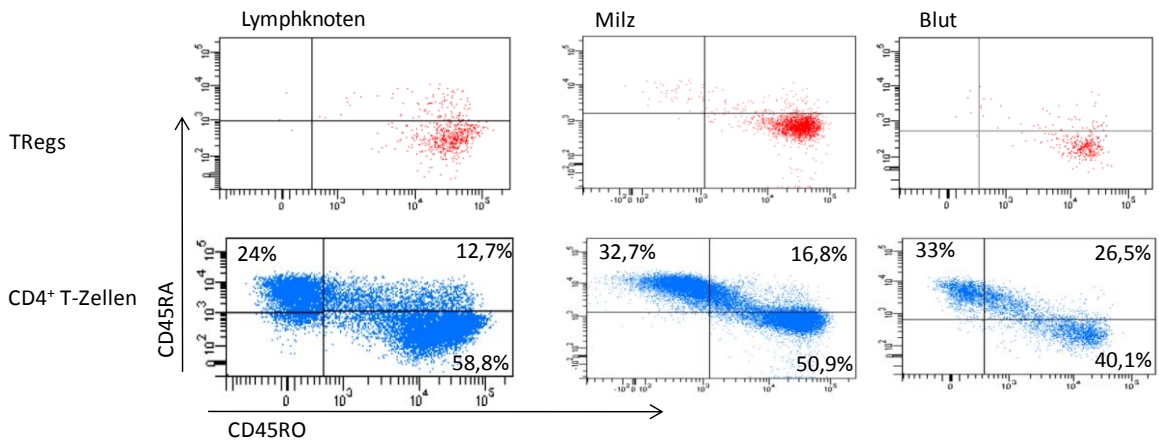
Abbildung 30: Der Großteil der peripheren Tregs exprimiert HLA-DR. Blut, Lymphknoten und Milz humanisierter Mäuse sowie Blut humaner Spender wurden durchflusszytometrisch untersucht. Die FOXP3⁺ CD25⁺ Population wurde als regulatorische T-Zellen dargestellt. Diese wurden in 3 Gruppen eingeteilt (Abbildung A): HLA-DR⁺, CD45RA⁺ sowie HLA-DR⁻ CD45RA⁺ doppeltnegativer (DN). Die Anteile der Gruppe wurden mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt (Abbildung B).

Der Großteil der humanen regulatorischen T-Zellen in der humanisierten Maus gehörte zu den stark suppressiven HLA-DR⁺ Tregs. Der Anteil humaner HLA-DR Tregs im peripheren Mausblut lag im Vergleich mit humanem Blut signifikant höher ($p \leq 0,001$). Der Anteil naiver CD45RA⁺ regulatorischer T-Zellen liegt in der Peripherie der humanisierten Mäuse unter 5 %. Im humanen Blut liegt dieser signifikant höher ($p \leq 0,01$). Der Anteil der doppeltnegativen HLA-DR⁻ CD45RA⁻ Tregs war im Mausblut signifikant niedriger als in humanem Blut ($p \leq 0,001$).

5.6.3 Die Tregs in der Peripherie humanisierter Mäuse zeigten einen aktivierten/ Gedächtnis-CD45RO⁺ CD45RA⁻ Phänotyp.

Die HLA-DR Expression ist nicht das einzige Kriterium, um Subgruppen humaner Tregs zu unterscheiden. Man unterteilt diese, genau wie die Effektor-T-Zellen, in CD45RA exprimierende naiven Tregs, CD45RO exprimierende aktivierte/ Gedächtnis-Tregs und eine beide Splicevarianten exprimierende Zwischenform. Zur Identifikation des Aktivierungsstatus wurden Tregs aus Blut, Milz und Lymphknoten durchflusszytometrisch auf die Expression von CD45RA und CD45RO untersucht. Als Kontrolle wurde diese Analyse auch bei CD4⁺ T-Zellen durchgeführt. Der Aktivierungsstatus der Tregs in den humanisierten Mäusen wurde mit dem in humanem Blut verglichen.

A



B

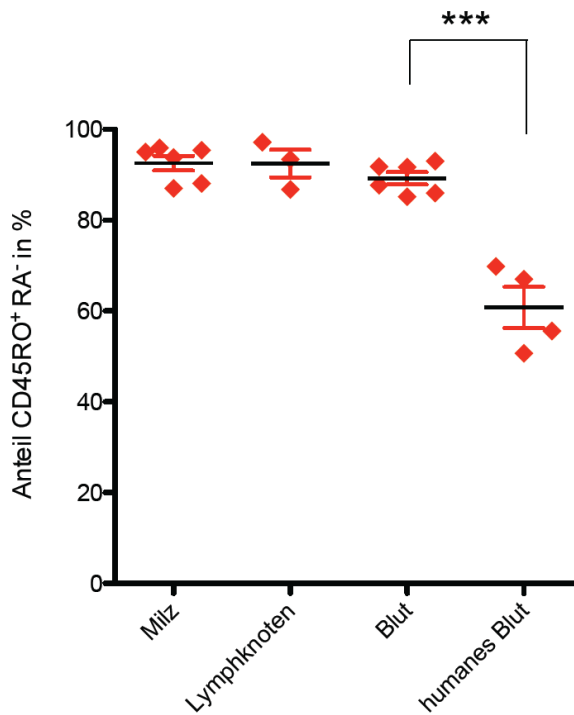


Abbildung 31. CD45RA und CD45RO Expression auf humanen regulatorischen T-Zellen in der humanisierten Maus.

Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Färbung (A) von CD45RA und CD45RO auf humanen regulatorischen T-Zellen aus humanisierten Mäusen (rot) und als Kontrolle auf CD4⁺ Effektor T-Zellen (blau). Ferner wurde die CD45RO Expression auf humanen regulatorischen T-Zellen in den induzierten lymphoiden Organen sowie in peripherem Blut einer Gruppe humanisierter Mäuse mit entsprechenden Mittelwerten und Standardabweichungen abgebildet (B).

Im Unterschied zu den konventionellen CD4⁺ T-Zellen waren unter den regulatorischen T-Zellen nur vereinzelt naive CD45RA⁺CD45RO⁻ Zellen vorhanden (Abbildung 31 A). Die humanen regulatorischen T-Zellen in der humanisierten Maus zeigten vorwiegend einen aktivierten/ Gedächtnis-Phänotyp LN: 92,5%, Milz: 92,5%, Blut 89,23%, Abbildung 31 B). Die CD4⁺ T-Zellen der gleichen Mäuse enthielten

einen hohen Anteil $CD45RA^+CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 31 A sowie Abbildung 25), naive T-Zellen waren nachweislich vorhanden. Die Tregs in peripherem Blut humaner Spender zeigten einen signifikant niedrigeren Anteil (60, 78%, $p \leq 0,001$) an $CD45RO^+CD45RA^-$ aktivierten/ Gedächtnis-Tregs.

5.6.4 Regulatorische T-Zellen exprimieren kein IL-2

Die Koexpression von CD25, CD127 und FoxP3 identifiziert regulatorische T-Zellen recht treffsicher. Um final sicher zu stellen, dass es sich bei den untersuchten Zellen um Tregs und nicht um aktivierte $CD4^+$ T-Zellen handelt, wurde zunächst die Zytokinproduktion der Tregs nach Stimulation eruiert. Eine charakteristische Eigenschaft von regulatorischen T-Zellen ist, dass sie im Gegensatz zu Effektor- $CD4^+$ T-Zellen kein IL-2 bei Stimulation sezernieren. Folgend wurde daher die IL-2 Expression der Tregs aus humanisierten Mäusen analysiert. Als Kontrolle dienten konventionelle Effektor- $CD4^+$ T-Zellen.

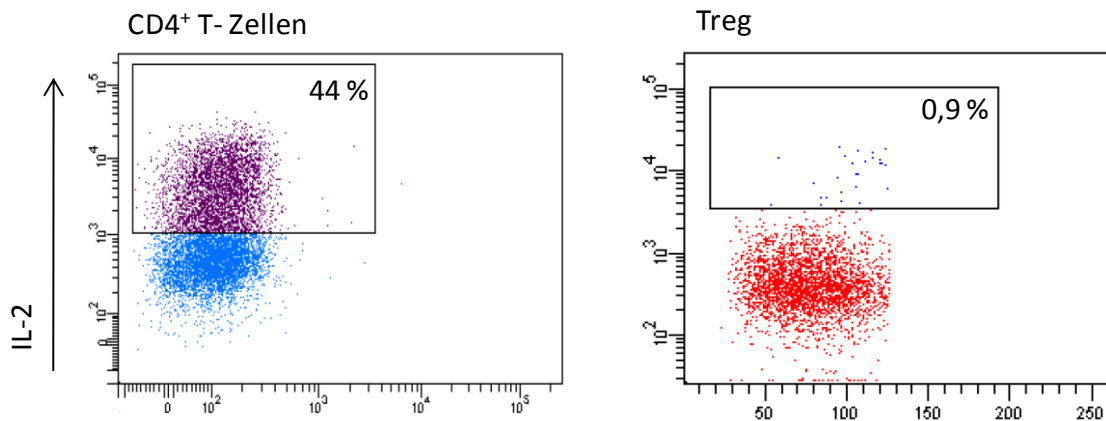


Abbildung 32: Regulatorische T-Zellen exprimieren nach Stimulation kein IL-2. $CD4^+$ T-Zellen und regulatorische T-Zellen wurden durchflusszytometrisch aus humanisierten Mäusen isoliert. Es wurden je 1×10^5 T-Zellen bzw. Tregs mit Ionomycin und PMA für 4 Stunden stimuliert. Gleichzeitig wurde durch Monensin die Sekretion der produzierten Zytokine verhindert. Anschließend wurde das in den Zellen gebildete und akkumulierte Interleukin-2 via Durchflusszytometrie bestimmt.

Die regulatorischen T-Zellen reagieren im Gegensatz zu den $CD4^+$ T-Zellen auf die Stimulation nicht mit IL-2 Expression (Abbildung 32)

5.6.5 Aktivierte Tregs aus der humanisierten Maus exprimierten GARP („Glycoprotein A Repetitions Predominant“)

GARP wird auf aktivierten regulatorischen T-Zellen, nicht aber auf aktivierten $FoxP3^+$ konventionellen T-Zellen exprimiert⁹⁰. Auf Grund dessen wurde die Expression von GARP auf humanen regulatorischen T-Zellen aus den humanäquivalenten Mäusen untersucht.

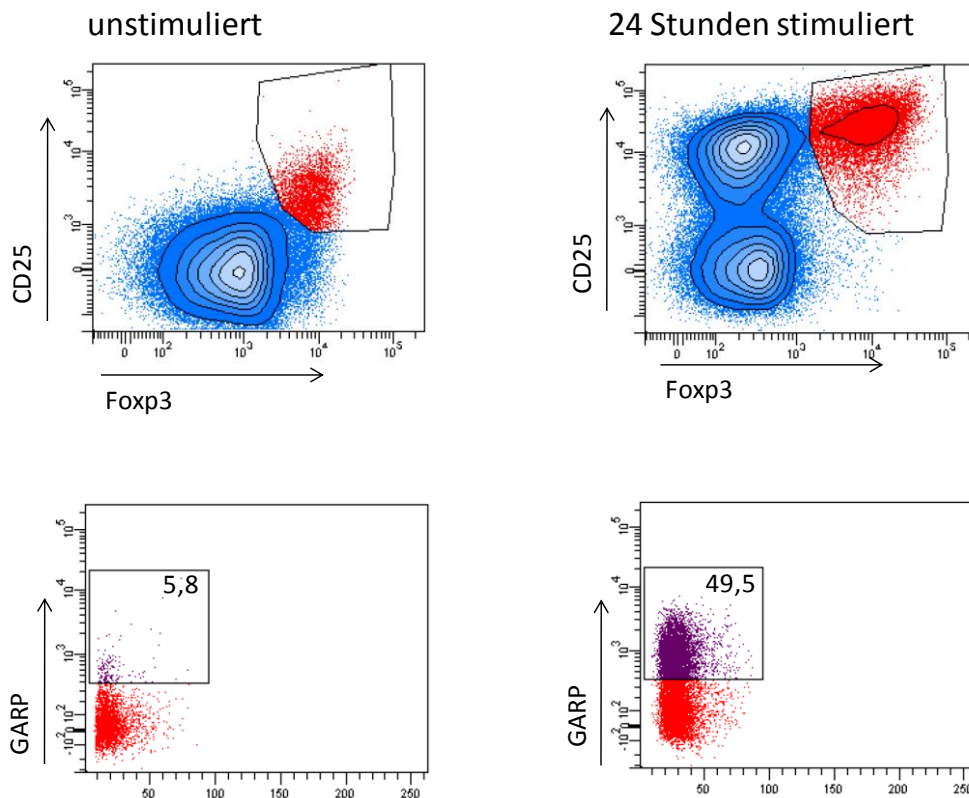


Abbildung 33: Etwa die Hälfte der regulatorische T-Zellen exprimierten GARP nach Stimulation mittels α CD3 und α CD28. $CD4^+$ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch isoliert. Die isolierten Zellen wurden mit α CD3 und α CD28 für 24 Stunden stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die regulatorischen T-Zellen wurden als CD25 und FoxP3 koexprimierende Zellen definiert. Folgend wurde deren jeweilige GARP Expression dargestellt.

