

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Immunologie

Direktor  
Prof. Dr. med Bernhard Fleischer

## **Die Rolle von regulatorischen T-Zellen in der Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien: Analysen im DEREK-Mausmodell**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Matthias Schafferus  
aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2012

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.11.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. H.-W. Mittrücker**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. F. Haag**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. O. Steinmetz**

# Inhaltsverzeichnis

Fragestellung und Ziel dieser Arbeit .....	1
1 Einleitung .....	2
1.1 Das Immunsystem: Einführung .....	2
1.2 Die angeborene Immunantwort .....	2
1.2.1 Die Phagozyten des angeborenen Immunsystems .....	2
1.3 Die adaptive Immunantwort .....	3
1.3.1 Regulatorische T-Zellen .....	3
1.3.1.1 Überblick .....	3
1.3.1.2 Geschichtlicher Hintergrund .....	4
1.3.1.3 Identifikation von <i>foxp3</i> : Ein Marker für regulatorische T-Zellen .....	5
1.3.1.4 Entstehung von „natürlichen“ T <sub>reg</sub> - und „induzierten“ T <sub>reg</sub> -Zellen .....	5
1.3.1.5 Stabilität der Foxp3-Expression .....	6
1.3.1.6 Regulatorische T-Zellen in chronischen Infektionen .....	7
1.4 Diphtherietoxin und Diphtherietoxinrezeptor .....	8
1.5 Das DEREK-Mausmodell .....	9
1.6 <i>Listeria monocytogenes</i> -Infektionsmodell .....	10
2 Materialien und Methoden* .....	11
2.1 Chemikalien und Reagenzien .....	11
2.2 Puffer und Lösungen .....	11
2.3 Stimulationssubstanzen .....	12
2.4 Medien und Medienzusätze .....	12
2.5 Sonstige Materialien .....	12
2.6 Geräte .....	12
2.7 Mauslinien .....	13
2.8 Bakterienstämme und Infektion der Mäuse .....	13
2.9 Bestimmung der Bakterienlast .....	13
2.10 Depletion der T <sub>reg</sub> -Zellen mit Diphtherietoxin .....	14
2.11 Isolation von Lymphozyten aus Organen der Maus .....	14
2.11.1 Aufreinigung der Lymphozyten aus der Milz .....	14
2.11.2 Aufreinigung der Lymphozyten aus der Leber .....	14
2.12 Zellzahlbestimmung .....	15
2.13 Antikörper .....	15
2.14 Stimulation der T-Zellen .....	16

2.15 FACS-Färbung .....	16
2.15.1 Extrazelluläre FACS-Färbung.....	17
2.15.2 Intrazelluläre FACS-Färbung.....	17
2.16 FACS-Messung .....	17
2.16.1 FACS – <i>Fluorescence activated cell sorting</i> – Durchflusszytometrie .....	17
2.16.2 FACS – Durchführung und Auswertung der Ergebnisse .....	18
2.17 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	19
2.18 TNF- $\alpha$ ELISA.....	20
2.19 Limulus Amöbozyten Lysat-Test.....	20
2.20 TLR/NOD Analysen .....	21
2.21 Phagozytostest .....	21
2.22 Statistische Auswertung .....	21
3 Ergebnisse .....	23
3.1 Wirkungen von Diphtherietoxin auf Mechanismen des angeborenen Immunsystems ..	23
3.1.1 Einfluss von Diphtherietoxin auf die Suszeptibilität von Mäusen gegenüber <i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
3.1.2 Effekt von Diphtherietoxin auf die Listerienlast in Mäusen.....	25
3.1.3 Wirkungen einer Diphtherietoxininjektion auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten .....	27
3.1.4 Zeitlicher Verlauf der Dt-Wirkung auf Immunzellen .....	30
3.1.5 Einfluss von Diphtherietoxin auf die Phagozytoseaktivität von Makrophagen.....	32
3.2 Untersuchung von Diphtherietoxin auf Verunreinigungen.....	34
3.2.1 SDS-PAGE.....	34
3.2.2 Limulus Amöbozyten Lysat-Test.....	35
3.2.3 TNF- $\alpha$ Synthese nach <i>in vitro</i> Stimulation mit Diphtherietoxin.....	35
3.2.4 Stimulation von TLR2-, TLR4-, NOD1- und NOD2-Reporterzellen mit Diphtherietoxin.....	38
3.3 Wirkungen einer Dt getriggerten T <sub>reg</sub> -Depletion auf Mechanismen des adaptiven Immunsystems.....	41
3.3.1 Wirkungen einer von Beginn der Infektion durchgeführten T <sub>reg</sub> -Depletion auf das adaptive Immunsystem.....	41
3.3.2 Wirkungen einer im Verlauf der Infektion durchgeführten T <sub>reg</sub> -Depletion auf das adaptive Immunsystem.....	43
3.4 Foxp3 <sup>+</sup> T-Zellen produzieren inflammatorische Zytokine nach Listerieninfektion .....	47

