

**Untersuchungen zum Einfluss  
des malignen Melanoms  
auf die Frequenz und Funktion  
regulatorischer T-Zellen**

**Dissertation**  
Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Angefertigt an der  
Haut- und Poliklinik  
der Universitätsmedizin Mainz

**Anita Luise Ellen Correll**  
Geboren am 29. Juni 1981  
in Heilbronn am Neckar

**Mainz, März 2012**

**Dekan:**

**1. Berichtstatter:**

**2. Berichtstatter:**

**Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2012**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Regulatorische T-Zellen .....	1
1.2 Das maligne Melanom.....	3
1.3 Die Interleukin-1-Familie .....	6
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
2.1 Material .....	12
2.1.1. Laborgeräte .....	12
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.3. Kulturmedien.....	13
2.1.3.1. Fertigmedien .....	13
2.1.3.2. Selbst angesetzte Medien human.....	13
2.1.3.3. Medien murin .....	14
2.1.4. Puffer, Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.....	15
2.1.5. Antigene .....	18
2.1.6. Serologische Reagenzien.....	18
2.1.6.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	18
2.1.6.2. Antikörper für die Zellseparation .....	19
2.1.6.3. Antikörper für die Zellstimulation.....	20
2.1.7. Vitalfarbstoffe.....	21
2.1.8. Zytokine .....	21
2.1.9. PCR-Reagenzien.....	22
2.1.10. Mäuse .....	22
2.2 Methoden .....	23
2.2.1. Methoden der Zellkultur .....	23
2.2.1.1. Verwendete Zellen .....	23
2.2.1.2. Isolierung humaner PBMC.....	23
2.2.1.3. Ermittlung der Lebendzellzahl.....	25
2.2.1.4. Magnetische Isolierung verschiedener T-Zellpopulationen aus PBMC.....	25
2.2.1.5. Depletion von CD3 <sup>+</sup> Zellen.....	27
2.2.1.6. <i>In vitro</i> -Stimulation isolierter PBMC mit Recallantigenen .....	27
2.2.1.7. Standard-Suppressionstest.....	27
2.2.1.8. Suppressionstest nach durchflusszytometrischer Sortierung .....	28
2.2.1.9. Suppressionstest mit reduziertem Kostimulus .....	29
2.2.1.10. Auswertung von <sup>3</sup> H-TdR-Tests .....	31

2.2.2. Durchflusszytometrische Untersuchungen .....	32
2.2.2.1. Färbung von Oberflächenmolekülen .....	32
2.2.2.2. Intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors Foxp3 .....	32
2.2.2.3. Durchflusszytometrische Sortierung von Treg-Populationen.....	33
2.2.2.4. Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Apoptose.....	33
2.2.2.5. Durchflusszytometrischer Proliferationstest mit CFSE und Cell Proliferation Dye eFluor 670 .....	34
2.2.3. Untersuchungen zur Genexpression mittels Real-Time qPCR .....	35
2.2.3.1. Isolation und Quantifizierung von RNA .....	35
2.2.3.2. cDNA-Gewinnung mittels RT-PCR .....	35
2.2.3.3. Real-Time qPCR mittels SYBR Green I.....	36
2.2.3.4. Relative Quantifizierung bei der Real-Time qPCR .....	36
2.2.4. Versuche im murinen System.....	37
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
3.1 Untersuchungen zum Einfluss des malignen Melanoms auf Treg- Frequenzen und T-Zellreaktivität.....	39
3.1.1 Durchflusszytometrische Frequenzbestimmung regulatorischer T-Zellen mittels Treg-assoziiertes Marker im peripheren Blut gesunder Spender.....	39
3.1.2 Funktionelle Testung der T-Zellpopulationen mit spezifischer Markerexpression.....	41
3.1.3 Vergleich der Frequenzen regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten und gesunden Spendern.....	46
3.1.4 Vergleich der Immunkompetenz gesunder Spender mit Stadium-II- bzw. Stadium-IV-Melanompatienten.....	49
3.1.5 Analyse von Treg-Frequenzen bei Melanompatienten im Verlauf einer DC-basierten Immunisierung.....	50
3.2 Untersuchungen zur Expression und Funktion des IL-1-Rezeptors 1 auf regulatorischen T-Zellen.....	53
3.2.1 Genexpression von Mitgliedern der IL-1-Familie auf regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen .....	54
3.2.2 Expression der IL-1-Rezeptoren 1 und 2 auf regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen auf Proteinebene .....	56
3.2.3 Wirkung von exogenem IL-1 auf regulatorische T-Zellen und Effektor-T-Zellen .....	59
3.2.4 Überprüfung des Einflusses von IL-1 auf das Überleben regulatorischer T-Zellen .....	62
3.2.5 Proliferation der regulatorischer T-Zellen in Kokultur mit Effektor-T-Zellen und in Anwesenheit von IL-1 .....	65

3.2.6 Differenzierung der Wirkung von IL-1 auf regulatorische T Zellen und Effektor-T-Zellen mittels IL 1 Rezeptor 1-defizienten Mäusen.....	67
3.2.7 Einfluss von IL-1 auf die Genexpression in humanen regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen mittels Real-Time qPCR .....	72
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>77</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>85</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>101</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>I-VIII</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatorische T-Zellen

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Treg) spielen eine essentielle Rolle bei der Homöostase des Immunsystems. Sie vermitteln Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen und schützen in einem ausgeglichenen Immunsystem vor der Entstehung von Autoimmunerkrankungen [1-5]. Darüber hinaus wirken sie bei Infektionen modulierend auf Immunreaktionen und verhindern somit schädliche Überreaktionen des Immunsystems [6].

Die Aufklärung der regulatorischen Komponenten des Immunsystems erwies sich über einen langen Zeitraum hinweg als schwierig. Schon in den 1970er Jahren wurde in vielen Untersuchungen das Konzept verfolgt, dass es Lymphozyten gibt, die andere Lymphozyten in ihrer Aktivität kontrollieren [7-9]. Diese damals sogenannten „Suppressor T-Zellen“ kamen aber bald in Verruf, da eine klare phänotypische Definition und funktionelle Charakterisierung dieser Population aufgrund damals noch eingeschränkter Methoden Schwierigkeiten bereitete. Die zuerst umstrittene und später widerlegte Hypothese, „Suppressor T-Zellen“ zeichneten sich durch eigene Restriktionselemente, einer sogenannten „I-J-Region“ im MHC-Lokus, aus, bedeuteten das zwischenzeitliche Aus für diesen Forschungszweig und machten die „Suppressor T-Zelle“ zu einem Tabuthema („*SAYING THE S-WORD IN PUBLIC*“, Green et al.) [9-11].

Erst in den 1990er Jahren kam es zur Wiederbelebung dieses Forschungsfeldes. Sakaguchi et al. konnten 1995 eine Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschreiben, die konstitutiv die IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette (CD25) exprimiert und regulatorische Funktion ausübt [12]. Seitdem wurde in weiterführenden Untersuchungen eine Vielzahl an Erkenntnissen über Treg hinzugewonnen. Dies betrifft unter anderem die Beschreibung verschiedener Typen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg. So kann z.B. zwischen natürlich vorkommenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg (nTreg) und induzierten Treg (iTreg) unterschieden werden. nTreg machen in gesunden Individuen ca. 5-10 % der peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus, reifen im Thymus heran

und bilden eine eigenständige T-Zellpopulation mit definierten Eigenschaften. In Mäusen, denen drei Tage nach der Geburt der Thymus entfernt wurde, konnten daher nur wenige bis gar keine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden [12]. Bei der Rekonstituierung T-Zell-defizienter Nude-Mäuse mit CD25-depletierten T-Zellpopulationen kam es zur Ausbildung einer lymphoproliferativen, letalen Autoimmunkrankheit. Transferierte man hingegen zusätzlich die Population der CD25<sup>+</sup> T-Zellen, konnte die Entstehung der Erkrankung verhindert werden [12;13]. Neben den aus dem Thymus stammenden nTreg konnten auch sekundär induzierte T-Zellen mit suppressiver Funktion, so genannte iTreg, beschrieben werden. Diese entstehen unabhängig vom Thymus in der Peripherie und umfassen eine heterogene Gruppe von suppressiven T-Zellen mit unterschiedlichen Charakteristika [14]. Je nach der Art ihrer Entstehung und Ausübung ihrer suppressorischen Aktivität werden sie in verschiedene Gruppen unterteilt. Die von Weiner et al. zuerst beschriebene Population von iTreg, die so genannten Th3-Zellen, inhibieren die antigenspezifische Aktivierung von T<sub>H</sub>1 durch die Sekretion großer Mengen von TGF-β. Sie entstehen durch eine suboptimale Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 in der Gegenwart tolerogener Zytokine wie IL-10 und TGF-β [15-17]. Neben den Th3-Zellen stellen die so genannten Typ-1 regulatorischen T-Zellen (Tr1-Zellen) eine zweite Gruppe von iTreg dar, die zum ersten Mal von Groux et al. beschrieben wurden [18]. Sie definieren sich durch eine geringe Proliferation und die Sekretion von IL-10, welches insbesondere die stimulatorische Eigenschaften von antigenpräsentierenden Zellen (APC) hemmen und damit indirekt die Aktivierung von T<sub>H</sub>1 unterdrücken [18]. Tr1 entstehen durch chronische Aktivierung aus T<sub>H</sub>1 in Anwesenheit von IL-10. Bei der Entstehung eines solchen Milieus spielen wiederum tolerogene APC und deren Sekretion von IL-10 eine Rolle [14;19-21]. Ein deutlicher Unterschied zwischen iTreg und nTreg besteht also auch in der Art der Suppressionsvermittlung: Während iTreg über die Sekretion von Zytokinen hemmen, ist die Suppression durch nTreg Zellkontakt-abhängig [14].

Die essentielle Rolle von Treg für die Homöostase des Immunsystems konnte in Untersuchungen von *scurfy*-Mäusen und später bei Menschen mit dem IPEX-Syndrom bestätigt werden. Bei *scurfy*-Mäusen liegt eine Mutation innerhalb des Gens *FOXP3* vor, welches zu einem Phänotyp mit lymphoproliferativen

Autoimmunerkrankungen führt. Durch diese Mutation kommt es zum Ausfall des Transkriptionsfaktors Foxp3. Foxp3 ist ein transkriptioneller Repressor, der die Expression einer Vielzahl von Zytokinen -darunter IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  - inhibiert und essentiell für die Entwicklung und Funktion von nTreg ist. Das IPEX-Syndrom (Immune Dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome) bei Menschen beschreibt ein Krankheitsbild, das als Phänotyp eine Vielzahl von immunologischen Funktionsstörungen wie der Typ-I Diabetes, Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn, schwere Allergien und chronische Entzündungen zur Folge hat. Ursächlich für das IPEX-Syndrom sind Mutationen im Foxp3-Gen, die wie bei der Maus zu einem Funktionsverlust von Foxp3 führen. Auch hier ist das Fehlen von funktionellen Treg die Grundlage für das Krankheitsbild [22;23]. Die Funktion von Foxp3 wurde daraufhin in vielen Arbeiten weiter untersucht und Foxp3 als charakteristischer, wenn auch nicht spezifischer Marker für Treg etabliert [24].

## **1.2 Das maligne Melanom**

Das maligne Melanom (MM) ist ein bösartiger (maligner) Tumor, der von den pigmentbildenden Zellen der Epidermis, den Melanozyten, ausgeht und auch als „schwarzer Hautkrebs“ bekannt ist. Ein Primärtumor kann überall auf der Haut entstehen, meist ausgehend vom Stratum basale der Epidermis. In seltenen Fällen jedoch auch an anderen Stellen, wo Melanozyten vorhanden sind, wie z.B. in Schleimhäuten, der Aderhaut des Auges oder in der Hirnhaut [25;26]. Da Melanozyten in keinem festen Gewebeverband wachsen, sondern sich relativ frei in der Haut bewegen können, weist das maligne Melanom eine hohe Tendenz zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung auf. Diese Eigenschaft macht das maligne Melanom zu einer der gefährlichsten Krebsarten.

Die Inzidenz des malignen Melanoms hat sich innerhalb der letzten 20 Jahre in Europa mehr als verdreifacht und betrifft oft auch junge Menschen [27;28]. Das Maß an natürlicher, aber auch unnatürlicher UV-Strahlung (Sonnenlicht bzw. Sonnestudios), der man sich aussetzt, und die Anzahl dabei erlittener Sonnenbrände werden als maßgebend für das entsprechende Erkrankungsrisiko eingestuft.



Maligne Melanome werden grundsätzlich in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe bilden Melanome, die sich überwiegend oberflächlich ausbreiten. Eine zweite Gruppe sind solche Melanome, die sich knotig und hauptsächlich in vertikaler Form ausbilden. Bei der klinischen Diagnosestellung eines MM ist die sogenannte A-B-C-D-(E)-Regel hilfreich (Tab. 1.1) [29;30].

<b>A</b>	Asymmetrie	Asymmetrisch, nicht rund oder oval
<b>B</b>	Begrenzung	Unregelmäßig oder unscharf
<b>C</b>	Color (Farbe)	Unterschiedlich starke Pigmentierung
<b>D</b>	Durchmesser	> 5mm
<b>E</b>	Erhabenheit	Neu entstanden auf sonst flachem Grund

**Tab. 1.1 : Kriterien zur differenziellen Diagnosestellung eines Melanoms**

Zur Diagnose eines malignen Melanoms wird die sogenannte A-B-C-D-(E)-Regel angewandt, mit Hilfe der beschreibenden Kriterien zur Asymmetrie, Begrenzung, Farbe (Color), dem Durchmesser und der Erhabenheit.

Das MM wird entsprechend der Tumordicke und des Grades der Metastasierung außerdem nach dem AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER SYSTEM [31] in verschiedene Krankheitsstadien unterschieden (Tab.1.2).

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknoten-Metastasen (N)	Fernmetastasen (M)	10-Jahres-Überlebensrate
I A	≤1,0 mm, keine Ulzeration	-	-	88 %
I B	≤1,0 mm mit Ulzeration 1,01 – 2,0 mm, keine Ulzeration	-	-	79 – 83 %
II A	1,01 – 2,0 mm mit Ulzeration 2,01 – 4,0 mm, keine Ulzeration	-	-	ca. 64 %
II B	2,01 – 4,0 mm mit Ulzeration > 4 mm	-	-	51 – 54 %
II C	4,0 mm mit Ulzeration	-	-	ca. 32 %
III A	Jede Tumordicke +/- Ulzeration	Mikrometastasen	-	20-30 %
III B	Jede Tumordicke +/- Ulzeration	Mikro- und Makrometastasen	-	ca. 20 %
III C	jede Tumordicke +/- Ulzeration	Makrometastasen	-	15 – 20 %
IV	jede Tumordicke +/- Ulzeration	jedes N	Fernmetastasen	2 – 16 %
IV	jede Tumordicke +/- Ulzeration	jedes N	Fernmetastasen	2 – 16 %

*(nach dem „American Joint Committee on cancer system“, Balch et al., 2002)*

**Tab.1.2: Einteilung der Melanomstadien nach Empfehlung des „American Joint Committee on cancer“**

Die Tabelle zeigt die Untergliederung in die Stadien und Substadien bei der Erkrankung an einem malignen Melanom. Dabei wird entsprechend des AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER SYSTEM die Einteilung nach Dicke des Primärtumors und Metastasierungsstatus vorgenommen.

Neben konventionellen Methoden (operative Entfernung des Tumorgewebes, Strahlen- und Chemotherapie) werden auch Kombinationen mit

immuntherapeutischen Ansätzen gewählt, um eine Heilung oder Remission der Erkrankung zu erreichen.

Die Untersuchung der Zellzusammensetzung von Tumoren des malignen Melanoms zeigen teilweise eine Infiltration mit zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (CTL), die spezifisch gegen Tumorantigene gerichtet sind [32]. Aufbauend auf diese Beobachtung wurden Vakzinierungstherapien entwickelt, bei denen mittels Tumorantigen-beladener dendritischer Zellen (DC) erhöhte T-Zell-vermittelte Anti-Tumorantworten in MM-Patienten initiiert und teilweise die Regression von Metastasen beobachtet werden konnten [33;34]. Trotz solcher Erfolge zeigt das maligne Melanom insbesondere im fortgeschrittenen Stadium eine starke Therapieresistenz. Unter anderem wird vermutet, dass Treg bei der Tumor-induzierten Suppression des Immunsystems eine Rolle spielen [35]. Dies macht Treg zu einem wichtigen Ansatzpunkt für die Entwicklung und Modulation von immuntherapeutischen Ansätzen.

### **1.3 Die Interleukin-1-Familie**

Zu den Mitgliedern der Interleukin-1(IL-1)-Familie zählen derzeit elf Mitglieder: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA), IL-18, IL-33 und IL-1F5 bis IL-1F10. Die Mitglieder der Interleukin-1(IL-1)-Familie spielen im Immunsystem eine tragende Rolle bei Entzündungsreaktionen. Mit IL-1 werden im Allgemeinen sowohl IL-1 $\alpha$ , als auch IL-1 $\beta$  beschrieben, zwei Zytokine, die in ihrer Aminosäuresequenz zwar nur zu 22 % übereinstimmen, sich in ihrer Tertiärstruktur stark ähneln und somit die gleiche biologische Wirkung zeigen [36]. Als die zuerst und am besten beschriebenen Mitglieder der IL-1-Familie sind IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  als typische proinflammatorische Zytokine bekannt geworden, deren Produktion Entzündungsreaktionen induziert [37;38]. Neben dieser proinflammatorischen Wirkung wurde ihr Einfluss auch im Zusammenhang mit Knochenbildung [39], Insulinsekretion [40;41], der Regulation von Appetit [42;43], Fieberentstehung [44-46] oder auch mit der neuronaler Entwicklung [39;40] beschrieben. Vor seiner molekularen Identifikation in den 1980er Jahren, wurde IL-1 und seine Wirkungsweise bereits in vielen Untersuchungen beschrieben. Dies

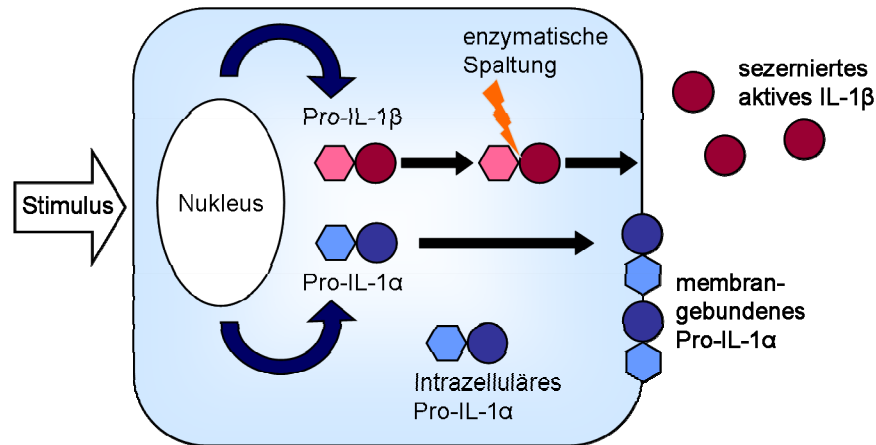
geschah unter einer Vielzahl von Namen, wie z.B. Lymphozyten-Aktivierungs-Faktor, endogenes Pyrogen, Katabolin oder Hemopoietin-1, welche auf die Vielseitigkeit der biologischen Funktionen von IL-1 hinweisen [38].

### **IL-1 $\alpha$**

IL-1 $\alpha$  wird als Pro-IL-1 $\alpha$  gebildet, das eine Länge von 271 Aminosäuren und ein Gewicht von 33kDa besitzt. Im Gegensatz zu IL-1 $\beta$  besitzt IL-1 $\alpha$  sowohl in dieser Vorläuferform, als auch nach enzymatischer Spaltung in seine reife Form mit 159 Aminosäuren und 17kDa biologische Aktivität [36;47-49]. Der Großteil des gebildeten IL-1 $\alpha$  verbleibt in seiner Vorläuferform im Zellinneren, wo es als ein autokriner Faktor zellintern wirkt. Es wird außerdem vermutet, dass ein kleiner Teil dieses Pro-IL-1 $\alpha$  membranständig als parakriner Faktor auf angrenzende Zellen im Zusammenhang mit lokalen Entzündungen eine Rolle spielt [50]. Eine Vielzahl an Zelltypen exprimiert IL-1 $\alpha$ , darunter Astrozyten, Fibroblasten [51], Hepatozyten [52], Keratinozyten [53], Typ-II-Alveolarzellen [54] und braune Adipozyten [55]; außerdem innerhalb der Immunzellen: T-Zellen [56], dendritische Zellen [57], Makrophagen [58], Monozyten [59] und Eosinophile [56].

### **IL-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  wird als Vorläuferform mit 269 Aminosäuren gebildet und erst nach enzymatischer Spaltung zum biologisch aktiven Protein mit einer Länge von 153 Aminosäuren und einem Gewicht von 17kDa [36;60]. Im Gegensatz zu IL-1 $\alpha$  wird IL-1 $\beta$  in seiner aktiven Form von der Zelle direkt in den extrazellulären Raum sezerniert wo es hormonähnlich als systemischer Inflammationsfaktor wirkt [50]. Die Produktion von IL-1 $\beta$  wurde unter anderem für folgende Zelltypen beschrieben: Endothelzellen [61], Keratinozyten [62], Megakaryozyten und Thrombozyten [61;63], Astrozyten [64], Neuronen [65], NK-Zellen [66], Makrophagen, und Monozyten [67], Neutrophile [68] und T-Zellen mit Fibroblasten [69].



**Abb. 1.3 Produktion von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach Moltó et al. Joint Bone Spine 2009**

Nach der Bildung der Vorläuferform, Pro-IL-1 $\beta$ , kommt es zur enzymatischen Spaltung in die Pro-Sequenz und das reife, biologisch aktive IL-1 $\beta$ , das von der Zelle sezerniert wird. IL-1 $\alpha$  hingegen ist auch in der Vorläuferform biologisch aktiv und wirkt entweder intrazellulär oder als membranständiger Mediator.

Zwischen humanem und murinem aktiven IL-1 $\beta$  besteht 78 % Aminosäureidentität [70] IL-1 $\alpha$  weist in seiner Vorläuferform 54 % und als reifes IL-1 $\alpha$  58 % Übereinstimmung in der Aminosäurefolge zwischen Mensch und Maus auf. Sowohl humanes IL-1 als auch das der Ratte zeigt eine biologische Wirkung auf murine Zellen [36;71].

### IL-1RA

Der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) ist ebenfalls ein Ligand der IL-1-Rezeptoren. Er wird als regulatorisches Molekül von fast allen Zellen gebildet, die auch IL-1 produzieren. Kompetitiv zu IL-1 bindet es an die IL-1-Rezeptoren, jedoch ohne ein Signal in der Zelle auszulösen und verhindert somit deren Aktivierung [38].

### Die IL-1-Rezeptor-Familie

Die Mitglieder der Interleukin-1-Rezeptor(IL-1R)-Familie spielen insbesondere bei der angeborenen Immunität eine große Rolle. Derzeit werden zehn Mitglieder zu dieser Familie gezählt, nämlich IL-1R1 bis IL-1R9 und SIGIRR (Single Ig Domain containing IL-1 Receptor-Related molecule). Übergeordnet gehören sie zu der Toll-like-Rezeptor/Interleukin-1-Rezeptor (TLR/IL-1R) Superfamilie [72].

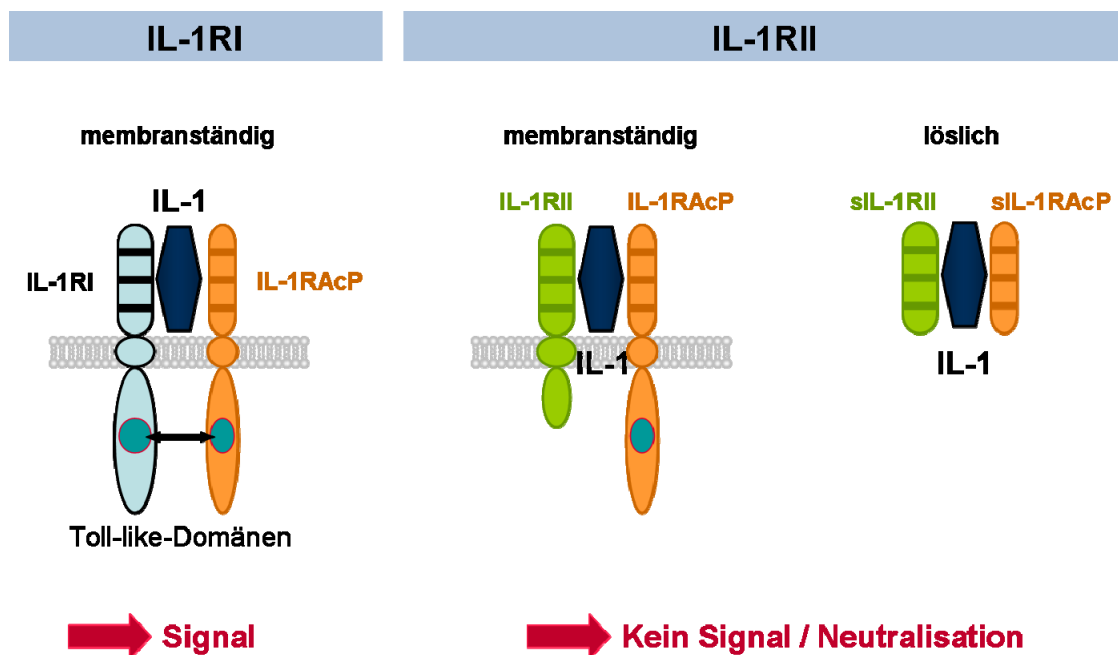
Systematischer Name	Alternativer Name	Liganden
IL-1R1	IL-1RI	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA
IL-1R2	IL-1RII	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA
IL-1R3	IL-1RAcP	Signalkomponente
IL-1R4	ST-2/T1/DER4/ Fit-1	?
IL-1R5	IL-18 Ra/ IL-1Rrp	IL-18, IL-1F7
IL-1R6	IL-1 Rrp2/ IL-1RL2	IL-1F9 und IL-1F5
IL-1R7	IL-18 Rb/AcPL	Signalkomponente
IL-1R8	TIGIRR-2/IL-1RAPL	?
IL-1R9	TIGIRR-1/IL-1RAPL2	?
SIGIRR		?

**Tabelle 1.3 Interleukin-1-Rezeptor-Familie**

Aufzählung der Mitglieder der IL-1R-Familie mit ihren alternativen Benennungen und, soweit bekannt, der Angabe ihrer Liganden (Verändert nach O'Neill, Immunol. Rev. 2008, The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress[72]).

Die am besten untersuchten Vertreter der IL-1R-Familie sind der IL-1-Rezeptor 1 (IL-1R1) und der IL-1Rezeptor 2 (IL-1R2). Der IL-1R1 ist ein membranständiger Rezeptor mit einer intrazellulären TIR (Toll-like-Rezeptor/IL-1R Signal)-Domäne, während der IL-1R2 eine solche TIR-Domäne nicht besitzt und somit auch keine Signalaktivität besitzt. Die entzündlichen Effekte, die über die Bindung von IL-1

ausgelöst werden, werden also ausschließlich über den IL-1R1 vermittelt. Der IL-1R2 dient als so genannter „Decoy-Rezeptor“ und unterbindet die Wirkung von IL-1, indem er es abfängt ohne ein Signal ins Zellinnere weiterzuleiten. Zudem existiert der IL-1R2 sowohl als membranständige, als auch als lösliche Form. Letztere wird z.B. durch die Gabe von Glucocorticoiden induziert, wodurch die Aktivität von IL-1 und die damit verbundene Entzündungsreaktion abgeschwächt wird [73]. Sowohl IL-1 $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$  binden in gleichem Maße an die beiden Rezeptoren. In ihrer biologischen Wirkweise sind keine Unterschiede bekannt, vielmehr unterscheiden sich IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in ihrer Lokalisation im Organismus (siehe oben). Bei der Bindung von IL-1 an den IL-1R1 als auch an den IL-1R2 kommt es zur Assoziation mit dem IL-1-Rezeptor-Akzessorischen-Protein (IL-1RAcP oder IL-1R3), das im Fall des IL-1R1 auch zur Signalaktivität notwendig ist [38;74].



**Abb. 1.4 Übersicht über Struktur und Funktion der IL-1-Rezeptoren 1 und 2**

Der IL-1R1 liegt nur membranständig vor, während vom IL-1R2 sowohl eine membranständige als auch eine lösliche Form vorliegen kann. Die Bindung von IL-1 am IL-1R1 führt mittels der Assoziation des IL-1RAcP zur Signalweiterleitung und somit zur Aktivierung der Zelle. Der IL-1R2 benötigt ebenfalls das IL-1RAcP zur Ligation mit IL-1. Er besitzt jedoch keine Toll-like-Domäne und somit auch keine Signalaktivität. Vielmehr dient der IL-1R2 als Decoy-Rezeptor, der IL-1 neutralisiert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des malignen Melanoms auf die Frequenz und Aktivität von Treg im peripheren Blut zu bestimmen. Des Weiteren sollte die Expression und Funktion des IL-1-Rezeptors 1 bei Treg und Teff verglichen werden.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

<b>BD FACSCalibur</b>	(Becton-Dickinson, Mountain View, Ca, USA) CellQuestPro™ Software V3.3 1994-1999
<b>BD LSRII</b>	(Becton-Dickinson, Mountain View, Ca, USA) BD FACSDIVA™ Software 6.1.3
<b>BD FACS Aria II Cellsorter</b>	(Becton-Dickinson, Mountain View, Ca, USA) BD FACSDIVA™ Software 6.1.3
<b>Bestrahlungsgerät</b>	Gammacell 2000 (Isgaard medical)
<b>Beta-Szintillations-Counter</b>	Betaplate® 1205 (Perkin Elmer Wallac GmbH)
<b>Brutschrank</b>	Hera Cell 240 (Heraeus)
<b>Depletionsmagnet</b>	DYNAL MPC-6 (Dynal)
<b>Magnetischer Zellseparator VarioMACS-Separator</b>	(Miltenyi-Biotech)
<b>Mikroskope</b>	Labormikroskop Leitz SM-LUX (Leitz) Labormikroskop Axiovert 135 (Carl Zeiss)
<b>PCR-Geräte</b>	i-Cycler (Biorad) Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems)
<b>Proben-Mixer</b>	Dynal Sempel-Mixer (Dynal)
<b>Spektrophotometer</b>	Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)
<b>Schüttler</b>	olymax 2040 (Heidolph)
<b>Zellerntegerät</b>	Semiautomatic Cell Harvester (Skatron AS)
<b>Zentrifugen</b>	Multifuge 3L-R (Heraeus) Sorvall RC5C Plus (Du Pont) Eppifuge (Heraeus)

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alle ZellkulturWaren wurden steril von den Firmen bezogen.

**FACS-Platten**            96-Well-Rundboden-Platten (Greiner #650701)

**FACS-Röhrchen**        Rundboden-Zentrifugenröhrchen 5 ml, unsteril (Falcon #2052)

**MACS LS Separation-Säulen**            (Milteny-Biotech)

**PCR Mikroplatten**    96-Well-PCR Mikroplatten (Greiner Bio One)

**Zellkulturplatten**     96-Well-Flachboden Cellstar (Greiner Bio One)

**Zellkulturplatten**     96-Well-Flachboden Half-Area Cellstar (Greiner Bio One)

## 2.1.3 Kulturmedien

### 2.1.3.1 Fertigmedien human

**X-VIVO-15** (*Cambrex Bio Science; Verviers, Belgien*)

### 2.1.3.2 Selbst angesetzte Medien human

Alle Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt, sterilfiltriert (0,2µm) und bei 4°C aufbewahrt.