Durch die Aktivierung exprimierten die regulatorischen T-Zellen aus den humanisierten Mäusen GARP. Direkt aus den humanisierten Mäusen isolierte, unstimulierte regulatorische T-Zellen exprimierten nur zu einem geringen Teil (5,8 %) GARP. Nach Stimulation mittels α CD3 und α CD28 stieg der Anteil auf 50 % (Abbildung 33).

5.7 *In vitro* Suppression durch humane regulatorische T-Zellen aus humanisierten Mäusen

Die wichtigste Eigenschaft regulatorischer T-Zellen ist deren Fähigkeit, T-Zellen supprimieren zu können. Es sollte daher die suppressive Kapazität der aus humanisierten Mäusen isolierten regulatorischen T-Zellen überprüft werden. Hierfür wurden zunächst $CD4^+CD25^-$ Effektor-T-Zellen und $CD4^+CD25^+CD127^-$ regulatorische T-Zellen via Durchflusszytometrie isoliert. Diese wurden in den indizierten Verhältnissen für 5 Tage kokultiviert. Für die letzten 20 Stunden wurde radioaktiv markiertes Thymidin (3 H-Tdr) zugegeben und anhand dessen Einbaus in neu synthetisierte DNA die Proliferation der T-Zellen ermittelt.

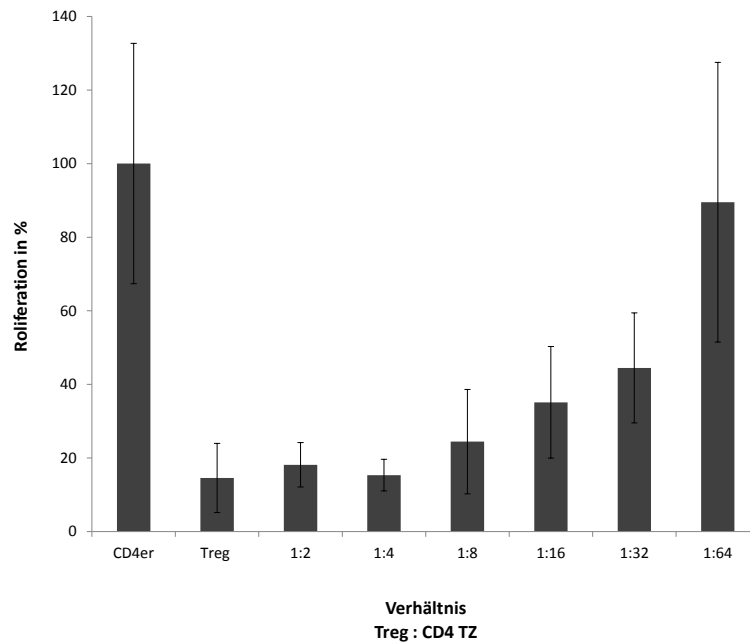


Abbildung 34: Aus humanisierten Mäusen isolierte regulatorische T-Zellen supprimierten humane CD4⁺ T-Zellen *in vivo*. Regulatorische T-Zellen wurden mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper markiert und durchflusszytometrisch als CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Zellpopulation isoliert. CD4⁺CD25⁻ Effektor-T-Zellen wurden in gleicher Weise aufgereinigt. Effektor- und regulatorische T-Zellen wurden in den indizierten Verhältnissen 5 Stunden kokultiviert. Für die letzten 20 Stunden wurde radioaktiv markiertes Thymidin zugegeben und die Proliferation anhand des Einbaus in die Zellen bestimmt. Dargestellt ist die Proliferation als prozentualer Anteil der Proliferation von CD4⁺T-Zellen (B).

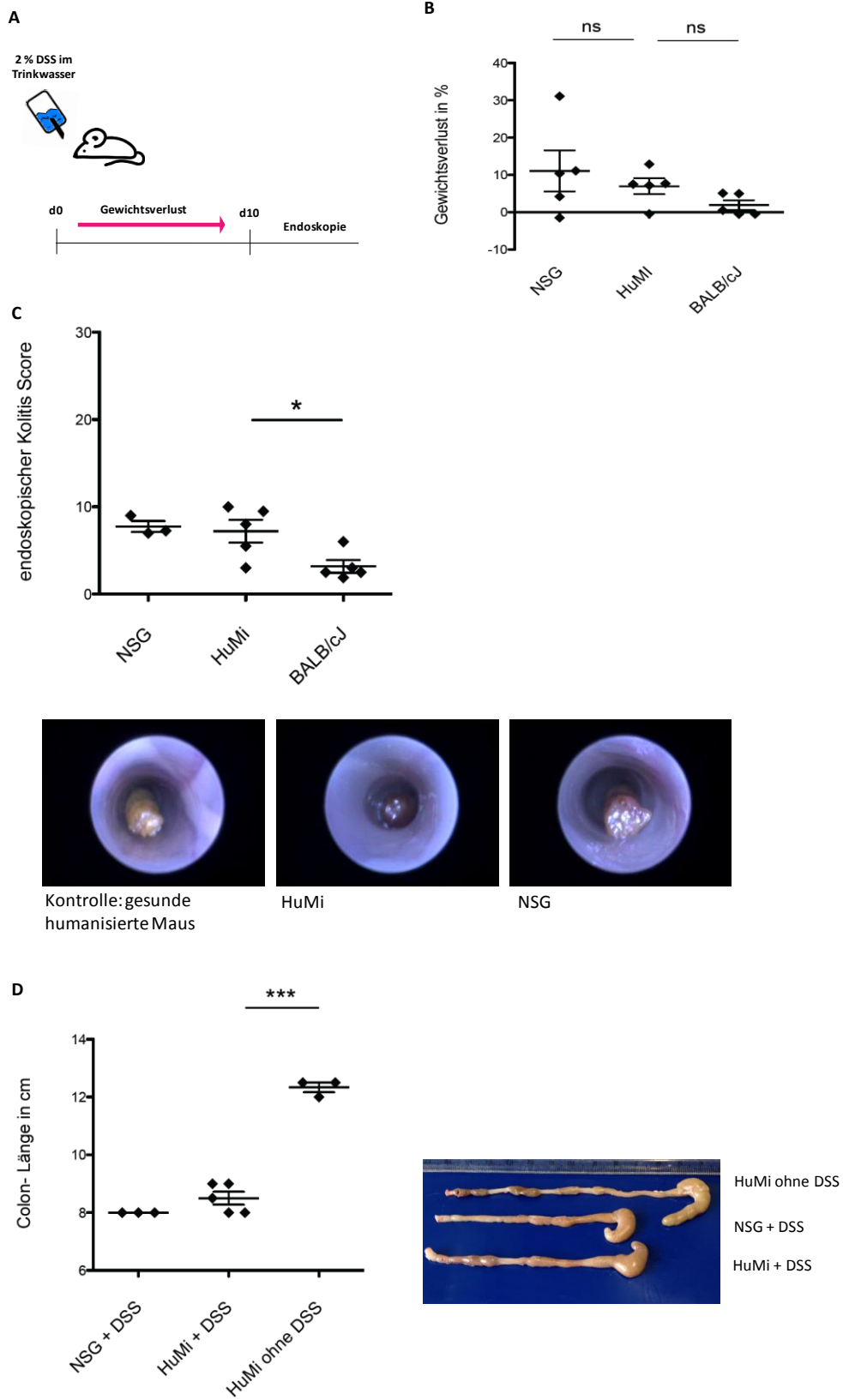
Die aus den humanisierten Mäusen isolierten regulatorischen T-Zellen inhibierten die Proliferation der Effektor T-Zellen verhältnisabhängig. CD4⁺CD25⁻ Effektor-T-Zellen reagierten auf die Stimulation mittels α CD3 und α CD28 mit Proliferation (Abbildung 34). Die regulatorischen T-Zellen zeigten sich anergisch und proliferierten nicht (Abbildung 34). Die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen konnte bis zu einem Verhältnis von 1:32 (Tregs zu T-Zellen) deutlich inhibiert werden.

5.8 *In vivo Modelle*

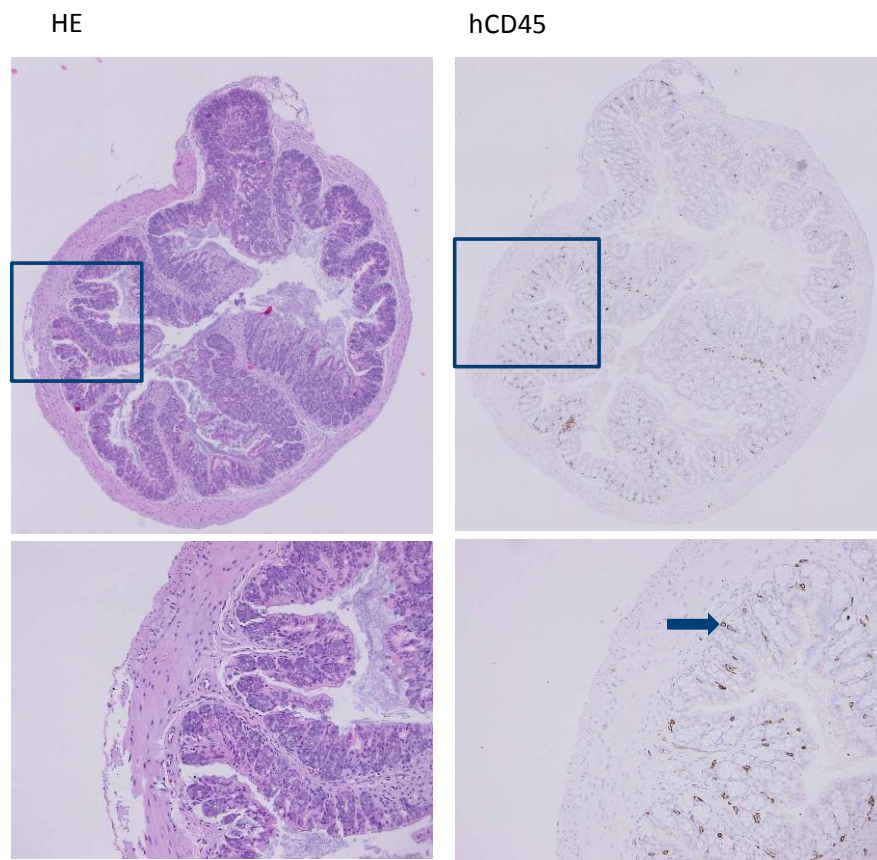
5.8.1 *DSS-Kolitis*

Die Natrium-Dextransulfat (*DSS*, „dextran sulphate sodium“) induzierte Kolitis, als Tiermodell für die humane chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (*CED*; engl.: „Inflammatory Bowel Disease“, *IBD*) wird für pathologische und therapeutische Forschung angewendet. Zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zählen unter anderem *Colitis ulcerosa* und Morbus Crohn, welche in einer hohen Frequenz in Nordeuropa vorkommen⁹¹. Eine *DSS*-Kolitis kann prinzipiell sowohl in immundefizienten Mäusen, als auch in mit humanen HSCs transplantierte *RAG2^{-/-}gc^{-/-}* Mäusen induziert werden^{92,93}. Für die Induktion der akuten *DSS*-Kolitis wurde den Mäusen 2 % *DSS* im

Trinkwasser verabreicht. Folgend wurde der Einfluss des rekonstituierten humanen Immunsystems speziell des T-Zell Kompartiments, auf den Verlauf der Kolitis überprüft.