4 Diskussion .....	50
4.1 Diphtherietoxin-Rezeptor gesteuerte Zellablationsmodelle: Schwierigkeiten der Interpretation .....	50
4.2 Die toxische Wirkung von Diphtherietoxin beruht nicht auf Verunreinigungen.....	51
4.3 Die Dt-Injektion hat einen toxischen Effekt auf den Organismus der Maus .....	52
4.4 Auswirkung einer Dt getriggerten T <sub>reg</sub> -Zelldepletion auf das angeborene Immunsystem .....	53
4.5 Auswirkung einer Dt getriggerten T <sub>reg</sub> -Zelldepletion auf das adaptive Immunsystem..	54
4.6 Foxp3 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen sind in der Lage inflammatorische Zytokine zu produzieren.....	57
4.6 Resümee und Ausblick.....	60
5 Zusammenfassung .....	61
6 Abkürzungsverzeichnis .....	62
7 Literaturverzeichnis.....	63
8 Danksagung .....	72
9 Lebenslauf .....	73
10 Eidesstattliche Versicherung .....	74

# Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

T<sub>reg</sub>-Zellen verhindern autoimmune Prozesse sowie überschießende Immunreaktionen bei Infektionen, indem sie das angeborene und adaptive Immunsystem supprimieren. Um den Einfluss von T<sub>reg</sub>-Zellen auf die Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) zu untersuchen, kombinierten wir das Dereg-Mausmodell (engl. **Depletion of regulatory T cells**) mit einem Listerien-Infektionsmodell. Dereg-Mäuse tragen den humanen Diphtherietoxinrezeptor transgen auf T<sub>reg</sub>-Zellen. Durch die Gabe von Diphtherietoxin (Dt) können daher gezielt T<sub>reg</sub>-Zellen depletiert werden.

Im Laufe der Arbeit kristallisierte sich heraus, dass bereits die Dt-Injektion selbst einen nicht unerheblichen Effekt auf den Verlauf der Infektion hat, da auch in nicht-transgenen Tieren eine veränderte Immunantwort nach Dt-Gabe beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund ging der Analyse der T<sub>reg</sub>-Zellfunktion eine Untersuchung der Diphtherietoxineffekte in Wildtyp-Mäusen voraus. Es sollte geklärt werden, ob und wieweit ein Toxin-Effekt Auswirkungen der T<sub>reg</sub>-Zelldepletion überlagert und hierdurch die mit dem Dereg-Mausmodell gewonnenen Ergebnisse verfälscht.