**MEM** (Ansatz für 5 Liter Medium)

1 Packung RPMI 1640 Trockenpulver (Gibco, Grand Island, USA)  
4,77 g/l HEPES (Biochrom AG, Berlin)  
2,2 g/l Natriumhydrogencarbonat (Merk, Darmstadt)  
3,6 µl/l Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg)  
(pH 7,2)

**Waschmedium für Depletionen**

MEM+ 2 % HSA (20 % Octalbin, Octapharma GmbH, Langenfeld)

**2.1.3.3 Medien murin**

**Medien für die Zellkultur**

Alle Medien und Puffer wurden mit voll entsalztem (Millipore-Entmineralisierungsanlage, Millipore) und durch Aktivkohle gereinigtem Wasser (VE-Wasser) angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter) und bei 4 °C aufbewahrt.

**IMDM (Iscove´s modified Dulbecco´s medium)**

17,67 g/l IMDM Trockenpulver (Gibco)  
3,02 g/l NaHCO<sub>3</sub>  
1 % Penicillin/Streptomycinlösung  
5x10<sup>-5</sup>M 2-Mercaptoethanol (Serva)  
Phenolrot als Indikator

**MEM (minimal essential medium):**

10,58 g/l MEM-Trockenpulver (Gibco)  
4,77 g/l HEPES

**Testmedium**

IMDM  
5 % fötales Kälberserum (FCS)  
1mM Natrium-pyruvatlösung  
2mM Glutaminlösung

## 2.1.4 Puffer, Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

### Human:

#### FACS-Puffer

1 x PBS  
0,5 % HSA (OCTAPHARMA)  
1 mM EDTA (GEBRU Biotechnik)  
10 µg/ml Sandoglobin

#### Ficoll (Biocoll Separating Solution)

BIOCOLL SEPARATING SOLUTION Dichte: 1.077 (Biochrome, Berlin)

#### Foxp3 Staining Kit

(eBioscience, San Diego, Kalifornien/USA über NatuTec)

Inhalt:

4x Fix/Perm-Konzentrat  
Fix/Perm-Diluent  
10x Permeabilisationspuffer  
Ratten-Serum  
anti-human FoxP3-PE Antikörper (Klon PCH101)

#### MACS-Puffer

1 x PBS  
0,5 % HSA (OCTAPHARMA)  
3 mM EDTA (GEBRU Biotechnik)

#### PBS (phosphate buffered saline)

Stammlösung = 10-fach konzentriert  
80,4 g/l NaCl (Roth)  
15,6 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Merk)  
mit 10N NaOH auf pH-Wert 6,6 einstellen, anschließend autoklavieren

**PBS/EDTA**

1 x PBS  
1mM EDTA (GEBRU Biotechnik, Gailsberg)

**PBS/EDTA/Heparin**

1 x PBS  
1 mM EDTA (GEBRU Biotechnik)  
0,2 % Liquemin N25000 (Roche)

**Murin:**

Alle Reagenzien für die Versuche im murinen System wurden von der AG von Dr. Tobias Bopp und Prof. Dr. Edgar Schmitt zur Verfügung gestellt.

**Fötale Kälberserum (FCS)**

Das verwendete FCS stammte von der Firma GIBCO.  
Inaktivierung der Komplementkomponenten durch eine Inkubation von 45 min. bei 56 °C im Wasserbad.

**Gey's Lösung (0,83 %ig)**

8,28g/l NH<sub>4</sub>Cl  
1g/l KHCO<sub>3</sub>  
0,037g/l EDTA

**PBS (phosphate buffered saline)**

10-fach konzentrierte Stammlösung  
1,4M NaCl (81,8 g/l)  
0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (15,6 g/l)

**Sort-Puffer**

1xPBS  
4 % FCS

### **MACS-Puffer**

0,5 % BSA 0,5 % Bsa  
0,01 % NaN<sub>3</sub> 5mM EDTA  
5mM EDTA  
in 1x PBS

### **Human und Murin:**

Alle Reagenzien für die Versuche im murinen System wurden von der AG von Dr. Tobias Bopp und Prof. Dr. Edgar Schmitt zur Verfügung gestellt.

### **Physiologische Trypanblaulösung**

Trypanblau ist ein sogenannter Vitalfarbstoff. Tote Zellen werden angefärbt, während lebende Zellen mit intakter Membran den Farbstoff nicht aufnehmen. Mit diesem Farbstoff wurde die Lebendzellzahl in Zellsuspension ermittelt.

Trypanblaulösung (0,4 %) (Sigma #T8154)

### **Szintillationsflüssigkeit**

Um die radioaktiven Emissionen der <sup>3</sup>H-TdR-enhaltenen DNA in messbare Lichtemissionen umzuwandeln, die mit dem Beta-Szintillations-Counter detektiert werden konnten, wurden die Glasfaserfilter mit der geernteten DNA in Plastikbeutel eingeschweißt, welche zuvor mit Szintillationsflüssigkeit befüllt wurden.

Szintillationsflüssigkeit: Rotizint© eco (Roth GmbH, Karlsruhe, #9500.2)

### **Tritium-markierte Thymidin-Desoxyribose (<sup>3</sup>H-TdR)**

Für die Proliferationstests wurde <sup>3</sup>H-TdR mit einer Aktivität von 3700 kBq/ml eingesetzt. Endkonzentration im Well: 37 kBq

Die Aktivität der Stammlösung betrug 1,3 MBq/ml.

(MP Biomedicals Europe, Eschwege)

## 2.1.5 Antigene

### PPD (Tuberkulin)

Tuberkulin GT  
(*Chiron Behring, Marburg*)

### TT (Tetanustoxoid)

Tetanustoxoid-Konzentrat (ohne Konservierungsstoffe)  
(*Chiron Behring, Marburg*)

## 2.1.6 Serologische Reagenzien

### 2.1.6.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

<b>CD3-PE</b>	(Maus anti-human CD3 PE) monoklonal, Isotyp IgG <sub>1</sub> (κ) Klon: UCHT1	( <i>BD Pharmingen</i> )
<b>CD4-FITC</b>	(Maus anti-human CD4 FITC/PE) monoklonal, Isotyp IgG <sub>2a</sub> Klon: B-A1	( <i>Diaclone</i> )
<b>CD4-PE</b>	(Maus anti-human CD4 PE) monoklonal, Isotyp IgG <sub>1</sub> (κ) Klon: RPA-T4	( <i>BD Pharmingen</i> )
<b>CD25-PE</b>	(Maus anti-human CD25-PE) monoklonal, Isotyp IgG <sub>1</sub> (κ) Klon: M-A251	( <i>BD Pharmingen</i> )
<b>CD25-PE-Cy5</b>	(Maus anti-human CD25 PE-Cy5) monoklonal, Isotyp IgG <sub>1</sub> (κ) Klon: M-A251	( <i>BD Pharmingen</i> )
<b>CD127-PE</b>	(Maus anti-human CD127 PE) monoklonal, Isotyp IgG <sub>1</sub> (κ) Klon: HIL-7R-M21	( <i>BD Pharmingen</i> )

<b>Foxp3-PE</b>	(Rat anti-human FoxP3-PE) monoklonal, Isotyp IgG <sub>2a</sub> Klon: PCH101	( <i>eBioscience</i> )
<b>Foxp3-APC</b>	(Maus anti-human FoxP3-APC) monoklonal, Isotyp IgG <sub>2a</sub> Klon: PCH101	( <i>eBioscience</i> )
<b>IL-1R1-PE</b>	(Rat anti-human IL-1R1-PE) monoklonal, Isotyp IgG <sub>2a</sub> Klon: R12	( <i>Antigenix America</i> )
<b>IL-1R2-PE</b>	(Maus anti-human IL-1R2-PE) monoklonal, Isotyp IgG <sub>1</sub> Klon: 34141	( <i>R&amp;D Systems</i> )
<b>HLA-DR-FITC</b>	(Maus-anti-human HLA-DR-FITC) monoklonal, Isotyp IgG <sub>2b</sub> Klon: TÜ36	( <i>BD Bioscience</i> )

### 2.1.6.2 Antikörper für die Zellseparation

#### Human:

- CD3-Dynabeads** (Maus-anti-human-CD3)  
monoklonal, Isotyp IgM Klon: OKT-3 (*Dynal*)
- CD8-Dynabeads** (Maus-anti-human-CD8)  
monoklonal, Isotyp IgG1 (*Dynal*)
- CD14-Dynabeads** (Maus-anti-human-CD14)  
monoklonal, Isotyp IgG2a, Klon: RMO-52 (*Dynal*)
- CD19-Dynabeads** (Maus-anti-human-CD19 panB)  
(*Dynal*)
- CD25-Dynabeads** (Maus-anti-human-CD25 Tac-Antigen)  
monoklonal, Isotyp IgM Klon: MEM-140 (*Dynal*)
- CD4-MicroBeads** (Maus-anti-human-CD4 Leu<sup>TM</sup>-3a)  
monoklonal, Isotyp IgG1 Klon: SK3 (*Miltenyi*)
- CD25-MicroBeads** (humanisierter AK-anti-human CD25)  
monoklonal, Isotyp: IgG2a (*Miltenyi*)



**Murin:**

Alle Reagenzien für die Versuche im murinen System wurden von der AG von Dr. Tobias Bopp und Prof. Dr. Edgar Schmitt zur Verfügung gestellt.

**CD25-Biotin** (Rat anti-mouse CD25-Biotin)

monoklonal, Isotyp Rat IgM ( $\kappa$ ) Klon: 7D4 (BD Pharmingen)

**Streptavidin-Phycoeritrin (SA-PE)**

SA-PE wurde von der Firma *BD Pharmingen* bezogen und nach den Angaben des Herstellers zur PE-Markierung biotnylierter Antikörper eingesetzt.

**Anti-PE-MicroBeads** (*Miltenyi*)**Dynabeads** (*Dynal*)**CD8 (Lyt2)-Beads** (Prod.Nr. 114.07)**Pan-B (B220)-Beads** (Prod.Nr. 114.01)**Anti-MAC 1-Beads** (CD11b)**2.1.6.3 Antikörper für die Zellstimulation****Human:****CD3** (Maus anti-human CD3 unkonjugiert)

monoklonal, Isotyp IgG1( $\kappa$ ) Klon: OKT-3

Anti-CD3 mAk wurde von Helmut Jonuleit aus dem Kulturüberstand der OKT-3-Zelllinie gewonnen und aufgereinigt.

**CD28** (Maus anti-human CD28 unkonjugiert)

monoklonal, Isotyp IgG1( $\kappa$ ) Klon: CD28.2 (Pharmingen)

**Murin:**

Alle Reagenzien für die Versuche im murinen System wurden von der AG von Dr. Tobias Bopp und Prof. Dr. Edgar Schmitt zur Verfügung gestellt.

**145-2C11** (Ratte anti-Maus CD3 $\epsilon$ )

Der Klon 145-C211 wurde von Dr. J. A. Bluestone (Ben May Institute, Department of Pathology, Chicago, IL, USA) zur Verfügung gestellt.

**2.1.7 Vitalfarbstoffe**

**Annexin V Apoptosis Detection Kit APC** (eBioscience)

**7-AAD Viability Staining Solution** (eBioscience)

**Cell Proliferation Dye eFluor® 670 (CPD 670)** (eBioscience)

**CFDASE (CFSE)** (Molecular Probes Europe BV)

**2.1.8 Zytokine****Human:**

**IL-1 $\beta$**  (Miltenyi Biotec)

**rhIL-2 (Proleukin)** (Chiron-Behring, Marburg, Deutschland)

**Murin:**

Das murine rekombinante IL-2 (rmIL-2) für die Versuche im murinen System wurde von der AG von Dr. Tobias Bopp und Prof. Dr. Edgar Schmitt zur Verfügung gestellt, das murine rekombinante IL-1 $\beta$  (rmIL-1 $\beta$ ) von der AG von Prof. Dr. Esther von Stebut-Borschitz.

**rmIL-1 $\beta$** *(BioLegend)***rmIL-2**

IL-2 wurde als murines rekombinantes IL-2 (rmIL-2) aus dem Kulturüberstand des mit IL-2-cDNA transfizierten Myeloms X63Ag.653 von Prof. Dr. Edgar Schmitt gewonnen. Die Zellen wurden von Prof. Dr. F. Melchers zur Verfügung gestellt.

### **2.1.9 PCR-Reagenzien**

**QuantiTect Rev. Transcription Kit***(Qiagen)***QuantiFast SYBR Green PCR Kit***(Qiagen)***RNeasy Mini Kit***(Qiagen)*

### **2.1.10 Mäuse**

Die verwendeten Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Esther von Stebut-Borschitz zur Verfügung gestellt. C57BL/6 und IL-1R1<sup>-/-</sup> Mäuse (Stamm B6.129S7-*Il1r1*<sup>tm1Imx</sup>/J) wurden über The Jackson Laboratory bezogen. Die eingesetzten Tiere waren zwischen fünf und acht Wochen alt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Methoden der Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank und mit sterilen Reagenzien durchgeführt. Die Kultivierung von Zellen erfolgte in Inkubatoren bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre.

#### **2.2.1.1 Verwendete Zellen**

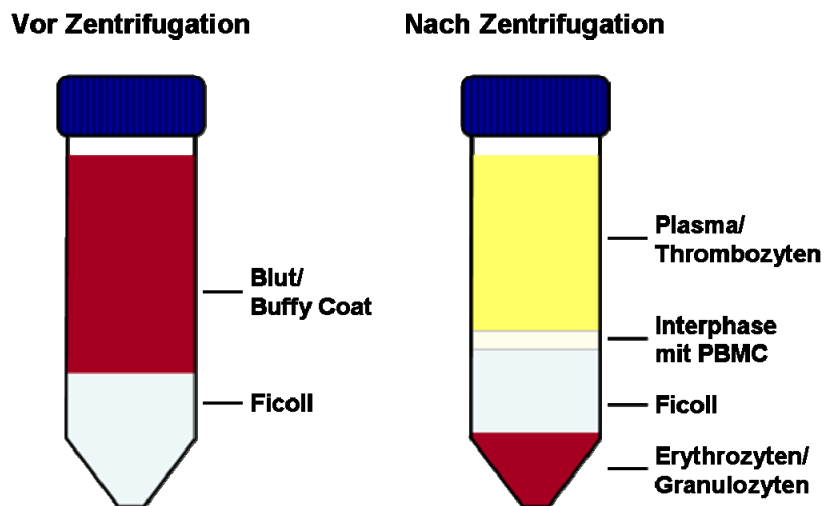
Für alle Versuche wurden als Primärzellen PBMC (Peripheral Blood derived Mononuclear Cells) aus humanem, peripheren Blut eingesetzt. Bei gesunden Spendern wurden hierzu BUFFY COATS herangezogen. BUFFY COATS wurden aus der Transfusionszentrale Mainz oder der Blutspendezentrale des Deutschen Roten Kreuzes in Frankfurt am Main bezogen. Im Fall von Melanompatienten wurden Vollblutspenden von 50-80 ml Volumen verwendet. Bei jedem Blutspender wurde nach einer mündlichen und schriftlichen Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Blutabnahme wurde entsprechend ethischer Richtlinien durchgeführt war von der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt (Protokoll 837.029.05 (4687)).

#### **2.2.1.2 Isolierung humaner PBMC**

Aus den BUFFY COATS bzw. aus dem Vollblut der Patienten wurden anschließend die PBMC mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation gewonnen [75;76]. Dabei diente Ficoll, eine isotonische, hydrophile Polysaccharoselösung mit einer mittleren Dichte von 1,077 g/ml (bei 20°C), als Trennmedium. Sowohl Dichte als auch Osmolarität dieser Lösung sind zur Isolierung von Leukozyten optimiert. Ficoll besitzt eine höhere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, jedoch eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten, wodurch es nach Zentrifugation entsprechend der jeweiligen Dichte zur Auftrennung in distinkte Phasen kommt, die isoliert werden können.

Die BUFFY COAT-Produkte wurden jeweils auf 100 ml mit eine Lösung aus 1xPBS + 1 mM EDTA + 2 % Heparin aufgefüllt. Je 15 ml Ficoll wurden mit 20-25 ml Vollblut bzw. 25 ml BUFFY COAT-Zellsuspension überschichtet und bei Raumtemperatur für 30 min. bei 350xg ohne Bremse zentrifugiert.

Durch den Zentrifugationsschritt kam es zur Auftrennung in vier Phasen (Abb.2.1): Die obere Phase enthielt Bestandteile mit der geringsten Dichte: das Plasma und Thrombozyten. Darauf folgte der weiße Interphasering, in dem sich mononukleäre Zellen wie Lymphozyten und Monozyten befinden. Die klare Ficollschicht trennte die Interphase von der unteren Phase aus Granulozyten und Erythrozyten.



**Abb. 2.1 Phasenbildung nach Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung humaner PBMC**

Vor der Zentrifugation wird das Blut bzw. die Zellsuspension auf die Ficollphase geschichtet (links). Durch die Dichtegradientenzentrifugation bilden sich vier Phasen (rechts). Die PBMC befinden sich in der Interphase und können durch vorsichtiges Abnehmen mit der Pipette isoliert werden. der Expression verschiedener.

Zur Isolierung der PBMC wurde zunächst 5-10 ml der oberen Plasma-/ Thrombozytenphase abgenommen. Anschließend wurde die Interphase vollständig in ein zweites 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in das zuvor 10-15 ml 1xPBS + 1 mM EDTA vorgelegt wurden. Um die PBMC von Plasma-, Ficollresten und Thrombozyten zu reinigen, wurden diese 3-4-mal durch

Resuspension in 1xPBS + 1 mM EDTA und anschließender Zentrifugation bei 4°C mit Bremse gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte bei 400xg für 7 min., die weiteren bei 300xg für 5 min.. Nach jedem Waschschrift wurde der Inhalt von je zwei Zentrifugenröhrchen bis schließlich auf ein einzelnes Gefäß vereint.

### **2.2.1.3 Ermittlung der Lebendzellzahl**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen mit einer physiologischen Trypanblau-Lösung verdünnt. Durch Zählen in einer Neubauer-Zählkammer wurde anschließend die Zahl lebender Zellen ermittelt. Tote und geschädigte Zellen, die über keine intakte Zellmembran mehr verfügen, nehmen Trypanblau auf und sind an ihrer Blaufärbung zu erkennen. Nach Auszählung von mindestens zwei Großquadraten (je 16 Einzelquadrate) lässt sich die Zellzahl nach folgender Formel errechnen:

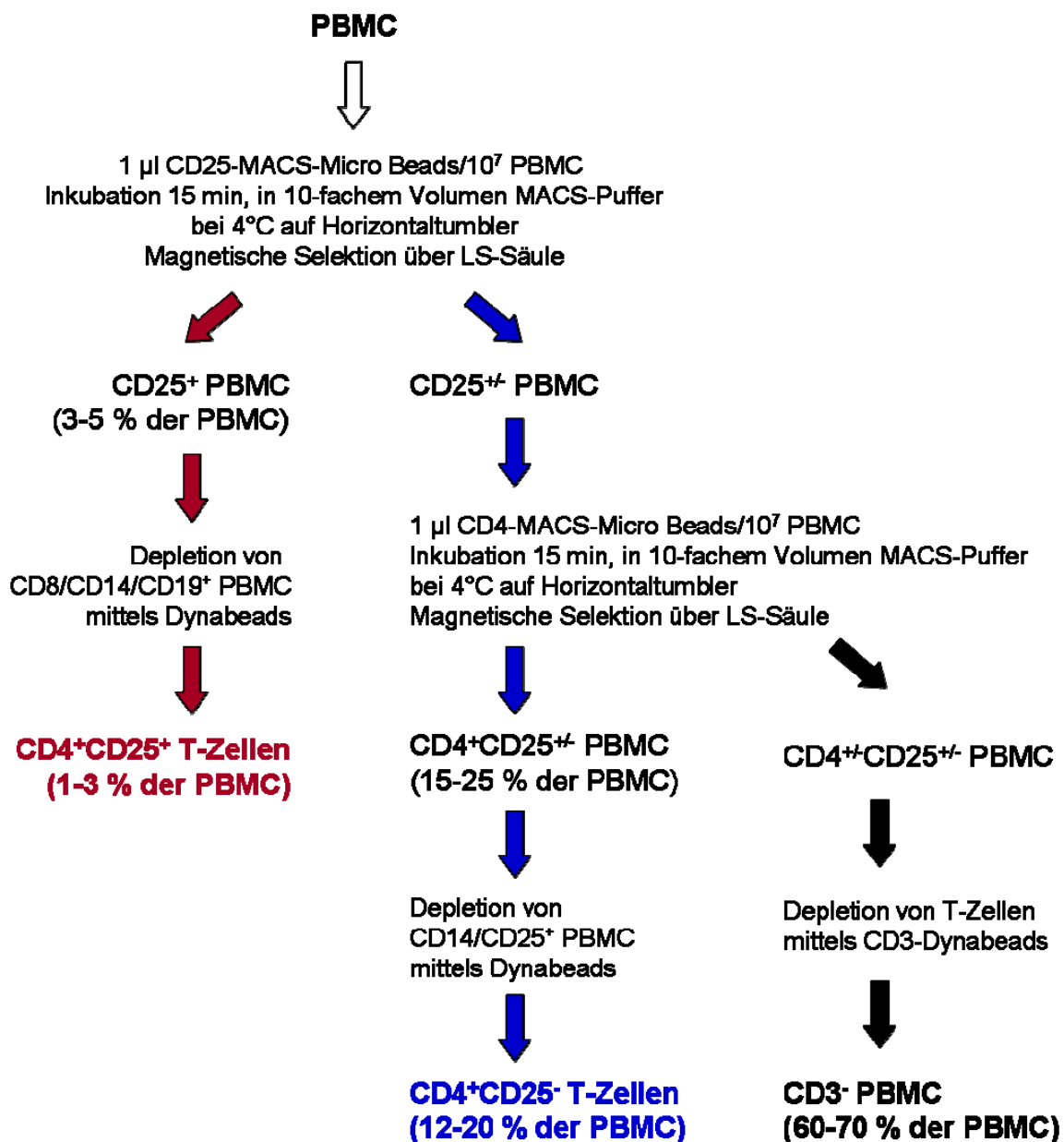
$$\text{Zellzahl pro Großquadrat} \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

V = Verdünnungsfaktor mit Trypanblau

$10^4$  = Kammerkonstante

### **2.2.1.4 Magnetische Isolierung verschiedener T-Zellpopulationen aus PBMC**

Die Isolation  $CD4^+CD25^-$  Teff und  $CD4^+CD25^+$  Treg wurde je nach Protokoll mittels immunomagnetischer Zellisolation mit einer Kombination aus MicroBeads (Durchmesser 50 nm; Miltenyi) und Dynabeads (Durchmesser 4,5  $\mu$ m; Dynal/Invitrogen) durchgeführt und ist in Abb. 2.2 beschrieben. Die Durchführung der magnetischen Selektion erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, wie zuvor beschrieben [77;78]. Der Erfolg der Anreicherung und Depletion wurde durchflusszytometrisch kontrolliert.



**Abb. 2.2 Protokoll zur Anreicherung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg und T-Zell-depletierten PBMC**

Entsprechend der Angaben wurden aus Gesamt-PBMC CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Teff und T-Zell-depletierten PBMC als APC isoliert.

### **2.2.1.5 Depletion von CD3<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC**

Zur Gewinnung von T-Zell-freien PBMC wurden entweder Gesamt-PBMC oder der Durchlauf nach der magnetischen Isolation der CD4<sup>+</sup> PBMC (Abb. 2.2 Mitte) verwendet. Hierbei wurde eine Depletion von CD3<sup>+</sup> PBMC (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen) mittels Dynabeads (Durchmesser 4,5 µm; Dynal/Invitrogen) durchgeführt. Abbildung 2.2 beschreibt das Vorgehen. Die Durchführung der magnetischen Selektion erfolgte nach Herstellerdatenblatt.

### **2.2.1.6 *In vitro*-Stimulation isolierter PBMC mit Recallantigenen**

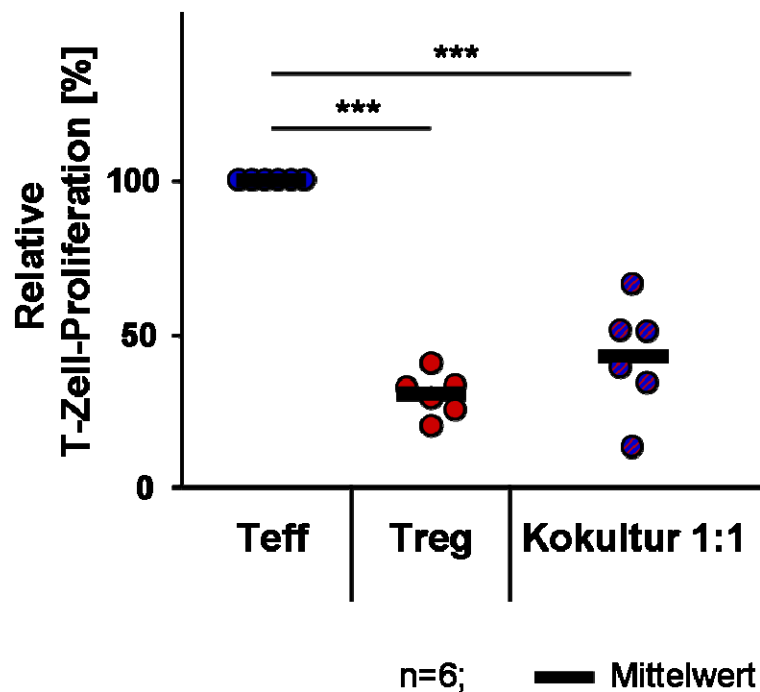
Zur Feststellung der antigenspezifischen Proliferation auf die Recallantigene Tetanustoxoid (TT) und Tuberculin (PPD) wurden PBMC in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well in X-VIVO-15 in 96-Well-Flachbodenplatten kultiviert. Die Kultur enthielt das jeweilige Recallantigen in einer Konzentration von 10 µg/ml. Nach 3-4 Tagen Kultur und einer zusätzlichen 16-stündigen Inkubation mit <sup>3</sup>H-TdR wurde die Proliferation gemessen (siehe 2.2.1.10). Das Hintergrundsignal unstimulierter Zellen wurde bei der Auswertung abgezogen.

### **2.2.1.7 Standard-Suppressionstest**

Um das Proliferationsverhalten von Teff und Treg in Einzel- und Kokultur zu beurteilen, wurden diese in einen „Standardproliferationstest“ eingesetzt. Dabei wurden von jeder T-Zellpopulation  $10^5$  Zellen pro Well eingesetzt. In der Kokultur aus Treg und Teff wurden die Treg-Dichte dabei teilweise in mehreren Schritten um jeweils die Hälfte verdünnt, um ihre konzentrationsabhängigen Wirkweise beurteilen zu können. Zur Stimulation diente als T-Zell-Rezeptor-(TCR-)Stimulus die Zugabe von anti-CD3 mAk in einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Als Kostimulus wurden CD3-depletierte, mit 90 Gy bestrahlte PBMC als APC verwendet ( $3 \times 10^5$  Zellen/Well). Für Versuchen, bei denen nur eine geringe Anzahl an angereicherten Treg zur Verfügung stand, wurde der Test statt in 96-Well-Flachbodenplatten in 96-Well-Flachboden-Half-Area-Platten mit gleichen Zellzahl-Verhältnissen aber nur halb so großen Zellzahlen durchgeführt. Auch hier wurde



nach 3-4 Tagen Kultur und einer zusätzlichen 16-stündigen Inkubation mit  $^3\text{H-TdR}$  die Proliferation, wie in 2.2.1.10 beschrieben, gemessen. Das Proliferationsverhalten von Teff und Treg in einer solchen Einzel- und Kokultur ist wie zuvor beschrieben [77] in Abbildung 2.3 dargestellt.



**Abb. 2.3 Proliferationsverhalten im „Standard-Suppressionstest“**

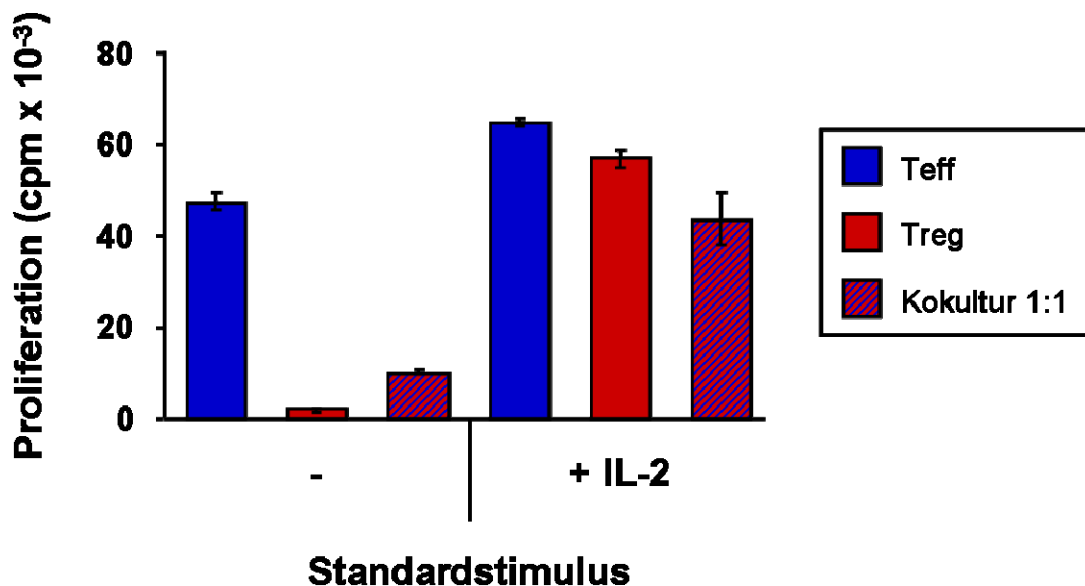
$\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  Teff und  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  Treg sechs gesunder Spender wurden isoliert und in einem „Standard-Proliferationstest“ eingesetzt. Die Zellproliferation wurde mittels  $^3\text{H-TdR}$ -Inkorporation gemessen und als Anteil an der Proliferation der Teff dargestellt, welche jeweils als 100 % festgelegt wurde. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$

### 2.2.1.8 Suppressionstest nach durchflusszytometrischer Sortierung

Die durch die durchflusszytometrische Sortierung gewonnenen Treg-Populationen wurden für ihre funktionelle Testung in einen Standardproliferationstest eingesetzt, wie er in 2.2.1.7 beschrieben ist.