E



F

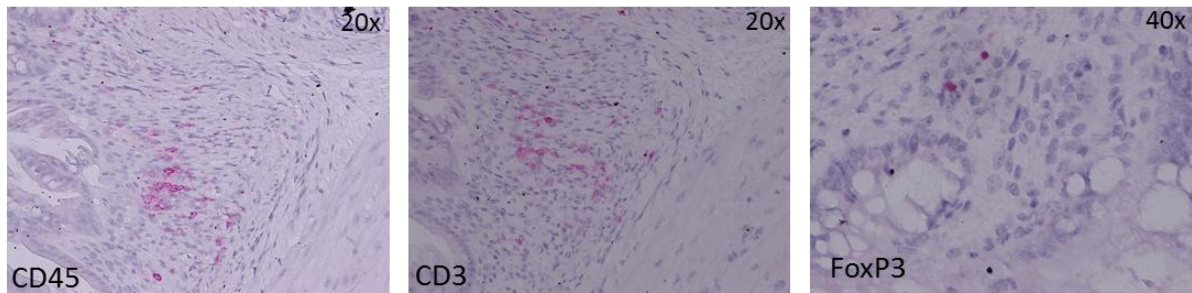
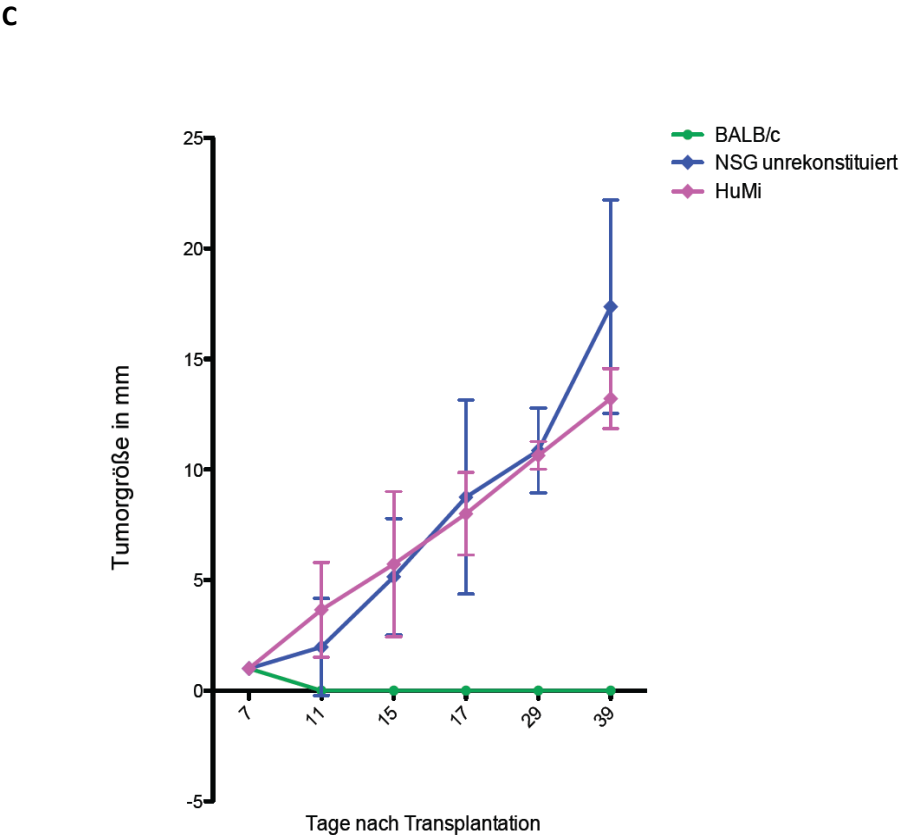
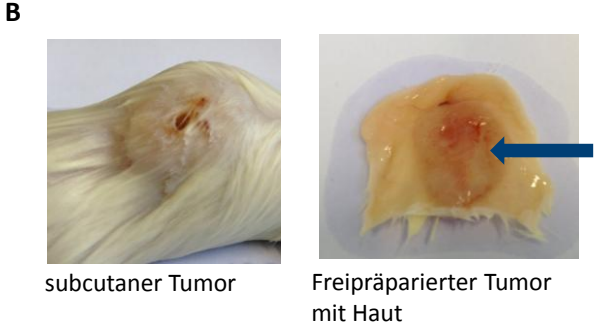
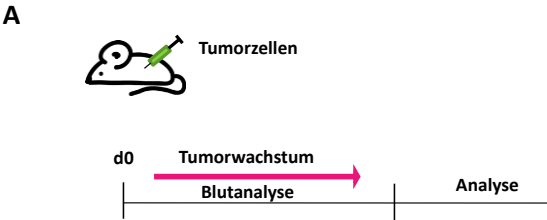


Abbildung 35: Humanisierte Mäuse erkrankten in gleichem Maße wie unrekonstituierte NSG an DSS- induzierter Kolitis. Humanisierten Mäusen und Kontrolltieren (unrekonstituierte NSG- und BALB/cJ Mäusen) wurde 2 % DSS im Trinkwasser verabreicht. Die Mäuse wurden täglich kontrolliert und die Gewichtsabnahme wurde dabei protokolliert. Dargestellt ist der Gewichtsverlust bei Versuchsende (B). Bei einsetzendem Gewichtsverlust und Durchfällen (7-10 Tage) wurden die Tiere endoskopisch untersucht (C). Anschließend wurden die Tiere präpariert. Hierbei wurde die Darmlänge vermessen. Die Darmlänge der humanisierten, an Kolitis erkrankten Mäuse, wurde mit der von kranken NSG und gesunden humanisierten Mäusen verglichen (D). Darmstücke wurden fixiert. Nach Anfertigung von Paraffinschnitten wurde eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung; E links) sowie ein anti-CD45 Antikörperfärbung (E rechts, hCD45 in braun, siehe auch Pfeil) durchgeführt. Gezeigt sind jeweils eine repräsentative Gesamtaufnahme sowie der angezeigte Ausschnitt in 10x Vergrößerung. Weiter wurden die Zellen auf CD45, CD3, sowie FoxP3 gefärbt (F in magenta).

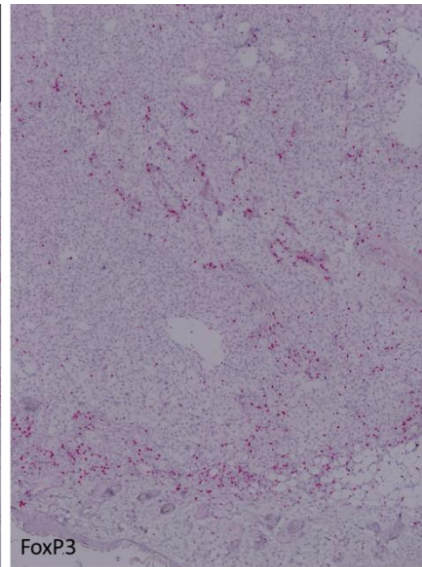
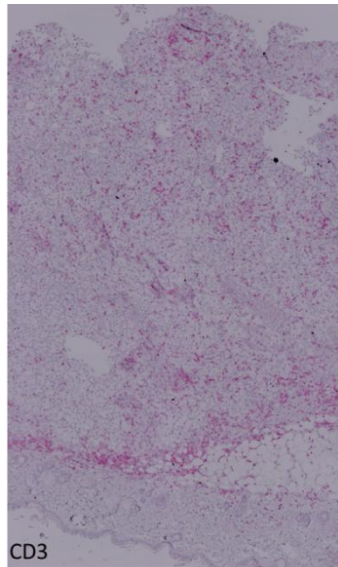
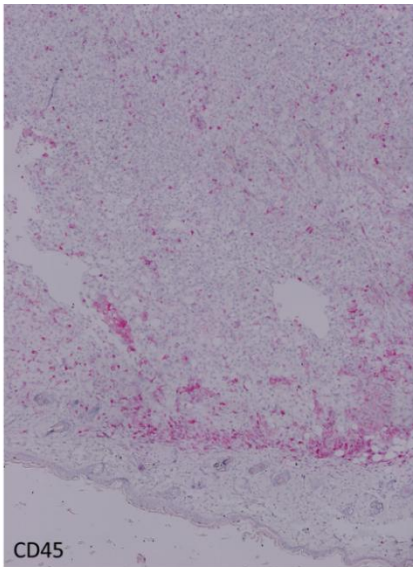
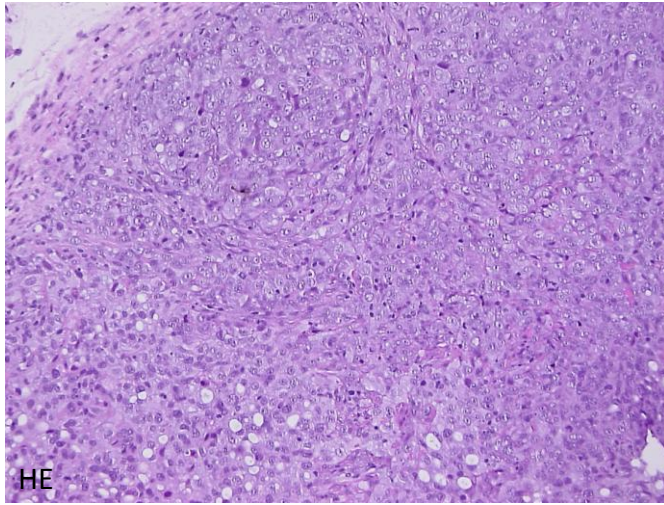
Humanisierte Mäuse zeigten eine DSS-induzierte Kolitis mit Infiltration von humanen Immunzellen in den Darm. NSG und humanisierte Mäuse zeigten eine stärkere Gewichtsabnahme als BALB/ cJ Mäuse (Abbildung 35B). Dies spiegelte sich auch in der endoskopischen Kolitis-Bewertung wieder. BALB/ cJ Mäuse zeigten eine signifikant niedrigere ($p \leq 0,1$) Kolitis-Bewertung (Abbildung 35C). Zwischen den unrekonstituierten NSG und den humanisierten Mäusen (HuMi) konnte kein Unterschied in der Schwere der DSS- induzierten Kolitis festgestellt werden. Sowohl der Kolitis- Score als auch die durch die Kolitis bedingte Darmverkürzung waren bei den unrekonstituierten NSG Tieren gleich wie bei den humanisierten Mäusen (Abbildung 35 C und D). Die histopathologische Untersuchung der Därme der humanisierten, an Kolitis erkrankten Mäuse, zeigte ein pathologisches Erscheinungsbild des Darmes (Abbildung 35.E links). Die Färbung auf humanes CD45 zeigte, dass auch humane Immunzellen in den Darm eingewandert sind (Abbildung 35 E rechts). Unter diesen eingewanderten Zellen konnten T-Zellen mittels spezifischer anti-CD3 Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 35). Tregs konnten nur vereinzelt im Darm kolitiserkrankter Tiere nachgewiesen werden (Abbildung 35 F).

5.8.2 Die humanisierte Maus als Modell für das pleomorphe Sarkom

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen spielen eine nachteilige Rolle bei der Tumorbekämpfung durch das Immunsystem. Hierbei wird die Abstoßung des Tumors durch Einwanderung von regulatorischen T-Zellen verhindert und die Tumorprogression gefördert^{94,78}. Untersuchungen von Antitumorantworten im humanen System sind stark reglementiert und haben vor allem beobachtenden Charakter. Das humanisierte Mausmodell bietet eine Möglichkeit, gezielt einzugreifen. Folgend wurde untersucht, ob regulatorische T-Zellen eine Rolle bei der Akzeptanz humanen Tumorgewebes haben. Hierfür wurde humanisierten Mäusen Zellen eines humanen pleomorphen Sarkoms (NOS, „not otherwise specified“, G3) subkutan injiziert und das Tumorwachstum und der Immunstatus der Mäuse überwacht (Abbildung 36 A). Das pleomorphe Sarkom gehört zur Gruppe der fibrohistiozytischen Tumore, die früher auch als maligne fibröse Histiozytome (MFH) bezeichnet wurden⁹⁵. Das pleomorphe Sarkom gehört zu den am häufigsten vorkommenden Weichgewebssarkomen im Erwachsenenalter⁹⁵. Das Blut der Tiere sowie das Tumorwachstum wurden während des gesamten Versuchszeitraums überwacht. Spätestens nach Aufbrechen des Tumors wurden die Tumore präpariert und immunhistochemisch und durchflusszytometrisch untersucht. Weiter wurden die Milzen entnommen und ebenfalls durchflusszytometrisch geprüft.