In entsprechend mit Wildtyp-Mäusen kontrollierten Experimenten sollte einerseits unabhängig vom Infektionsmodell die Funktion von T<sub>reg</sub>-Zellen für das angeborene Immunsystem analysiert werden, insbesondere der Einfluss auf die Akkumulation und den Aktivierungsgrad von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Andererseits sollte in der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* der Einfluss von T<sub>reg</sub>-Zellen auf die T-Zellantwort sowohl in Bezug auf die frühe als auch auf die späte Phase geprüft werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß eine Infektion mit *L. monocytogenes* die Differenzierung und Zytokinproduktion von T<sub>reg</sub>-Zellen verändert. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf einer Ausprägung eines Th1-Effektorzytokinprofils und damit verbunden einer Erweiterung des Aufgabenspektrums der T<sub>reg</sub>-Zellen.

Zusammenfassend hat diese Dissertationsarbeit das Ziel, die Rolle von T<sub>reg</sub>-Zellen in der Infektion mit einem bakteriellen Krankheitserreger zu charakterisieren.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem: Einführung

Das Immunsystem des Menschen hat die Aufgabe, den Körper vor allem Fremden zu schützen, das potentiellen Schaden anrichten kann. Hierzu kontrolliert es den Körper kontinuierlich auf toxische Substanzen, Mikroorganismen und Viren sowie eigene gestresste oder entartete Zellen. Diesen Schutz gewährleisten das angeborene und das adaptive Immunsystem.

Damit sich die Immunantwort nicht gegen gesunde körpereigene Zellen richtet, ist eine Abstimmung zwischen Aktivierung und Hemmung erforderlich. Störungen dieser fein austarierten Abstimmung können zu verringerten oder überschießenden Reaktionen des Immunsystems führen. Konsequenzen wären z.B. eine ungenügende Kontrolle von Infektionen, Allergien oder Autoimmunerkrankungen. Regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ -Zellen) tragen einen großen Teil zum Ausgleich zwischen Aktivierung und Hemmung bei, indem sie Immunantworten aktiv eindämmen.

## 1.2 Die angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort wird häufig als „erste Linie der Verteidigung“ bezeichnet. Vereinfachend kann man diese in drei Felder aufteilen: Physikalische Barrieren, wie die Epithelien, zelluläre Komponenten, wie Phagozyten, und lösliche oder humorale Komponenten, wie das Komplementsystem. Eine weitere wichtige Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist die Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

### 1.2.1 Die Phagozyten des angeborenen Immunsystems

Die wichtigsten Phagozyten des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen (DC). Diese Zellen sind mit Rezeptoren ausgestattet, die häufig vorkommende mikrobielle Strukturen erkennen. Die in den Epithelbarrieren lokalisierten Makrophagen sind meistens die ersten Phagozyten, die mit einem Eindringling in Kontakt kommen. Dies führt zur Ausschüttung von Zytokinen, die neutrophile Granulozyten und weitere Makrophagen anlocken und in den meisten Fällen bereits zu einer effizienten Kontrolle des Eindringlings. DC transportieren phagozytiertes Material in sekundäre lymphatische Organe, um sie den T-Lymphozyten zu präsentieren und dadurch eine

erworbene Immunantwort in Gang zu setzen. Makrophagen können grundsätzlich in zwei unterschiedliche Richtungen differenzieren: M1-Makrophagen, durch ein Milieu von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und bakterielle Bestandteile z.B. Lipopolysaccharid (LPS) induziert, haben verstärkte zytotoxische und antitumorale Eigenschaften. Auf der anderen Seite stehen M2-Makrophagen, denen eher eine immunregulatorische Aktivität zugeschrieben wird. Sie entstehen vor allem nach Aktivierung in Gegenwart von Interleukin-10 (IL-10), IL-4 und IL-13 [1]. T<sub>reg</sub>-Zellen sind wahrscheinlich an der Differenzierung zu M2-Makrophagen beteiligt [2]. Im Gegenzug induzieren M2-Makrophagen die Entwicklung von T<sub>reg</sub>-Zellen und verhindern die Entstehung von T-Helfer-17-Zellen (T<sub>H</sub>17-Zellen) [3, 4].