### 2.2.1.9 Suppressionstest mit reduziertem Kostimulus

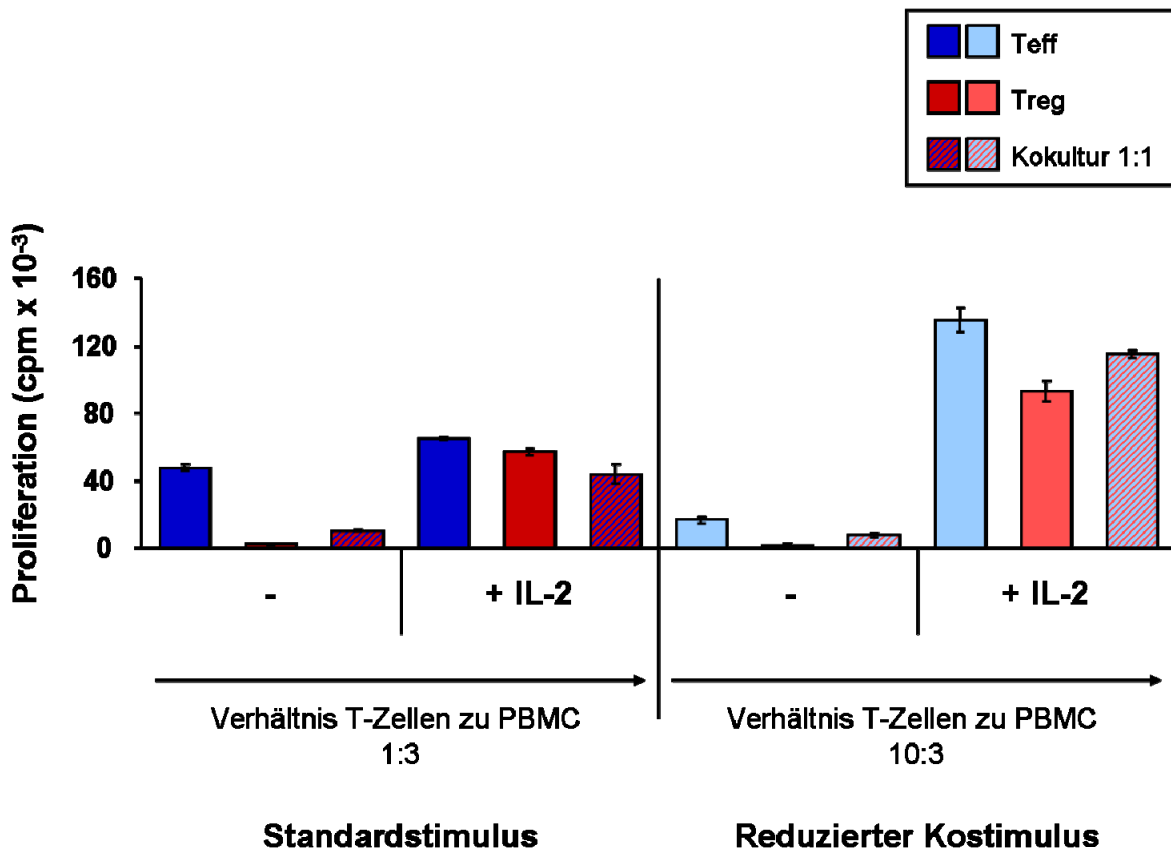
Bei der Untersuchung des Effekts von IL-1 auf die Proliferation von Treg und Teff wurde das proliferationsfördernde Zytokin IL-2 als Kontrollzytokin eingesetzt. Die Zugabe von IL-2 in einem Standard-Suppressionstest zeigte jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Proliferation der Teff. Dies war auf den dort gewählten Stimulus zurückzuführen, der auch ohne die Zugabe von IL-2 bereits eine maximale Proliferationsinduktion in den Teff bewirkte (Abb.2.4).



**Abb. 2.4 Proliferationsverhalten im „Standard-Suppressionstest“ ohne und mit Zugabe von IL-2**

Die in Abb. 2.4 gezeigte relative Proliferation der T-Zellkulturen ist im Vergleich ohne und mit Zugabe von IL-2 dargestellt. Die Zellproliferation wurde mittels <sup>3</sup>H-TdR-Inkorporation gemessen. Es sind die beispielhaften Ergebnisse für einen Spenders abgebildet.

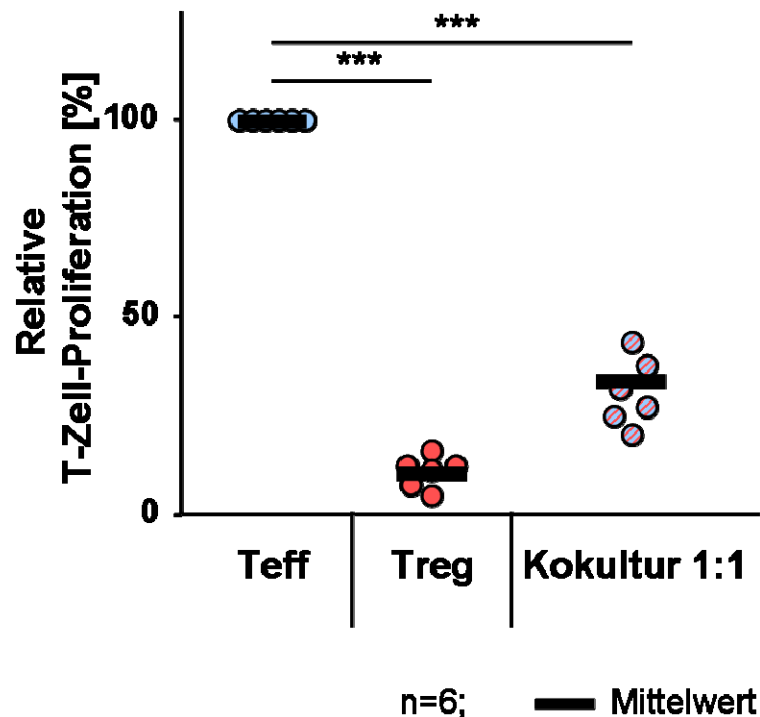
Daraufhin etablierten wir einen Suppressionstest, bei dem wir nur ein Zehntel an PBMC als Kostimulus einsetzten. Mit Hilfe dieses reduzierten Kostimulus wurde es möglich die proliferationsfördernde Wirkung von exogenen IL-2 auf Teff darzustellen (Abb 2.5). Gleichzeitig wird die bekannte Wirkung von exogenen IL-2 auf Treg und deren Kokultur mit Teff sichtbar: sowohl Treg-Anergie als auch deren suppressorischer Einfluss auf die Teff-Proliferation werden gebrochen [79].



**Abb. 2.5 Vergleich der Zytokinwirkung mit Standardstimulus und reduziertem Kostimulus**

Der proliferationsfördernde Einfluss von IL-2 auf die Teff- und Treg-Einzelkultur, bzw. ihrer Kokultur wird bei verschiedenen Stimulationsbedingungen verglichen. Dabei wird die Proliferation mit dem „Standard-Stimulus“ der mit einem reduzierten Kostimulus gegenübergestellt. Gezeigt ist ein beispielhafter Spender.

Auch bei in dem Suppressionstest mit reduziertem Kostimulus bleibt das charakteristische Proliferationsverhalten von Teff und Treg in der Einzel- und Kokultur erhalten: Die Teff zeigen im Gegensatz zu den Treg eine starke Proliferation nach Aktivierung. Ebenso zeigen in einer Kokultur die Treg eine hemmende Wirkung auf die Proliferation der Teff (Abb. 2.6).



**Abb. 2.6 Aufrechterhaltung der Suppression im Proliferationstest mit reduziertem Kostimulus**

Es wird die Proliferation von  $CD4^+CD25^-$  Teff und  $CD4^+CD25^+$  Treg gesunder Spender bei Stimulation mit reduziertem Kostimulus gezeigt. Die Zellproliferation wurde mittels  $^3H$ -TdR-Inkorporation gemessen und als Anteil an der Proliferation der Teff dargestellt, welche als 100 % gesetzt wurde. Die Ergebnisse zeigen die relative Proliferation für sechs verschiedene Spender. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

**2.2.1.10 Auswertung von  $^3H$ -TdR-Tests**

Die Proliferation von stimulierten PBMC wurde indirekt über den Einbau von  $^3H$ -TdR in die DNA der sich teilenden Zellen bestimmt. Hierzu wurde an Tag drei der Zellkultur für die Dauer von 16-18 h radioaktiv markiertes  $^3H$ -TdR mit einer 1 ml Spritze und einer Kanüle (25x0,5 nm)  $^3H$ -TdR mit einer Aktivität von 37 kBq/Well zugesetzt. Anschließend wurden die Kulturplatten bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Auswertung eingefroren, um einen weiteren Einbau von  $^3H$ -TdR zu verhindern. Die Auswertung selbst erfolgte nach dem Auftauen der Kulturplatten und dem Absaugen der Kulturen mit Hilfe eines Zellerntegerätes (Cell Harvester;

Pharmacia) auf Glasfaserfiltermatten in einem Szintillationscounter. Die DNA mit dem eingebauten  $^3\text{H}$ -TdR wurde auf dem Filter zurückgehalten, freies  $^3\text{H}$ -TdR mit dem Kulturmedium abgesaugt. Der Filter wurde anschließend bei 100 °C für 10 min. in einem Wärmeschrank getrocknet und mit 10 ml Szintillationslösung in eine Plastikfolie eingeschweißt. Im Anschluss erfolgte durch Flüssigszintillationszählung die indirekte Bestimmung des  $^3\text{H}$ -Td-Gehalts in einem  $\beta$ -Counter in Form von gezählten Impulsen (cpm = counts per minute). Als Maß für die Proliferation wurde jeweils das arithmetische Mittel der cpm-Werte dreier identischer und parallel angesetzter Proben (Triplets) angegeben.

## **2.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen**

Zur Ermittlung der Expressionsraten verschiedener Moleküle erfolgte eine fluoreszenzserologische Untersuchung der Zellen an Durchflusszytometern.

### **2.2.2.1 Färbung von Oberflächenmolekülen**

Für die Anfärbung von Oberflächenmolekülen wurde eine Inkubation der jeweiligen Zellen mit direkt-fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern durchgeführt. Diese fand über einen Zeitraum von 30 min. bei 4 °C im Dunkeln statt. Nach zweimaligem Waschen mit wurden die Zellen in je 100-200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen und anschließend am Durchflusszytometer analysiert.

### **2.2.2.2 Intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors Foxp3**

Die Anfärbung von Foxp3 wurde in einem zweiten Schritt nach der Färbung von Oberflächenmolekülen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach Händlerangaben mit dem Foxp3 Staining Kit (eBioscience) fixiert, permeabilisiert und angefärbt.

### **2.2.2.3 Durchflusszytometrische Sortierung von Treg-Populationen**

Die durchflusszytometrische Sortierung von Treg-Populationen wurde von Mitarbeitern der Flow Cytometry Core Facility (FCCF) der Universitätsmedizin Mainz an einem FACS Aria II durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Anreicherung der Treg-Populationen für die murinen Versuche wurden von Dr. Tobias Bopp aus dem Institut für Immunologie an der Universitätsmedizin Mainz an einem FACS Aria II durchgeführt.

### **2.2.2.4 Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Apoptose**

Zur Messung von toten und apoptotischen Zellen mittels der Durchflusszytometrie wurden zwei Reagenzien verwendet. Annexin V-APC (eBioscience) und 7-AAD (eBioscience). Die Färbung der Zellen fand dabei nach Herstellerangaben statt.

Prinzip und Anwendung von Annexin V:

In frühen Stadien der Apoptose finden Veränderungen in der Zellmembran statt. Dabei kommt es unter anderem zur Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran. Unter nicht apoptotischen Bedingungen ist Phosphatidylserin auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert [80-82].

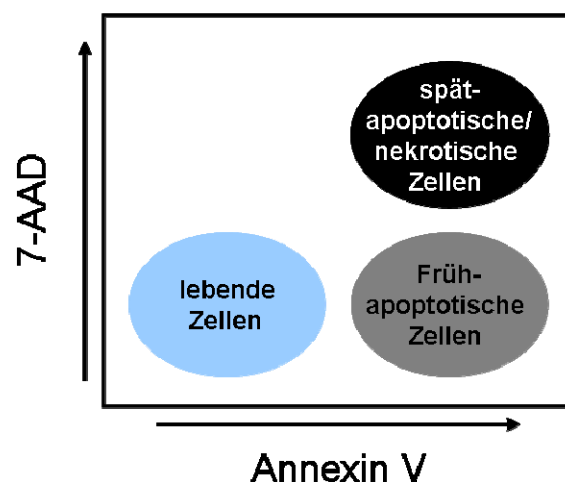
Annexin V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, welches eine hohe Affinität für Phosphatidylserin aufweist. Somit kann fluoreszenzmarkiertes Annexin V in der Durchflusszytometrie als Sonde für die Phosphatidylserin-Exposition auf der Membranaußenseite eingesetzt werden und damit früh-apoptotische Zellen erkannt werden [83;84].

Prinzip und Anwendung von 7-AAD:

Neben früh-apoptotischen Zellen, können auch nekrotische bzw. spät-apoptotische Zellen detektiert werden. Letztere Zellen weisen einen Verlust der Membran-Integrität auf. Ihre Zellmembran ist daher für gewisse Farbstoffe wie Trypanblau, Propidium-Iodid oder auch 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) durchlässig [84]. 7-AAD ist ein DNA-bindender Farbstoff, der sein Anregungsmaximum bei 543 nm und sein Emissionsmaximum bei 647 nm hat.

Mittels 7-AAD können also nekrotische und spät-apoptotische Zellen detektiert werden.

Da Zellen sowohl im früh- als auch spät-apoptotischen Stadium Annexin V binden und sich sowohl nekrotische als auch spät-apoptotische Zellen mit 7-AAD anfärben lassen, ergibt sich bei einer Doppelfärbung mit im Durchflusszytometer folgendes Bild für eine gemischte Zellpopulation (Abb 2.7):



**Abb. 2.7 Schema für die Verteilung von Zellen in verschiedenen Apoptose-Stadien im Durchflusszytometer bei einer Färbung mit 7-AAD und Annexin V**  
Bei einer Doppelfärbung mit 7 AAD und Annexin V einer gemischten Zellpopulation ist eine Unterscheidung zwischen lebenden, früh-apoptotischen und spätapoptotischen/nekrotischen Zellen möglich

### 2.2.2.5 Durchflusszytometrischer Proliferationstest mit CFSE und Cell Proliferation Dye eFluor 670

Mittels verschiedener Proliferationsfarbstoffe sind die Proliferationschritte in einer sich teilenden Zellpopulation im Durchflusszytometer nachzuweisen. Das Prinzip dieses Nachweises beruht darauf, dass die angefärbte, sich teilende Zellen jeweils die Hälfte des Farbstoffes auf die jeweiligen Tochterzellen überträgt, dadurch weist jeder Tochtergeneration eine halb so hohe Fluoreszenzintensität auf, wie ihre Muttergeneration. In den Versuchen in dieser Arbeit wurden die Farbstoffe

CFSE-(5,6-Carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester) (Molecular Probes Europe BV, Niederlande) und CPD 670 (Cell Proliferation Dye eFluor 670) (eBioscience) verwendet. Dabei wurden Treg mit CFSE und Teff mit CPD 670 angefärbt und ihre Proliferation nach Stimulation in An- und Abwesenheit der Zytokine IL-1 und IL-2 über fünf Tage hinweg analysiert. Durch die differentielle Färbung war es in diesen Versuchen auch möglich die Proliferation der beiden T-Zellpopulationen in ihrer Kokultur getrennt voneinander zu beobachten, da sich ansonsten der Phänotyp von Teff und Treg nach Stimulation stark angleicht. CFSE wurde bei der Färbung mit einer Konzentration von 1  $\mu$ M, CPD 670 mit einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M eingesetzt und die Färbungen entsprechend der jeweiligen Herstellerinformationen durchgeführt.

## **2.2.3 Untersuchungen zur Genexpression mittels Real-Time qPCR**

### **2.2.3.1 Isolation und Quantifizierung von RNA**

Humane Zellen wurden aus der Kultur geerntet und zweimal mit kaltem 1xPBS gewaschen. Danach wurden sie in Drypellets bei -80 °C gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Im nächsten Schritt wurde aus diesen Drypellets mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Händlerangaben eine RNA-Isolation durchgeführt. Zur anschließenden Bestimmung der RNA-Konzentration in den gewonnenen Proben wurde eine Messung an einem Spektrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) durchgeführt.

### **2.2.3.2 cDNA-Gewinnung mittels RT-PCR**

Aus den gewonnenen RNA-Proben wurde mittels einer Reversen Transkription cDNA generiert. Für diese Reaktionen wurde von jeder Probe eine Menge von 200 ng RNA eingesetzt. Dabei wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.



### 2.2.3.3 Real-Time qPCR mittels SYBR Green I

Für die Real-Time qPCR-Reaktionen wurde das QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Jede Probe wurde in Dupletts angesetzt und war wie folgt zusammengesetzt:

12,5 µl des SYBR Green Mastermix

2,5 µl Primerpärchen

2 µl cDNA

8µl H<sub>2</sub>O

Folgende Primer wurden verwendet

EF-1 $\alpha$ 1 (Haushaltsgen):

EF-1 $\alpha$ 1 FOR: GATTACAGGGACATCTCAGGCTG

EF-1 $\alpha$ 1 REV: TATCTCTTCTGGCTGTAGGGTGG

RORC (Crome et al. Eur. J. Immunol. 2009 PMID 19449310):

RORC FOR: TGGAAGTGGTGCTGGTTAGGA

RORC REV: AAGGCTCGGAACAGCTCCAT

IL2:

Hs\_IL2\_1\_SG QuantiTect Primer Assay (200)

Die Messung der Proben fand in 96-Well-PCR Mikroplatten mit dem Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems) nach dem von Qiagen empfohlenen Programm für das QuantiFast SYBR Green PCR Kit statt.

### 2.2.3.4 Relative Quantifizierung bei der Real-Time qPCR

Die Berechnung der relativen Genexpression wurde nach der Methode von M.W. Pfaffl durchgeführt [85]. Dabei diente die Genexpression des Haushaltsgens EF-1 $\alpha$ 1 als Referenz.

### 2.2.4 Versuche im murinen System

Für die Differenzierung des IL-1-Effekts auf Treg- und Teff-Zellen wurden Mäuse des Stammes B6.129S7-IL1r1<sup>tm1lmx</sup>/J (003245) verwendet. Sie wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Esther von Stebut-Borschitz zur Verfügung gestellt und von „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, Maine USA) bezogen. Die Mäuse tragen die gezielte Mutation IL1r1<sup>tm1lmx</sup> homozygot und haben ihre Reaktivität auf IL-1 damit verloren. Bei systemischer LPS-Challenge zeigen sie eine normale Akute-Phase-Immunantwort, jedoch nur eine eingeschränkte Reaktivität bei lokaler Entzündungssetzung. Der Hintergrundstamm; C57BL/6 diente als Kontrollstamm.

Die Zellisolation für die murinen *in vitro* Versuche wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Tobias Bopp durchgeführt. Dabei wurden zur Zellanreicherung und –Kultur Protokolle verwendet, die von Prof. Dr. Edgar Schmitt etabliert wurden. Die detaillierten Protokolle sind in der Dissertationsschrift von Dr. Tobias Bopp beschrieben [86].

### 3. ERGEBNISSE

Die Wiederentdeckung der CD4<sup>+</sup> Suppressor T-Zellen [87] als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Treg) in den 1990er Jahren [12] eröffnete ein weites Forschungsfeld für die Grundlagen- als auch die angewandte klinische Forschung. Obwohl bis heute die Bedeutung und Funktion von Treg von vielen Seiten beleuchtet worden sind, bleibt noch immer eine Vielzahl an offenen Fragestellungen.

Allgemein gilt, dass Treg in einem ausgeglichenen Immunsystem dazu beitragen, sowohl überschießende und somit gewebeschädigende Immunantworten bei Infektionen einzudämmen [88], als auch Überreaktionen gegenüber harmlosen Fremdstoffen oder Selbstantigenen zu verhindern [89-91]. Letzteres betrifft z.B. die Entstehung von Allergien und Autoimmunerkrankungen [92;93]. Neben diesen Aufgaben der Treg bei der zellulären Immunabwehr wurde jedoch auch eine Involvement von Treg bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Tumorerkrankungen beschrieben. Dabei zeigten Untersuchungen eine Beteiligung von Treg bei der Aufrechterhaltung von Toleranz gegenüber dem entarteten körpereigenen Gewebe, wodurch eine erfolgreiche Immunantwort gegen den Tumor verhindert werden kann [94].

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen Untersuchungen zum Einfluss des malignen Melanoms auf die Frequenz und Aktivität von Treg im peripheren Blut. Des Weiteren wurde die Wirkung von IL-1 auf Treg und T-Effektorzellen (Teff) verglichen.

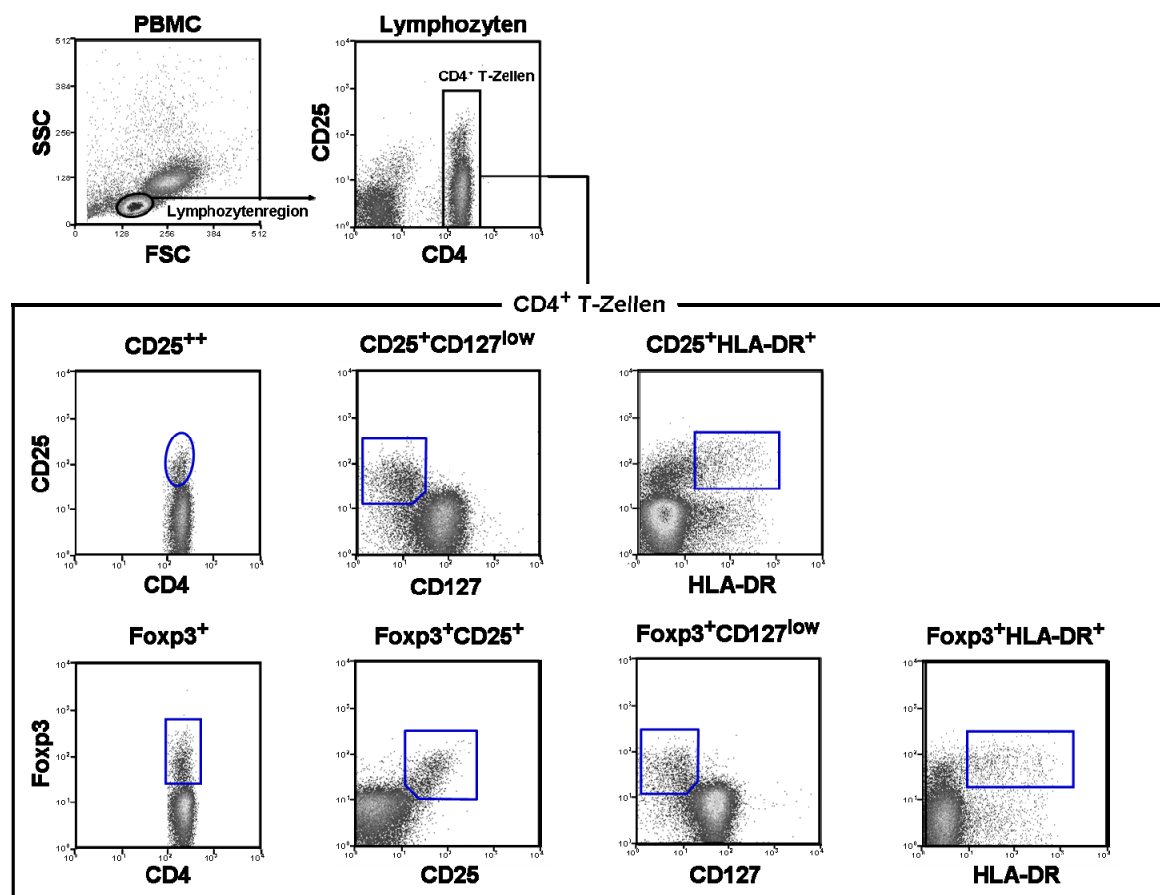
### **3.1 Untersuchungen zum Einfluss des malignen Melanoms auf Treg-Frequenzen und T-Zellreaktivität**

Bislang konnte noch kein exklusiver Marker für Treg identifiziert werden. Allerdings wurde eine Reihe von Treg-assoziierten Markern beschrieben. Die früheste Definition von Treg erfolgte mittels der konstitutiven Expression von CD25, der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors [12]. Einige Jahre später wurde Foxp3 als Treg-assoziiertes Transkriptionsfaktor entdeckt [95-97]. Im Jahr 2006 veröffentlichten Mitarbeiter um J.A. Bluestone eine Arbeit, die eine inverse Korrelation der Expression von CD127, der  $\alpha$ -Kette des IL-7-Rezeptors, mit der Expression von Foxp3 auf humanen Treg und deren suppressiven Funktion postulierte [98]. Mit Hilfe dieser Marker wurde es nun möglich die Population natürlich vorkommender Treg von ruhenden Treg zu unterscheiden und deren Frequenz zu bestimmen. Überdies hinaus konnten bei Treg anhand weiterer Marker unterschiedliche Subpopulationen beschrieben werden. Dabei wurden 2006 von C. Baecher-Allan et al. eine funktionell distinkte Subpopulation von Treg beschrieben, welche konstitutiv MHC-Klasse II-Moleküle exprimieren und rein Zellkontakt-abhängig supprimieren [99-101]. Da bei einer Vielzahl von Krebsformen Treg sowohl im soliden Tumor als auch im peripheren Blut vermehrt vorzufinden sind [102-106], wollten wir Hilfe oben genannter Marker die Treg-Frequenzen im peripheren Blut von Melanompatienten im Vergleich zu gesunden Spendern durchflusszytometrisch bestimmen.

#### **3.1.1 Durchflusszytometrische Frequenzbestimmung regulatorischer T-Zellen mittels Treg-assoziierten Marker im peripheren Blut gesunder Spender**

Aus BUFFY COATS gesunder Spender wurden mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) gewonnen. Diese wurden im Durchflusszytometer hinsichtlich der Expression Treg-assoziierten Moleküle untersucht. Abbildung 3.1 zeigt beispielhaft für einen dieser Spender die Auswahlstrategie zur Identifizierung der verschiedenen Populationen. Folgende Subpopulationen wurden quantifiziert:  $CD4^+CD25^{++}$ ,  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ,  $CD4^+CD25^+HLA-DR^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD127^{low}$  und

CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen. Die Frequenzbestimmung erfolgte als Anteil an den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, wozu zuerst die Lymphozytenregion im FSC/SSC und im zweiten Schritt alle darin enthaltenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausgewählt und als 100 Prozent gesetzt wurden. Tabelle 3.1 fasst das Ergebnis der Frequenzbestimmung für alle untersuchten gesunden Individuen zusammen.



**Abb. 3.1 Frequenzbestimmung von T-Zellpopulationen, die Treg-assoziierte Marker exprimieren**

Mittels Durchflusszytometrie wurden anhand der Expression verschiedener Treg-assoziierte Marker T-Zell-Populationen in PBMC gesunder Spender charakterisiert. Gezeigt ist die Auswahlstrategie für die untersuchten T-Zell-Populationen innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten exemplarisch für einen gesunden Spender. Blau umrandet sind folgende Populationen beispielhaft abgebildet: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen.

**Tabelle 3.1** Frequenzen der identifizierten T-Zellpopulationen im peripheren Blut gesunder Spender

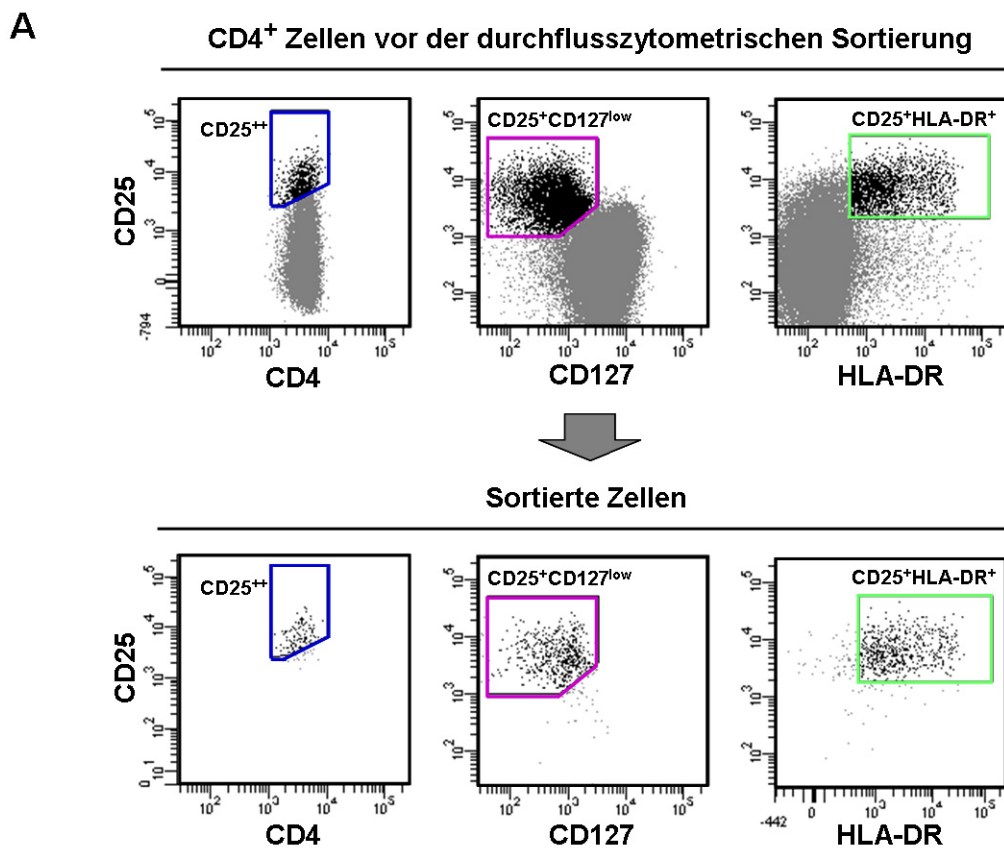
	Mittelwert +/- SD	MAX	MIN
<b>CD25<sup>++</sup></b>	<b>3,6 ± 0,9 %</b>	5,6 %	2,2 %
<b>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup></b>	<b>5,8 ± 1,4 %</b>	8,6 %	3,3 %
<b>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup></b>	<b>1,4 ± 0,6 %</b>	2,7 %	0,6 %
<b>Foxp3<sup>+</sup></b>	<b>4,9 ± 1,7 %</b>	7,5 %	2,0 %
<b>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	<b>4,9 ± 2,3 %</b>	9,8 %	0,7 %
<b>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup></b>	<b>6,6 ± 1,5 %</b>	9,6 %	4,7 %
<b>Foxp3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup></b>	<b>1,9 ± 0,8 %</b>	3,5 %	0,5 %

Die Tabelle zeigt den Prozentsatz der in Abb. 3.1 beschriebenen T-Zell-Populationen als Anteil an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut gesunder Spender. Neben den jeweiligen Mittelwerten mit Standardabweichung SD ist die höchste (MAX) und geringste (MIN) Frequenz angegeben, die bei den untersuchten Individuen gefunden wurde. Die Anzahl der jeweils untersuchten Spender ist wie folgt: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>: n=27, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>: n=28, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>: n=26, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>: n=25, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>: n=28, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>: n=15 und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>: n=28.

### 3.1.2 Funktionelle Testung der T-Zellpopulationen mit spezifischer Markerexpression

Da es sich bei allen zur Charakterisierung verwendeten Markern um Treg-assoziierte aber keine Treg-spezifischen Moleküle handelt, interessierte uns im nächsten Schritt die Überprüfung der funktionellen Eigenschaften dieser identifizierten T-Zellpopulationen. Dazu setzten wir sie in einem *in vitro* Suppressionsassay (Methoden 2.2.1.7) ein. Hierbei überprüften wir ihre Proliferation infolge polyklonaler Stimulation und ihre Fähigkeit, die Proliferation polyklonal stimulierter CD4<sup>+</sup> Teff zu unterdrücken.

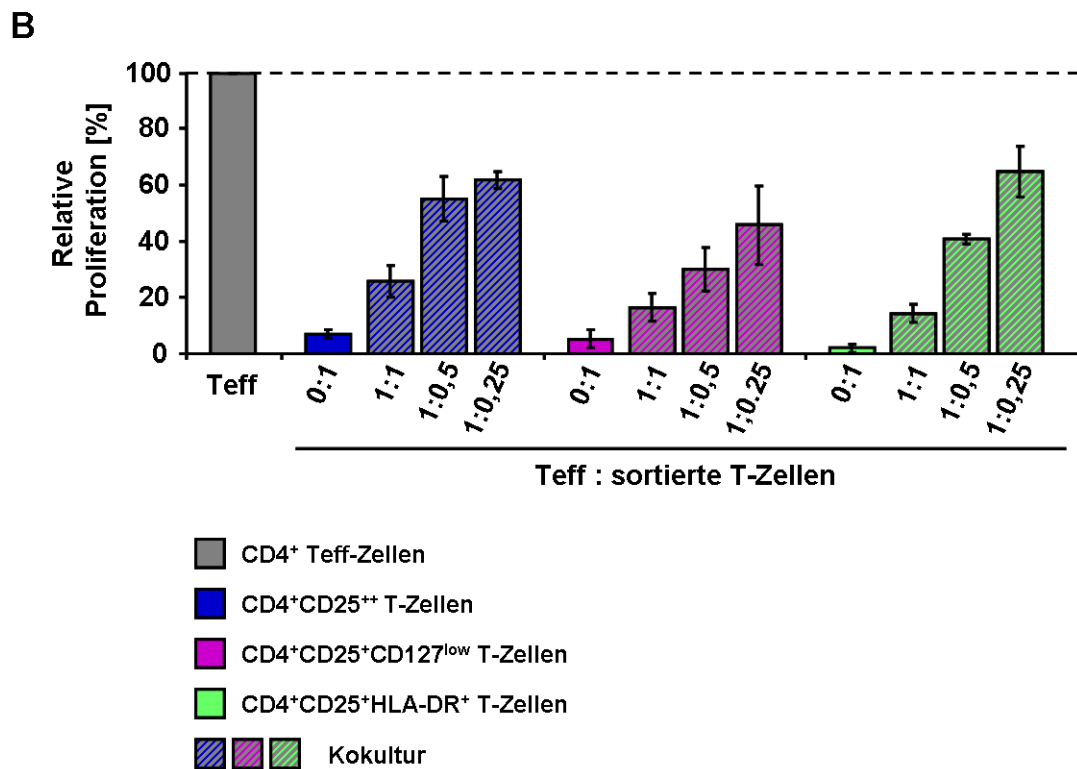
CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC gesunder Spender (n=3) wurden immunomagnetisch angereichert. Daraus wurden mittels durchflusszytometrischer Sortierung folgende T-Zellpopulationen isoliert: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> (Reinheit 80 ± 1 %), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> (Reinheit 92 ± 1 %), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (Reinheit 89 ± 5 %) (Abb.3.2 A).