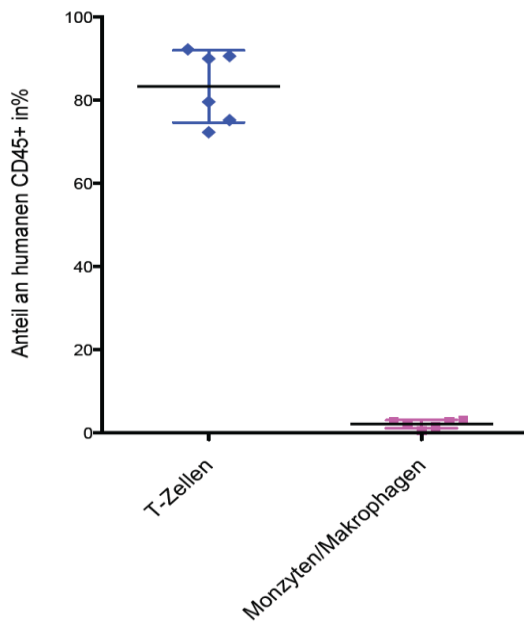


D Histologie Tumor

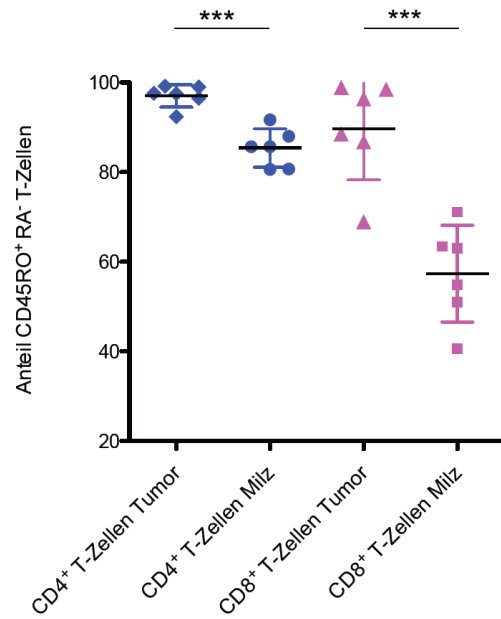


E

Zellpopulationen im Tumor



Aktivierte T-Zellen im Tumor



F

Regulatorische T-Zellen

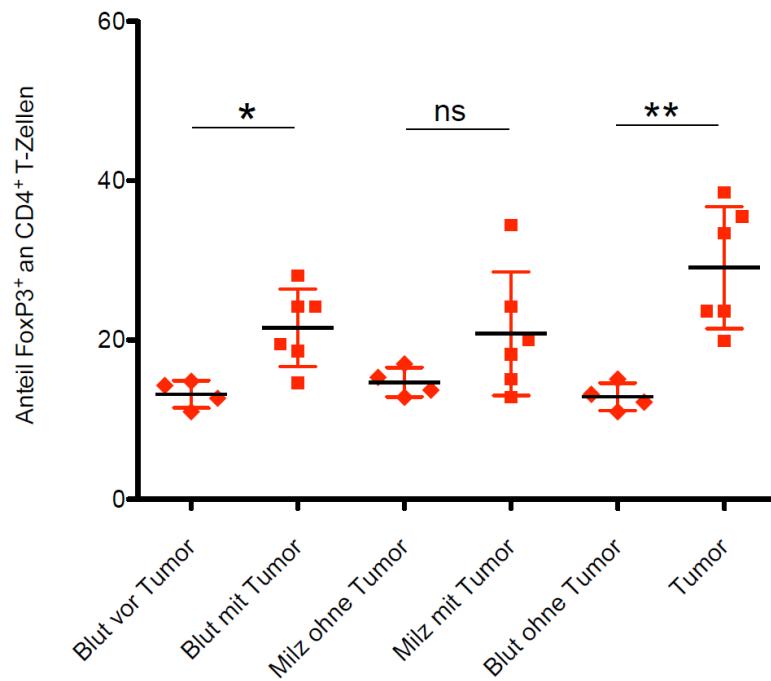
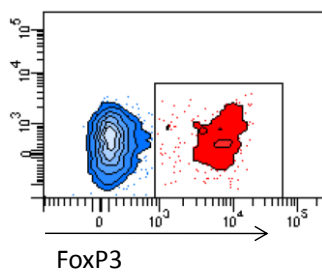


Abbildung 36: Humanes Tumorgewebe wächst in den humanisierten Mäusen an. An Tag 0 (d0) wurde den humanisierten Mäusen sowie NSG und BALB/c Kontrollgruppen subkutan in die Flanke in 50 µl PBS jeweils 1×10^6 Zellen eines humanen pleomorphen Sarkoms (NOS, „not otherwise specified“, G3) appliziert (A). Abbildung B zeigt den Tumor 11 Wochen nach Transplantation. Das Wachstum des Tumors wurde während dieses Zeitraums aufgezeichnet (C). Bei einer TumorgroÙe ≥ 15 mm bzw. bei Aufbrechen des Tumors (11 Wochen nach Injektion der Tumorzellen) wurden die Mäuse abgetötet und der Tumor immunhistochemisch untersucht (D). Es wurde eine HE Färbung (D oben) sowie eine spezifische Färbung gegen humanes CD45, CD3 und FoxP3 durchgeführt (D unten, CD45 links in magenta, CD3 mitte in magenta, FoxP3

rechts in magenta). Eine durchflusszytometrische Analyse des Tumors wurde durchgeführt (E und F). Abbildung E zeigt den Anteil von T-Zellen sowie CD14⁺ Monozyten/Makrophagen an den humanen, den Tumor infiltrierenden Immunzellen sowie den Anteil aktivierter CD45RO⁺CD45RA⁻ Zellen an den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. In Abbildung F ist der Anteil der Tregs in den Mäusen mit und ohne transplantiertem Tumor dargestellt. Verglichen wurden hier sowohl der Treg Anteil im Blut und in der Milz als auch im Tumor selbst mit den Treg Anteilen einer gesunden Maus.

Die transplantierten Tumorzellen zeigten in den humanisierten Mäusen ein ähnlich gutes Wachstum wie in unrekonstituierten NSG-Mäusen. In den BALB/cj Mäusen konnte kein Tumorstadium beobachtet werden (Abbildung 36B). Der Tumor besteht zum einen aus festem Gewebe, besitzt aber auch einen hohen Flüssigkeitsanteil. Etwa nach 10- 11 Wochen wurde ein Aufbrechen des Tumors mit Verlust der flüssigen Anteile beobachtet (Abbildung 36 B). Der freipräparierte Tumor wies eine starke Vaskularisierung auf (Abbildung 36 B). In der HE Färbung zeigte sich der Tumor als sehr heterogen, mit zytologischer und nukleärer Pleomorphie sowie einem hohen Zellanteil (Abbildung 33 D). Die weitere histopathologische Analyse machte eine Infiltration von humanen CD45⁺ Zellen deutlich (Abbildung 36 D links unten in Magenta). Der größte Anteil dieser Zellen bestand aus tumorinfiltrierenden T-Zellen (Abbildung 36 D mitte). Die CD3⁺ T-Zellen waren verstärkt im Randbereich des Tumors zu finden, aber auch über den gesamten Tumor verteilt. Es konnte ebenfalls ein Anteil FoxP3⁺ Tregs im Tumor detektiert werden. Diese waren vor allem in den Randbereichen des Tumors, am Übergang zur gesunden Haut, zu finden und nur vereinzelt im Tumor selber (Abbildung 36 D rechts). Durchflusszytometrische Analysen des Tumorgewebes verifizierten, dass es sich bei dem Großteil der in den Tumor eingewanderten humanen Immunzellen um T-Zellen handelte (>80% Abbildung 36 E). Hierbei wiesen sowohl die CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen nahezu ausschließlich einen aktivierten CD45RO⁺CD45RA⁻ Phänotyp auf und zwar signifikant höher als in der Peripherie (Abbildung 36 E). Einige wenige tumorinfiltrierende CD14⁺ Monozyten/ Makrophagen konnten im Tumor detektiert werden (Abbildung 36 E). Bei eingehender durchflusszytometrischer Analyse der regulatorischen T-Zellen fiel ein erhöhter Anteil dieser Zellen in den Mäusen mit Tumor auf (Abbildung 36 F). Im Blut zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil von regulatorischen T-Zellen, aber auch in den Milzen war ein tendenziell erhöhter Anteil humaner regulatorischer T-Zellen in den Tieren mit Tumor detektierbar. Besonders auffällig war der sehr hohe Anteil an regulatorischen T-Zellen an den CD4⁺ T-Zellen im Tumor selbst (Abbildung 36 F). Hier konnte der höchste Treg Anteil in den humanisierten Mäusen mit Tumor ermittelt werden. Dieser ist signifikant höher als in der Peripherie gesunder Tiere (Abbildung 36 F).

6 *Diskussion*

In dieser Arbeit sollte die Entstehung und Funktion regulatorischer T-Zellen in dem hier verwendeten humanisierten Mausmodell charakterisiert werden. Die essentielle Rolle von regulatorischen T-Zellen für die immunologische Toleranz ist in zahlreichen Studien nachgewiesen worden. *In vivo* Untersuchungen regulatorischer T-Zellen beschränken sich meist, nicht zuletzt wegen ethischer Grenzen, auf den Modellorganismus Maus. Allerdings haben Daten, die mit Hilfe präklinischer Mausmodelle gewonnen wurden, oft nur eine beschränkte Aussagekraft hinsichtlich der betreffenden humanen Erkrankung^{1,2}. Um Grenzen der Übertragbarkeit zu verringern, bietet das humanisierte Mausmodell ein großes Potenzial als Bindeglied zwischen Grundlagenforschung und Klinik.

6.1 *Generierung der humanisierten Mäuse und Charakterisierung ihres humanen Immunsystems*

Es gibt vielfältige humanisierte Mausmodelle (Einleitung 2.6). Das hier verwendete Mausmodell (Abbildung 7) wurde auf Grund der einfachen Handhabung und der daraus resultierenden bestmöglichen Reproduzierbarkeit ausgewählt. Vorteile von Nabelschnurblut als Stammzellquelle sind zum einen die hohe Stammzellfrequenz (Einleitung 2.2). Weiter sind HSC aus Nabelschnurblut im Vergleich mit adulten HSC weniger gealtert, was sich anhand unverkürzter Telomere nachweisen lässt⁹⁶. Vermutlich darauf basierend zeigen mit HSCs aus Nabelschnurblut rekonstituierte, immundefiziente Mäuse eine deutlich schnellere und effektivere Entstehung humaner Leukozyten⁹⁷. Nach der Isolation waren die HSCs T-Zell frei (Abbildung 6). Hierdurch konnte zum einen sichergestellt werden, dass das T-Zell Kompartiment nicht durch Proliferation von Spender-T-Zellen aufgefüllt wurde, zum anderen wurde hierdurch eine xenogene GvHD („Graft versus Host Disease“) durch Spender T-Zellen ausgeschlossen, wodurch Langzeitexperimente erst ermöglicht wurden. Dies spielt vor allem bei Untersuchungen des relativ spät entstehenden T-Zell Kompartiments (Abbildung 15) eine wichtige Rolle.

Durch die vor der Stammzelltransplantation stattfindende DNA schädigende Bestrahlung (Abbildung 7) wird in den Knochenmarksstromazellen der für HSC chemoattraktive Faktor SDF-1 (*stromal derived factor-1*) exprimiert⁹⁸. Die so angelockten, transplantierten humanen HSCs wandern ins Knochenmark und nehmen dort die durch die Bestrahlung frei gewordenen Nischen ein. Hier konnten diese *via* Durchflusszytometrie detektiert werden (Abbildung 8). Die ersten aus den humanen HSCs entstehenden CD45⁺ Blutzellen waren nach 4-6 Wochen im Blut der Mäuse

durchflusszytometrisch nachweisbar. Allerdings war deren Anteil im Blut bis zu einem Zeitpunkt von ca. 20 Wochen (Abbildung 11) so niedrig, dass sich die Tiere bis dahin nur mäßig für Experimente eigneten. Erst ab diesem Zeitpunkt fanden sich optimal hohe Anteile humaner Leukozyten im peripheren Blut sowie in den lymphoiden Organen (Abbildung 9 sowie Abbildung 13). Dies entspricht dem Geschehen bei humanen Knochenmarktransplantationen, auch hier ist der Schlüsselfaktor für die Immunrekonstitution die Zeit⁹⁹. Die gute Langzeitrekonstitution mit humanen Immunzellen (Abbildung 11) in den Mäusen ermöglichte die Durchführung zeitintensiver *in vivo* Versuche. Die Rekonstitution zeigte sich neben den durchflusszytometrisch detektierbaren hohen Anteilen humaner Leukozyten in der deutlichen Größenzunahme der lymphoiden Organe (Thymus, Lymphknoten, Milz) (Abbildung 12)¹⁰⁰. Diese ist vorwiegend auf die Besiedelung der Organe mit humanen hämatopoetischen Zellen zurückzuführen. Der optimale Zeitpunkt für die Verwendung der Tiere sowie der generelle Anteil humaner Zellen variierte je nach Stammzellcharge und Empfängertier, möglicherweise auf Grund unterschiedlicher Qualitäten der HSCs. Weiter spielt das Geschlecht der Empfängertiere eine Rolle bei der Rekonstitution⁸⁹. Weibliche Tiere zeigten eine signifikant bessere Rekonstitution mit humanen Zellen (Abbildung 10). Dies passt zu der Tatsache, dass Sexualhormone einen Einfluss auf die Regulation von hämatopoetischen Zellen haben¹⁰¹. Der Unterschied beschränkt sich auf die Anteile der humanen Leukozyten, die T-Zell-Anteile an den humanen Immunzellen unterschieden sich nicht (Abbildung 23).