### **1.3 Die adaptive Immunantwort**

Die adaptive Immunantwort entwickelt sich im Gegensatz zu Mechanismen des angeborenen Immunsystems erst im Verlauf der Immunantwort. Professionelle antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen und dendritische Zellen) phagozytieren mikrobielle Bestandteile und prozessieren die enthaltenen Proteine zu Peptiden, die dann in sekundären Lymphgeweben den T-Zellen im Kontext mit Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC-Moleküle) präsentiert werden. In einem Schlüssel-Schloss-Prinzip werden T-Lymphozyten mit passendem T-Zellrezeptor durch Peptid-MHC-Komplexe aktiviert. Es folgt eine fulminante klonale Expansion der aktivierten T-Lymphozyten. Nach etwa vier bis fünf Tagen stehen ausreichend Lymphozyten für eine nennenswerte adaptive Immunantwort zur Verfügung. T-Zellen können in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen untergliedert werden. CD8<sup>+</sup> Lymphozyten bilden die Killerzellen, die infizierte Zellen erkennen und zerstören. CD4<sup>+</sup> Lymphozyten können weiter in T-Helferzellen und Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften unterteilt werden. T-Helferzellen prägen schließlich je nach Art des Infektionserregers unterschiedliche Zytokinprofile aus und werden dann unter anderem in T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen untergliedert. [5]

#### **1.3.1 Regulatorische T-Zellen**

##### **1.3.1.1 Überblick**

Generell ist mittlerweile akzeptiert, dass Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen eine zentrale Rolle in der peripheren Toleranz gegenüber Selbstantigenen aber auch bestimmten Fremdantigenen, z.B. Bestandteilen von Nahrungsmitteln oder von Kommensalen des Darmtrakts, spielen. Eine ausschlaggebende Bedeutung haben sie bei der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen,

wie zum Beispiel Typ 1 Diabetes, Asthma oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [6]. Eine wichtige Funktion ist schließlich die Kontrolle der Immunantwort gegen Pathogene: T<sub>reg</sub>-Zellen begrenzen überschießende Immunreaktionen und limitieren dadurch immunpathologische Prozesse. Unter bestimmten Umständen können T<sub>reg</sub>-Zellen aber auch protektive Immunantworten gegen Pathogene und Tumore begrenzen [6].

### **1.3.1.2 Geschichtlicher Hintergrund**

Das Konzept von suppressiven oder regulatorischen Lymphozyten, die Immunantworten begrenzen, sei es gegen den eigenen Organismus oder fremde Strukturen, wurde bereits 1971 postuliert [7]. Bisher wurden unterschiedliche Zellen mit immunmodulatorischen Funktionen in Verbindung gebracht: Für Toleranz erzeugende dendritische Zellen und myeloide Suppressor-Zellen, Natürliche Killer-T-Zellen sowie IL-10 produzierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen gibt es Hinweise, dass sie die mit der Immunantwort einhergehende Entzündung einschränken [8]. Während der letzten 15 Jahre haben sich allerdings Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen als zentrale Akteure der Immunsuppression und der damit zusammenhängenden Immunhomöostase in den Vordergrund geschoben [8]. Seit Mitte der 1980er Jahre wurden Transfer- und Depletionsexperimente durchgeführt, um in Mausmodellen für Autoimmunerkrankungen die Population der regulatorischen Zellen zu identifizieren [9, 10]. Erste Hinweise auf die Identität der regulatorischen Zellen ergab die Depletion von Zellen mithilfe des anti-CD5-Antikörpers Lyt-1 [11]. Dieser Antikörper wurde verwendet, weil in Vorversuchen gezeigt worden war, dass nach einer neonatalen Thymektomie, die eine Autoimmunreaktion in Ovarien verursachte, vor allem Lyt-1<sup>hoch</sup> Zellen vermindert waren [12]. Ein weiterer Schritt war die Identifizierung einer geringen Ausprägung des Oberflächenmoleküls CD45RB auf potentiellen regulatorischen Zellen [13]. Schließlich gelang in Mäusen die Erzeugung einer disseminierten Autoimmunität nach Injektion einer CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation, in der vorher die CD25<sup>+</sup> Zellen depletiert worden waren [14, 15]. Die Autoimmunerkrankung konnte gestoppt werden, indem die zuvor depletierte Population von CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen nachträglich injiziert wurde. CD25 wird seither als wichtiges Merkmal für die Identifikation von T<sub>reg</sub>-Zellen verwendet. Das Molekül CD25 ist die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors und wird auf 5-10% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert [9]. Da aber auch aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD25 auf ihrer Oberfläche tragen, ist die Identifizierung von T<sub>reg</sub>-Zellen durch CD25 nicht unproblematisch. So sind im humanen Blut ca. 30% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD25