**Abb. 3.2 Charakterisierung der isolierten Treg-Subpopulationen**

Die anhand der Treg-assoziierten Marker definierten T-Zell-Populationen wurden auf ihre regulatorische Funktion hin untersucht. A) immunomagnetisch isolierte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten gesunder Spender wurden entsprechend der Expressionsmuster CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> oder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> mittels durchflusszytometrischer Sortierung isoliert.

Im Anschluss folgte die funktionelle Testung der sortierten T-Zellpopulationen, indem sie in einen Suppressionsassay mit CD4<sup>+</sup> Teff eingesetzt wurden. Die jeweilige Proliferation wurde auf die Proliferation der Teff in Einzelkultur (= 100 %) normalisiert. Abbildung 3.2 B) zeigt, dass alle drei sortierten T-Zellpopulationen in der Einzelkultur Anergie zeigten, in der Kokultur dosisabhängig die Proliferation der Teff supprimierten und somit Treg-Eigenschaften besitzen. In Tabelle 3.2 sind die Suppressionswerte aus drei unabhängigen Versuchen zusammengefasst.



### Abb. 3.2 Charakterisierung der isolierten Treg-Subpopulationen

Die anhand der Treg-assoziierten Marker definierten T-Zell-Populationen wurden auf ihre regulatorische Funktion hin untersucht. B) Die sortierten T-Zellpopulationen wurden parallel in einen Suppressionsassay mit CD4<sup>+</sup> Teff eingesetzt und ihre suppressiven Eigenschaften untersucht. Die Stimulation erfolgte mittels 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk in Anwesenheit von bestrahlten PBMC. Die T-Zellproliferation wurde mittels <sup>3</sup>H-TdR-Inkorporation gemessen. Abbildung B) zeigt die relative Proliferation der Einzel- bzw. Kokulturen als Mittelwert aus drei unabhängigen Assays. Die Proliferation der CD4<sup>+</sup> Teff - in Abwesenheit von Treg - wurde auf 100 % gesetzt.

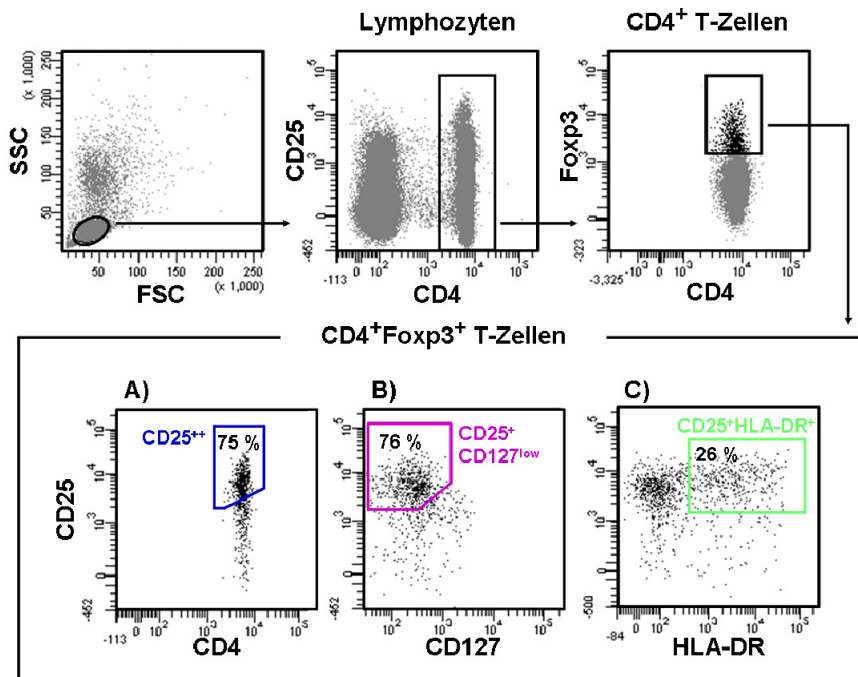


**Tabelle 3.2 Suppression der Teff-Proliferation durch sortierte T-Zellpopulationen**

Teff : sortierte T-Zellen	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>
1 : 1	74 ± 5 %	84 ± 5 %	86 ± 3 %
1 : 0,5	45 ± 8 %	70 ± 8 %	59 ± 2 %
1 : 0,25	38 ± 3 %	54 ± 14 %	35 ± 9 %

Die Tabelle zeigt die prozentuale Suppression der Teff-Proliferation durch die, in Abbildung 3.2 A) gezeigten, sortierten T-Zellpopulationen als Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen inklusive Standardabweichung.

Da Foxp3 als Transkriptionsfaktor intrazellulär vorliegt, ist vor dessen Anfärbung eine Fixierung und Permeabilisierung der zu untersuchenden Zellen notwendig. Dieser Vorgang führt zum Tod der Zellen. Aus diesem Grund ist die Isolation lebender Foxp3<sup>+</sup> Zellen mittels durchflusszytometrischer Sortierung nicht möglich. Daher konnte die Foxp3<sup>+</sup> T-Zellpopulation funktionell nicht isoliert getestet werden. In Abbildung 3.3 ist dargestellt, dass die CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen (schwarz) eine große Überschneidung mit den im Suppressionsassay getesteten T-Zellpopulationen aufweisen. Daher ist anzunehmen, dass Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen weitgehend übereinstimmende funktionelle Eigenschaften mit den getesteten Treg-Subpopulationen besitzen.



**Abb. 3.3 Analyse der relativen Expression Treg-assoziiierter Marker in den CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen**

Im Durchflusszytometer wurde die CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellpopulation ausgewählt (schwarze Population oben rechts) und die Expression der Treg-assoziierten Markerkombinationen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (A), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> (B) und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (C) innerhalb dieser CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellpopulation festgestellt.

Es konnte somit gezeigt werden, dass mit Hilfe der Markerkombinationen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Zellpopulationen mit Suppressorfunktion innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten des peripheren Blutes bestimmt werden können. Eine weitgehende Übereinstimmung der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen mit diesen *in vitro* funktionell getesteten Treg-Populationen legt nahe, dass diese ähnliche Eigenschaften im Proliferationstest besitzen. Im Folgenden wurde neben den Markerkombinationen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> daher ebenfalls die Kombinationen CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> zur Bestimmung der Treg-Frequenzen im peripheren Blut verwendet.

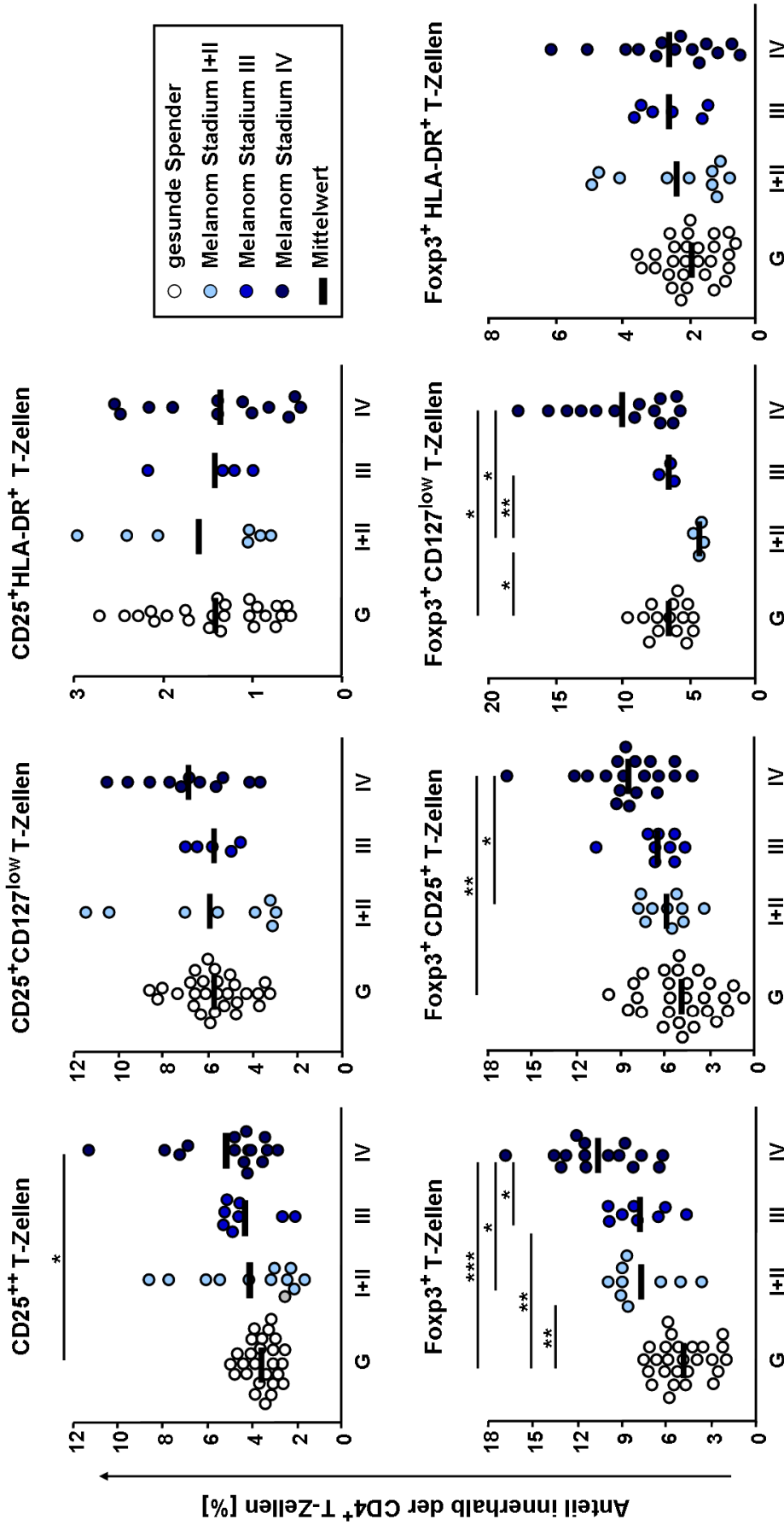
### 3.1.3 Vergleich der Frequenzen regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut von Melanompatienten und gesunden Spendern

Die Frequenz der in Abbildung 3.1 definierten Treg-Populationen wurde im nächsten Schritt in PBMC aus peripherem Blut von Melanompatienten im Stadium I-IV (Tabelle 3.3) bestimmt und mit den Frequenzen bei gesunden Spendern verglichen (Abb. 3.4). Anhand der Markerkombinationen  $CD4^+CD25^{++}$ ,  $CD4^+Foxp3^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD25^+$  und  $CD4^+Foxp3^+CD127^{low}$  lassen sich bei Melanompatienten im Spätstadium IV, verglichen mit gesunden Spendern, signifikant erhöhte Treg-Frequenzen erkennen. Vergleicht man zwischen den verschiedenen Melanomstadien, weisen Patienten mit fortgeschrittener Melanomerkrankung im Stadium III oder IV verglichen mit Patienten im Stadium I-II (ohne Metastasierung) für die Markerkombinationen  $CD4^+Foxp3^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD25^+$  und  $CD4^+Foxp3^+CD127^{low}$  einen Anstieg der Treg-Frequenzen auf. Die  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ,  $CD4^+Foxp3^+HLA-DR^+$  und  $CD4^+CD25^+HLA-DR^+$  Treg-Subpopulationen hingegen zeigen hinsichtlich ihrer Frequenz keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier verglichenen Spendergruppen. Zusammengefasst ergibt sich insbesondere bei den Markerkombinationen mit Foxp3 ein Anstieg der Treg-Frequenzen im peripheren Blut in fortgeschrittenen Stadien der Melanomerkrankung.

**Tabelle 3.3 Klinische Charakteristika der untersuchten Melanompatienten**

Stadium	Geschlecht	Alter	Tumordicke	Metastasen	Therapie
I-II	♀ n=5 ♂ n=8	Ø 54,3 Jahre (37-74 Jahre)	0,5-4 mm	keine	Ohne Therapie: n=10 Nach Mitteldosis- IFN- $\alpha$ -Therapie: n=3
III	♀ n=4 ♂ n=5	Ø 55,6 Jahre (38-71 Jahre)	0,6-7,8 mm	Lymphknoten	Ohne Therapie: n=6 Nach Hochdosis- IFN- $\alpha$ -Therapie: n=3
IV	♀ n=7 ♂ n=11	Ø 54,8 Jahre (32-83 Jahre)	1,3-35 mm	Lymphknoten, Leber, Lunge, Gehirn, Haut, Knochen	Ohne Therapie: n=9 Nach Chemotherapie: n=7 Nach Immuntherapie: n=2

Die untersuchten Melanompatienten wurden entsprechend der AJCC-Klassifikation 2003 in die Stadien I-IV eingeteilt. Vorkommende Melanomtypen waren das Superfiziell spreitende Melanom (SSM), das Akrolentiginöse Melanom (ALM) und das Noduläre maligne Melanom (NMM). Die Tumordicken reichten von 0,5 bis 35 mm (I-IV). Die Lokalisation der Tumore betraf sowohl Gesicht/Hals, Rücken als auch Ober- und Unterschenkel. Zwei Patienten im Stadium IV hatten ein Melanom mit unbekanntem Primarius. Die Erstdiagnosen des malignen Melanoms erfolgten zwischen 1980 und 2008. Zum Zeitpunkt der hier aufgeführten Untersuchungen erhielt keiner der Patienten eine Immun-, Radio- oder Chemotherapie. Bei allen Patienten betrug der zeitliche Abstand zwischen einer systemischen Therapie und der Treg-Frequenzanalyse mindestens drei Monate.



**Abb. 3.4 Vergleichende Untersuchung von definierten Treg-Populationen im Blut gesunder Spender und im Blut von Melanompatienten in den Stadien I-IV**

PBMC von gesunden Spendern (G) und Melanompatienten im Stadium I-IV wurden im Durchflusszytometer untersucht. Wie in Abbildung 3.1 gezeigt, wurden die Frequenzen der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten bestimmt. Dargestellt sind die relativen Frequenzen in den einzelnen Spendergruppen und die Signifikanz der Unterschiede. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$

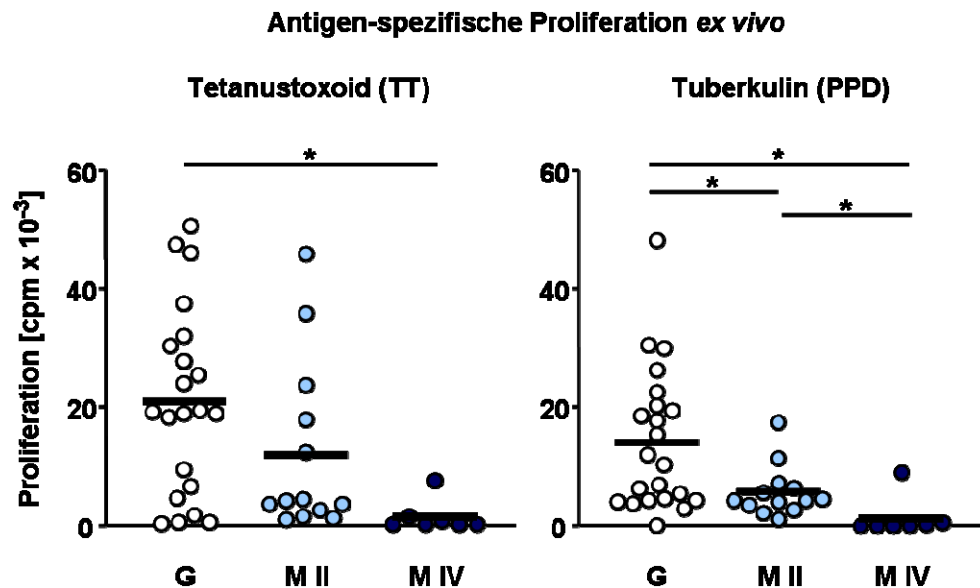
### 3.1.4 Vergleich der Immunkompetenz gesunder Spender mit Stadium-II- bzw. Stadium-IV-Melanompatienten

Obwohl das maligne Melanom bekanntermaßen ein immunogener Tumor ist, der vom Immunsystem als „entartet“ erkannt werden kann [107-109], zeigen viele Immuntherapien bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium keine oder nur sehr geringe Erfolge [34]. Dies wird auf eine systemische Toleranz gegenüber dem Tumor im Stadium-IV-Melanompatienten zurückgeführt [110;111]. Dabei wird angenommen, dass das Melanom nicht nur durch lokal induzierte Toleranzmechanismen, sondern als körpereigenes Gewebe auch durch die Mechanismen der peripheren Toleranz vor der Elimination geschützt wird. Bei DC-basierten Immunisierungsstudien sind Recallantigene<sup>1</sup> wie Tetanustoxoid (TT) und Tuberkulin (PPD) häufig verwendete Kontrollantigene, um die T-Zellaktivität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu überprüfen. Sie sind deshalb als Kontrolle geeignet, da sie als klassische Impfstoffe bei einem breiten Teil der Bevölkerung eine Immunantwort auslösen. In vorangegangenen Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten bei *in vivo* Restimulationen mittels DTH-Reaktion<sup>2</sup> gegen die Recallantigene Tetanustoxoid (TT) und Tuberkulin (PPD) bei Melanompatienten im Stadium IV sehr viel geringere Reaktionen beobachtet werden (Schwellungen < 1 cm) als bei tumorfreien Patienten im Stadium II [34]. Entsprechende *ex vivo* Versuche dieser Arbeit (Abb. 3.5), bei denen PBMC aus gesunden Spendern und Melanompatienten im Stadium II bzw. IV *in vitro* ebenso mit TT und PPD stimuliert wurden, zeigten verglichen mit der Proliferation bei gesunden Spendern (TT und PPD) und im Vergleich zu tumorfreien Melanompatienten im Stadium II (PPD) signifikant verminderte T-Zellantworten bei Patienten im Stadium IV. Bemerkenswerterweise zeigten auch tumorfreie Stadium-II-Patienten gegenüber PPD eine signifikant geringere T-Zellreaktivität als gesunde

<sup>1</sup> Recallantigene sind z.B. Antigene aus Bakterien oder Pilzen, auf die viele Personen mit einer Immunantwort reagieren, da sie, z.B. in Form einer Impfung (z.B. Tetanus- oder Tuberkulose-Schutzimpfung) bereits Kontakt mit diesem Antigen hatten. Bei einer erneuten Stimulation mit dem entsprechenden Recallantigen werden antigenspezifische Gedächtniszellen reaktiviert und lösen eine Immunantwort aus [112;113].

<sup>2</sup> Delayed-type hypersensitivity (DTH) ist ein *in vivo* Hauttest zur Testung einer T-Zell-abhängigen Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen. Geringe Mengen eines spezifischen Antigens werden dabei intradermal injiziert. Fand zuvor bereits eine Sensibilisierung mit dem jeweiligen Antigen statt, kommt es i.d.R. innerhalb von 24-72 h zu einer lokalen Induration, die eine Schwellung, Rötung und Monozyten-Infiltration beinhaltet. In wenigen Fällen kann auch eine systemische Reaktion in Form von Fieber ausgelöst werden [114-116].

Spender. Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellung einer tumorinduzierten systemischen Suppression der T-Zellreaktivität in Melanompatienten, die mit den beschriebenen erhöhten Treg-Frequenzen korreliert und somit eine Rolle der Treg bei diesen Mechanismen vermuten lässt.



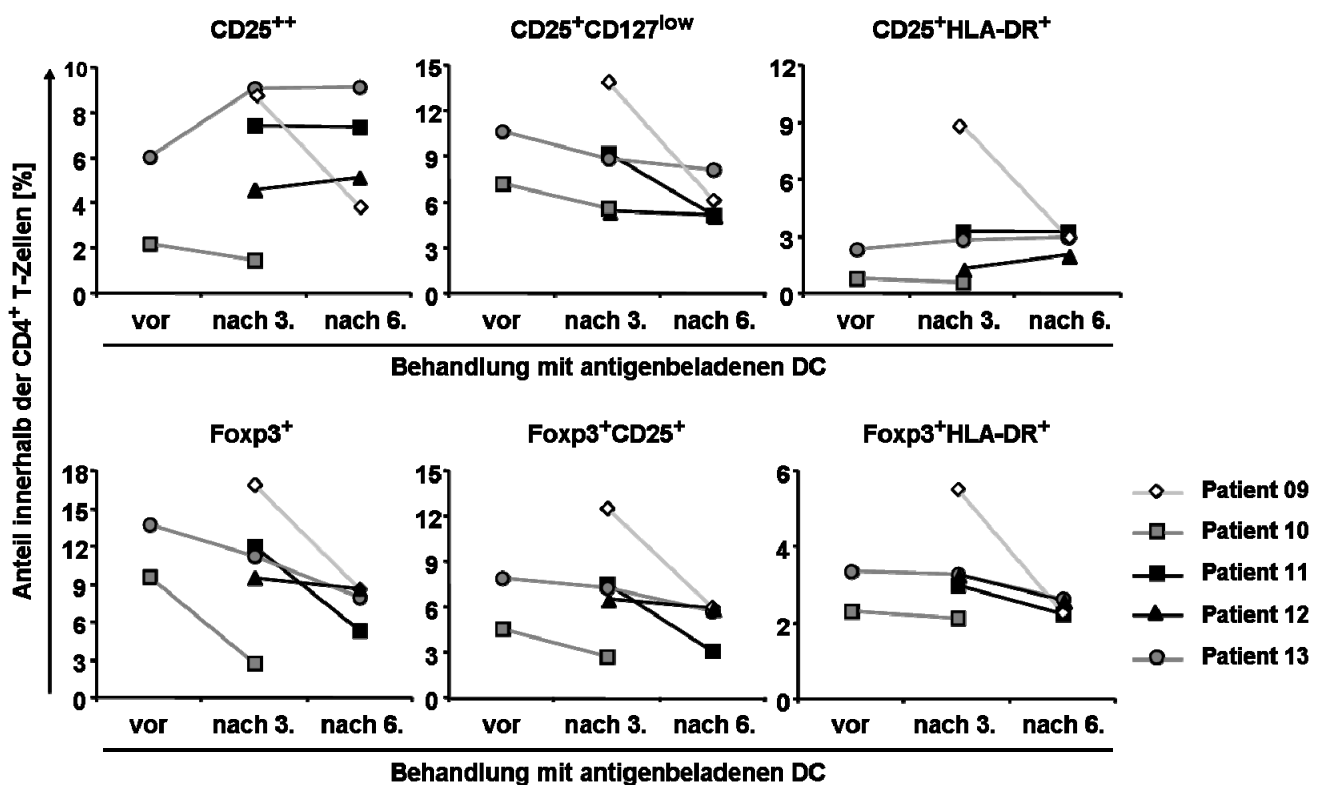
**Abb. 3.5 Stadienabhängigkeit der antigenspezifischen T-Zellantwort bei Melanompatienten**

PBMC gesunder Spender (G n=22) und von Melanompatienten (M II n=13; M IV n=7) wurden mit den Recallantigenen TT und PPD *in vitro* restimuliert. Die antigenspezifische Proliferation wurde mittels <sup>3</sup>HTdR-Inkorporation gemessen. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$

### 3.1.5 Analyse von Treg-Frequenzen bei Melanompatienten im Verlauf einer DC-basierten Immunisierung

Wie in vorangegangenen Studien gezeigt, kann durch eine DC-basierte Immuntherapie bei einigen Patienten mit fortgeschrittenem Melanomstadium IV zumindest vorübergehend eine antigenspezifische T-Zellantwort induziert werden [34;117]. Wir stellten uns daher die Frage, ob diese Vakzinierungen auch einen Einfluss auf die Treg-Häufigkeit haben könnten. Um dies zu untersuchen, wurde im Zuge dieser Arbeit daher die Frequenz regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut der behandelten Patienten bestimmt. Bei den vorangegangenen DC-basierten Immunisierungsstudien unserer Arbeitsgruppe

wurden vor der ersten und nach der dritten bzw. sechsten Behandlung PBMC aus dem Blut der Melanompatienten (Stadium II und IV) gesammelt. Sofern noch verfügbar, wurden PBMC vor und nach der dritten bzw. sechsten Behandlung, wie in Abbildung 3.1 beschrieben, durchflusszytometrisch auf ihre Treg-Frequenz hin untersucht. Tatsächlich konnte hinsichtlich der Markerkombinationen  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ,  $CD4^+Foxp3^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD127^{low}$  und  $CD4^+Foxp3^+HLA-DR^+$  eine Reduktion der Treg-Frequenz im Verlauf der DC-basierten Immuntherapie beobachtet werden. Bezüglich der  $CD4^+CD25^{++}$  und  $CD4^+CD25^+HLA-DR^+$  Treg-Populationen zeigte nur ein Patient eine verminderte Frequenz nach Behandlung (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7 Analyse von Treg-Frequenzen im Blut von Melanompatienten unter dem Einfluss einer DC-basierten Immuntherapie**

PBMC von Melanompatienten im Stadium IV (n=5) wurden durchflusszytometrisch vor der ersten, zwei Wochen nach der dritten und zwei Wochen nach der sechsten Behandlung untersucht. Die Abbildung zeigt die Frequenzen von  $CD4^+CD25^{++}$ ,  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ,  $CD4^+CD25^+HLA-DR^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD127^{low}$  und  $CD4^+Foxp3^+HLA-DR^+$  T-Zellen innerhalb der  $CD4^+$  T-Lymphozyten im Verlauf der Behandlung.

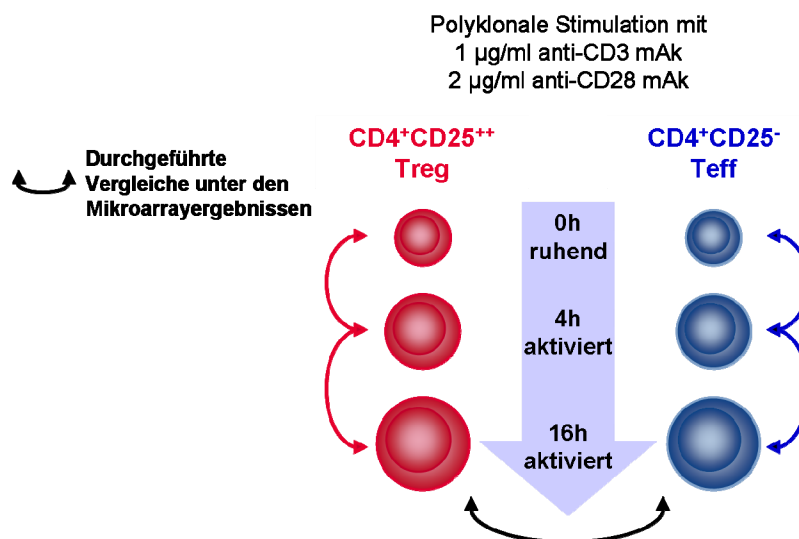


Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Frequenz von Treg-Populationen im peripheren Blut mittels der Markerkombinationen  $CD4^+CD25^{++}$ ,  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ,  $CD4^+CD25^+HLA-DR^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD127^{low}$  und  $CD4^+Foxp3^+HLA-DR^+$  zuverlässig bestimmt und zwischen verschiedenen Kollektiven verglichen werden kann. Die Frequenzbestimmung kann weiterhin in Zusammenhang zu funktionellen Beobachtungen gesetzt werden. So korrelieren erhöhte Treg-Frequenzen im peripheren Blut von Melanompatienten im Stadium IV mit verminderter antigenspezifischer T-Zellreaktivität gegen Recallantigene in solchen Patienten. Ebenso stehen deutliche Verbesserungen der T-Zellreaktivität bei einer DC-basierten Immuntherapie [34] möglicherweise in Zusammenhang mit der beobachteten Reduktion der Treg-Frequenzen bei Melanompatienten im Stadium IV nach Behandlung.

### 3.2 Untersuchungen zur Expression und Funktion des IL-1-Rezeptors 1 auf regulatorischen T-Zellen

Die phänotypische Charakterisierung regulatorischer T-Zellen kann nicht nur zur Bestimmung ihrer Frequenz dienen, sondern darüber hinaus auch Aufschluss über ihren funktionellen Zustand geben. Außerhalb dieser Arbeit wurden dazu in einer Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Biberach/ Riß) die Expression aktivierungsabhängige Moleküle bei Treg und Teff in Mikroarrayanalysen verglichen, um Aktivierungsmarker für humane Treg zu identifizieren.

Für die Durchführung dieser Mikroarrayanalysen durch Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG wurden von uns in vorangegangenen Untersuchungen sowohl  $CD4^+CD25^{++}$  *bona fide* Treg, als auch  $CD4^+CD25^-$  Teff aus PBMC gesunder Spender immunomagnetisch isoliert. Diese Zellpopulationen wurden maximal polyklonal stimuliert (1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 mAk und 2  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD28 mAk) und deren Gesamt-RNA vor Stimulation bzw. nach vier und 16 Stunden in Mikroarrayanalysen untersucht. Im Anschluss wurden die Expressionsmuster zwischen Teff und Treg bzw. zwischen ruhenden und aktivierten Zellen verglichen (Abb. 3.8).