In humanisierten NSG-Mäusen entstehen vielfältige humane immunologische Zelllinien⁸². So konnten auch hier B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, plasmazytoiden und myeloiden dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 14). Dies ermöglicht realitätsnahe *in vivo* Versuche, in denen es auf Interaktionen verschiedener Immunzellen ankommt. Es zeigten sich im Vergleich zum humanen Normalzustand jedoch auch Abweichungen. Hier führt vermutlich die nicht immer optimale Interaktion zwischen murinen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und humanen Zellen⁸⁶ zu der beobachteten Überrepräsentation von Lymphozyten (Abbildung 15) und kann weiter zu dysfunktionalen Zellpopulationen führen.

Der Anteil der einzelnen Zellpopulationen an den humanen hämatopoetischen Zellen variierte ebenfalls mit der Zeit. T-Zellen entstanden erst Wochen, nachdem die ersten humanen Zellen in den Mäusen detektiert werden konnten und beispielsweise deutlich später als B-Zellen, welche anfangs den Großteil der humanen Zellen ausmachten (Abbildung 15). Möglicherweise sind auf Grund dessen gelegentlich niedrige T-Zell Anteile in diesem humanisierten Mausmodell publiziert^{82,102}. Der Anteil der T-Zellen an den humanen Leukozyten nimmt allerdings mit der Zeit stark zu (Abbildung 15)¹⁰³. Nach ca. 25 Wochen nach Rekonstitution machten die T-Zellen den größten Anteil der humanen hämatopoetischen Zellen in den Mäusen aus. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieses Teils der

vorliegenden Arbeit, dass die sorgfältige Bestimmung der individuellen hämatopoetischen Rekonstitution essentiell ist für die Beurteilung der mit diesem experimentellen Modell erzielten Resultate.

6.2 Humane T-Zellen in der humanisierten Maus

Es ist ein weiter Weg von der transplantierten HSC zur reifen zirkulierenden T-Zelle, in dessen Verlauf die immunologische Ontogenie rekapituliert wird¹⁰⁴. Die Festlegung in Richtung T-Zell Schicksal erfordert das Durchwandern 3 verschiedener anatomischer Bereiche (Knochenmark, Zirkulation, Thymus), Interaktionen mit verschiedenen Mikroumgebungen und den Verlust vielfältiger alternativer Potentiale. Trotz dieses komplexen Weges können in immundefizienten Mäusen prinzipiell humane T-Zellen entstehen^{103,105,106,82}. Auch in dem hier etablierten Modell entstehen T-Zellen, anfangs deutlich unterrepräsentiert, zu späteren Zeitpunkten aber in hohen Anteilen (Abbildung 15). Bei ihrem Weg in Richtung T-Zelle sind die Vorläufer zwar nur sehr kurz im Blut, nur Sekunden oder Minuten, durchleben folgend aber einen recht langwierigen Reifungsprozess im Thymus^{107,7}. Komplizierend kommt hinzu, dass der Thymus der NSG Mäuse, aufgrund fehlender Interaktionen der heranreifenden T-Zellen mit dem Thymusepithel, nur rudimentär ausgebildet ist (Abbildung 12A). Dieses Thymusrudiment wurde nach der Stammzelltransplantation mit humanen Zellen besiedelt (Abbildung 13) und nahm hierdurch deutlich in seiner Größe zu (Abbildung 12). Zu der Größenzunahme trägt weiter das Ausbilden medullärer Thymusstrukturen aufgrund nun stattfindender Interaktionen mit heranreifenden T-Zellen bei (Einleitung 2.3)¹⁰⁸. Im Zuge ihres Heranreifens im Thymus exprimieren die Vorläufer nach einem initialen doppelnegativen Stadium zunächst einen präT-Zell Rezeptor Komplex sowie die Korezeptoren CD4 und CD8 gemeinsam. Diese doppelpositiven Zellen machen im humanen Thymus mit altersabhängig zwischen 60 und 70% den größten Anteil der Thymozyten aus¹⁰⁹. Dies entspricht in etwa den hier vorgefundenen Verhältnissen im Thymus von vor mehr als 20 Wochen rekonstituierten Mäuse (Abbildung 17) und lässt auf eine bis zu diesem Punkt „normale“ Entwicklung der humanen Zellen im murinen Thymus schließen. In diesem Stadium findet auch die Positivselektion und somit die Restriktion der positiv-selektierten Zellen auf die MHC Moleküle statt (Einleitung 2.3). Dies ist ein kritischer Schritt in der Entwicklung humaner T-Zellen im Maus-Thymus, da bei nicht erfolgreicher Positivselektion die Zelle abstirbt. Da bei der Positivselektion die cTECs die wichtigste Rolle spielen und diese in dem hier verwendeten humanisierten Mausmodell murinen Ursprungs sind, findet vor allem eine Restriktion auf murine MHC Moleküle statt^{100,102,82}. Dass murine Thymusepithelzellen prinzipiell in der Lage sind humane T-Zell Selektion auszulösen, zeigt auch die Interaktion humaner CD8⁺ Zellen mit murinen MHC (H2) Klasse I Molekülen und humaner CD4⁺ T-Zellen mit murinen MHC Klasse II Molekülen^{110,111}. In mit

humanen hämatopoetischen HSC transplantierten NSG-Mäusen konnte weiter das Entstehen von auf humane MHC Moleküle restringierten T-Zell Klonen nachgewiesen werden¹⁰². Es findet daher zumindest eine marginale Selektion an humanen HLA exprimierenden Zellen, wie etwa den im Thymus vorhandenen dendritischen Zellen (Abbildung 16), statt. Dies spielt eine Rolle bei der späteren Interaktion von humanen T-Zellen mit humanen antigenpräsentierenden Zellen. Um eine komplette Restriktion auf humane MHC Moleküle zu erreichen und so mögliche Inkompatibilitäten zu verringern, wurden HLA transgene Mäuse generiert. Diese tragen auch im Thymus transgen humane MHC Moleküle, an denen dann die heranreifenden T-Zellen selektiert werden^{112,113}. Weiter besteht die Möglichkeit, neben den Stammzellen humanes Thymusgewebe zu transplantieren, um die Selektion von humanen T-Zellen zu verbessern¹¹⁴. Da im Thymus der Mäuse sowohl humane CD4 als auch humane CD8 einzelpositive Zellen entstanden sind (Abbildung 17) und diese auch im Blut zu finden waren (Abbildung 24), hat hier eine produktive Positivselektion stattgefunden. Die Fähigkeit der T-Zellen, auf allogene Stimulation zu reagieren, ist ein weiteres Indiz hierfür (Abbildung 27)¹⁰³. Es besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass einige Zellen auf Grund suboptimaler Kompatibilitäten humaner T-Zell-Rezeptoren und muriner MHC Moleküle nicht positivselektiert werden, was Grund für die nicht optimal hohen T-Zell Zahlen sein könnte (oft nur 1/10 der CD4 T-Zellen in der Milz im Vergleich zu wildtypischen Mäusen). Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da unter anderem die Anteile einzelpositiver T-Zellen im Thymus der humanisierten Mäuse eine dem adulten humanen Thymus ähnliche Verteilung aufwiesen (Abbildung 17) und sich auch sonst kein Hinweis auf überdurchschnittliche Sterberaten bot¹⁰⁹. Weiter konnte in einem ähnlichen Humanisierungsmodell auch schon eine hohe T-Zell Rezeptor Diversität in der Peripherie nachgewiesen werden, was die Positivselektion vieler unterschiedlicher T-Zell-Spezifitäten impliziert¹¹⁵. Die heranreifenden Thymozyten exprimieren nach erfolgreicher Positivselektion ausschließlich die CD45RO Isoform des CD45-Antigens (Einleitung 2.3, Abbildung 18).

Für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz ist die Deletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus, die sogenannte Negativselektion, essentiell wichtig¹¹⁶. An diesen Prozess sind die murinen mTECs maßgeblich beteiligt. Diese präsentieren den heranreifenden Thymozyten über ihre MHC Moleküle Autoantigene. Der Transkriptionsfaktor AIRE (Autoimmun Regulator) sorgt hierbei in den mTECs für die ektopische Expression einer Vielzahl von Genen, zumindest auf mRNA-Ebene.^{117,118}. Hochaffine/-avide Interaktionen führen hierbei zur Apoptose der Thymozyten. Bei der Negativselektion spielen wahrscheinlich aber auch im Thymus vorgefundene humane antigenpräsentierende Zellen (B-Zellen sowie dendritische Zellen) eine Rolle (Einleitung 2.4, Abbildung 16)⁹⁷, so sind beispielsweise dendritische Zellen potente Auslöser von Negativselektion^{119,120}. Hierbei können die mTECs den dendritischen Zellen Antigene liefern¹¹⁶, so

dass auch an humanen antigenpräsentierenden Zellen Toleranz für murine Gewebe generiert werden kann. In den humanisierten Mäusen konnten keine Immunreaktionen, wie beispielsweise eine xenogene GvHD, detektiert werden, was ein starker Hinweis auf eine funktionelle Negativselektion ist. Weiter zeigten sich die entstandenen T-Zellen in Kokultur mit dendritischen Zellen tolerant gegenüber „syngenen“ (aus NSG Knochenmark generierten) DCs, während allogene murine dendritische Zellen eine Proliferation der T-Zellen auslösten (Abbildung 27). Auch bei Kokultur mit allogenen humane DCs Proliferierten die aus den Mäusen isolierten humanen T-Zellen heftig¹⁰⁰. Wie genau die Selektion der humanen T-Zellen im Maus Thymus stattfindet bedarf noch weiterer Aufklärung, sicher ist, dass die humanen T-Zellen zwischen Selbst und Fremd unterscheiden können. Nach abgeschlossener Selektion wechseln die Thymozyte kurz vor ihrem Auswandern in die Peripherie als finalen Reifungsschritt von der CD45RO Expression zur Expression von CD45RA (Einleitung 2.3). Im Thymus der humanisierten Mäuse konnten dementsprechend sowohl bei humanen CD4 als auch bei CD8 einzelpositiven T-Zellen ein Anteil CD45RA⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 18).

Die naiven T-Zellen wandern aus dem Thymus in die Peripherie aus. Hier ist das Verhältnis der CD4 zu CD8 T-Zellen im Vergleich zu humanem Blut in Richtung CD4 T-Zelle verschoben (Abbildung 24), was möglicherweise auf eine beeinträchtigte CD8 T-Zell Homöostase hinweist. Die niedrigen, mit humanem Blut vergleichbaren Anteile der doppelpositiven oder doppelnegativen T-Zellen lieferten auf Grund ihrer im normalen Rahmen liegenden Anteile keinen Hinweis auf einen suboptimalen „Thymusoutput“ (Abbildung 24). Prinzipiell ist hierbei jedoch der Vergleich zwischen den unter SPF Bedingungen gehaltenen Mäuse und humanem Blut schwierig, da das humane Immunsystem vielfältigsten Umwelteinflüssen ausgesetzt ist.