positiv, aber nur die 1-2% dieser Population mit der höchsten CD25-Expression zeigen eine ausgeprägte suppressive Aktivität [16, 17].

### **1.3.1.3 Identifikation von *foxp3*: Ein Marker für regulatorische T-Zellen**

Ein wichtiger Schlüssel zur weiteren Identifikation von regulatorischen T-Zellen war das humane IPEX-Syndrom (Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie und x-chromosomal gebundene Vererbung). Das IPEX-Syndrom ist das humane Äquivalent zum „Scurfy-Mouse“-Syndrom [18] und manifestiert sich in Autoimmunerkrankungen unterschiedlicher Organe [19, 20]. Merkmale der Erkrankung sind eine erhöhte Proliferation von CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> Zellen, massive Organinfiltrate und eine Erhöhung diverser T<sub>H</sub>1- wie auch T<sub>H</sub>2-Zytokine [8, 21]. Beide Syndrome beruhen auf Mutationen des *foxp3* Gens [20]. Foxp3, Forkhead Box Protein 3, ist ein 47kDa großes Protein, das zur Gruppe der Forkhead/winged-Helix Familie von Transkriptionsfaktoren gehört. Diese Proteine tragen eine Forkhead-Domäne, welche für Kernlokalisierung und DNA-Bindung verantwortlich ist [22]. Die Familie umfasst aktivierende und inhibierende Transkriptionsfaktoren, Foxp3 zählt zu den Inhibitoren [23].

Es zeigte sich, dass die Expression von Foxp3 essentiell für die Entwicklung einer CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zelle ist [24-26]. In der Maus scheint die Foxp3-Expression auf T<sub>reg</sub>-Zellen beschränkt zu sein [27-30]. Im Menschen findet sich Foxp3 ebenfalls in T<sub>reg</sub>-Zellen, aber auch konventionelle T-Zellen zeigen eine transiente Foxp3 Ausprägung nach Aktivierung, die jedoch nicht mit einer suppressiven Aktivität einhergeht [31, 32]. Unabhängig von der Frage, ob Foxp3 exklusiv in T<sub>reg</sub>-Zellen vorkommt, ist es aber bisher unstrittig, dass Foxp3 essentiell für ihre Entstehung und die Ausprägung der spezifischen Funktionen von T<sub>reg</sub>-Zellen ist [24-26, 33, 34].