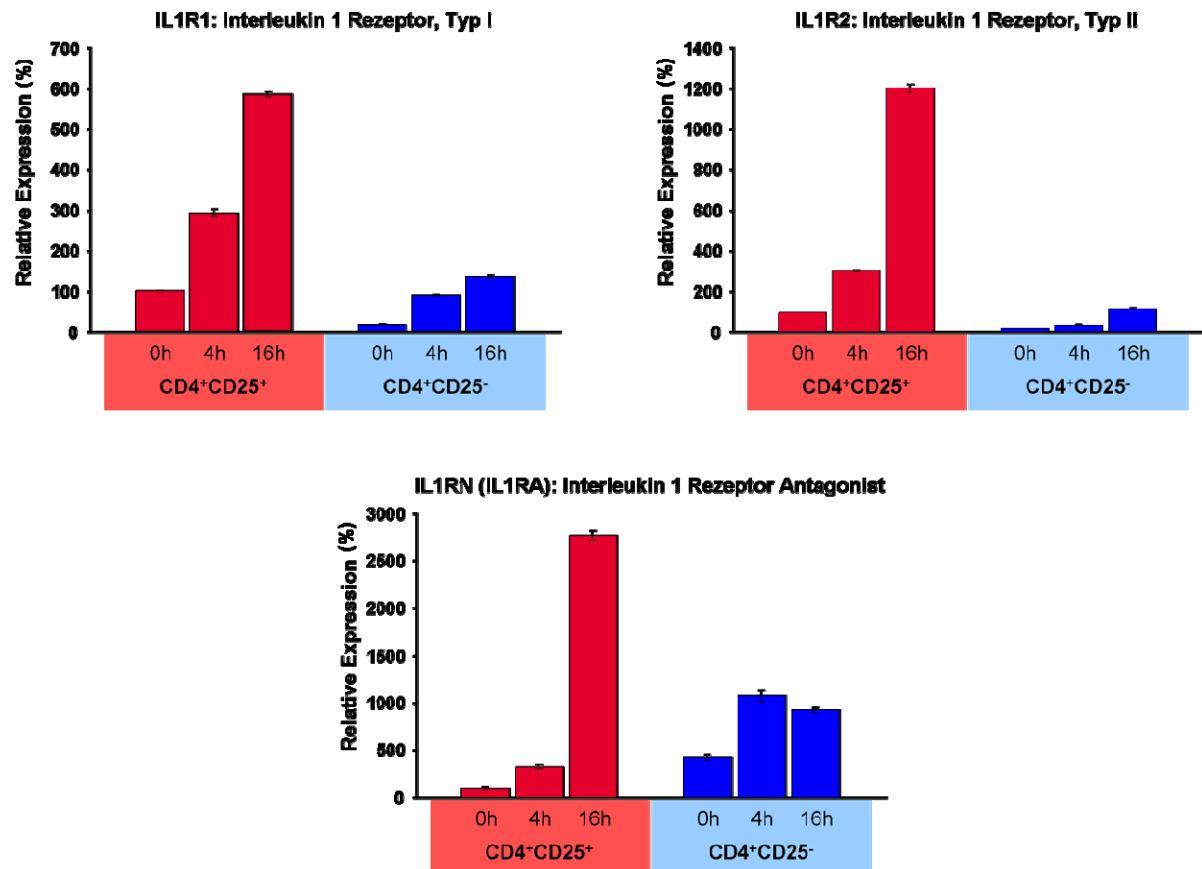


#### Abb. 3.8 Stimulationsschema der in den Mikroarrayanalysen verglichenen T-Zellpopulationen

Aus PBMC von zehn gesunden Spendern wurden  $CD4^+CD25^{++}$  Treg-Zellen und  $CD4^+CD25^-$  Teff-Zellen isoliert. Diese Zellen wurden über einen Zeitraum von 16h polyklonal stimuliert (1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 mAk löslich und 2  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD28 mAk löslich). Aus den frisch isolierten Zellen (0h) bzw. 4h und 16h nach Stimulation wurde RNA gewonnen und in Mikroarrayanalysen die Genexpression untersucht.

### 3.2.1 Genexpression von Mitgliedern der IL-1-Familie auf regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen

Der Vergleich der Genexpression zwischen den verschiedenen T-Zellpopulationen und Aktivierungszuständen ergab eine Vielzahl an differentiell exprimierten Targets [118]. Unter den in ruhenden und aktivierten Treg differentiell exprimiert gefundenen Genen befanden sich auch einige Mitglieder der IL-1-Familie. Dies waren z.B. der IL-1-Rezeptor 1 (IL1R1), der IL-1-Rezeptor 2 (IL1R2) und der IL-1-Rezeptorantagonist (IL1RN). Im Mittel aus zehn unabhängigen Präparationen ergab sich dabei für alle drei Gene eine, im Vergleich zu Teff, deutlich erhöhte Expression in Treg. Zudem wurden alle drei Gene erst nach Stimulation deutlich exprimiert und konnten in diesen vorangegangenen Arbeiten somit als Aktivierungsmarker eingestuft werden. Diese Ergebnisse wurden des Weiteren in einer Kooperation mit Dr. Kazuki Satoh (Daiichi Sankyo Co., Ltd. Tokyo, Japan) mittels Real-Time qPCR anhand von genspezifischen Sonden validiert. Die jeweilige Genexpression in den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> T-Zellen zum Zeitpunkt 0h (unstimuliert) wurde auf 100 % gesetzt und alle Werte wurden anhand der entsprechenden Expressionsintensität des EF-1 $\alpha$ 1 normalisiert. Für alle drei Gene (IL1R1, IL1R2 und IL1RN) zeigte sich nach Stimulation eine erhöhte mRNA-Expression. Dies galt sowohl für Treg, als auch Teff. Besonders für den IL-1-Rezeptor 1 und 2 war die Expressionsintensität im Vergleich zu Teff in Treg sehr viel höher. Für den IL-1-Rezeptorantagonisten zeigte sich ein etwas anderes Bild. Während Teff bei 0h und 4h eine höhere Genexpression für den IL-1-Rezeptorantagonisten zeigten, lag diese beim 16h-Wert bei Treg weit über dem Wert der Teff. Der IL-1-Rezeptor 1, IL-1-Rezeptor 2 und der IL-1-Rezeptorantagonist konnten also als Aktivierungsmarker für Treg und in geringerer Intensität auch für Teff mittels Real-Time qPCR validiert werden. (Abb. 3.9; unveröffentlichte Daten von Dr. Kazuki Satoh [119]).



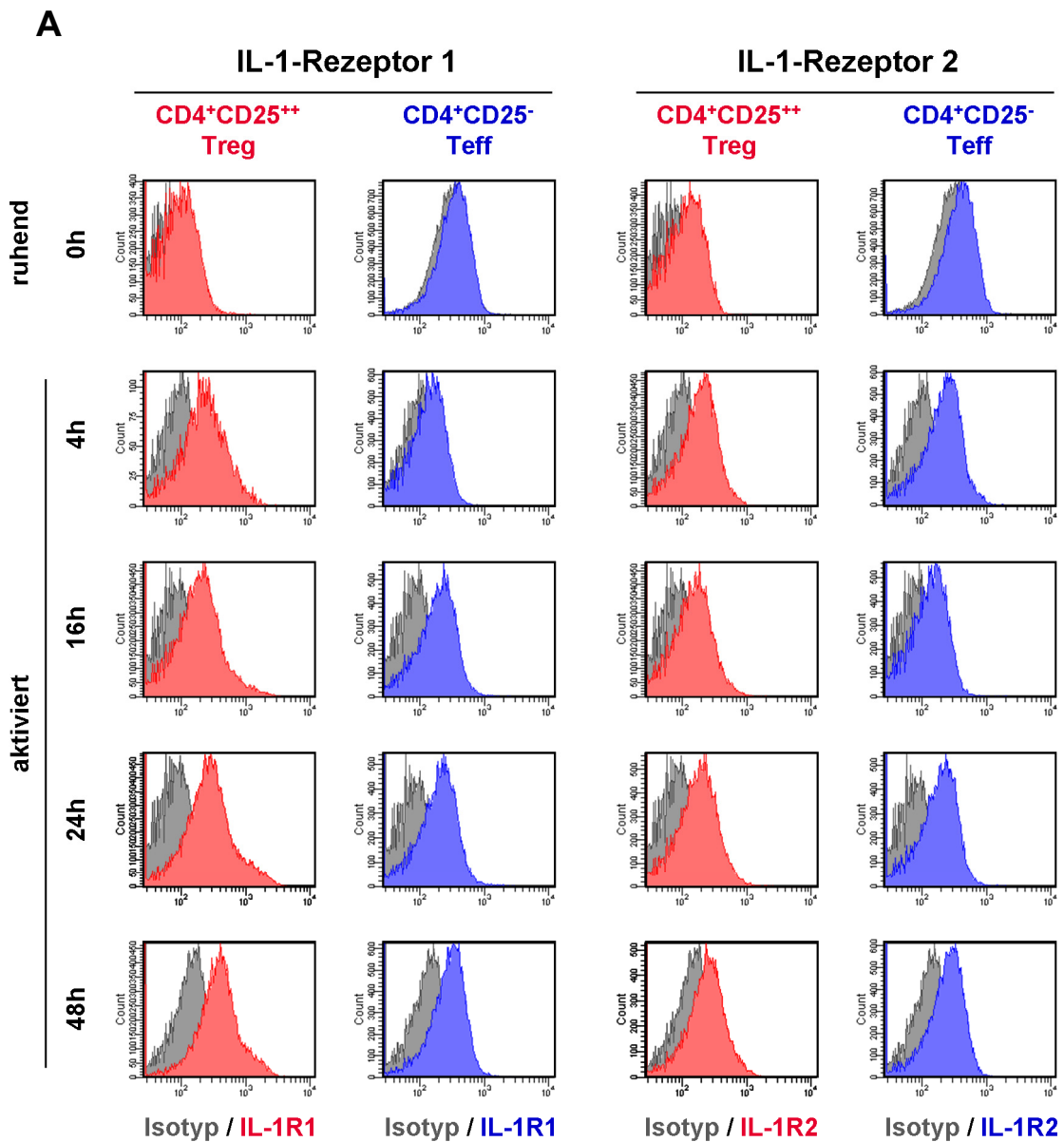
**Abb. 3.9 Evaluation der Mikroarrayergebnisse für den IL-1-Rezeptor 1, IL-1-Rezeptor 2 und den IL-1-Rezeptorantagonisten mit Hilfe von Real-Time qPCR-Analysen<sup>3</sup>**

Mittels Real-Time qPCR wurde die relative Expression der IL-1-Rezeptoren 1, 2 und des IL-1-Rezeptorantagonisten auf mRNA-Ebene validiert. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> T-Zellen einer beispielhaften Präparation (n=2). Alle Werte wurden anhand der entsprechenden Expressionsintensität des EF-1 $\alpha$ 1 normalisiert. Die mRNA-Expression der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> T-Zellen zum Zeitpunkt 0h (unstimuliert) wurde auf 100% gesetzt. Angezeigt ist der Mittelwert aus einem Triplettansatz einschließlich der Standardabweichung.

<sup>3</sup> Die Daten in Abb. 3.9 wurden uns freundlicherweise von Dr. Kazuki Satoh zur Verfügung gestellt [119].

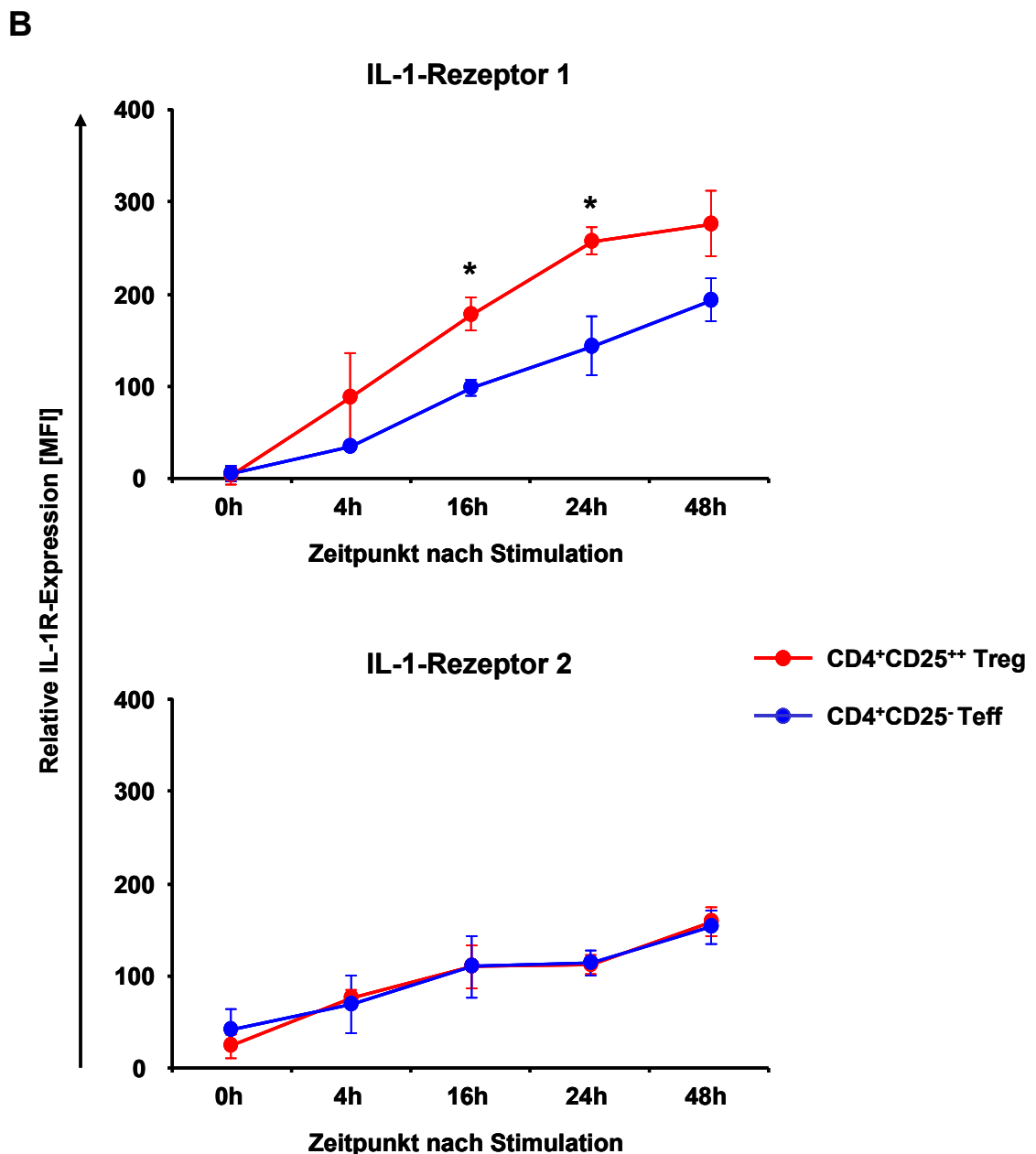
### 3.2.2 Expression der IL-1-Rezeptoren 1 und 2 auf regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen auf Proteinebene

Im nächsten Schritt wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Expression der Oberflächenmoleküle IL-1-Rezeptor 1 (IL-1R1) und IL-1-Rezeptor 2 (IL-1R2) mittels Durchflusszytometrie auf Proteinebene bestimmt.  $CD4^+CD25^{++}$  Treg und  $CD4^+CD25^-$  Teff wurden entsprechend der Mikroarray- und Real-Time qPCR-Analysen isoliert und polyklonal stimuliert. Abbildung 3.10 A) zeigt beispielhaft für eine Präparation die Expression des IL-1R1 (links) und des IL-1R2 (rechts) für Treg (rot) und Teff (blau) im Verlauf der Aktivierung (0h, 4h, 16h, 24h, 48h). Als Referenz für die Expressionshöhe diente die jeweilige Isotyp-Färbung (grau). Da die Moleküldichte von Zytokinrezeptoren auf Zelloberflächen generell gering ist, konnte keine deutlich abgesetzte positive Population dargestellt werden. Vielmehr erkennt man die Expressionsintensität solcher Rezeptoren anhand einer Verschiebung der Gesamtpopulation in der Höhe ihres Fluoreszenzsignals. Darum wurde in Abbildung 3.10 B) die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der untersuchten Populationen abzüglich der MFI des zugehörigen Isotyps als Maß für die Rezeptorexpression angegeben. Gezeigt ist die relative Expressionshöhe der IL-1-Rezeptoren als Mittelwert aus drei unabhängigen Präparationen. Auf Proteinebene stellte sich ein etwas anderes Bild dar, als das auf mRNA-Ebene der Fall war: Zwar wurde auch hier sowohl der IL-1R1 als auch der IL-1R2 erst nach Aktivierung deutlich exprimiert, was diese als Aktivierungsmarker für Treg und Teff bestätigte, allerdings war eine differentielle Expression zwischen Treg und Teff nur für den IL-1R1 sichtbar. Der Expressionsverlauf des IL-1R2 auf Proteinebene zeigte hingegen im untersuchten Zeitraum keinen Unterschied zwischen Treg und Teff.



**Abb. 3.10 Proteinexpression der IL-1-Rezeptoren 1 und 2 auf Treg und Teff nach Aktivierung**

Aus PBMC gesunder Spender wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff isoliert. Im Verlauf einer polyklonalen Aktivierung (1 µg/ml anti-CD3 mAk und 2 µg/ml anti-CD28 mAk) wurden die Expression des IL-1-Rezeptors 1 und 2 auf den T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert (0h, 4h, 16h, 24h und 48h). A) zeigt die Expression des IL-1-Rezeptors 1 und des IL-1-Rezeptors 2 (Treg: rot; Teff: blau) bzw. der entsprechenden Isotypen (grau) einer beispielhaften Untersuchung aus drei unabhängigen Versuchen.



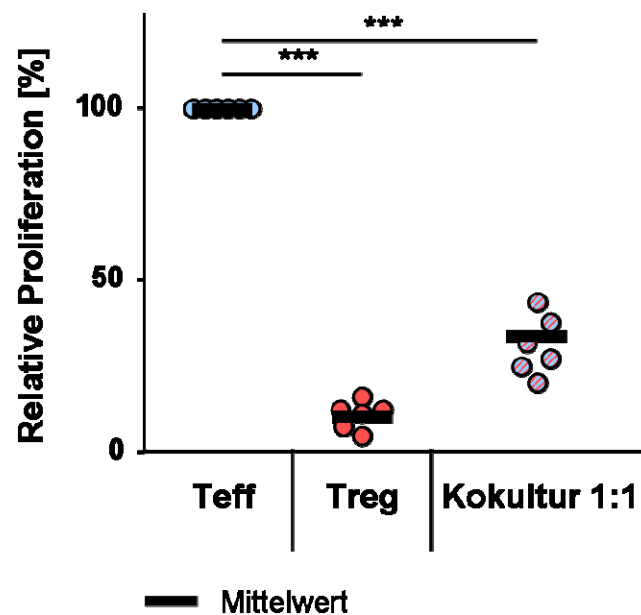
**Abb. 3.10 Proteinexpression der IL-1-Rezeptoren 1 und 2 auf Treg und Teff nach Aktivierung**

Aus PBMC gesunder Spender wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff isoliert. Im Verlauf einer polyklonalen Aktivierung (1 µg/ml anti-CD3 mAk und 2 µg/ml anti-CD28 mAk) wurden die Expression des IL-1-Rezeptors 1 und 2 auf den T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert (0h, 4h, 16h, 24h und 48h). In B) ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für die Expression des IL-1R1 bzw. des IL-1R2 abzüglich der MFI des jeweils entsprechenden Isotypen für Treg und Teff dargestellt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 3 unabhängigen Ansätzen inklusive Standardabweichung (SD). \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$

### **3.2.3 Wirkung von exogenem IL-1 auf regulatorische T-Zellen und Effektor-T-Zellen**

Da sich auf Proteinebene der IL-1R1 als differentieller Aktivierungsmarker für Treg darstellte und dieser auch der Rezeptor für die IL-1-induzierte Signaltransduktion ist, interessierte uns im Folgenden der Einfluss des proinflammatorischen Zytokins IL-1 auf die Suppressorfunktion der Treg. Als Testsystem wählten wir einen Proliferationsassay, in dem die Proliferation von Teff, Treg und deren Kokultur in An- und Abwesenheit von IL-1 $\beta$  beobachtet werden sollte. In einem „klassischen“ Proliferationsassay zeigen Teff nach einer polyklonalen Stimulation eine starke Proliferation, die von der endogenen Bildung von IL-2 abhängig ist. Treg hingegen zeigen nach Aktivierung keine IL-2-Produktion und entsprechend auch keine Proliferation (=Anergie). In Kokultur mit Treg wird die Proliferation der Teff unterdrückt (=Suppression), indem unter anderem die IL-2-Produktion supprimiert wird. Exogen hinzugefügtes IL-2 kann sowohl die Anergie der Treg, als auch die Suppression der Teff in der Kokultur brechen [79]. Darum wurde in den folgenden Tests IL-2 als Referenz-Zytokin zu IL-1 $\beta$  verwendet. Um die Wirkung der verwendeten Zytokine deutlich sichtbar machen zu können, wählten wir als Stimulus eine polyklonale Aktivierung mit reduziertem Kostimulus (Methoden 2.2.1.9). Der in Abbildung 3.11 gezeigte Suppressionsassay mit reduziertem Kostimulus zeigte in sechs unabhängigen Versuchen die eben beschriebenen Charakteristika der T-Zell-Einzel- und Kokulturen und war als Testsystem somit geeignet.

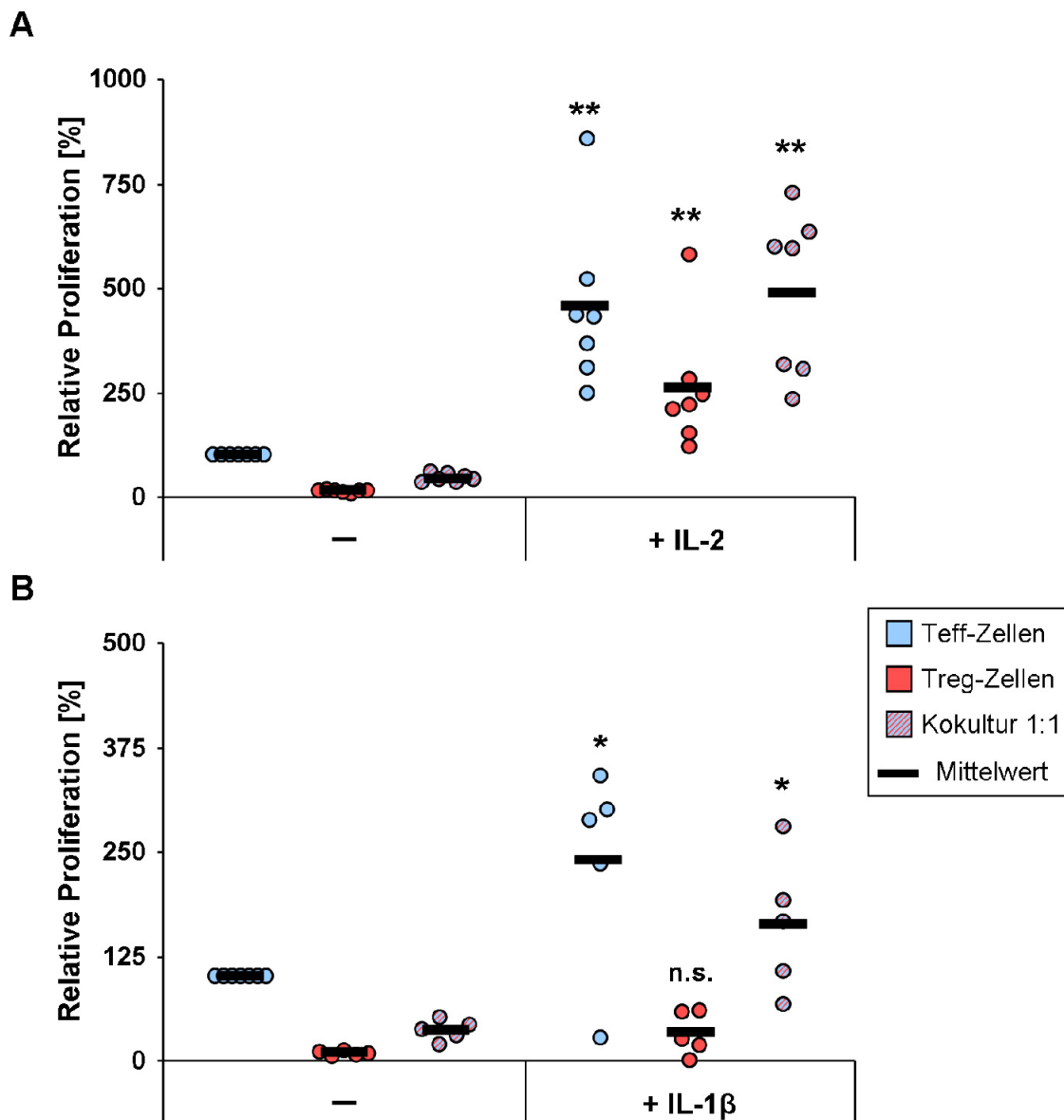




**Abb. 3.11 Proliferation von T-Zellen im Suppressionstest mit reduziertem Kostimulus**

Teff und Treg aus sechs gesunden Spendern wurden in einem etablierten Proliferationsstest mit reduziertem Kostimulus (siehe Methoden 2.2.1.9) eingesetzt. Die Proliferation wurde mittels  $^3\text{H-TdR}$ -Inkorporation gemessen und im Vergleich zur Proliferation der Teff (= 100 %) dargestellt.

Durch die exogene Zugabe von 2000 IU/ml IL-2 konnte in diesem Testsystem sowohl der anerge Status der Treg, als auch die Treg-vermittelte Suppression überkommen werden. Dieser „IL-2-Effekt“ ist in 3.12 A) dargestellt. In Abbildung 3.12 B) ist der gleiche Assay dargestellt, hier wurde nun der Effekt der exogenen Zugabe von IL-1 $\beta$  auf die T-Zellproliferation überprüft. Auch IL-1 $\beta$  zeigte, wenn auch schwächer als IL-2, eine proliferationsfördernde Wirkung auf die Teff. Des Weiteren konnte auch in der Kokultur aus Teff und Treg in Anwesenheit von exogenem IL-1 $\beta$  eine signifikante Proliferationssteigerung verzeichnet werden. Erstaunlicherweise behielt jedoch die Treg-Einzelkultur nach Zugabe von IL-1 $\beta$  ihren anergen Phänotyp bei und zeigte keinen signifikanten Zuwachs in der Proliferation. Im Unterschied zu IL-2, brach IL-1 $\beta$  also die Suppression in der Teff-Treg-Kokultur, jedoch ohne den anergen Zustand der Treg-Einzelkultur aufzuheben. Diese Beobachtung warf die Frage auf, was für einen funktionellen Effekt IL-1 $\beta$  auf die Treg in der Einzel- bzw. Kokultur hat.

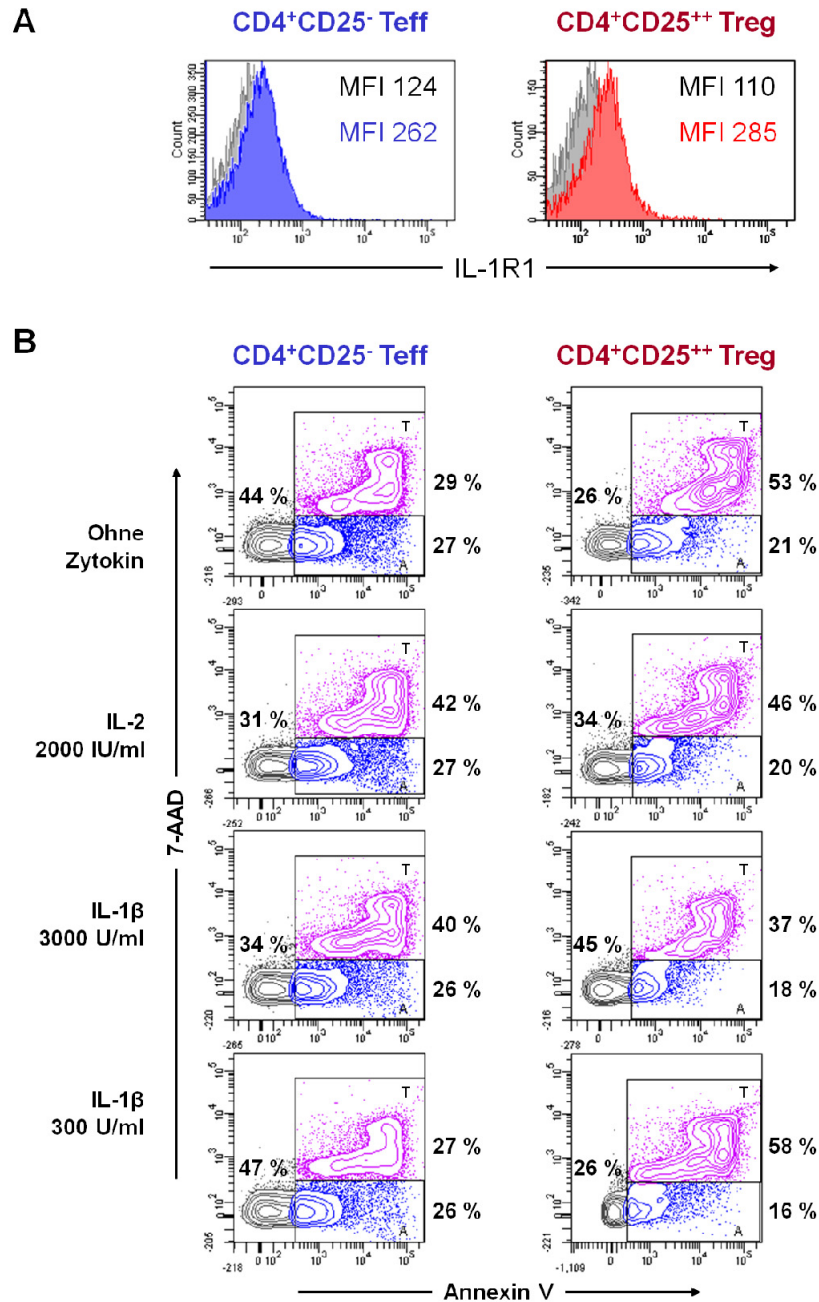


**Abb. 3.12 Einfluss von exogenem IL-2 bzw. IL-1β auf die Proliferation von Teff und Treg**

Gezeigt ist die Proliferation der Teff und Treg in Einzel- und Kokultur in An- bzw. Abwesenheit von 2000 IU/ml IL-2 (A) bzw. 3000 U/ml IL-1β (B). Der Proliferationstest wurde mit reduziertem Kostimulus durchgeführt. Gezeigt sind die Ergebnisse von sieben (A) bzw. fünf (B) unabhängigen Präparationen und die Signifikanz der Unterschiede. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , nicht signifikant (n.s.)