Die im Thymus entstandenen naiven CD45RA exprimierenden T-Zellen^{121,122} konnten in der Peripherie der Mäuse detektiert werden (Abbildung 25). Es zeigten jedoch nicht alle peripheren T-Zellen in den humanisierten Mäusen einen naiven CD45RA⁺ CD45RO⁻ Phänotyp (Abbildung 25). Die vorhandenen CD45RO⁺ T-Zellen könnten bereits aktiviert worden sein. Zusätzlich wird eine Expansion der „Recent Thymic Emigrants“ dadurch gefördert, dass aufgrund des Gendefektes das T-Zellkompartiment solcher Tiere leer ist. Solch eine homöostatische Expansion führt, genau wie die antigenspezifische Aktivierung, zu Verlust der CD45RA Expression und zur Expression der CD45RO Isoform^{31,123}. An sich naive T-Zellen können also einen Memory-Phänotyp aufweisen¹²⁴. Da die Homöostase der B- und T-Zellen unabhängig voneinander reguliert wird, spielen die zu dem Zeitpunkt der T-Zell-Entstehung bereits vorhandenen B-Zellen (Abbildung 15) hier keine Rolle^{125,126}. Diese stattfindende homöostatische Expansion liefert weiter ein Indiz für stattfindende Interaktionen zwischen den T-Zellen und peripheren antigenpräsentierenden Zellen, da hierfür T-Zell Rezeptor-

MHC Interaktionen benötigt werden²². Auffällig ist der höhere Anteil naiver T-Zellen an den CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 25). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass CD45RO positive T-Zellen auch wieder zu CD45RA positiven T-Zellen revertieren können. Die Population der CD45RA⁺ T-Zellen kann also einen Anteil ehemals aktivierter bzw. proliferierter Zellen enthalten^{127,128,129}. Hierbei können CD8⁺ T-Zellen die CD45RO Expression komplett verlieren, CD4 T-Zellen erhalten die CD45RO Expression und werden CD45RA CD45RO doppelpositiv^{130,131}. Die naiven T-Zellen benötigen für ihr Überleben und eine sowie für ihre Expansion in der Peripherie kontinuierlich Signale über ihren T-Zell Rezeptor, welche sie über MHC Interaktionen mit antigenpräsentierenden Zellen erhalten^{132,133,134}. Auf funktionelle Interaktionen dieser Art weist zum einen der bestehende Anteil naiver T-Zellen (Abbildung 25) in den Tieren hin. Die normale Funktionsfähigkeit dieser humanen CD4⁺ T-Zellen zeigt sich auch dadurch, dass diese nicht nur polyklonal (CD3/CD28) aktiviert werden können (Abbildung 26 und Abbildung 34), sondern auch antigenspezifisch unter Verwendung allogener DCs (Abbildung 27).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen belegen, dass in den humanisierten Mäusen eine naive humane CD4⁺ T-Zell Population entsteht, die voll funktionsfähig ist. Da solche T-Zellen auch das präferentielle Ziele der suppressiven Wirkung regulatorischer T-Zellen sind, können diese humanisierten Mäuse auch zur Analyse humaner regulatorischer T-Zellen verwendet werden.

6.3 Humane regulatorische T-Zellen in der humanisierten Maus

Eine wichtige Population innerhalb der T-Zellen stellen die Tregs dar. Diese verhindern unerwünschte Autoimmunreaktionen und kontrollieren überschießende Immunreaktionen. Das humanisierte Mausmodell bietet erstmalig die Möglichkeit, Entwicklung und Funktion humaner regulatorische T-Zellen unter standardisierten Bedingungen *in vivo* zu analysieren sowie zu manipulieren. In immundefizienten Mäusen können prinzipiell humane Tregs durch Stammzelltransplantation generiert werden^{135,136,137}. Hier wurde nun die Entwicklung von Tregs aus den transplantierten humanen HSCs von der Entstehung im murinen Thymus bis hin zur funktionellen zirkulierenden regulatorischen T-Zelle analysiert. Der größte und wichtigste Teil der regulatorischen T-Zellen, die natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (nTreg), entsteht im Thymus. Die Selektion von regulatorischen T-Zellen im Thymus läuft prinzipiell gleich derer konventioneller T-Zellen. Auch die regulatorischen T-Zellen werden an Thymusepithelzellen sowie einigen humanen, aus dem Knochenmark stammenden antigenpräsentierenden Zellen selektiert^{138,139,70}. Präferentiell entwickeln sich diejenigen Thymozyten zu regulatorischen T-Zellen, welche T-Zell-Rezeptoren mit relativ hoher Selbst-Affinität exprimieren^{140,141}. Dieser Prozess der Treg-Selektion lässt sich in den

humanisierten Mäusen nachweisen, da unter den einzelpositiven CD4 T-Zellen im Thymus regulatorische T-Zellen anhand ihres CD4⁺ CD8⁻ CD25⁺ FoxP3⁺ Phänotyps detektiert wurden (Abbildung 19). Dass es sich bei diesen Zellen wirklich um dort entstandene regulatorische T-Zellen handelt und nicht etwa um eingewanderte, in der Peripherie aus konventionellen T-Zellen induzierten iTregs handelt, bestätigt deren dauerhafte Helios-Expression (Abbildung 20)⁶⁴. Eine dauerhafte Helios Expression ist einer der zur Zeit besten verfügbaren Marker für die Unterscheidung zwischen diesen Treg-Subgruppen, obwohl eine transiente Helios Expression auch in induzierten Tregs auftreten kann⁶⁵. Die humanen Tregs im murinen Thymus sind überwiegend CD45RO positiv (Abbildung 21). Dies entspricht den Befunden in humanem fötalem Thymus⁷². Weiter entspricht auch der Anteil MHC II (HLA-DR) positiver humaner Tregs im murinen Thymus der humanisierten Mäusen (Abbildung 22) dem Anteil dieser im humanen Thymus¹³⁵. Dies alles spricht für eine normale Entwicklung von humanen regulatorischen T-Zellen im Maus-Thymus.

Nach ihrem Auswandern aus dem Thymus besiedelten die regulatorischen CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁺ T-Zellen die Peripherie und konnten in den Mäusen sowohl im Blut, als auch in den lymphoiden Organen detektiert werden (Abbildung 28). Diese humanen regulatorischen T-Zellen in den humanisierten Mäusen sind nahezu ausschließlich im Thymus entstanden Helios⁺ nTregs, während in parallel analysiertem humanem peripheren Blut ein deutlicher Anteil Helios⁻ induzierter regulatorischer T-Zellen vorhanden war (Abbildung 29). Aufgrund der Haltungsbedingungen haben die Tiere nur mit wenig Umweltantigenen und Krankheitserregern Kontakt, wodurch wenig Potential für die Induktion von iTregs vorhanden ist. Möglicherweise tragen aber auch die Defizite in der Interaktion mit humanen MHC Molekülen zu dem Nichtvorhandensein von iTregs bei (siehe Diskussion 6.2). Zum einen kann also die Gesamtheit der regulatorischen T-Zellen in induzierte regulatorische T-Zellen sowie im Thymus entstandene natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen unterteilt werden. Aber auch die Gruppe der nTregs kann anhand von HLA-DR (MHC II) sowie CD45RA/RO Expression in funktionell distinkte Subpopulationen untergliedert werden. HLA-DR positive regulatorische T-Zellen exprimieren höhere Level an FoxP3 und supprimieren T-Zellen schneller und effektiver wie HLA-DR negative Tregs⁷⁴. Der Anteil dieser hochsuppressiven HLA-DR⁺ Tregs liegt in den humanisierten Mäusen sehr viel höher als in parallel analysiertem humanem peripheren Blut (Abbildung 30) Dementsprechend ist der Anteil der weniger stark suppressiven CD45RA positiven HLA-DR negativen Tregs in den humanisierten Mäusen stark und der Anteil der CD45RA und HLA-DR doppeltnegativen intermediär suppressiven Tregs leicht erniedrigt (Abbildung 30)¹⁴². Es ist anzunehmen, dass der erhöhte Anteil der hochsuppressiven HLA-DR positiven regulatorischen T-Zellen vermutlich mit einer erhöhten suppressiven Aktivität in den humanisierten Mäusen einhergeht. Weiter ist der Anteil CD45RO exprimierender regulatorischer T-

Zellen in den Mäusen ebenfalls höher als in humanem Blut (Abbildung 31). Diese CD45RO⁺ Tregs wurden bereits zur Proliferation angeregt, entweder durch (Selbst-) Antigenkontakt oder aufgrund der in den Mäusen vorherrschenden Lymphopenie, und stellen eine hochdifferenzierte Population mit geringer Kapazität zur Selbsterneuerung dar¹⁴³. Dieser aktivierte CD45 RO positive Phänotyp war T-Reg spezifisch und nicht auf einen allgemein aktivierten Zustand in den Mäusen zurückzuführen, da ein deutlicher Anteil nichtaktivierter CD45RO negativer CD4 und CD8 einzelpositiver CD25 negativer T-Zellen vorhanden war (Abbildung 31). Die erhöhte CD45RO Expression geht einher mit einem erhöhten Anteil humaner regulatorischer T-Zellen in den humanisierten Mäusen verglichen mit humanem Blut (Abbildung 28). Dies deutet zusammen auf eine stärkere homöostatische Proliferation der vorwiegend Selbst-Antigen erkennenden Tregs in den lymphopenischen Individuen hin. Der niedrige Anteil an GARP Expression (Abbildung 33), welches aktivierte Treg kennzeichnet⁹⁰, macht hierbei eine antigenspezifische Aktivierung unwahrscheinlich. Ein erhöhter Anteil Tregs wird allgemein in lymphopenischen Individuen beobachtet. So ist der Anteil von regulatorischen T-Zellen in sich von bestrahlungsverursachter Lymphopenie erholenden Mäusen, sowie human bei der Rekonvaleszenz nach Chemotherapie, erhöht^{144,145}. In den humanisierten Mäusen fand sich ein im Vergleich zu humanem Blut erhöhter Anteil von Tregs, welche einen aktivierten, hochsuppressiven CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ FoxP3⁺ HLA-DR⁺ CD45RO⁺ Phänotyp zeigten, was auf ein hohes suppressives Potential der Tregs in den Mäusen schließen lässt.

Die Tregs in den humanisierten Mäusen zählen nicht nur phänotypisch zu den humanen Tregs. Sie zeigten weiter auch eine normale Funktionalität. Die aus den humanisierten Mäusen isolierten humanen Tregs verhielten sich *in vitro* typisch anergisch, indem sie in Antwort auf Stimulation weder mit Proliferation noch mit IL-2 Expression reagierten (Abbildung 32 und Abbildung 34)¹⁴⁶. Dass die humanen Tregs trotzdem aktiviert wurden, zeigte deren GARP-Expression (Abbildung 33), da GARP erst nach Aktivierung auf humanen Tregs exprimiert wird⁹⁰. Weiter waren die humanen Tregs in der Lage, verhältnisabhängig die Proliferation von konventionellen CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁻ T-Zellen zu supprimieren (Abbildung 34). Auch in der Maus selbst ist das Nichtauftreten von Autoimmunitäten ein klarer Hinweis auf die Funktionalität dieser Zellen, da es ohne funktionierende regulatorische T-Zellen zu Autoimmunreaktionen kommen würde. So führt beispielsweise die Depletion von Tregs in Wildtyp-Mäusen oder der Transfer von konventionellen CD25⁻ T-Zellen ohne Tregs in Mäuse, denen T-Zellen fehlen, zu Autoimmunreaktionen^{147,148}. Auch bei Menschen führen fehlende Tregs zu der schweren Multiorgan-Autoimmunerkrankungen IPEX („immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome“)^{48,49}.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass in den humanisierten Mäusen eine humane, voll funktionsfähige, Treg Population entsteht.

6.4 Die humanisierte Maus als Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Zur weiteren Spezifizierung von T-Zell-Antworten und Etablierung möglicher therapeutischer Ansätze, wurde ein Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED auch IBD für „inflammatory bowel disease“), die DSS-induzierte Kolitis (siehe 4.24), untersucht. Die humanisierten Mäuse zeigten eine starke DSS-induzierte Kolitis, welche anhand vielfältiger Merkmale charakterisiert wurde (verkürzte Darmlänge, blutige Durchfälle, Gewichtsabnahme, fibrinöse Kolitis, bestätigt durch Pathologie, Endoskopie und Histologie, Abbildung 35). Die Stärke der Kolitis in den NSG-Mäusen entsprach jedoch genau derer von unrekonstituierten Tieren. Dies spricht dafür, dass die rekonstituierten humanen Immunzellen nur eine untergeordnete Rolle in diesem Modell spielen. Vermutlich nehmen hier die in den NSG vorhandenen murinen neutrophilen Granulozyten eine zentrale Rolle ein, da diese als wichtig in diesem Modell bekannt sind¹⁴⁸. Nichtsdestotrotz infiltrierten im Zuge der Entzündungsregion auch humane Immunzellen die betroffenen Darmregionen (Abbildung 35). Hierbei fanden sowohl T-Zellen als auch regulatorische T-Zellen ihren Weg in die entzündeten Darmareale, was für deren funktionelle Beteiligung an der Immunreaktion unerlässlich ist. Die eingewanderten regulatorischen T-Zellen könnten hierbei einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Kolitis haben¹⁴⁹. Durch die Beteiligung humaner T-Zellen an der DSS-vermittelten Kolitis bietet dieses Modell prinzipiell die Möglichkeit, die humanen chronischen-entzündlichen Darmerkrankungen weiter zu erforschen und Therapieansätze zu etablieren.