### **1.3.1.4 Entstehung von „natürlichen“ T<sub>reg</sub>- und „induzierten“ T<sub>reg</sub>-Zellen**

T<sub>reg</sub>-Zellen entstehen entweder im Thymus als unabhängige T-Zellsubpopulation (natürliche T<sub>reg</sub>-Zellen, nT<sub>reg</sub>) oder sie differenzieren in der Peripherie aus konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf von Entzündungs- und Infektionsgeschehen (induzierte T<sub>reg</sub>-Zellen, iT<sub>reg</sub>). T<sub>reg</sub>-Zellen unterdrücken die Immunantwort durch Produktion von Zytokinen, wie IL-10, TGF-β und IL-35, sowie durch zellkontaktabhängige Hemmung [6, 35, 36]. Mehrere Studien konnten für nT<sub>reg</sub>-Zellen zeigen, dass sie durch hoch-afide Interaktionen ihres T-Zell-

Rezeptors (TCR) mit MHC II-Molekülen im Thymus entstehen [27, 36-40]. Neben dieser „Agonist-Selektion“ scheint es aber alternative Reifungswege für  $T_{reg}$ -Zellen im Thymus zu geben [41]. Periphere T-Zellen können nach TCR- und TGF- $\beta$ -Stimulation ebenso Foxp3 exprimieren und einen regulatorischen Phänotyp ( $iT_{reg}$ ) erwerben [42]. Aufgrund der Fülle an Stimuli durch Nahrungsmittelantigene und Antigenen der residenten Darmflora besteht im Magen-Darm-Trakt ein starker Bedarf an regulatorischer Aktivität. Das darmassoziierte Lymphgewebe wird deshalb als Hauptbildungsort für  $iT_{reg}$ -Zellen angesehen [43].  $iT_{reg}$ -Zellen werden aber ebenso in chronisch entzündetem Gewebe, zum Beispiel der Lunge [44], Tumoren [45] und transplantiertem Gewebe [46] induziert. Im Magen-Darm-Trakt begünstigt unter nicht inflammatorischen Bedingungen eine Kombination aus TGF- $\beta$  und Retinsäure (einem Vitamin A Metabolit), welche hier durch  $CD103^+$  DC gebildet wird [47, 48], die Entwicklung von  $T_{reg}$ -Zellen aus  $CD4^+$  Foxp3 $^-$ -Zellen [43, 49]. Ein anschauliches Beispiel für die Induktion von  $T_{reg}$ -Zellen zeigten Mucida *et al.*: Nach oraler Gabe von Ovalbumin (OVA) konnten OVA-spezifische  $T_{reg}$ -Zellen in den mesenterialen Lymphknoten nachgewiesen werden [50]. Nach aktuellem Stand benötigen  $iT_{reg}$ -Zellen zur Entstehung TGF- $\beta$ , IL-2 sowie eine TCR-Stimulation [36]. Die Abwesenheit von TGF- $\beta$  hindert Mäuse in einem Autoimmunmodell an einer Toleranzentwicklung [51, 52].

Die Bildung von  $T_{reg}$ -Zellen und T-Effektor-Zellen läuft in der Regel koordiniert ab und beide Populationen beeinflussen sich gegenseitig. Zytokine, die die Bildung von T-Helfer-Zellen begünstigen, wirken gleichzeitig antagonistisch auf die Bildung von  $T_{reg}$ -Zellen [53]. Fördert beispielsweise die Zusammensetzung der Bakterienflora die Bildung von  $T_H17$ -Zellen, so verringert sich meist die Zahl der  $T_{reg}$ -Zellen. Umgekehrt verursacht ein die  $T_{reg}$ -Zellen förderndes Zytokinmilieu meist eine Verkleinerung der  $T_H17$ -Zellpopulation [54].

### 1.3.1.5 Stabilität der Foxp3-Expression

Die Unterscheidung in  $nT_{reg}$ -Zellen und  $iT_{reg}$ -Zellen geht einher mit der Frage nach der Stabilität der Foxp3-Expression. Aus dem Thymus stammende  $nT_{reg}$ -Zellen haben die  $T_{reg}$ -spezifische demethylierte Region (TSDR) im *foxp3*-Lokus vollständig demethyliert [55].  $nT_{reg}$ -Zellen zeigen daher eine dauerhafte Foxp3 Expression [55, 56]. Die Stabilität der TSDR-Demethylierung in  $nT_{reg}$ -Zellen ist jedoch umstritten [57] und scheint auch abhängig vom immunologischen Umfeld zu sein [58]. Im Gegensatz zu  $nT_{reg}$ -Zellen zeigt sich bei *in vitro* generierten  $T_{reg}$ -Zellen nur eine eingeschränkte Demethylierung der TSDR. So verlieren *in vitro* generierte  $T_{reg}$ -Zellen ihre Foxp3-Expression und ihre regulatorische Aktivität bei