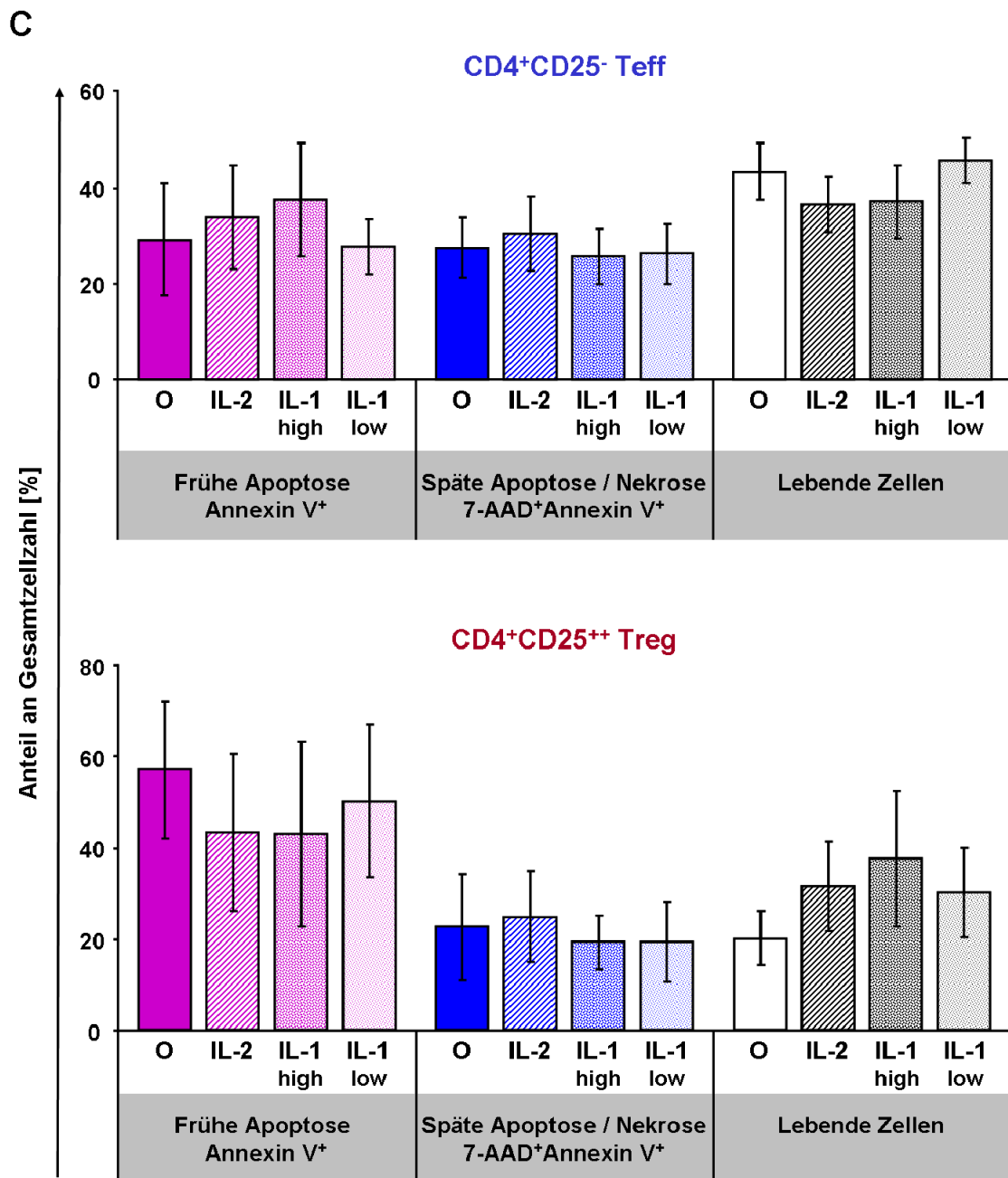
### 3.2.4 Überprüfung des Einflusses von IL-1 auf das Überleben regulatorischer T-Zellen

Obwohl IL-1 als „Überlebensfaktor“ bekannt ist [120;121], wollten wir im folgenden Schritt ausschließen, dass die verminderte Suppression in der Treg-Teff-Kokultur in Anwesenheit von IL-1 durch eine erhöhte Sterberate in der Treg-Population bedingt war. Dafür wurden  $CD4^+CD25^{++}$  Treg und  $CD4^+CD25^-$  Teff aus PBMC sechs gesunder Spender isoliert und für 24 Stunden polyklonal stimuliert, so dass der IL-1-Rezeptor 1 auf den Zellen exprimiert wurde (Abb. 3.13 A). Daraufhin wurde den Treg bzw. Teff entweder eine hohe Dosis (3000 U/ml) oder eine geringe Dosis IL-1 $\beta$  (300 U/ml) zugegeben und nach vier Stunden der Anteil früh apoptotischer (Annexin V<sup>+</sup>) bzw. toter/spät apoptotischer Zellen (7-AAD<sup>+</sup>Annexin V<sup>+</sup>) bestimmt. Als Kontrollpopulationen dienten die gleichen Zellpopulationen ohne Zytokinzugabe bzw. mit Zugabe von 2000 IU/ml IL-2. Abbildung 3.13 B) zeigt beispielhaft für einen Spender die durchflusszytometrische Analyse der Sterberate in Teff und Treg mit und ohne Zytokinzugabe. In Abbildung 3.13 C) ist der Anteil an früh apoptotischen, toten bzw. lebenden Zellen als Mittelwert aus allen sechs untersuchten Präparationen zusammengefasst. Zwischen den drei verschiedenen behandelten Ansätzen ergaben sich weder bei Teff, noch bei Treg signifikante Unterschiede. Tendenziell ließ sich aber ablesen, dass sowohl IL-2, als auch IL-1 $\beta$  das Überleben der Treg eher förderte, IL-1 $\beta$  also nicht Apoptose-induzierend wirkt. Das Ergebnis zeigt somit, dass das Aufheben der Suppression in der Kokultur aus Treg und Teff in Anwesenheit von IL-1 $\beta$  nicht auf ein vermehrtes Sterben der Treg zurückzuführen ist.



**Abb. 3.13 Analyse des aktivierungsbedingten Zelltodes bei Treg und Teff in Anwesenheit von IL-2 bzw. IL-1β**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> Treg wurden nach magnetischer Isolation für 4h polyklonal aktiviert (0,5 µg/ml anti-CD3 mAk, plattegebunden), um die Expression des IL-1-Rezeptors 1 zu gewährleisten. Diese Expression ist in Abbildung 3.13 A) für einen Spender beispielhaft gezeigt. Im Anschluss wurden die Zellen in Anwesenheit einer hohen Dosis (3000 U/ml) und einer niedrigen Dosis (300 U/ml) IL-1β kultiviert. Als Kontrolle dienten Zellen, die in Anwesenheit von 2000 IU/ml IL-2 bzw. ohne exogene Zytokingabe kultiviert wurden. Nach vier Stunden Kultur wurden die Zellen hinsichtlich der Induktion von Apoptose durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden Annexin V<sup>+</sup> Zellen als früh apoptotisch (A) und Annexin V<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup> als spät apoptotisch bzw. tot (T) definiert. In Abbildung 3.13 B) ist die durchflusszytometrische Analyse eines beispielhaften Spenders dargestellt.



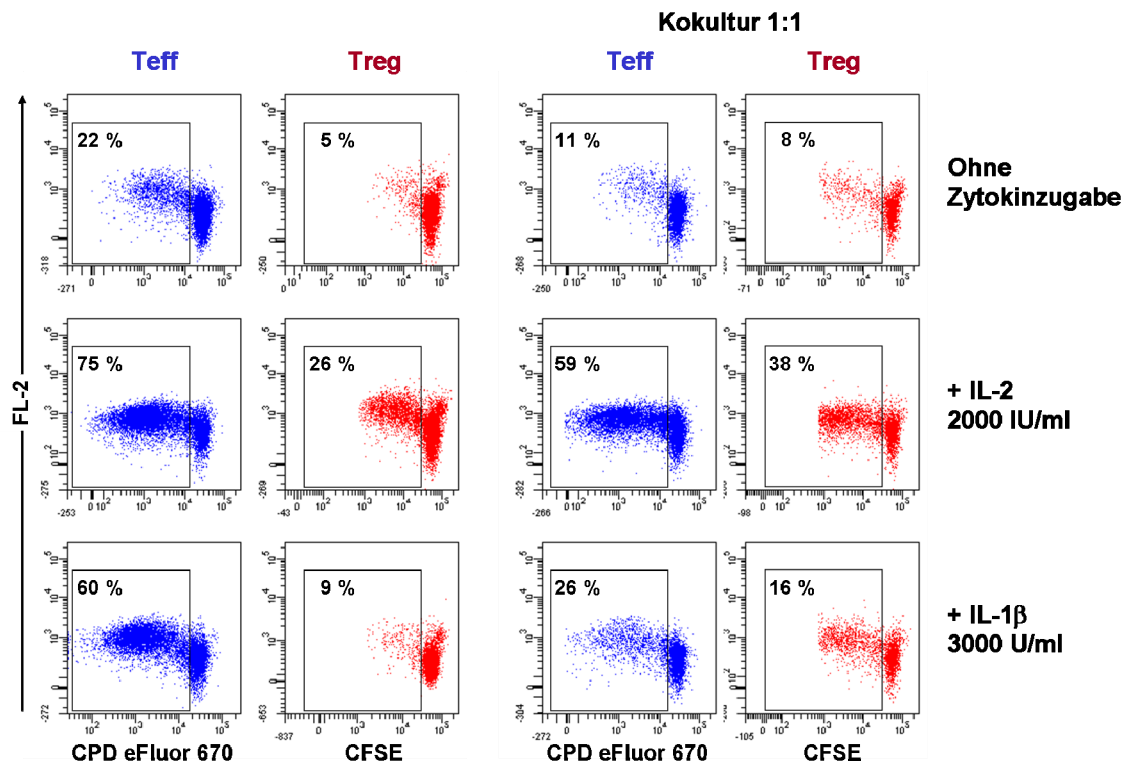
**Abb. 3.13 Untersuchung zum aktivierungsbedingten Zelltodes bei regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 bzw. IL-1 $\beta$**

Diese Abbildung fasst das in Abbildung 3.13 A) und B) beispielhaft beschriebene Experiment zusammen. Hier ist der Mittelwert aus sechs unabhängigen Präparationen mit Standardabweichung dargestellt. Gezeigt ist der prozentuale Anteil an früh apoptotischen Zellen (pink), spät apoptotischen/toten Zellen (blau) bzw. lebenden Zellen (weiß) für Teff (oben) und Treg (unten). Verglichen werden dabei jeweils folgende Zellpopulationen: Teff bzw. Treg ohne Zytokinzugabe (O); mit Zugabe von 2000 IU/ml IL-2 (IL-2); mit Zugabe von 3000 U/ml IL-1 $\beta$  (IL-1 high); mit Zugabe von 300 U/ml IL-1 $\beta$  (IL-1 low).

### 3.2.5 Proliferation der regulatorischer T-Zellen in Kokultur mit Effektor-T-Zellen und in Anwesenheit von IL-1

Die Suppression, die in einer Kokultur aus Treg und Teff im  $^3\text{H-TdR}$ -Assay zu beobachten war, wurde in unseren Untersuchungen in Anwesenheit von IL-1 aufgehoben. Nachdem wir zeigen konnten, dass dieser Effekt nicht durch eine verminderte Viabilität der Treg bedingt war, wollten wir im nächsten Schritt untersuchen, ob die Proliferation in der „Kokultur + IL-1 $\beta$ “ ausschließlich von den Teff herrührt oder ob unter diesen Bedingungen auch die Treg zur Proliferation angeregt werden. Dafür untersuchten wir die Zellteilung mittels Durchflusszytometrie, anstelle von  $^3\text{H-TdR}$ -Inkorporation. Wir färbten die Treg und Teff mit zwei verschiedenen Proliferationsfarbstoffen, die Teff mit „Cell Proliferation Dye eFluor® 670“ (CPD eFluor 670) und die Treg mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE). Durch die Farbunterscheidung war es möglich die Proliferation beider T-Zellpopulation innerhalb der Kokultur im Durchflusszytometer getrennt voneinander zu beobachten. Teff und Treg wurden einzeln und in einer Kokultur im Verhältnis 1:1 ohne Zytokinzugabe bzw. in Anwesenheit von 2000 IU/ml IL-2 oder 3000 U/ml IL-1 $\beta$  in Kultur genommen und polyklonal stimuliert. Die Proliferation wurde täglich durchflusszytometrisch untersucht. Die höchste Proliferation war an Tag fünf zu beobachten. Diese ist für die verschiedenen Bedingungen in Abb. 14 beispielhaft für eine von drei Präparationen dargestellt. Die Teff (blau) zeigten ohne Zytokinzugabe einen Anteil von 22 % proliferierender Zellen, der durch die Zugabe von IL-2 auf 75 % gesteigert wurde. Auch die Zugabe von IL-1 $\beta$  erbrachte eine deutliche (60 %), wenn auch geringere Proliferationssteigerung als IL-2. Bei den Treg (rot) fand sowohl ohne als auch mit IL-1 $\beta$  kaum Proliferation statt (=Anergie) und nur die Anwesenheit von IL-2 brach diesen anergen Zustand deutlich. Dies entsprach den Beobachtungen, die wir im  $^3\text{H-TdR}$ -Assay gemacht hatten. Die Kokultur zeigte ebenfalls ein, dem  $^3\text{H-TdR}$ -Assay entsprechendes Proliferationsverhalten: Die Teff wurden ohne Zytokinzugabe in der Kokultur durch die Anwesenheit der Treg in ihrer Proliferation supprimiert, wobei die Treg kaum Eigenproliferation zeigten. Die Zugabe von IL-2 führte zur deutlichen Proliferation beider T-Zellpopulationen (=Brechen der Suppression). Auch in Anwesenheit von IL-1 $\beta$  schienen beide

T-Zellpopulationen zur Proliferation angeregt zu werden, wenn auch die Treg in geringerem Maße als die Teff-Population.



**Abb. 3.14 Proliferation der Teff und Treg in ihrer Einzel- und Kokultur in Anwesenheit von exogenem IL-1β bzw. IL-2**

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Untersuchung eines Proliferationstests, wobei die Proliferation für die  $CD4^+CD25^-$  Teff mittels „Cell Proliferation Dye eFluor® 670“ und für die  $CD4^+CD25^{++}$  Treg mittels CFSE dargestellt ist. Die Abbildung zeigt die Proliferation der Teff (blau) und Treg (rot) in der Einzel- bzw. ihrer Kokultur unter drei Bedingungen: ohne Zytokinzugabe (oben), in Anwesenheit von 2000 IU/ml IL-2 (mittig) bzw. von 3000 U/ml IL-1β (unten). Gezeigt wird die Proliferation einer beispielhaften Präparation (n=3).

Diese Versuche zeigten also, dass in der Kokultur auch ein Teil der Treg in Anwesenheit von IL-1 zur Proliferation gebracht wird. Da dies jedoch nur im Beisein der Teff beobachtet werden konnte, resultierte für uns daraus die Möglichkeit, dass die Treg-Proliferation durch eine indirekte Wirkung von IL-1, nämlich mittels einer Wirkung auf die Teff, ausgelöst werden könnte. Um die

direkte Wirkung von IL-1 auf die Proliferation der beiden T-Zellpopulationen, Treg und Teff, genauer differenzieren zu können, machten wir uns im Folgenden ein murines Modell zu Nutzen.

### **3.2.6 Differenzierung der Wirkung von IL-1 auf regulatorische T-Zellen und Effektor-T-Zellen mittels IL-1-Rezeptor 1-defizienten Mäusen**

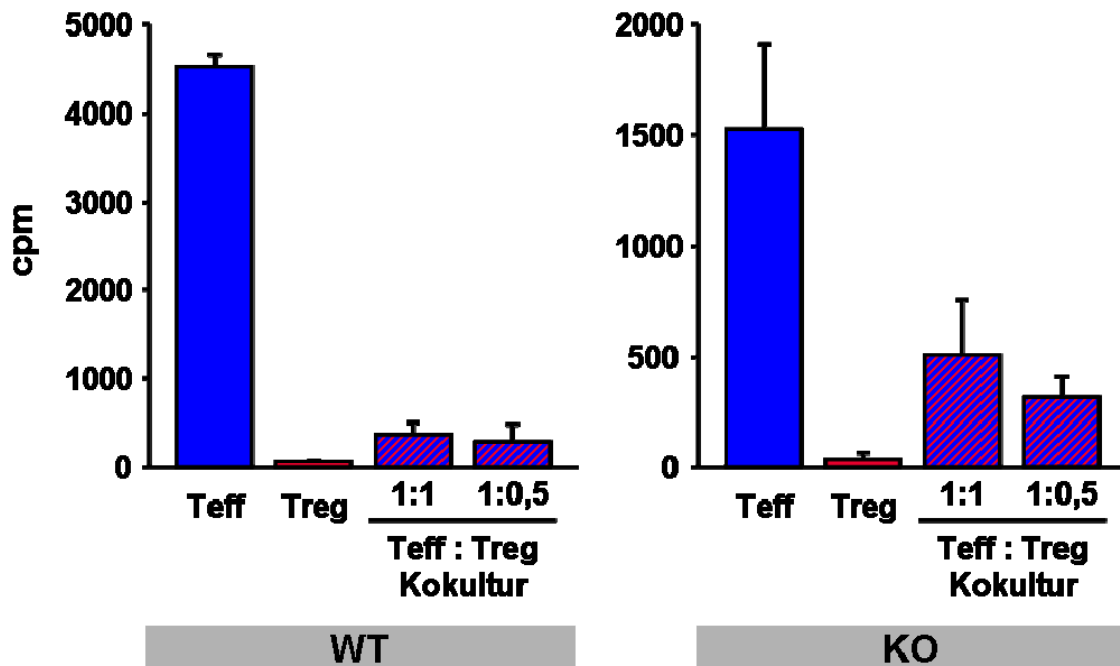
Da uns im humanen System die eindeutige Differenzierung der Wirkung von IL-1 $\beta$  auf Treg bzw. Teff in deren Kokultur nicht möglich war, versuchten wir im Folgenden die Fragestellung in einem murinen Modell näher zu beantworten. Dafür verwendeten wir einen IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mausstamm<sup>4</sup> auf C57BL/6-Hintergrund. Dieser Stamm zeigt durch eine gezielte Mutation im IL-1R1 keine Reaktivität auf IL-1. Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Tobias Bopp durchgeführt. Hierbei wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> Treg immunomagnetisch bzw. im Fall der Treg zusätzlich mittels durchflusszytometrischer Sortierung angereichert. Entsprechend der Analysen im humanen System, führten wir einen <sup>3</sup>H-TdR-Proliferationsassay durch. Der Stimulus wurde so gewählt, dass die beobachtete Proliferation und der Einfluss des IL-1 $\beta$  nur auf die zu betrachtenden Treg und Teff beschränkt blieb: Neben löslichem anti-CD3 mAk wurden als APC T-Zell-depletierte bestrahlte Milzzellen aus IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen verwendet. Diese konnten somit aufgrund ihres Defekts keine IL-1-abhängige Hintergrundproliferation zeigen.

Wie in Abbildung 3.15 zu sehen ist, zeigte sich, vergleichbar mit den Zellen aus Wildtypmäusen, auch bei den IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen ein typisches Bild eines Suppressionsassays: Die Teff zeigten im Vergleich zu den Treg eine starke Proliferation, welche in der Kokultur mit Treg supprimiert wurde (Abb. 3.15). Somit konnte der Suppressionsassay auch im Fall der IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäuse als adäquates System verwendet werden. Durch die Mutation im IL-1R1 besteht keine Beeinträchtigung des charakteristischen Proliferationsverhaltens der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> Treg-Populationen.

---

<sup>4</sup> Der IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mausstamm wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Esther von Stebut-Borschitz zur Verfügung gestellt.



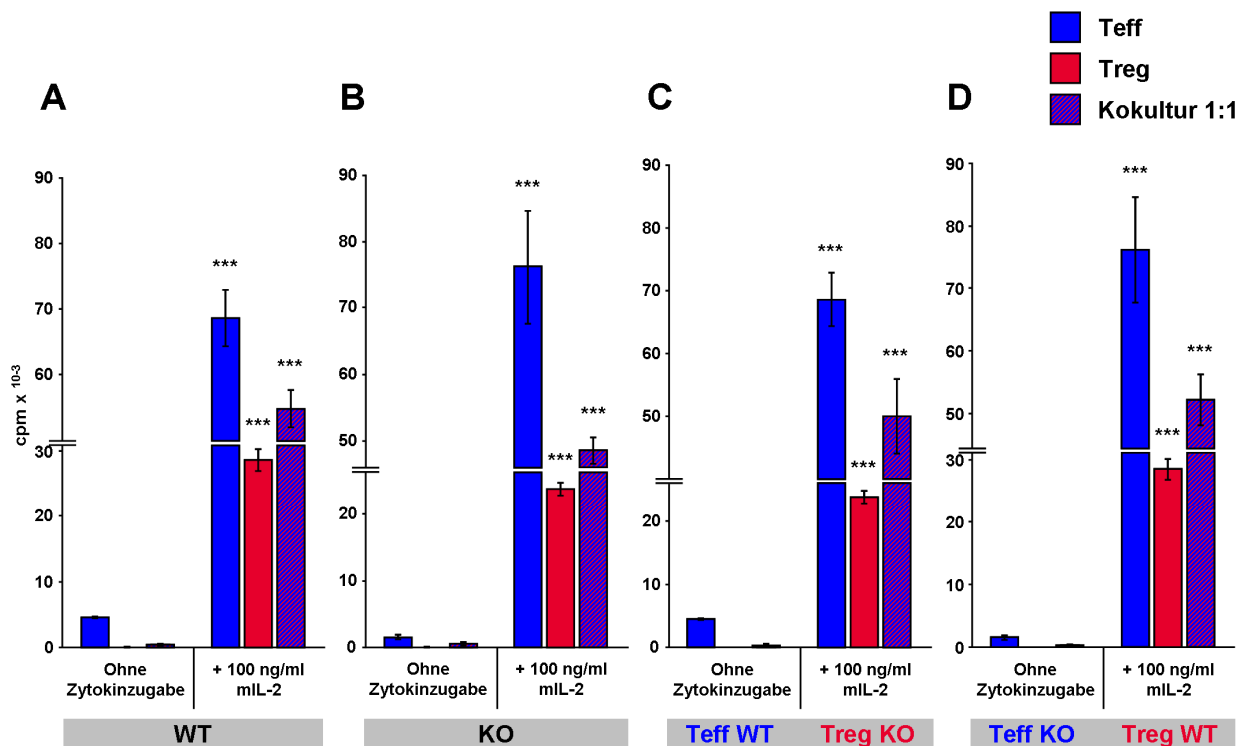


**Abb. 3.15 Suppressionsassay mit murinen T-Zellen aus C57BL/6 Wildtyp- und IL 1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Isolierte Teff und Treg aus C57BL/6-Wildtypmäusen (WT, links) oder IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen (KO, rechts) wurden in Einzel- und Kokultur in einen Suppressionstest eingesetzt und polyklonal stimuliert (anti-CD3 mAk löslich + T-Zell-depletierte, bestrahlte Milzzellen aus IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen). Gezeigt ist der Mittelwert aus Triplettansätzen eines Experiments einschließlich der Standardabweichung. Die Proliferation wurde mittels <sup>3</sup>H-TdR-Inkorporation gemessen.

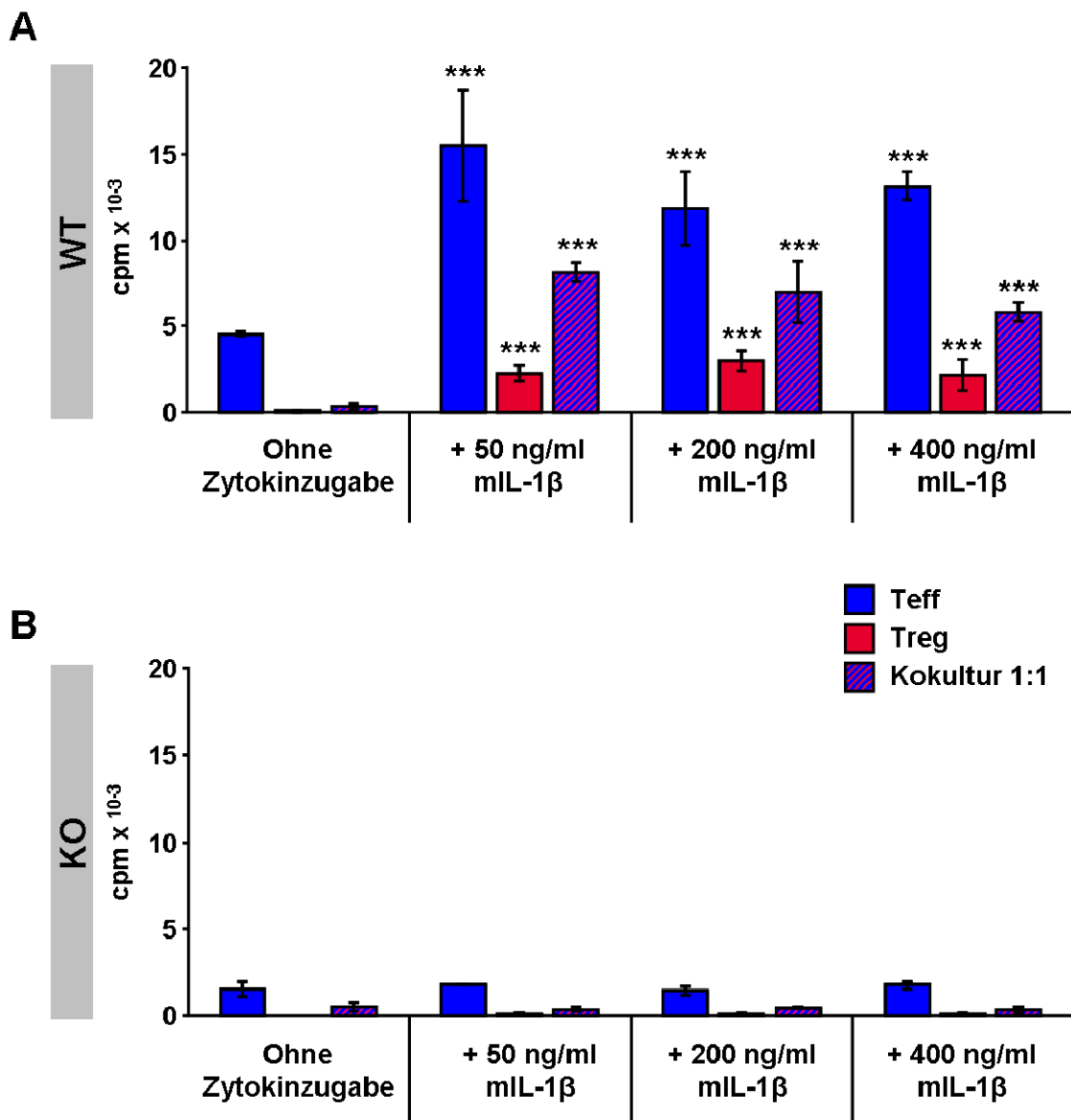
Um nun die Wirkung von IL-1 $\beta$  auf Treg und Teff in der Kokultur differenzieren zu können, verglichen wir vier verschiedene Ansätze. Wie im humanen System diente dabei wiederum jeweils eine Kultur mit Zugabe von IL-2 als Positivkontrolle:

Zum einen setzten wir Assays an, in denen die Teff und Treg nur aus C57BL/6-Wildtypmäusen (WT) (Abb. 3.16 A und 3.17 A) oder aus IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen (KO) (Abb. 3.16 B und 3.17 B) stammten. Zum anderen wählten wir „Überkreuzansätze“, bei denen entweder die Teff aus den Wildtypmäusen und die Treg aus den IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen stammten (Abb. 3.16 C und 3.17 C) oder umgekehrt (Abb. 3.16 D und 3.17 D). In Abbildung 3.16 A)-D) ist zu sehen, dass in allen vier Ansätzen die Zugabe von IL-2 sowohl die Proliferation der Teff als auch der Treg und der Kokultur signifikant steigerte und somit als Positivkontrolle zu verwenden war.



**Abb. 3.16 Proliferation der Teff und Treg aus Wildtyp- bzw. IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen in ihrer Einzel- und Kokultur in Anwesenheit von exogenem IL-2**  
 Isolierte Teff und Treg aus C57BL/6-Wildtypmäusen (WT) bzw. IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen (KO) wurden in Einzel- und Kokultur in einen Suppressionstest eingesetzt und polyklonal stimuliert (anti-CD3 mAk löslich + T-Zell-depletierte, bestrahlte Milzzellen aus IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen). Als Positivkontrolle wurde der Effekt von exogenem IL-2 auf die Proliferation der Einzel- und Kokulturen untersucht. Gezeigt ist der Mittelwert aus Triplettsansätzen eines Experiments inklusive Standardabweichung. Die Proliferation wurde mittels <sup>3</sup>H-TdR-Inkorporation gemessen. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$

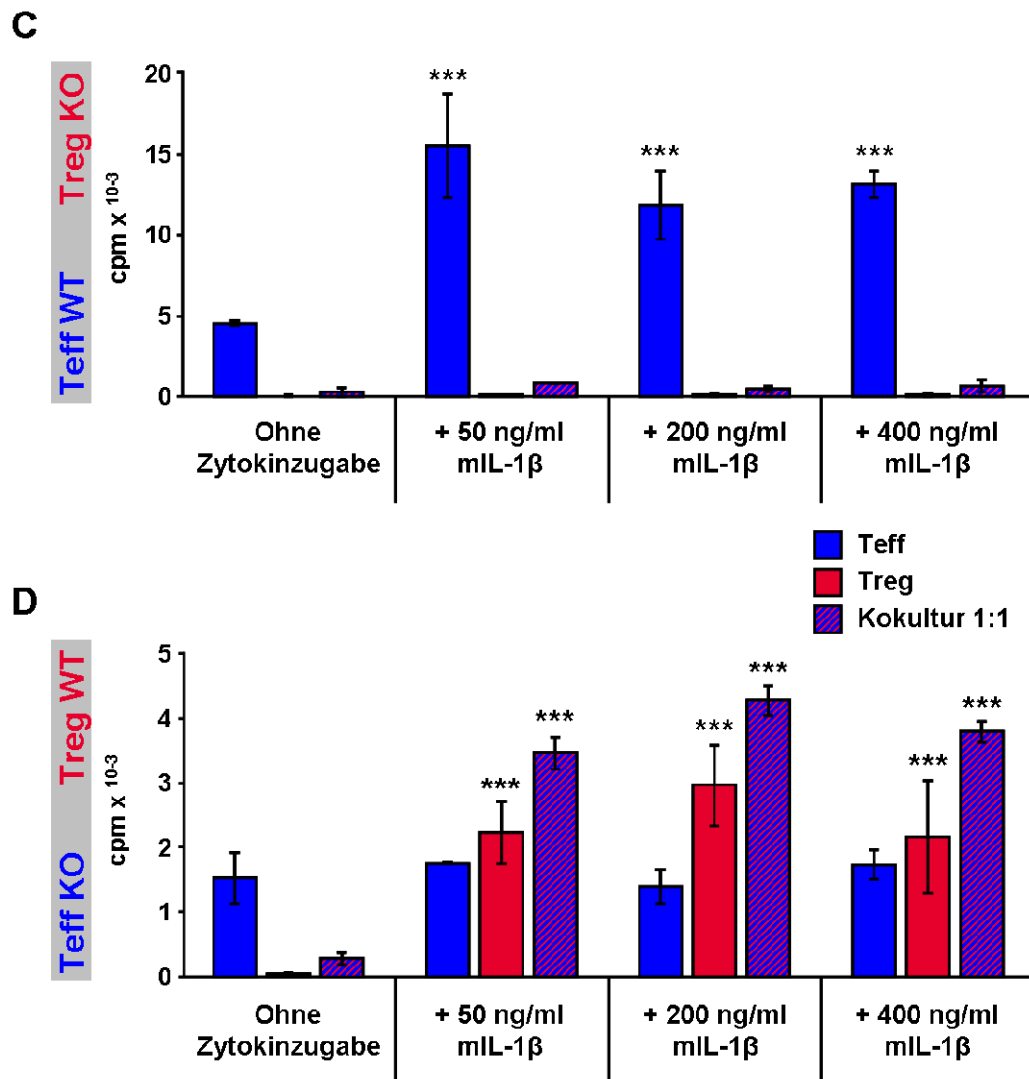
Die Zugabe von IL-1 $\beta$  zeigte bei den Wildtypmäusen ebenfalls eine Proliferationssteigerung, jedoch in geringerem Maß als bei IL-2-Zugabe. Im Unterschied zum humanen System wurde jedoch nicht nur die Suppression signifikant aufgehoben, sondern auch die Anergie der Treg signifikant gebrochen (Abb. 3.17 A). Durch die Zugabe von IL-1 $\beta$  zu den Zellpopulationen aus IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde deren Proliferationsverhalten nicht beeinflusst. Die Zellen zeigten also, entsprechend ihrer Mutation im IL-1R1, keine Reaktivität auf IL-1 $\beta$  (Abb. 3.17 B).



**Abb. 3.17 Proliferation der Teff und Treg aus Wildtyp- bzw. IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen in ihrer Einzel- und Kokultur in Anwesenheit von exogenem IL-1β**  
 Isolierte Teff und Treg aus C57BL/6-Wildtypmäusen (WT) bzw. IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen (KO) wurden in Einzel- und Kokultur in einen Suppressionstest eingesetzt und polyklonal stimuliert (anti-CD3 mAk löslich + T-Zell-depletierte, bestrahlte Milzzellen aus IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen). Untersucht wurde der Effekt von exogenem IL-1β (50, 200 oder 400 ng/ml) auf die Proliferation der Einzel- und Kokulturen. Gezeigt ist der Mittelwert aus Triplettansätzen eines Experiments einschließlich der Standardabweichung. Die Proliferation wurde mittels <sup>3</sup>H-TdR-Inkorporation gemessen. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$

Die in Abbildung 3.17 C) und D) dargestellten „Überkreuzversuche“ zeigten bei der Zugabe von IL-1β erstaunlicherweise nur dann eine Proliferationszunahme in der Kokultur, wenn diese Treg aus Wildtypmäusen enthielt

(Abbildung 3.17 D). Bei einer Kokultur, in der die Teff aus Wildtypmäusen und die Treg aus IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen stammten (Abbildung 3.17 C), war kein Effekt von IL-1β auf die Kokultur zu sehen. Dies spricht dafür, dass IL-1β einen direkten Einfluss auf die Proliferation der Treg hat und keine indirekte Wirkung über die Teff vorliegt.