6.5 Die humanisierte Maus als Modell für das pleomorphes Sarkom

Das pleomorphe Sarkom gehört zur Gruppe der fibrohistiozytischen Tumore, die früher auch als maligne fibröse Histiozytome (MFH) bezeichnet wurden und ist eines der am häufigsten vorkommenden Weichgewebssarkome im Erwachsenenalter⁹⁵. Für die Untersuchung des pleomorphen Sarkoms gibt es bisher kein Modellsystem. Das hier verwendete humanisierte Tumor-Maus-Modell bietet ein elegantes System, welches erstmalig *in vivo* Studien ermöglicht. Malignome verfügen über eine Vielzahl an Strategien, mit denen sie der Überwachung durch das Immunsystem entgehen können. Beispielsweise können sie aufgrund schlechter Immunogenität ungehindert in immunkompetenten Individuen wachsen. So kommt es auch nicht zwangsläufig zu einer Abstoßung von transplantierten Tumorzellen, die identische Fremddantigene tragen, wie ein abgestoßenes Transplantat¹⁵⁰. Auch hier wurden die, in die humanisierten Mäuse transplantierten, Fremddantigene tragenden Tumorzellen nicht vom humanen Immunsystem der humanisierten Mäuse eliminiert (Abbildung 36 C). Der Tumor wird hierbei jedoch prinzipiell von humanen Leukozyten erkannt,

welche in den gut vaskularisierten Tumor infiltrieren (Abbildung 36 B und D). Die Analyse der humanen tumorinfiltrierenden Zellen zeigte zum einen tumorassoziierte humane Makrophagen (Abbildung 36 E). Diese können zur Aktivierung von CD4⁺ und auch CD8⁺ T-Zellen über Kreuzpräsentation von Tumorantigenen beitragen. Zum anderen konnten im Tumor diese humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, welche den Phänotyp bereits aktivierter beziehungsweise schon proliferierter T-Zellen aufwiesen, detektiert werden (Abbildung 36 E). Trotz alledem kam es in den Tieren zu keiner effektiven Antitumor-Immunantwort. Neben einer Herunterregulation von MHC I Molekülen auf Tumorzellen, wird eine effektive Tumorabstoßung vor allem durch ein immunsuppressives Tumormilieu verhindert^{151,152}. Hierbei können zum einen die tumorassoziierten Makrophagen eine Rolle spielen. Makrophagen sind eine sehr heterogene Population mit vielfältigen Funktionen. Neben der oben schon erwähnten Aktivierung von T-Zellen, können Makrophagen ebenfalls an immunsuppressiven Prozessen beteiligt sein und somit das Tumorwachstum begünstigen¹⁵³. Unter anderem ist bekannt, dass Makrophagen über das Chemokin CCL22 Tregs anlocken können¹⁵⁴. In dem pleomorphen Sarkom der humanisierten Mäuse konnte ein deutlich erhöhter Anteil von Tregs nachgewiesen werden (Abbildung 36 F), welche potentiell effektive Antitumor-Immunantworten hemmen¹⁵⁵. Kombiniert mit den erhöhten Anteilen humaner Tregs in der Peripherie weist dies deutliche Parallelen mit Befunden von Malignom-Patienten aus der Klinik auf^{156,77}. Somit eignet sich diese Tumor-Maus als präklinisches Modell zur Erforschung der Rolle humaner Tregs in Tumoren sowie zur Etablierung und Austestung neuer Therapiemöglichkeiten.

Die Entwicklung funktioneller humaner Tregs in diesem humanisierten Mausmodell führt zu einer beträchtlichen Erweiterung der experimentellen Möglichkeiten hinsichtlich der Analyse humaner Tregs. Zum einen kann *in vivo* die Entwicklung humaner Tregs, von der Entstehung im Thymus bis zu ihrer Funktion in der Peripherie untersucht und manipuliert werden. Weiter bietet sich die Möglichkeit, die Funktion humaner Tregs *in vivo* in präklinischen Modellen, wie in dem hier untersuchten Tumormodell, zu analysieren und somit innovative Therapien zu etablieren. Somit stellt dieses Modell ein Bindeglied zwischen Maus-Forschung und Klinik dar.

7 Abkürzungen

BSA	Bovines Serumalbumin
CCL22	Engl. „chemokine (C-C motif) ligand 22“
CCPM	Engl. “Corrected Counts Per Minute” Korrigierte Impulse pro Minute
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, engl. „Inflammatory Bowel Disease“ (IBD)
CFA	Engl. “Complete Freund's adjuvant” Komplettes Freundsches Adjuvant
d	Engl.: day = Tag
DC	dendritische Zelle („Dendritic Cell“)
DP	Doppelpositiv
DN	Doppelnegative Zellen
DSS	Engl. “Dextran Sulfate Sodium” Natriumdextransulfat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EF1- α	Engl. “Elongation factor-1 alpha”
FCS	Engl. „Fetal Calf Serum” fötales Kälberserum
FoxP3	Forkhead box P3
FSC	Engl. “Forward Scatter” Vorwärtsstreulicht
G	Gauge
GARP	Engl. „Glycoprotein A Repetitions Predominant“
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA-DR	humanes Leukozyten-Antigen-DR
HSC	Engl. „Haematopoietic Stem Cell“ hämatopoetische Stammzelle
$^3\text{H-Tdr}$	Tritium-markiertes Thymidin
HuMi	Engl. „Humanised mice“ Humanisierte Mäuse
IBD	Engl. „Inflammatory Bowel Disease“ chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPEX	Engl. “Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome”
i.v.	intravenös
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zellen
mDC	myeloide dendritische Zellen
MHC	Engl. “Major Histocompatibility Complex” Haupt-

	Histokompatibilitätskomplex
MLR	Engl. „ <u>M</u> ixed <u>L</u> ymphocyte <u>R</u> eaction“ gemischte Lymphozytenreaktion
NSG	NOD-scid IL2Rgamma ^{null} Maus
nTreg	Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen
pDC	Engl. „ <u>P</u> lasmacytoid <u>D</u> endritic <u>C</u> ells“ Plasmazytoide dendritische Zellen
PBMC	Engl. „ <u>P</u> eripheral <u>B</u> lood <u>M</u> ononuclear <u>C</u> ells“, mononukleäre Zellen im peripheren Blut
PBS	Engl. „ <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline“ Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PMA	<u>P</u> horbol 12- <u>M</u> yrystate 13- <u>A</u> cetate
qRT-PCR	<u>q</u> uantitative <u>R</u> eal <u>t</u> ime PCR
RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskription
SP	Engl. „ <u>S</u> ingle <u>P</u> ositive“ eizelpositive Zellen
SPF	<u>S</u> pezifisch <u>p</u> athogen <u>f</u> rei
SSC	Engl. „ <u>S</u> ide <u>S</u> catter“ Seitwärtsstreulicht
Treg	Regulatorische T-Zelle
TZR	<u>T</u> - <u>Z</u> ell- <u>R</u> ezeptor
VE	<u>v</u> ollentsalzt

8 Referenzen

1. Seok, J. *et al.* Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 3507–12 (2013).
2. Van der Worp, H. B. *et al.* Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS medicine* **7**, e1000245 (2010).
3. Mayani, H. & Lansdorp, P. M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem cells* **16**, 153–65 (1998).
4. Awong, G. *et al.* Characterization in vitro and engraftment potential in vivo of human progenitor T cells generated from hematopoietic stem cells. *Blood* **114**, 972–82 (2009).
5. Haddad, R. *et al.* Dynamics of thymus-colonizing cells during human development. *Immunity* **24**, 217–30 (2006).
6. Takahama, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature reviews. Immunology* **6**, 127–35 (2006).
7. Petrie, H. T. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual review of immunology* **25**, 649–79 (2007).
8. Holländer, G. A. *et al.* Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* **373**, 350–3 (1995).
9. Radtke, F. *et al.* Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547–58 (1999).
10. Van Ewijk, W., Holländer, G., Terhorst, C. & Wang, B. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development* **127**, 1583–91 (2000).
11. Shores, E. W., Van Ewijk, W. & Singer, A. Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *European journal of immunology* **21**, 1657–61 (1991).
12. Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T. & Zlotnik, A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *Journal of immunology* **150**, 4244–52 (1993).
13. Krangel, M. S. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Current opinion in immunology* **21**, 133–9 (2009).
14. Ciofani, M., Knowles, G. C., Wiest, D. L., Von Boehmer, H. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. *Immunity* **25**, 105–16 (2006).
15. Love, P. E. & Bhandoola, A. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nature reviews. Immunology* **11**, 469–77 (2011).

16. Habu, S., Kimura, M., Katsuki, M., Hioki, K. & Nomura, T. Correlation of T cell receptor gene rearrangements to T cell surface antigen expression and to serum immunoglobulin level in scid mice. *European journal of immunology* **17**, 1467–71 (1987).
17. Mombaerts, P. *et al.* Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* **360**, 225–31 (1992).
18. Abbey, J. L. & O'Neill, H. C. Expression of T-cell receptor genes during early T-cell development. *Immunology and cell biology* **86**, 166–74 (2008).
19. Kisielow, P., Teh, H. S., Blüthmann, H. & Von Boehmer, H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* **335**, 730–3 (1988).
20. Jameson, S. C., Hogquist, K. A. & Bevan, M. J. Positive selection of thymocytes. *Annual review of immunology* **13**, 93–126 (1995).
21. Scollay, R. G., Butcher, E. C. & Weissman, I. L. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *European journal of immunology* **10**, 210–8 (1980).
22. Goldrath, a W. & Bevan, M. J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* **402**, 255–62 (1999).
23. Fujii, Y., Okumura, M., Inada, K., Nakahara, K. & Matsuda, H. CD45 isoform expression during T cell development in the thymus. *European journal of immunology* **22**, 1843–50 (1992).
24. Gallegos, A. M. & Bevan, M. J. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *The Journal of experimental medicine* **200**, 1039–49 (2004).
25. Merckenschlager, M., Terry, L., Edwards, R. & Beverley, P. C. Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation. *European journal of immunology* **18**, 1653–61 (1988).
26. Jameson, S. C. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nature reviews. Immunology* **2**, 547–56 (2002).
27. Takeda, S., Rodewald, H. R., Arakawa, H., Bluethmann, H. & Shimizu, T. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* **5**, 217–28 (1996).
28. Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Pérarnau, B., Freitas, A. A. & Rocha, B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* **276**, 2057–62 (1997).
29. Geppert, T. D., Davis, L. S., Gur, H., Wacholtz, M. C. & Lipsky, P. E. Accessory cell signals involved in T-cell activation. *Immunological reviews* **117**, 5–66 (1990).
30. Linsley, P. S. & Ledbetter, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annual review of immunology* **11**, 191–212 (1993).
31. Akbar, a N., Terry, L., Timms, a, Beverley, P. C. & Janossy, G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *Journal of immunology* **140**, 2171–8 (1988).
32. Picker, L. J. *et al.* Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *Journal of immunology* **150**, 1105–21 (1993).

33. Murali-Krishna, K. *et al.* Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* **286**, 1377–81 (1999).
34. Swain, S. L., Hu, H. & Huston, G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* **286**, 1381–3 (1999).
35. Brocker, T. The role of dendritic cells in T cell selection and survival. *Journal of leukocyte biology* **66**, 331–5 (1999).
36. Zöller, M. Intrathymic presentation by dendritic cells and macrophages: their role in selecting T cells with specificity for internal and external nominal antigen. *Immunology* **74**, 407–13 (1991).
37. Frommer, F. & Waisman, A. B cells participate in thymic negative selection of murine auto-reactive CD4+ T cells. *PLoS one* **5**, e15372 (2010).
38. Spencer, J. *et al.* Properties of human thymic B cells. *Immunology* **75**, 596–600 (1992).
39. Xing, Y. & Hogquist, K. A T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, (2012).
40. Mackay, I. R. Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity. *BMJ (Clinical research ed.)* **321**, 93–6 (2000).
41. Alderson, M. R. *et al.* Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **181**, 71–7 (1995).
42. Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* **165**, 302–19 (1987).
43. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annual review of immunology* **21**, 305–34 (2003).
44. Greenwald, R. J., Boussiotis, V. a, Lorschach, R. B., Abbas, A. K. & Sharpe, A. H. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* **14**, 145–55 (2001).
45. Tivol, E. a *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541–7 (1995).
46. Waterhouse, P. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* **270**, 985–8 (1995).
47. Walker, L. S. K. & Abbas, A. K. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nature reviews. Immunology* **2**, 11–9 (2002).
48. Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* **27**, 20–1 (2001).
49. Ziegler, S. F. FOXP3: of mice and men. *Annual review of immunology* **24**, 209–26 (2006).
50. Fontenot, J. D. *et al.* Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**, 329–41 (2005).
51. Aschenbrenner, K. *et al.* Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nature immunology* **8**, 351–8 (2007).