Restimulation in Abwesenheit von TGF- $\beta$  [59, 60]. Interessanterweise zeigen *in vivo* erzeugte iT<sub>reg</sub>-Zellen eine vollständige Demethylierung, vergleichbar zu nT<sub>reg</sub>-Zellen [61]. Aufgrund unterschiedlicher Analysezeitpunkte der Demethylierung in diesen *in vivo* und *in vitro* Experimenten zogen Curotto de Lafaille und Lafaille [36] den Schluss, dass sich der Grad der Demethylierung mit zunehmender Reifung in iT<sub>reg</sub>- wie auch in nT<sub>reg</sub>-Zellen vervollständigt.

Prinzipiell ist die Foxp3-Expression in iT<sub>reg</sub>-Zellen *in vivo* reversibel, wahrscheinlich als Anpassung an inflammatorische Signale. T<sub>reg</sub>-Zellen verlieren bei hohen IL-6 Konzentrationen ihre Eigenschaften und prägen Merkmale von T<sub>H</sub>17 Zellen aus [62, 63]. Bei einer letalen *Toxoplasma gondii*-Infektion wurde eine drastische Abnahme der T<sub>reg</sub>-Zellpopulation beobachtet. Die noch verbleibenden T<sub>reg</sub>-Zellen bildeten teilweise proinflammatorische Charakteristika aus, wie die Produktion von IFN- $\gamma$  [64]. Auch unter lymphopenischen Umständen können Foxp3<sup>+</sup>-Zellen ihre Foxp3-Expression verlieren [65]. Zhou *et al.* beobachteten sogar, dass vormalige Foxp3<sup>+</sup> Zellen in entzündeten Geweben einer Autoimmunerkrankung vorhanden waren und inflammatorische Zytokine ausschütteten. Dies führte sie zur Aussage, dass Instabilität von Foxp3 Autoimmunität auslösen kann [57]. Aufgrund des hohen Anteils an selbstreaktiven T-Zellrezeptoren in T<sub>reg</sub>-Zellen [66] ist eine Konversion von T<sub>reg</sub>-Zellen in Effektorzellen als potentieller Mechanismus der Genese von Autoimmunerkrankungen durchaus plausibel [57].