**Abb. 3.17 Proliferation der Teff und Treg aus Wildtyp- bzw. IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen in ihrer Einzel- und Kokultur in Anwesenheit von exogenem IL-1β**  
 Isolierte Teff und Treg aus C57BL/6-Wildtypmäusen (WT) bzw. IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen (KO) wurden in Einzel- und Kokultur in einen Suppressionstest überkreuz eingesetzt und polyklonal stimuliert. Untersucht wurde der Effekt von exogenem IL-1β auf die Proliferation der Einzel- und Kokulturen. Gezeigt ist der Mittelwert aus Triplettansätzen eines Experiments inklusive Standardabweichung. Die Proliferation wurde mittels <sup>3</sup>H-TdR-Inkorporation gemessen. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$  und \*\*\* =  $p \leq 0,001$

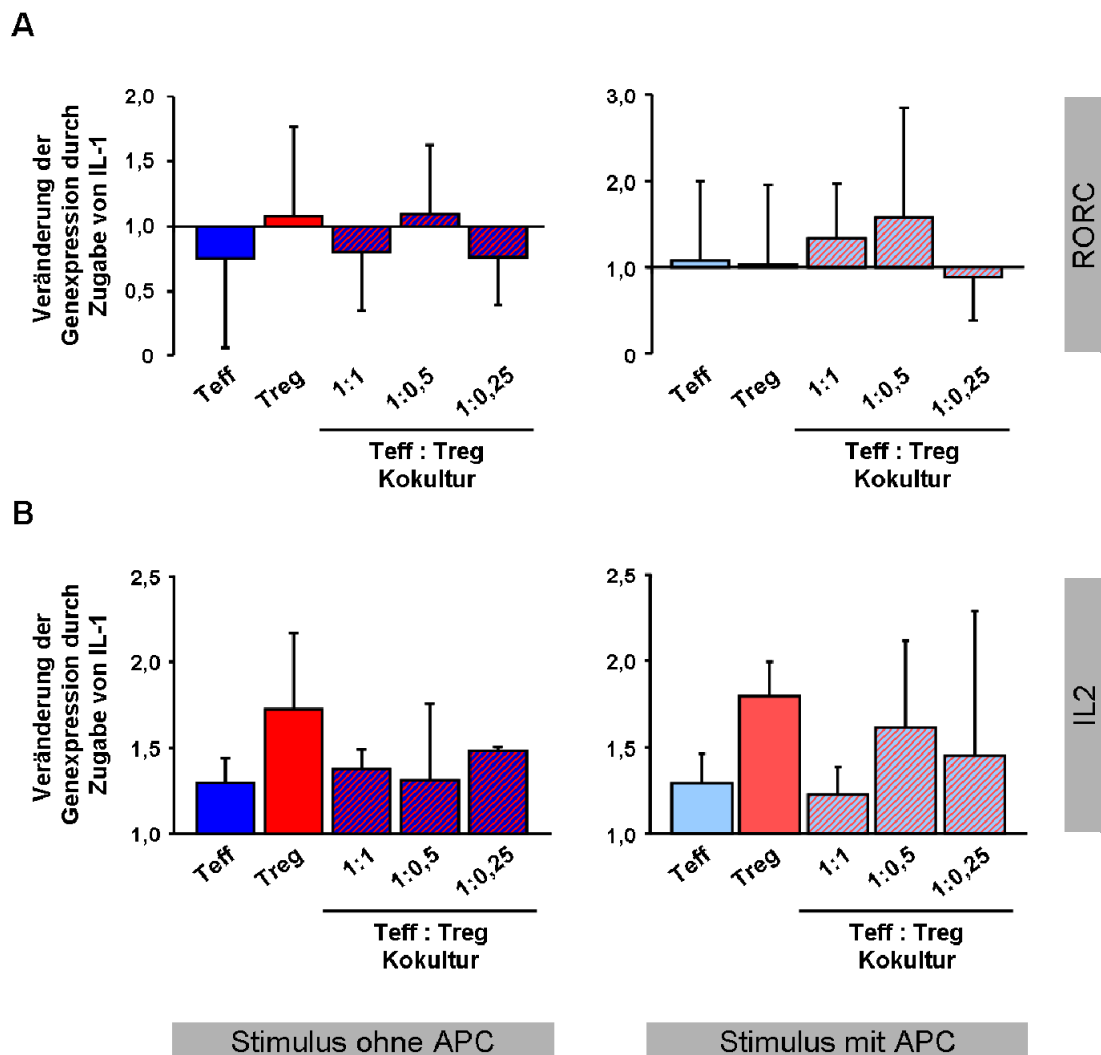
Nachdem im murinen System also eine direkte proliferationsfördernde Wirkung von IL-1 auf Treg, jedoch nicht auf Teff beobachtet werden konnte, interessierte uns, die Wirkung von IL-1 auf Treg und Teff auch im humanen System weiter zu untersuchen. Zu dieser Zeit wurde im murinen System die Beobachtung gemacht, dass es in Anwesenheit von IL-1 und von antigenpräsentierenden Zellen (APC) zur Konversion von Treg in IL-17-Produzenten kommt [122;123]. Somit lag nahe, für das humane System ein ähnliches Szenario in Betracht zu ziehen. Ebenfalls möglich erschien weiterhin eine durch IL-1 induzierte Produktion des proliferationsfördernden Zytokins IL-2, wodurch es zur Aufhebung der Suppression in der Kokultur kommen könnte. Daher untersuchten wir im Folgenden auf molekularer Ebene mittels Real-Time qPCR die Konversion von Treg in T<sub>H</sub>17-Zellen bzw. die Induktion von IL-2 im bereits etablierten *in vitro* Suppressionsassay.

### **3.2.7 Einfluss von IL-1 auf die Genexpression in humanen regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen mittels Real-Time qPCR**

Es wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> Treg und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Teff mittels immunomagnetischer Beads isoliert und in einen *in vitro* Suppressionsassay eingesetzt. Für die Stimulation wurden in Anlehnung an die Veröffentlichung von Lequn et al. - eine Konversion von Treg in IL-17-Produzenten war nur in Anwesenheit von APC zu beobachten - zwei verschiedene Systeme verwendet: Zum einen wurde der etablierte Stimulus mit reduziertem Kostimulus verwendet (Methoden 2.2.1.9), welcher als APC T-Zell-depletierte bestrahlte PBMC und als T-Zell-Rezeptorstimulus anti-CD3 mAk enthielt. Zum anderen wurde ein APC-freies System gewählt, welches als polyklonalen Stimulus eine Kombination aus löslichem anti-CD3 mAk und anti-CD28 mAk verwendete. Nach vier Stunden Stimulation in An- und Abwesenheit von humanem IL-1 $\beta$  (3000 U/ml) wurde aus den Zellen mRNA gewonnen, mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und die jeweilige Genexpression mit einer Real-Time qPCR mittels SYBR Green I quantifiziert. Untersucht wurden die mRNA-Expression für IL-2 und RORC, dem charakteristischen T<sub>H</sub>17-Transkriptionsfaktoren [124;125].

Alle Werte wurden anhand der entsprechenden Expressionsintensität des EF-1 $\alpha$ 1 normalisiert. Die Genexpression in den Zellpopulationen mit IL-1-Zugabe wurde in Relation zur Genexpression in den jeweiligen Zellen ohne IL-1-Zugabe (Expression = 1) gesetzt und somit die durch IL-1 induzierte Veränderung der Genexpression bestimmt.

Durch die Zugabe von IL-1 $\beta$  konnte keine signifikante Veränderung der Expression des charakteristischen T<sub>H</sub>17-Transkriptionsfaktors RORC und somit auch keine Konversion in T<sub>H</sub>17-Zellen nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für einen Stimulus ohne als auch mit APC (Abb. 3.18 A). Unter beiden Stimulationsbedingungen kam es durch die Zugabe von IL-1 $\beta$  tendenziell in allen Zellpopulationen zu einer vermehrten Expression von IL-2 (Abb. 3.18 B), die jedoch nicht signifikant war.



**Abb. 3.18 Veränderung der Genexpression von RORC und IL-2 durch Zugabe von IL-1 bei der Stimulation humaner regulatorischen T-Zellen, Effektor-T-Zellen und deren Kokultur mit Hilfe von Real-Time qPCR-Analysen**

Mittels Real-Time qPCR-Analyse wurde die relative Genexpression von RORC und IL-2 auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei wurden die Werte für Teff, Treg und deren Kokultur in einer Stimulation mit und ohne IL-1 $\beta$  verglichen. Zur Normalisierung der Werte diente die entsprechende Expressionsintensität des EF-1 $\alpha$ 1. Die Genexpression der jeweiligen Zellpopulation in Abwesenheit von IL-1 $\beta$  wurde als Referenz auf 1 gesetzt. Angezeigt ist die jeweils relative Veränderung der Genexpression als Mittelwert aus drei unabhängigen Präparationen einschließlich der Standardabweichung.

Bei Krebspatienten kommt es im Verlauf der Erkrankung zu funktionellen Veränderungen des Immunsystems. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Frequenz und Aktivität verschiedener Treg-Subpopulationen in Melanompatienten untersucht. Für die meisten untersuchten Treg-Subpopulationen zeigten sich bei Patienten im Spätstadium IV, verglichen mit gesunden Spendern, deutlich erhöhte Frequenzen. Des Weiteren ließ sich für  $CD4^+Foxp3^+$ ,  $CD4^+Foxp3^+CD25^+$  und  $CD4^+Foxp3^+CD127^{low}$  Treg auch mit fortschreitender Melanomerkrankung eine Frequenzzunahme erkennen. Die  $CD4^+CD25^+HLA-DR^+$  Treg-Subpopulation hingegen zeigte hinsichtlich ihrer Frequenz im peripheren Blut keine signifikanten Unterschiede zwischen den verglichenen Spendergruppen. Weiterhin wiesen Melanompatienten im Stadium IV im Vergleich zu gesunden Spendern und Stadium-II-Patienten stark verminderte antigenspezifische Immunantworten gegen Recallantigene auf. Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellung einer tumorinduzierten systemischen Suppression der T-Zellreaktivität in Tumorpatienten. Die Korrelation dieser verminderten Immunreaktivität mit den beschriebenen erhöhten Treg-Frequenzen lässt eine Beteiligung der Treg bei der Immunsuppression durch das maligne Melanom vermuten. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei Melanompatienten, bei denen nach einer DC-basierten Immuntherapie vorübergehend eine antigenspezifische Immunantwort wiederhergestellt konnten, auch eine Verminderung von Treg-Frequenzen im peripheren Blut festzustellen war.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte der IL-1R1 als Aktivierungsmarker auf Treg bestätigt werden. Daraus ergaben sich Untersuchungen zur Wirkung von IL-1 auf die Suppressoreigenschaft von Treg. Human wurde die Beobachtung gemacht, dass die Anwesenheit von IL-1 die Suppressorfunktion von Treg in der Kokultur mit Teff aufhebt, die Anergie von Treg in der Einzelkultur jedoch nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde im murinen System gefunden, dass neben der Teff- auch die Treg-Einzelkultur durch Zugabe von IL-1 eine erhöhte Proliferation aufweist. Einen wichtigen Hinweis auf die Zielzellen des IL-1 gaben Versuche mit IL-1-R<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die entscheidende proliferationsinduzierende Wirkung von IL-1 in der Kokultur aus Teff und Treg auf Seiten der Treg stattfindet. IL-1 hebt dabei die



suppressorische Kapazität und die Anergie der Treg auf. Entsprechend vorhandener Literatur zu murinen Versuchen [122;123] war zu vermuten, dass diese Proliferation der Treg durch die IL-1-induzierte Konversion zu IL-17-Produzenten zustande kommt. Im humanen System konnte eine solche IL-17-induzierende Wirkung von IL-1 auf die Treg-Population nicht bestätigt werden. Hier scheint die Induktion von IL-2 die entscheidene Wirkung von IL-1 auf Treg und Teff darzustellen. Diese führt vermutlich zum Überkommen der Suppression in der Kokultur.

## 4. DISKUSSION

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte in verschiedenen Studien mit Patienten mit malignem Melanom mittels DC-basierter Vakzine eine verbesserte Antitumorantwort induziert werden. Dabei kam es zu erhöhten antigenspezifischen T-Zellantworten, zur Infiltration von Metastasen mit CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (CTL) und sogar teilweise zu einer Regression von Metastasen [33;34]. Es ist bekannt, dass gegen einige Melanom-assoziierte Tumorantigene ohne spezifische Immuntherapie „spontane“ T-Zellantworten stattfinden können [107-109]. Das Melanom gilt also als immunogener Tumor, der vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden kann. Solche T-Zellantworten können auch durch Tumorantigen-spezifische DC-vermittelte Immuntherapien induziert oder verstärkt werden. Insbesondere das Vorhandensein von tumorinfiltrierenden Lymphozyten wurde beim Melanom, aber auch beim Ovarial- und beim Dickdarmkarzinom in einen positiven Zusammenhang mit einem verbesserten Überleben der Patienten gebracht [126-128]. Allerdings konnten insbesondere bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien oben genannte Erfolge einer DC-vermittelten Immuntherapie seltener, in geringerem Maße oder nur transient erzielt werden [33;34;129]. Neben einer eingeschränkten Anti-Tumorantwort war mit zunehmendem Stadium der Melanomerkrankung zudem eine verminderte allgemeine T-Zellreaktivität zu beobachten. Dies zeigte sich anhand schwacher DTH-Reaktionen und geringer T-Zellreaktivitäten auf die Recallantigene Tetanuntoxoid oder Tuberkulin. Während bei Melanompatienten im Stadium II in der Regel sehr deutliche Indurationen nach DTH-Testung auf Tetanustoxoid auftraten, die teilweise sogar mit erhöhter Körpertemperatur einhergingen, fielen diese bei Patienten im Stadium IV sehr viel geringer aus (Schwellungen < 1 cm) ([34;117] und unveröffentlichte Beobachtungen). Dies spiegelte sich auch in den in vitro Restimulationen von PBMC mit Recallantigenen in dieser Arbeit wieder und lässt eine systemische Immunsuppression durch den Tumor vermuten.

Bei verschiedenen Tumorarten, auch im Melanom, konnten sowohl im Tumor als auch im peripheren Blut erhöhte Treg-Frequenzen festgestellt werden, deren Auftreten mit den teilweise geringen Erfolgen von Immuntherapien bei Tumoren in

Zusammenhang gebracht werden [103-105;129;130]. Hierbei dienten bisher jedoch entweder nur die Expression von CD25 oder die Koexpression von CD25 und Foxp3 als Marker für die Charakterisierung der Treg-Population und der Bestimmung ihrer Frequenz.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Bestimmung der Treg-Frequenz mit zusätzlichen Treg-assoziierten Markerkombinationen durchgeführt werden. Dabei wurde die Frequenz der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Treg-Subpopulationen im peripheren Blut von gesunden Spendern und Patienten mit malignem Melanom quantifiziert. Insbesondere bei Patienten im Spätstadium IV des malignen Melanoms zeigten sich, verglichen mit gesunden Spendern und Patienten mit früher Erkrankung (Stadium I-II) erhöhte Treg-Frequenzen, welche mit einer verminderten antigenspezifischen T-Zellreaktivität gegen Recallantigene in diesen Patienten korrelierten. Eine erhöhte Frequenz von Treg bei Melanompatienten im Spätstadium IV lässt sich teilweise mit vorangegangenen Beobachtungen erklären: Tumore bilden als einen Mechanismus des so genannten „Immune-Escapes“ ein suppressives Mikromilieu aus, indem sie z.B. Zytokine wie TGF-β und IL-10 sezernieren. Diese Zytokine führen zum einen zur Suppression der Differenzierung von DC und CTL, der T-Zellproliferation und sie hemmen ebenso die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen [131-134]. Dadurch kann eine erfolgreiche Anti-Tumorantwort unterdrückt werden, was die teilweise schwachen Erfolge von DC-Vakzinen bedingen könnte. Zum anderen ist auch ein systemischer suppressiver Einfluss auf die T-Zellreaktivität denkbar, der für die verminderten antigenspezifischen T-Zellantworten gegen Recallantigene in Melanompatienten verantwortlich sein könnte [135]. Auch Treg werden in Verbindung mit solchen „Immune-Escape“-Mechanismen gebracht [35;129]. Dabei spielen mindestens zwei Typen von regulatorischen T-Zellen eine wichtige Rolle. Zum einen kann es durch die Sekretion von PGE(2) und TGF-β durch Tumore zur Induktion und Expansion von sogenannten induzierten Treg (Tr1) kommen [136;137]. Diese Tr1 üben ihre suppressorische Aktivität wiederum über die Sekretion von IL-10 und TGF-β aus [14;18;138]. Zum anderen spielt auch die Rekrutierung von Treg über die Bildung von Chemokinen wie CCL22 im Mikromilieu von Tumoren eine

wichtige Rolle [139]. Zudem kann angenommen werden, dass im Zuge der natürlich ablaufenden peripheren Toleranzmechanismen die Anzahl der tumorspezifischen Treg expandiert, da es bei einem entstehenden Tumor zu einer vermehrten Präsentation von Tumorantigenen kommt, welche als Teil des körpereigenen Gewebes erkannt werden und im Zuge der Autotoleranz zu einer wachsenden Toleranzinduktion gegenüber dem Tumor führen können. Hinweise dazu geben die Arbeiten von Szajnik et al., bei denen vom Tumor ausgehende Exosomen, so genannte TMV (Tumor-derived microvesicles), als Mediatoren zur Induktion, Expansion und Aktivierung von tumorspezifischen Treg beschrieben werden [140]. Treg scheinen also nicht nur vermehrt in Patienten mit malignen Tumoren vorzufinden, sondern auch Teil der immunsuppressorischen Mechanismen der Tumore zu sein [35;129;141]. Dazu passt auch, dass in verschiedenen Arbeiten mit Mausmodellen die Depletion oder funktionelle Blockade von Treg zu einer verbesserten Anti-Tumorantwort führte [129;142]. Eine mögliche funktionelle Beteiligung der Treg an der beobachteten Verminderung der T-Zellantworten in Melanompatienten konnte wegen der geringen Mengen an Zellmaterial in dieser Arbeit nicht untersucht werden und ist in weiterführenden Untersuchungen zu klären.

Im Rahmen dieser Arbeit war es des Weiteren möglich bei Melanompatienten im Stadium IV mit Hilfe der oben beschriebenen Treg-assoziierten Markerkombinationen die Treg-Frequenz im peripheren Blut im Verlauf einer DC-basierten Immuntherapie zu bestimmen. Dabei konnte nach mehrfacher Behandlung tendenziell eine Abnahme der Treg-Frequenzen im peripheren Blut festgestellt werden. Diese Verminderung der Treg-Frequenzen korreliert mit der Beobachtung verbesserter Anti-Tumorantworten in vorangegangenen Untersuchungen [34]. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen einer Tumor-abhängigen Immunsuppression und der Frequenz zirkulierender Treg, wie sie oben bereits diskutiert wurde, besteht. Kommt es, wie zuvor beobachtet [34], durch eine Tumorantigen-spezifische DC-basierte Vakzine zu einer verbesserten Antitumorantwort, ist zu vermuten, dass es zu einer teilweisen Verminderung der Tumor-abhängigen Suppression kommen könnte. Diese könnte sich auch in einer verminderten Treg-Frequenz widerspiegeln.

Bei der Quantifizierung der verschiedenen Treg-Populationen in dieser Arbeit konnte nicht bei allen Markerkombinationen eine signifikant erhöhte Treg-Frequenz bei Melanompatienten festgestellt werden. Diese Unterschiede könnten darauf beruhen, dass die unterschiedlichen Treg-Subpopulationen unterschiedliche Differenzierungs- oder Aktivierungszustände beschreiben. Die Expression von HLA-DR charakterisiert eine distinkte Subpopulation von Treg, welche  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin<sup>+</sup> sind, 20-30 % der CD25<sup>+</sup> Treg ausmachen und ausschließlich über zellkontaktabhängige Mechanismen Suppression ausüben [101;143]. Die Funktion von HLA-DR auf Treg ist bisher ungeklärt, es wird jedoch nach Aktivierung auf Treg hochreguliert und könnte somit eine Population kürzlich aktivierter Treg beschreiben. Die Quantifizierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Treg-Population im peripheren Blut erbrachte weder Unterschiede zwischen gesunden Spendern und Melanompatienten noch im Verlauf einer DC-basierten Vakzine. Dies könnte damit erklärt werden, dass eine Hochregulierung von HLA-DR als aktivierungsbedingter Phänotyp nur vorübergehend zu beobachten ist und zu den Zeitpunkten oder unter den Bedingungen der Untersuchungen keine kürzliche Aktivierung der Treg stattgefunden hatte. Zudem könnte aber auch angenommen werden, dass sich solche kürzlich aktivierten HLA-DR<sup>+</sup> Treg nicht im peripheren Blut, sondern direkt im Tumorgewebe vermehrt vorzufinden sind und in diesen Untersuchungen somit nicht erfasst werden konnten. Nähere Aufschlüsse über den Aktivierungszustand von Treg könnte in zukünftigen Arbeiten die Untersuchung der Expression des Treg-spezifischen Aktivierungsmarkers GARP (LRRC32) [144;145] oder des IL-1R1 [118;119] geben.

Insbesondere die Charakterisierung der Treg mittels der Koexpression von Foxp3 ergab für Patienten mit malignem Melanom erhöhte Treg-Frequenzen im peripheren Blut. Wie alle verwendeten Marker ist auch Foxp3 kein exklusiver Treg-Marker, sondern wird als Treg-assoziiert beschrieben. Nach polyklonaler Stimulation wird es auch von Teff exprimiert [146-148]. Es gibt jedoch auch Beobachtungen, die hinsichtlich der Expressionshöhe und -stabilität einen Unterschied zwischen der Expression von Foxp3 in Treg und aktivierten Teff beschreiben [149]. Diesbezüglich kann Foxp3 als Marker für humane Treg unter nicht aktivierten Bedingungen verwendet werden. Bei zukünftigen

Treg-Bestimmungen könnten jedoch zusätzliche Methoden wie die quantitative DNA-Methylierung von FOXP3 [150] herangezogen werden.

Die stichhaltigste Charakterisierung von Treg ist jedoch der Nachweis ihrer suppressiven Funktion. Diese konnte in dieser Arbeit für die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Treg-Populationen bei gesunden Spendern erbracht werden. Wie zuvor beschrieben konnte eine solche Testung für die Foxp3<sup>+</sup> Treg-Populationen nicht erfolgen, da Foxp3 als intrazellulärer Marker die Isolation lebender Foxp3<sup>+</sup> Zellen unmöglich macht. Vor dessen Anfärbung ist eine Fixierung und Permeabilisierung notwendig, was zum Tod der Zellen führt. Da die Population der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen jedoch eine große Überschneidung mit den im Suppressionsassay getesteten Treg-Populationen aufweist, ist anzunehmen, dass Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen weitgehend übereinstimmende funktionelle Eigenschaften mit den getesteten Treg-Subpopulationen besitzen. Die funktionelle Testung der Treg aus dem peripheren Blut der Melanompatienten konnte wegen des geringen Zellmaterials in dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Ihre suppressive Funktion können Treg nur nach Aktivierung ausüben [151]. Da bei der tumorabhängigen Immunsuppression Treg eine bedeutende Rolle zuzukommen scheint, ist davon auszugehen, dass diese im Fall einer Tumorerkrankung vermehrt aktiviert vorliegen. Um den Aktivierungsstatus von Treg zukünftig genau bestimmen zu können, ist die Identifikation und Untersuchung von eindeutigen Treg-Aktivierungsmarkern für weiterführende Analysen von großem Interesse. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher die Expression und Funktion des IL-1R1 auf Treg untersucht.

Der IL-1R1 und der IL-1R2 wurden in Vorarbeiten in einer Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Bberach/ Riß) auf mRNA-Ebene als differentiell exprimierter Aktivierungsmarker auf Treg und Teff gefunden [118;119]. In dieser Arbeit konnte der IL-1R1 auch auf Proteinebene als Aktivierungsmarker für Treg bestätigt werden. Der IL-1R1 wurde nach polyklonaler Stimulation auf Treg in einer höheren Dichte exprimiert als auf Teff. Der IL-1R2 hingegen wurde auf Proteinebene nach Aktivierung in gleichem Maße von Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> T-Zellen) und Teff (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen) exprimiert. Diese Beobachtung ist teilweise im Widerspruch zu Untersuchungen von Mercer et al..

Hier konnte auch der IL-1R2 auf Treg als differentiell exprimiert beschrieben werden [152]. Im Gegensatz zu den Untersuchungen in dieser Arbeit unterscheiden Mercer et al. allerdings bei der Bestimmung der IL-1R2-Expression zwischen CD45RO<sup>+</sup> und CD45RO<sup>-</sup> Teff und Treg, wobei nur die CD45RO<sup>-</sup> Teff den IL-1R2 nicht exprimieren. CD45RO<sup>+</sup> Teff zeigen nach Stimulation ebenfalls eine Expression des IL-1R2, wenn auch nicht im gleichen Maß wie CD45RO<sup>+</sup> Treg, so aber in ähnlichem Maße wie CD45RO<sup>-</sup> Treg. Es ist also möglich, dass Mercer et al. durch die Unterteilung der Teff- und Treg in Subpopulationen und deren isolierte Stimulation und Analyse zur Beobachtung anderer Expressionsmuster für den IL-1R2 kommen, als diese Untersuchung, die diese Unterscheidung nicht macht.

Entsprechend der differentiellen Expression und der signalweiterleitenden Funktion des IL-1R1, interessierte in dieser Arbeit des Weiteren der Vergleich der Wirkung von IL-1 auf Treg und Teff. Dabei zeigte IL-1 eine proliferationsfördernde Wirkung auf Teff, die geringer ausfiel, als bei der Zugabe von IL-2, aber dennoch signifikant war. Dies ist in Einklang mit der schon früh beschriebenen proliferationsfördernden Wirkung von IL-1 auf aktivierte humane Lymphozyten, weswegen IL-1 damals auch Lymphozyten-Aktivierender-Faktor (LFA) genannt wurde [153;154]. Die Proliferation der Treg wurde in Anwesenheit von IL-1 nicht signifikant erhöht, ihr aneurer Phänotyp wurde unter den gewählten Stimulationsbedingungen mit IL-1 also nicht gebrochen. In der Kokultur aus Teff und Treg war in Anwesenheit von IL-1 jedoch keine Suppression, sondern eine deutliche Proliferation, festzustellen. Dabei lag dieser Verlust der Suppression nicht in einem verminderten Treg-Überleben begründet. Bei einem Proliferationstest im Durchflusszytometer konnte die Proliferation der beiden angereicherten T-Zellpopulationen auch in ihrer Kokultur getrennt voneinander beurteilt werden. Hier konnten wir zeigen, dass in der Kokultur beide T-Zellpopulationen proliferierten. IL-1 scheint in der Kokultur also auch die Proliferation der Treg zu induzieren. Allerdings gibt es für dieses Szenario zumindest zwei Interpretationsmöglichkeiten. Zum einen gibt es die Möglichkeit, dass IL-1, wie im murinen System beschrieben [155], die Treg nur in Anwesenheit von Teff zur Proliferation anregen kann. Die Teff dienen in diesem Fall als direkte Zielzellen für IL-1 und wären mittels sekundärer Mechanismen, z.B. durch die

Bildung von IL-2, indirekt für die Expansion der Treg verantwortlich. Eine weitere Erklärung wäre eine Teff-Verunreinigung in den Treg-Präparationen, welche die proliferierenden Zellen innerhalb der Treg ausmachen könnten. Auch wenn in den Treg-Einzelkulturen kaum Proliferation zu verzeichnen ist, ist nicht auszuschließen, dass in Anwesenheit von IL-1 in der Kokultur eine geringe Teff-Verunreinigung in der Treg-Präparation proliferiert. Da die Wirkung von IL-1 auf die Teff in der Kokultur offensichtlich die Suppression durch die Treg überkommt. Die Beobachtung einer durch IL-1 induzierten IL-2 Produktion in Teff und Treg unterstützt diese Vorstellung. Da eine vollkommen reine Isolation von Treg im humanen System nicht zu gewährleisten ist, waren diese Fragen im humanen System nicht restlos zu klären.

Im murinen System bieten genetische Manipulationen mehr Möglichkeiten zur Beantwortung dieser Fragestellung. So konnten die detaillierten Beobachtungen zur Expansion von  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  und  $CD4^+CD25^+Foxp3^-$  T-Zellen in der Veröffentlichung von Brinster et al. nur durch die Verwendung von GFP-Reportermausen gemacht werden [155]. In dieser Arbeit verwendeten wir als Mausmodell einen IL-1R1<sup>-/-</sup>-Mausstamm, der durch eine gezielte Mutation im IL1R1 keine Reaktivität auf IL-1 zeigt. Angereicherte Treg und Teff aus diesen Mäusen zeigten im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine Proliferationszunahme bei IL-1-Zugabe. Treg aus Wildtypmäusen zeigten im Gegensatz zum humanen System eine deutliche Zunahme der Proliferation, was, als Folge der potentiellen Teff-Verunreinigung, mit den zuvor beschriebenen Daten von Brinster et al. zu erklären wäre.

Erstaunlicherweise zeigte die gemischte Kokultur aus KO- und WT-Zellen in Anwesenheit von IL-1 nur dann eine signifikante Proliferationszunahme, wenn die Treg aus Wildtypmäusen stammten. In einer Kokultur aus WT-Teff und KO-Treg kam es zu keiner Proliferationsinduktion, die Suppressionsfähigkeit der Treg war hier also ungebrochen. Dies spricht für eine direkte Wirkung von IL-1 auf Treg als auch auf Teff. Die Teff können in Anwesenheit von IL-1 in einer Kokultur mit Treg jedoch nur proliferieren, wenn diese Treg den IL-1R1 exprimieren und somit für IL-1 sensitiv sind. In diesem Fall scheint IL-1 die Suppressoraktivität der Treg einzuschränken. Eine Erklärung für die Induktion der Proliferation in der Kokultur von IL-1-sensitiven Treg mit Teff in den hier durchgeführten murinen Versuchen ist



die IL-1-abhängige Konversion von Treg zu nicht suppressiven T<sub>H</sub>17-Zellen in Anwesenheit von APC, wie sie in einer Veröffentlichung von Li et al. beschrieben wird [122]. Auch bei der Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), einer der menschlichen Multiplen Sklerose (MS) ähnliche Modellerkrankung des zentralen Nervensystems bei Mäusen spielt IL-1 eine wichtige Rolle. Mit ausschlaggebend bei dieser Erkrankung sind IL-17-produzierende T<sub>H</sub>17-Zellen, [156;157]. In IL 1R1<sup>-/-</sup>-Mäusen jedoch unterbleibt die Induktion von Autoantigen-spezifischen T<sub>H</sub>17-Zellen und deren IL-17-Produktion, was mit verminderten Ausprägung der EAE einhergeht. IL-1 kommt also auch bei der EAE eine wichtige Rolle bei der Induktion der IL-17-Produktion zu [158].