52. Hsieh, C.-S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J. D. & Rudensky, A. Y. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nature immunology* **7**, 401–10 (2006).
53. Hsieh, C.-S. *et al.* Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* **21**, 267–77 (2004).
54. Nishizuka, Y. & Sakakura, T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* **166**, 753–5 (1969).
55. Sakaguchi, S. *et al.* Immunologic self tolerance maintained by T-cell-mediated control of self-reactive T cells: implications for autoimmunity and tumor immunity. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **3**, 911–8 (2001).
56. Wing, K., Suri-Payer, E. & Rudin, a CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scandinavian journal of immunology* **62**, 1–15 (2005).
57. Wing, K., Ekmark, A., Karlsson, H., Rudin, A. & Suri-Payer, E. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* **106**, 190–9 (2002).
58. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057–61 (2003).
59. Fontenot, J. D., Gavin, M. a & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* **4**, 330–6 (2003).
60. Tran, D. Q., Ramsey, H. & Shevach, E. M. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* **110**, 2983–90 (2007).
61. Liu, W. *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1701–11 (2006).
62. Shalev, I., Schmelzle, M., Robson, S. C. & Levy, G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Seminars in immunology* **23**, 282–92 (2011).
63. Strobel, S. & Mowat, a M. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunology today* **19**, 173–81 (1998).
64. Thornton, A. M. *et al.* Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology* **184**, 3433–41 (2010).
65. Gottschalk, R. a, Corse, E. & Allison, J. P. Expression of Helios in Peripherally Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *Journal of immunology* **188**, 976–80 (2011).
66. Seddiki, N. *et al.* Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood* **107**, 2830–8 (2006).
67. Valmori, D., Merlo, A., Souleimanian, N. E., Hesdorffer, C. S. & Ayyoub, M. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1953–62 (2005).
68. Miyara, M. *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**, 899–911 (2009).

69. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. & Hafler, D. a. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology* **10**, 490–500 (2010).
70. Hsieh, C.-S., Lee, H.-M. & Lio, C. J. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature reviews. Immunology* **12**, 157–67 (2012).
71. Taams, L. S. *et al.* Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *European journal of immunology* **31**, 1122–31 (2001).
72. Darrasse-Jèze, G., Marodon, G., Salomon, B. L., Catala, M. & Klatzmann, D. Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in human fetuses. *Blood* **105**, 4715–21 (2005).
73. Fritzsching, B. *et al.* Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood* **108**, 3371–8 (2006).
74. Baecher-Allan, C., Wolf, E. & Hafler, D. A. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *Journal of immunology* **176**, 4622–31 (2006).
75. Sakaguchi, S. & Powrie, F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* **317**, 627–9 (2007).
76. Shevach, E. M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* **30**, 636–45 (2009).
77. Nishikawa, H. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *International journal of cancer*. **127**, 759–67 (2010).
78. Beyer, M. & Schultze, J. L. Regulatory T cells in cancer. *Blood* **108**, 804–11 (2006).
79. Bosma, G. C., Custer, R. P. & Bosma, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**, 527–30 (1983).
80. Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M. & Wilson, D. B. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* **335**, 256–9 (1988).
81. McCune, J. M. *et al.* The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* **241**, 1632–9 (1988).
82. Shultz, L. D. *et al.* Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *Journal of immunology* **174**, 6477–89 (2005).
83. Shultz, L. D., Brehm, M. a, Garcia-Martinez, J. V. & Greiner, D. L. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nature reviews. Immunology* **12**, 789–98 (2012).
84. Takenaka, K. *et al.* Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nature immunology* **8**, 1313–23 (2007).
85. Denton, P. W. & García, J. V. Humanized mouse models of HIV infection. *AIDS reviews* **13**, 135–48 (2011).
86. Willinger, T., Rongvaux, A., Strowig, T., Manz, M. G. & Flavell, R. a Improving human hemato-lymphoid-system mice by cytokine knock-in gene replacement. *Trends in immunology* **32**, 321–7 (2011).

87. Karasuyama, H. & Melchers, F. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *European journal of immunology* **18**, 97–104 (1988).
88. Thomas, M. L. The leukocyte common antigen family. *Annual review of immunology* **7**, 339–69 (1989).
89. Notta, F., Doulatov, S. & Dick, J. E. Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2Rgc-null recipients. *Blood* **115**, 3704–7 (2010).
90. Wang, R. *et al.* Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13439–44 (2009).
91. Saro, C. Inflammatory bowel diseases: A disease (s) of modern times? Is incidence still increasing? *World Journal of Gastroenterology* **14**, 5491 (2008).
92. Perše, M. & Cerar, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**, 718617 (2012).
93. Hofer, U. *et al.* RAG2-/- gamma(c)-/- mice transplanted with CD34+ cells from human cord blood show low levels of intestinal engraftment and are resistant to rectal transmission of human immunodeficiency virus. *Journal of virology* **82**, 12145–53 (2008).
94. Onizuka, S. *et al.* Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer research* **59**, 3128–33 (1999).
95. Dei Tos, a P. Classification of pleomorphic sarcomas: where are we now? *Histopathology* **48**, 51–62 (2006).
96. Vaziri, H. *et al.* Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 9857–60 (1994).
97. André, M. C. *et al.* Long-Term Human CD34+ Stem Cell-Engrafted Nonobese Diabetic/SCID/IL-2R{gamma}null Mice Show Impaired CD8+ T Cell Maintenance and a Functional Arrest of Immature NK Cells. *Journal of immunology* **185**, 2710–20 (2010).
98. Ponomaryov, T. *et al.* Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *The Journal of clinical investigation* **106**, 1331–9 (2000).
99. Lum, L. G. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* **69**, 369–80 (1987).
100. Traggiai, E. *et al.* Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* **304**, 104–7 (2004).
101. Goldberg, G. L. *et al.* Enhanced immune reconstitution by sex steroid ablation following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Journal of immunology* **178**, 7473–84 (2007).
102. Ishikawa, F. *et al.* Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* **106**, 1565–73 (2005).
103. Yahata, T. *et al.* Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. *Journal of immunology* **169**, 204–9 (2002).

104. Schneider, L. C. *et al.* Lymphokine profile in bone marrow transplant recipients. *Blood* **78**, 3076–80 (1991).
105. Ito, M. *et al.* NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* **100**, 3175–82 (2002).
106. Hiramatsu, H. *et al.* Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/gammacnull mice model. *Blood* **102**, 873–80 (2003).
107. Wright, D. E., Wagers, a J., Gulati, a P., Johnson, F. L. & Weissman, I. L. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* **294**, 1933–6 (2001).
108. Huntington, N. D. *et al.* Autonomous and extrinsic regulation of thymopoiesis in human immune system (HIS) mice. *European journal of immunology* **41**, 2883–93 (2011).
109. Bertho, J. M. *et al.* Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cellular immunology* **179**, 30–40 (1997).
110. Vignali, D. A., Moreno, J., Schiller, D. & Hämmerling, G. J. Species-specific binding of CD4 to the beta 2 domain of major histocompatibility complex class II molecules. *The Journal of experimental medicine* **175**, 925–32 (1992).
111. Moots, R. J. *et al.* A cross-species functional interaction between the murine major histocompatibility complex class I alpha 3 domain and human CD8 revealed by peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *European journal of immunology* **22**, 1643–6 (1992).
112. Shultz, L. D. *et al.* Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r gamma(null) humanized mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 13022–7 (2010).
113. Suzuki, M. *et al.* Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/ycnull mouse. *International immunology* **24**, 243–52 (2012).
114. Lan, P., Tonomura, N., Shimizu, A., Wang, S. & Yang, Y.-G. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. *Blood* **108**, 487–92 (2006).
115. Marodon, G. *et al.* High diversity of the immune repertoire in humanized NOD.SCID.gamma c-/- mice. *European journal of immunology* **39**, 2136–45 (2009).
116. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature reviews. Immunology* **9**, 833–44 (2009).
117. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395–401 (2002).
118. Kyewski, B. & Derbinski, J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nature reviews. Immunology* **4**, 688–98 (2004).
119. Vandekerckhove, B. A. *et al.* Thymic selection of the human T cell receptor V beta repertoire in SCID-hu mice. *The Journal of experimental medicine* **176**, 1619–24 (1992).
120. Vandekerckhove, B. A., Namikawa, R., Bacchetta, R. & Roncarolo, M. G. Human hematopoietic cells and thymic epithelial cells induce tolerance via different mechanisms in the SCID-hu mouse thymus. *The Journal of experimental medicine* **175**, 1033–43 (1992).

121. Mackall, C. L., Granger, L., Sheard, M. a, Cepeda, R. & Gress, R. E. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* **82**, 2585–94 (1993).
122. Heitger, A. *et al.* Requirement of residual thymus to restore normal T-cell subsets after human allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* **69**, 2366–73 (2000).
123. Watanabe, N. *et al.* Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nature immunology* **5**, 426–34 (2004).
124. Murali-Krishna, K. & Ahmed, R. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *Journal of immunology* **165**, 1733–7 (2000).
125. Tanchot, C., Rosado, M. M., Agenes, F., Freitas, a a & Rocha, B. Lymphocyte homeostasis. *Seminars in immunology* **9**, 331–7 (1997).
126. Kitamura, D., Roes, J., Kühn, R. & Rajewsky, K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* **350**, 423–6 (1991).
127. Brod, S. A., Rudd, C. E., Purvee, M. & Hafler, D. A. Lymphokine regulation of CD45R expression on human T cell clones. *The Journal of experimental medicine* **170**, 2147–52 (1989).
128. Tough, D. F. & Sprent, J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *The Journal of experimental medicine* **179**, 1127–35 (1994).
129. Bell, E. B. & Sparshott, S. M. Interconversion of CD45R subsets of CD4 T cells in vivo. *Nature* **348**, 163–6 (1990).
130. Human, E. *et al.* Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine* **186**, 1407–18 (1997).
131. Hamann, D. *et al.* Heterogeneity of the human CD4+ T-cell population: two distinct CD4+ T-cell subsets characterized by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms. *Blood* **88**, 3513–21 (1996).
132. Onoe, T. *et al.* Homeostatic expansion and phenotypic conversion of human T cells depend on peripheral interactions with APCs. *Journal of immunology* **184**, 6756–65 (2010).
133. Freitas, A. A. & Rocha, B. Peripheral T cell survival. *Current opinion in immunology* **11**, 152–6 (1999).
134. Harper, J. *et al.* Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* **420**, 429–34 (2002).
135. Onoe, T. *et al.* Human Natural Regulatory T Cell Development, Suppressive Function, and Postthymic Maturation in a Humanized Mouse Model. *Journal of immunology* **187**, 3895–903 (2011).
136. Billerbeck, E. *et al.* Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2Rγ(null) humanized mice. *Blood* **117**, 3076–86 (2011).
137. Jiang, Q. *et al.* FoxP3+CD4+ regulatory T cells play an important role in acute HIV-1 infection in humanized Rag2-/-gammaC-/- mice in vivo. *Blood* **112**, 2858–68 (2008).
138. Proietto, A. I. *et al.* Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19869–74 (2008).

139. Spence, P. J. & Green, E. A. Foxp3⁺ regulatory T cells promiscuously accept thymic signals critical for their development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 973–8 (2008).
140. Jordan, M. S. *et al.* Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature immunology* **2**, 301–6 (2001).
141. Maloy, K. J. & Powrie, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature immunology* **2**, 816–22 (2001).
142. Schaier, M. *et al.* DR(high+)CD45RA(-)-Tregs Potentially Affect the Suppressive Activity of the Total Treg Pool in Renal Transplant Patients. *PLoS one* **7**, e34208 (2012).
143. Vukmanovic-Stejic, M. *et al.* Human CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *The Journal of clinical investigation* **116**, 2423–33 (2006).
144. Baba, J. *et al.* Depletion of radio-resistant regulatory T cells enhances antitumor immunity during recovery from lymphopenia. *Blood* **120**, 2417–27 (2012).
145. Zhang, H. *et al.* Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature medicine* **11**, 1238–43 (2005).
146. Shevach, E. M. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature reviews. Immunology* **2**, 389–400 (2002).
147. 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. *Journal of immunology* **155**, 1151–64 (1995).
148. Solomon, L. *et al.* The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comparative Clinical Pathology* **19**, 235–239 (2010).
149. Iliev, I. D., Mileti, E., Matteoli, G., Chieppa, M. & Rescigno, M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal immunology* **2**, 340–50 (2009).
150. Wick, M. *et al.* Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *The Journal of experimental medicine* **186**, 229–38 (1997).
151. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology* **29**, 235–71 (2011).
152. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature reviews. Cancer* **5**, 263–74 (2005).
153. Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
154. Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* **10**, 942–9 (2004).
155. Gallimore, A. & Godkin, A. Regulatory T cells and tumour immunity - observations in mice and men. *Immunology* **123**, 157–63 (2008).

156. Wolf, A. M. *et al.* Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 606–12 (2003).

9 Danksagung

10 Lebenslauf