Eine ähnliche Wirkung von IL-1 auf Treg und deren Konversion zu T<sub>H</sub>17-Zellen war auch für unsere Beobachtungen im humanen System denkbar. Daher untersuchten wir im Folgenden die Genexpression von RORC, dem für T<sub>H</sub>17-Zellen charakteristischen Transkriptionsfaktor in humanen Treg und Teff, die in An- und Abwesenheit von IL-1 entsprechend der Bedingungen bei Lequn et al. mit oder ohne APC stimuliert wurden. Dabei zeigte sich durch die Zugabe von IL-1 weder mit noch ohne APC eine Induktion von RORC. Allerdings ist aufgrund der geringen n-Zahl und der großen Varianz zwischen den verschiedenen Präparationen keine zuverlässige Aussage möglich. Neben der Expression von RORC wurde auch die Induktion von IL-2 mittels der Genexpression von IL2 untersucht. Auch hierbei ist die geringe n-Zahl zu berücksichtigen. Tendenziell zeigt sich aber durch die Zugabe von IL-1 sowohl bei Teff, als auch bei Treg und deren Kokultur eine Induktion von IL-2. Diese IL-1-abhängige IL-2-Induktion könnte der Grund für das Brechen der Suppression in der Kokultur aus Treg und Teff und der daraus folgenden Proliferation sein. Weitere Untersuchungen sind allerdings nötig, um eine zuverlässige Aussage über die Wirkung von IL-1 auf die Veränderung des Phänotyps von Treg und Teff zu machen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Immunsystem spielen regulatorische T-Zellen (Treg) eine essentielle Rolle bei der Unterdrückung und Eindämmung von überschüssigen oder schädlichen Immunreaktionen. Ihre suppressiven Eigenschaften wirken aber auch bei Immune-Escape-Mechanismen von Tumoren mit und können den Erfolg von Tumorimmuntherapien deutlich mindern.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Frequenz verschiedener Treg-Subpopulationen im peripheren Blut von gesunden Spendern und Melanompatienten in verschiedenen Stadien der Erkrankung verglichen werden. Dabei wurden Treg-Subpopulationen mit den Markerkombinationen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> und CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> untersucht. Insbesondere bei den Subpopulationen, die durch die Expression von Foxp3 charakterisiert sind, konnten in Patienten im Spätstadium IV der Melanomerkrankung, verglichen mit Patienten im Stadium I-II oder gesunden Spendern, erhöhte Treg-Frequenzen im peripheren Blut festgestellt werden. Diese Funde korrelierten mit der Beobachtung einer verminderten antigenspezifischen T-Zellreaktivität in solchen Melanompatienten. Des Weiteren zeigte sich, dass eine DC-basierte Tumorantigen-spezifische Immuntherapie bei einem Teil der behandelten Stadium-IV-Melanompatienten eine Abnahme der Treg-Frequenzen im peripheren Blut zur Folge hatte. Dies korrelierte mit Beobachtungen aus vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe, bei denen sich zeigte, dass eine solche Immuntherapie die zuvor supprimierten T-Zellantworten zumindest vorübergehend wiederherstellen kann. Bei Untersuchungen zur Expression des IL-1-Rezeptors-1 konnte dieser auf Proteinebene als verstärkt exprimierter Aktivierungsmarker auf Treg bestätigt werden. In Anwesenheit von IL-1 wird die Suppressorfunktion der Treg inhibiert. Eine Konversion von humanen Treg zu nicht suppressorischen TH-17-Zellen durch die Kostimulation mit IL-1 konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Vielmehr scheint die Induktion von IL-2 die entscheidende Wirkung von IL-1 auf humane Treg und Teff darzustellen.

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycoerythrin-Cyanin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CFDASE	Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester
CFSE	CFDASE
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte; Zytotoxische T-Zelle
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	Delayed-type hypersensitivity
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Disodium Ethylenediam Tertaacetic Acid
EF-1 $\alpha$ 1	Elongationsfaktor-1 $\alpha$ 1
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein 5-isothiozyanat
Foxp3	Forkhead Box Protein 3
FSC	Forward- Scatter
g	Erdbeschleunigung
Gy	Gray; physikalische Größe, welche eine durch ionisierende Strahlung verursachte Energiedosis angibt
<sup>3</sup> H-TdR	Tritium-markiertes Thymidin
HLA	Human Leucocyte Antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RAcP	Interleukin-1-Rezeptor-Akzessorischen-Protein
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-1R1	Interleukin-1-Rezeptor 1
IL-1R2	Interleukin-1-Rezeptor 2
IPEX	Immune Dysregulation Poleendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle

IU	International Unit (internationale Einheit)
mAK	monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic Activated Cell Sort
MEM	Minimal essential Medium
min.	Minute
MM	Malignes Melanom
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
nTreg	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
PBMC	periphere mononukleare Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin5
PPD	Tuberkulin
qPCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RT Reverse	Transkription
SD	Standardabweichung
SSC	Sideward- Scatter
Teff	Effektor-T-Zelle
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TMV	Tumor-derived Microvesicles
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
Treg	regulatorische T-Zelle
TT	Tetanustoxoid
TZR	T-Zellrezeptor

## REFERENZEN

1. Horwitz DA: **Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future.** *Arthritis Research & Therapy* 2008, **10**.
2. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C: **Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF alpha therapy.** *Journal of Experimental Medicine* 2004, **200**:277-285.
3. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA: **Loss of functional suppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.** *Journal of Experimental Medicine* 2004, **199**:971-979.
4. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TIM: **Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes.** *Diabetes* 2005, **54**:92-99.
5. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M: **Regulatory T cells and immune tolerance.** *Cell* 2008, **133**:775-787.
6. Belkaid Y: **Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity.** *Nature Reviews Immunology* 2007, **7**:875-888.
7. Gershon RK, Kondo K: **Cell Interactions in Induction of Tolerance - Role of Thymic Lymphocytes.** *Immunology* 1970, **18**:723-&.
8. Gershon RK, Kondo K: **Infectious Immunological Tolerance.** *Immunology* 1971, **21**:903-&.
9. Gershon RK: **Disquisition on Suppressor T-Cells.** *Transplantation Reviews* 1975, **26**:170-185.
10. Möller G: **Do suppressor T cells exist?** *Scand J Immunol.* 1988, **27**:247-250.
11. Green DR, Webb DR: **Saying the S Word in Public.** *Immunology Today* 1993, **14**:523-525.
12. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: **Immunological 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* 1995, **155**:1151-1164.
13. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S: **Thymus and autoimmunity: Production of CD25(+)CD4(+) naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance.** *Journal of Immunology* 1999, **162**:5317-5326.
14. Jonuleit H, Schmitt E: **The regulatory T cell family: Distinct subsets and their interrelations.** *Journal of Immunology* 2003, **171**:6323-6327.

15. Weiner HL: **Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells.** *Immunological Reviews* 2001, **182**:207-214.
16. Weiner HL: **Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells.** *Microbes and Infection* 2001, **3**:947-954.
17. Becker C, Stoll S, Bopp T, Schmitt E, Jonuleit H: **Regulatory T cells: present facts and future hopes.** *Medical Microbiology and Immunology* 2006, **195**:113-124.
18. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, deVries JE, Roncarolo MG: **A CD4(+) T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis.** *Nature* 1997, **389**:737-742.
19. Steinbrink K, Kubsch S, Graulich E, Tueting T, Knop J, Enk A: **IL-10-treated human dendritic cells induce allergic CD4+and CD8+T cells with antigen-specific suppressor activity.** *Journal of Investigative Dermatology* 2001, **117**:446.
20. Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH: **Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells.** *Trends in Immunology* 2001, **22**:394-400.
21. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH: **CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity.** *Blood* 2002, **99**:2468-2476.
22. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH: **Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome.** *Journal of Medical Genetics* 2002, **39**:537-545.
23. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD: **Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis.** *Current Opinion in Rheumatology* 2003, **15**:430-435.
24. Rudensky AY: **Regulatory T cells and Foxp3.** *Immunological Reviews* 2011, **241**:260-268.
25. Hurst R, White DE, Heiss J, Lee DS, Rosenberg SA, Schwartzentruber DJ: **Brain metastasis after immunotherapy in patients with metastatic melanoma or renal cell cancer: Is craniotomy indicated?** *Journal of Immunotherapy* 1999, **22**:356-362.
26. Rahimi-Movaghar V, Karimi M: **Meningeal melanocytoma of the brain and oculodermal melanocytosis (nevus of Ota): Case report and literature review.** *Surgical Neurology* 2003, **59**:200-210.
27. Pearce MS, Parker L, Cotterill SJ, Gordon PM, Craft AW: **Skin cancer in children and young adults: 28 years' experience from the Northern Region Young Person's Malignant Disease Registry, UK.** *Melanoma Research* 2003, **13**:421-426.

28. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland. 2006.  
Ref Type: Report
29. Stolz W, Riemann A, Cognetta AB, Pillet L, Abmayr W, Holzel D, Bilek P, Nachbar F, Landthaler M, Braunfalco O: **Abcd Rule of Dermatoscopy - A New Practical Method for Early Recognition of Malignant-Melanoma.** *European Journal of Dermatology* 1994, **4**:521-527.
30. Nachbar F, Stolz W, Merkle T, Cognetta AB, Vogt T, Landthaler M, Bilek P, Braunfalco O, Plewig G: **The Abcd Rule of Dermatoscopy - High Prospective Value in the Diagnosis of Doubtful Melanocytic Skin-Lesions.** *Journal of the American Academy of Dermatology* 1994, **30**:551-559.
31. Balch CM, Mihm MC: **Reply to the article "the AJCC staging proposal for cutaneous melanoma: comments by the EORTC Melanoma Group", by D. J. Ruitter et al. (Ann Oncol 2001; 12 : 9-11).** *Annals of Oncology* 2002, **13**:175-176.
32. Hussein MR: **Tumour-infiltrating lymphocytes and melanoma tumorigenesis: an insight.** *British Journal of Dermatology* 2005, **153**:18-21.
33. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G: **Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.** *Journal of Experimental Medicine* 1999, **190**:1669-1678.
34. Tuettenberg A, Becker C, Huter E, Knop J, Enk AH, Jonuleit H: **Induction of strong and persistent MelanA/MART-1-specific immune responses by adjuvant dendritic cell-based vaccination of stage II melanoma patients.** *International Journal of Cancer* 2006, **118**:2617-2627.
35. Baecher-Allan C, Anderson DE: **Regulatory cells and human cancer.** *Seminars in Cancer Biology* 2006, **16**:98-105.
36. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, Conlon PJ, Hopp TP, Cosman D: **Cloning, Sequence and Expression of 2 Distinct Human Interleukin-1 Complementary Dnas.** *Nature* 1985, **315**:641-647.
37. Dinarello CA, Bendtzen K, Wolff SM: **Studies on the Active-Site of Human Leukocytic Pyrogen.** *Inflammation* 1982, **6**:63-78.
38. Sims JE, Smith DE: **The IL-1 family: regulators of immunity.** *Nature Reviews Immunology* 2010, **10**:89-102.
39. Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM: **Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines.** *Experimental Neurology* 1998, **149**:411-423.
40. Shadiack AM, Hart RP, Carlson CD, Jonakait GM: **Interleukin-1 Induces Substance-P in Sympathetic-Ganglia Through the Induction of Leukemia Inhibitory Factor (Lif).** *Journal of Neuroscience* 1993, **13**:2601-2609.

41. Fan J, Wojnar M, Theodorakis M, Lang CH: **Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA and peptide and IGF-binding proteins by interleukin-1.** *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 1996, **270**:R621-R629.
42. Dinarello CA: **Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism.** *Blood* 1991, **77**:1627-1652.
43. Delhanty PJD: **Interleukin-1 beta suppresses growth hormone-induced acid-labile subunit mRNA levels and secretion in primary hepatocytes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, **243**:269-272.
44. Zheng H, Fletcher D, Kozak W, Jiang MH, Hofmann KJ, Conn CA, Soszynski D, Grabiec C, Trumbauer ME, Shaw A, Kostura MJ, Stevens K, Rosen H, North RJ, Chen HY, Tocci MJ, Kluger MJ, Vanderploeg LHT: **Resistance to Fever Induction and Impaired Acute-Phase Response in Interleukin-1-Beta-Deficient Mice.** *Immunity* 1995, **3**:9-19.
45. Goehler LE, Relton JK, Dripps D, Kiechle R, Tartaglia N, Maier SF, Watkins LR: **Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: A possible mechanism for immune-to-brain communication.** *Brain Research Bulletin* 1997, **43**:357-364.
46. Hansen MK, Taishi P, Chen ZT, Krueger JM: **Vagotomy blocks the induction of interleukin-1 beta (IL-1 beta) mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1 beta.** *Journal of Neuroscience* 1998, **18**:2247-2253.
47. Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK: **The Interleukin-1 Receptor Binds the Human Interleukin-1-Alpha Precursor But Not the Interleukin-1-Beta Precursor.** *Journal of Biological Chemistry* 1987, **262**:2941-2944.
48. Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K: **Model for Calcium-Mediated Processing and Release of Human Pre IL-1-Alpha.** *Lymphokine Research* 1990, **9**:590.
49. Watanabe N, Kobayashi Y: **Selective Release of A Processed Form of Interleukin-1-Alpha.** *Cytokine* 1994, **6**:597-601.
50. Dinarello CA: **Mechanism of Disease - the Role of Interleukin-1 in Disease (Vol 328, Pg 106, 1993).** *New England Journal of Medicine* 1993, **328**:744.
51. Fini ME, Strissel KJ, Girard MT, Mays JW, Rinehart WB: **Interleukin-1-Alpha Mediates Collagenase Synthesis Stimulated by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate.** *Journal of Biological Chemistry* 1994, **269**:11291-11298.
52. Tsukui T, Kikuchi K, Mabuchi A, Sudo T, Sakamoto T, Asano G, Yokomuro K: **Production of Interleukin-1 by Primary Cultured Parenchymal Liver-Cells (Hepatocytes).** *Experimental Cell Research* 1994, **210**:172-176.
53. Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS: **Low-energy helium-neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes.** *Journal of Investigative Dermatology* 1996, **107**:593-596.



54. Kumar NM, Rabadi NH, Sigurdson LS, Schunemann HJ, LwebugaMukasa JS: **Induction of interleukin-1 and interleukin-8 mRNAs and proteins by TGF beta(1) in rat lung alveolar epithelial cells.** *Journal of Cellular Physiology* 1996, **169**:186-199.
55. Burysek L, Houstek J: **Multifactorial induction of gene expression and nuclear localization of mouse interleukin 1 alpha.** *Cytokine* 1996, **8**:460-467.
56. Krzesicki RF, Winterrowd GE, Brashler JR, Hatfield CA, Griffin RL, Fidler SF, Kolbasa KP, Shull KL, Richards IM, Chin JE: **Identification of cytokine and adhesion molecule mRNA in murine lung tissue and isolated T cells and eosinophils by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1997, **16**:693-701.
57. Ghanekar S, Zheng L, Logar A, Navratil J, Borowski LA, Gupta P, Rinaldo C: **Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus.** *Journal of Immunology* 1996, **157**:4028-4036.
58. Brody DT, Durum SK: **Membrane II-1 - II-1-Alpha Precursor Binds to the Plasma-Membrane Via A Lectin-Like Interaction.** *Journal of Immunology* 1989, **143**:1183-1187.
59. Mallardo M, Giordano V, Dragonetti E, Scala G, Quinto I: **Dna-Damaging Agents Increase the Stability of Interleukin-1-Alpha, Interleukin-1-Beta, and Interleukin-6 Transcripts and the Production of the Relative Proteins.** *Journal of Biological Chemistry* 1994, **269**:14899-14904.
60. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding GJF, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yamin TT, Lee TD, Shively JE, Maccross M, Mumford RA, Schmidt JA, Tocci MJ: **A Novel Heterodimeric Cysteine Protease Is Required for Interleukin-1-Beta Processing in Monocytes.** *Nature* 1992, **356**:768-774.
61. Goolsby CL, Variakojis D, Jiang S, Lurie M: **Flow Cytometric Determination of Bcl-2 Oncoprotein Expression in Hyperplastic and Neoplastic Lymphoid-Tissue.** *Blood* 1994, **84**:A443.
62. Lundqvist EN, Egelrud T: **Biologically active, alternatively processed interleukin-1 beta in psoriatic scales.** *European Journal of Immunology* 1997, **27**:2165-2171.
63. Loppnow H, Bil R, Hirt S, Schonbeck U, Herzberg M, Werdan K, Rietschel ET, Brandt E, Flad HD: **Platelet-derived interleukin-1 induces cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells.** *Blood* 1998, **91**:134-141.
64. Dacunha A, Jefferson JA, Jackson RW, Vitkovic L: **Glial Cell-Specific Mechanisms of Tgf-Beta-1 Induction by Il-1 in Cerebral-Cortex.** *Journal of Neuroimmunology* 1993, **42**:71-86.

65. Freidin M, Bennett MVL, Kessler JA: **Cultured Sympathetic Neurons Synthesize and Release the Cytokine Interleukin-1-Beta.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**:10440-10443.
66. Jokhi PP, King A, Loke YW: **Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface.** *Cytokine* 1997, **9**:126-137.
67. Wewers MD, Dare HA, Winnard AV, Parker JM, Miller DK: **IL-1 beta-converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: Macrophage IL-1 beta release limitation is ICE independent.** *Journal of Immunology* 1997, **159**:5964-5972.
68. Malyak M, Smith MF, Abel AA, Arend WP: **Peripheral-Blood Neutrophil Production of Interleukin-1 Receptor Antagonist and Interleukin-1-Beta.** *Journal of Clinical Immunology* 1994, **14**:20-30.
69. Sporri B, Bickel M, Limat A, Waelti ER, Hunziker T, Wiesmann UN: **Juxtacrine stimulation of cytokine production in cocultures of human dermal fibroblasts and T cells.** *Cytokine* 1996, **8**:631-635.
70. Gray PW, Glaister D, Chen E, Goeddel DV, Pennica D: **2 Interleukin-1 Genes in the Mouse - Cloning and Expression of the Cdna for Murine Interleukin-1-Beta.** *Journal of Immunology* 1986, **137**:3644-3648.
71. Bergsteinsdottir K, Kingston A, Mirsky R, Jessen KR: **Rat Schwann-Cells Produce Interleukin-1.** *Journal of Neuroimmunology* 1991, **34**:15-23.
72. O'Neill LAJ: **The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress.** *Immunological Reviews* 2008, **226**:10-18.
73. Colotta F, Mantovani A: **Induction of the Interleukin-1 Decoy Receptor by Glucocorticoids.** *Trends in Pharmacological Sciences* 1994, **15**:138-139.
74. Sims JE: **IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family.** *Current Opinion in Immunology* 2002, **14**:117-122.
75. Holter H, Moller KM: **A Substance for Aqueous Density Gradients.** *Experimental Cell Research* 1958, **15**:631-632.
76. Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H: **Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood.** *Curr Protoc Immunol.* 2009, **Chapter 7:Unit7.1.**
77. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH: **Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood.** *Journal of Experimental Medicine* 2001, **193**:1285-1294.
78. Wiebringhaus T, Brinck H, Lutter P, Schmitt E, Jonuleit H: **Proteins of the epidermal differentiation complex (EDC) are differentially expressed in CD4+CD25+ regulatory T cells.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2005, **4**:S58.

79. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M: **Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25(high) regulatory T cells.** *Blood* 2004, **104**:895-903.
80. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: **Exposure of Phosphatidylserine on the Surface of Apoptotic Lymphocytes Triggers Specific Recognition and Removal by Macrophages.** *Journal of Immunology* 1992, **148**:2207-2216.
81. Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, Vanoers MHJ: **Annexin-V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B-Cells Undergoing Apoptosis.** *Blood* 1994, **84**:1415-1420.
82. van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM: **Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.** *Cytometry* 1998, **31**:1-9.
83. Buller GM, Bradford JA, Janes MS, Salisbury JJ, Ignatius MJ, Godfrey WL: **Detection of apoptosis markers by flow cytometry over time after induction.** *Molecular Biology of the Cell* 2004, **15**:259A.
84. Pozarowski P, Grabarek J, Darzynkiewicz Z: **Flow cytometry of apoptosis.** *Curr Protoc Cell Biol* 2004, **Chapter 18:Unit 18.8**..
85. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Research* 2001, **29**.
86. Bopp T. **Molekulare Mechanismen der Kontrolle von T-Helferzellen durch natürlich vorkommende CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen.** 2006.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
87. Asherson GL, Zembala M: **Suppressor T Cells in Cell-Mediated-Immunity.** *British Medical Bulletin* 1976, **32**:158-164.
88. Suvas S, Rouse BT: **Treg control of antimicrobial T cell responses.** *Current Opinion in Immunology* 2006, **18**:344-348.
89. de Lafaille MAC, Lafaille JJ: **CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy.** *Current Opinion in Immunology* 2002, **14**:771-778.
90. Sakaguchi S: **Naturally arising Foxp3-expressing CD25(+) CD4(+) regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.** *Nature Immunology* 2005, **6**:345-352.
91. Sakaguchi S: **Regulatory T cells in autoimmune diseases - Preface.** *International Reviews of Immunology* 2005, **24**:157-158.
92. Chatila TA: **Role of regulatory T cells in human diseases.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005, **116**:949-959.
93. Long SA, Buckner JH: **CD4(+)FOXP3(+) T Regulatory Cells in Human Autoimmunity: More Than a Numbers Game.** *Journal of Immunology* 2011, **187**:2061-2066.

94. Cao XF: **Regulatory T cells and immune tolerance to tumors.** *Immunologic Research* 2010, **46**:79-93.
95. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F: **Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.** *Nature Genetics* 2001, **27**:68-73.
96. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME: **X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy.** *Nature Genetics* 2001, **27**:18-20.
97. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD: **The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.** *Nature Genetics* 2001, **27**:20-21.
98. Liu WH, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA: **CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4(+) T reg cells.** *Journal of Experimental Medicine* 2006, **203**:1701-1711.
99. Baecher-Allan C, Wolf E, Haller DA: **MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells.** *Journal of Immunology* 2006, **176**:4622-4631.
100. Baecher-Allan C, Wolf E, Ashley C, Hafler D: **HLA-class II defines functionally distinct populations of human CD4+CD25high Treg cells.** *Journal of Immunology* 2006, **176**:S220-S221.
101. Bonnin B, Correll A, Swiatek-de Lange M, Lenter M, Schneider FJ, Wijdenes J, Jonuleit H, Becker C: **Large scale preparation of human MHC class II(+) integrin beta(+)(1) Tregs.** *Journal of Immunological Methods* 2010, **360**:96-102.
102. Zhou J, Ding T, Pan WD, Zhu LY, Li L, Zheng LM: **Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients.** *International Journal of Cancer* 2009, **125**:1640-1648.
103. Tokuno K, Hazama S, Yoshino S, Yoshida S, Oka M: **Increased Prevalence of Regulatory T-Cells in the Peripheral Blood of Patients with Gastrointestinal Cancer.** *Anticancer Research* 2009, **29**:1527-1532.
104. Yokokawa J, Remondo C, Gulley JL, Arlen PM, Schlom JR, Tsang KY: **Enhanced functionality of CD4(+)CD25(high)FoxP3(+) regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer.** *Clinical Cancer Research* 2008, **14**:1032-1040.

105. Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellstrom M, Egevad L, Pisa P: **CD4(+)CD25(high) T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients.** *Journal of Immunology* 2006, **177**:7398-7405.
106. Barnett B, Kryczek I, Cheng P, Zou WP, Curiel TJ: **Regulatory T cells in ovarian cancer: Biology and therapeutic potential.** *American Journal of Reproductive Immunology* 2005, **54**:369-377.
107. Nuber N, Curioni-Fontecedro A, Matter C, Soldini D, Tiercy JM, von Boehmer L, Moch H, Dummer R, Knuth A, van den Broek M: **Fine analysis of spontaneous MAGE-C1/CT7-specific immunity in melanoma patients.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**:15187-15192.
108. Pittet MJ, Valmori D, Dunbar PR, Speiser DE, Lienard D, Lejeune F, Fleischhauer K, Cerundolo V, Cerottini JC, Romero P: **High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals.** *Journal of Experimental Medicine* 1999, **190**:705-715.
109. Griffioen M, Borghi M, Schrier PI, Osanto S: **Detection and quantification of CD8(+) T cells specific for HLA-A\*0201-binding melanoma and viral peptides by the IFN-gamma-elispot assay.** *International Journal of Cancer* 2001, **93**:549-555.
110. Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Ueda R, Iwata-Kajihara T, Nishio H, Kawamura N, Kawakami Y: **The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies.** *International Journal of Hematology* 2011, **93**:294-300.
111. Jacobs JFM, Nierkens S, Figdor CG, de Vries IJM, Adema GJ: **Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy?** *Lancet Oncology* 2012, **13**:E32-E42.
112. Streng HB: **Immunization with Tetanus Toxoid: The Recall Response.** *Yale J Biol Med.* 1940, **12**:487-491.
113. Whittingham S, Feery B, Mackay IR: **Use of Tetanus Toxoid for Testing Cell-Mediated-Immunity.** *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 1982, **12**:511-514.
114. Morris DL, Gutterman JU, Mavligit GM, Hsi BP, Hersh EM, Marshall MM: **Recall Antigen Delayed-Type Hypersensitivity Skin Testing in Melanoma and Acute-Leukemia Patients and Their Associates.** *Cancer Research* 1979, **39**:219-226.
115. Black CA: **Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective.** *Dermatol Online J.* 1999, **5**:7.
116. Luo Y, Dorf ME: **Delayed-type hypersensitivity.** *Curr Protoc Immunol.* 2001, **Chapter 4.**

117. Correll A, Tuettenberg A, Becker C, Jonuleit H: **Increased regulatory T-cell frequencies in patients with advanced melanoma correlate with a generally impaired T-cell responsiveness and are restored after dendritic cell-based vaccination.** *Experimental Dermatology* 2010, **19**:E213-E221.
118. EMBL-EBI: Array Express Zugangscode: ETABM779. 2010.  
Ref Type: Data File
119. Satoh K. Validierung IL1Rezeptor1, IL1Rezeptor2 und IL1Rezeptorantagonist mittels Real-Time qPCR. 2012.  
Ref Type: Unpublished Work
120. Helle M, Boeije L, Aarden LA: **IL-6 Is An Intermediate in IL-1-Induced Thymocyte Proliferation.** *Journal of Immunology* 1989, **142**:4335-4338.
121. Ben-Sasson SZ, Caucheteux S, Crank M, Hu-Li J, Paul WE: **IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses.** *Cytokine* 2011, **56**:122-125.
122. Li LQ, Kim J, Boussiotis VA: **IL-1 beta-Mediated Signals Preferentially Drive Conversion of Regulatory T Cells but Not Conventional T Cells into IL-17-Producing Cells.** *Journal of Immunology* 2010, **185**:4148-4153.
123. Li LQ, Kim JS, Boussiotis VA: **Endogenous IL-beta Selectively Converts T Regulatory Cells Into IL-17 Producers During Antigen Stimulation.** *Blood* 2010, **116**:259.
124. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR: **The orphan nuclear receptor ROR gamma t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17(+) T helper cells.** *Cell* 2006, **126**:1121-1133.
125. Nurieva R, Yang XXO, Martinez G, Zhang YL, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C: **Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells.** *Nature* 2007, **448**:480-488.
126. Clemente CG, Mihm MG, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N: **Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma.** *Cancer* 1996, **77**:1303-1310.
127. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G: **Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer.** *New England Journal of Medicine* 2003, **348**:203-213.
128. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J: **Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer.** *New England Journal of Medicine* 2005, **353**:2654-2666.

129. Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L: **Foxp3 expressing CD4(+)CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells.** *Journal of Immunology* 2004, **173**:1444-1453.
130. McCarter MD, Baumgartner J, Escobar GA, Richter D, Lewis K, Robinson W, Wilson C, Palmer BE, Gonzalez R: **Immunosuppressive dendritic and regulatory T cells are upregulated in melanoma patients.** *Annals of Surgical Oncology* 2007, **14**:2854-2860.
131. Murphy DB: **T-Cell Mediated Immunosuppression.** *Current Opinion in Immunology* 1993, **5**:411-417.
132. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J: **Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma.** *International Journal of Cancer* 1997, **73**:309-316.
133. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, Blay JY: **Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: Role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor.** *Blood* 1998, **92**:4778-4791.
134. Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH: **Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells.** *Blood* 1999, **93**:1634-1642.
135. Tuettenberg A, Schmitt E, Knop J, Jonuleit H: **Dendritic cell-based immunotherapy of malignant melanoma: success and limitations.** *J Dtsch Dermatol Ges* 2007, **5**:190-196.
136. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang XM, Zhang Q, Lonning S, Teicher BA, Lee C: **Tumor evasion of the immune system by converting CD4(+) CD25(-) T cells into CD4(+) CD25(+) T regulatory cells: Role of tumor-derived TGF-beta.** *Journal of Immunology* 2007, **178**:2883-2892.
137. Baratelli A, Lee JM, Hazra S, Lin Y, Walser TC, Schaeue D, Pak PS, Elashoff D, Reckamp K, Zhang L, Fishbein MC, Sharma S, Dubinett SM: **PGE(2) contributes to TGF-beta induced T regulatory cell function in human non-small cell lung cancer.** *Am J Transl Res.* 2010, **2**:356-367.
138. Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, Malefyt RD, deVries JE, Roncarolo MG: **High-Levels of Interleukin-10 Production In-Vivo Are Associated with Tolerance in Scid Patients Transplanted with Hla Mismatched Hematopoietic Stem-Cells.** *Journal of Experimental Medicine* 1994, **179**:493-502.
139. Curiel TJ, Coukos G, Zou LH, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen LP, Zou WP: **Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.** *Nature Medicine* 2004, **10**:942-949.

140. Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL: **Tumor-Derived Microvesicles Induce, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T Cells (Treg).** *Plos One* 2010, **5**.
141. James E, Yeh A, King C, Korangy F, Bailey I, Boulanger DS, Van den Eynde BJ, Murray N, Elliott TJ: **Differential Suppression of Tumor-Specific CD8(+) T Cells by Regulatory T Cells.** *Journal of Immunology* 2010, **185**:5048-5055.
142. van Elsas A, Suttmuller RPM, Hurwitz AA, Ziskin J, Villasenor J, Medema JP, Overwijk W, Restifo NP, Melief CJM, Offringa R, Allison JP: **Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: Comparison of prophylaxis and therapy.** *Journal of Experimental Medicine* 2001, **194**:481-489.
143. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA: **CD4+CD25(high) regulatory cells in human peripheral blood.** *Journal of Immunology* 2001, **167**:1245-1253.
144. Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S: **Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg.** *European Journal of Immunology* 2009, **39**:3315-3322.
145. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D: **Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+regulatory T cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**:13439-13444.
146. Ziegler SF: **FOXP3: Of mice and men.** *Annual Review of Immunology* 2006, **24**:209-226.
147. Wang J, Ioan-Facsinay A, Van der Voort EIH, Huizinga TWJ, Toes REM: **Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4(+) T cells.** *European Journal of Immunology* 2007, **37**:129-138.
148. Kmiecik M, Gowda M, Graham L, Godder K, Bear HD, Marincola FM, Manjili MH: **Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function.** *Journal of Translational Medicine* 2009, **7**.
149. Nagar M, Vernitsky H, Cohen Y, Dominissini D, Berkun Y, Rechavi G, Amariglio N, Goldstein I: **Epigenetic inheritance of DNA methylation limits activation-induced expression of FOXP3 in conventional human CD25(-)CD4(+) T cells.** *International Immunology* 2008, **20**:1041-1055.
150. Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, Stanch D, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmuller U, Grutzkau A, Mustea A, Huehn J, Scheibenbogen C, Olek S: **Quantitative DNA Methylation Analysis of FOXP3 as a New Method for Counting Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Solid Tissue.** *Cancer Research* 2009, **69**:599-608.
151. Sakaguchi S: **Naturally arising CD4(+) regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses.** *Annual Review of Immunology* 2004, **22**:531-562.



152. Mercer F, Kozhaya L, Unutmaz D: **Expression and Function of TNF and IL-1 Receptors on Human Regulatory T Cells.** *Plos One* 2010, **5**.
153. Gery I, Gershon RK, Waksman BH: **Potentialiation of T-Lymphocyte Response to Mitogens .1. Responding Cell.** *Journal of Experimental Medicine* 1972, **136**:128
154. Gery I, Waksman BH: **Potentialiation of T-Lymphocyte Response to Mitogens .2. Cellular Source of Potentiating Mediator(S).** *Journal of Experimental Medicine* 1972, **136**:143-&.
155. Brinster C, Shevach EM: **Costimulatory effects of IL-1 on the expansion/differentiation of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) and CD4(+) CD25(+) Foxp3(-) T cells.** *Journal of Leukocyte Biology* 2008, **84**:480-487.
156. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK: **IL-17 and Th17 Cells.** *Annual Review of Immunology* 2009, **27**:485-517.
157. Aranami T, Yamamura T: **Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS).** *Allergol Int.* 2008, **57**:115-120.
158. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KHG, Lavelle EC: **A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis.** *Journal of Experimental Medicine* 2006, **203**:1685-1691.