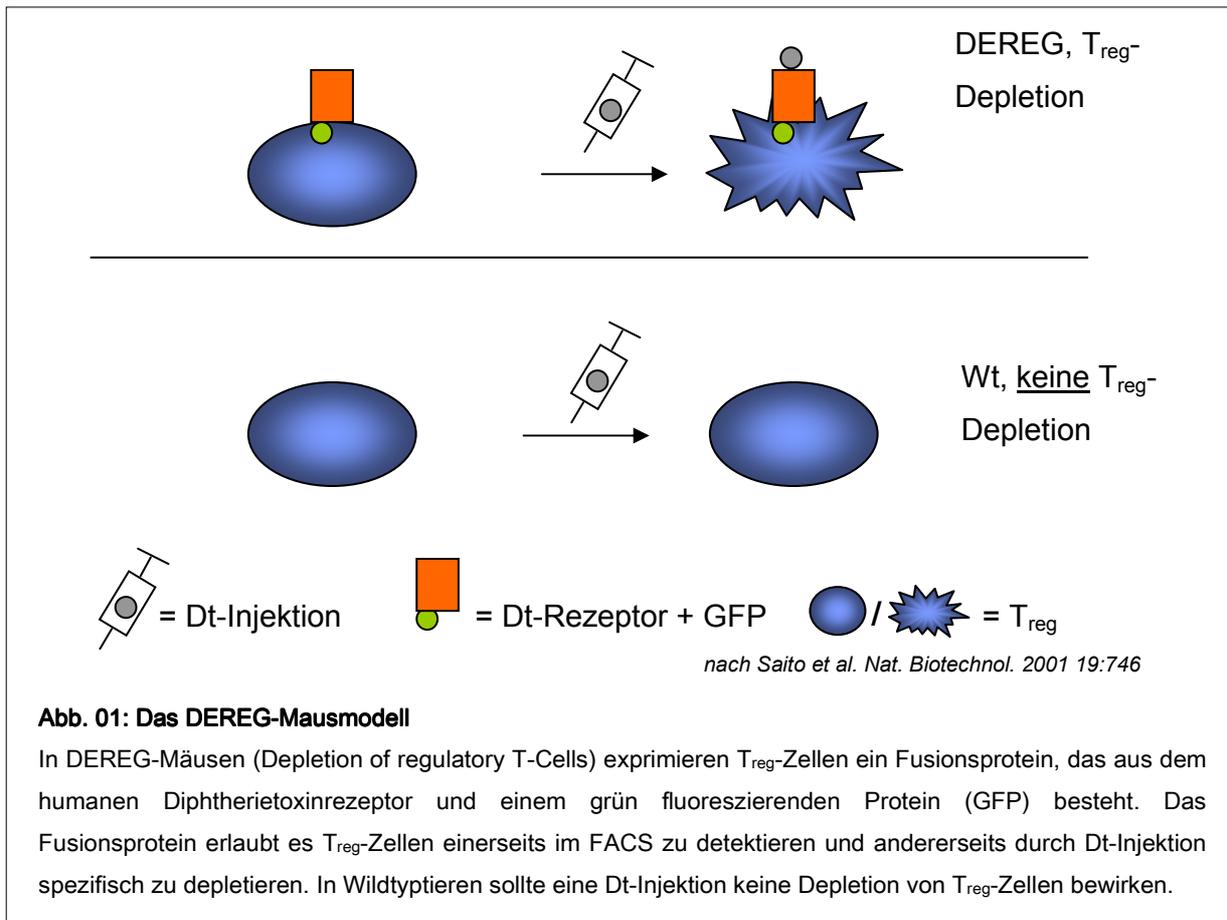
### 1.3.1.6 Regulatorische T-Zellen in chronischen Infektionen

Viele chronische Infektionen sind mit erhöhten Population an T<sub>reg</sub>-Zellen assoziiert [67, 68]. Eine Akkumulation von Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen zeigt sich zum Beispiel in *Helicobacter pylori*-Infektionen [69] oder parasitären Wurmbesiedlungen [70, 71]. Nach *Helicobacter pylori* Infektionen sind in der Mukosa des Darmes erhöhte Konzentrationen an TGF- $\beta$ - und Foxp3-Transkripten zu finden [69]. Auch für chronisch virale Infektionen wird eine erhöhte T<sub>reg</sub>-Zellaktivität beschrieben [72]. In der chronischen Hepatitis-C-Virus-Infektion beobachtet man neben einer unzureichenden DC Aktivität [73] auch eine Akkumulation an T<sub>reg</sub>-Zellen [74, 75]. Anscheinend beeinflusst HCV die T<sub>reg</sub>-Entstehung direkt durch eine Hochregulation der TGF- $\beta$ -Synthese in infizierten Hepatozyten [76].

## **1.4 Diphtherietoxin und Diphtherietoxinrezeptor**

Diphtherietoxin (Dt) ist eines der am besten erforschten bakteriellen Toxine [77]. Nur mit dem Corynebacterien  $\beta^{\text{tox+}}$  infizierte *Corynebacteria diphtheriae* synthetisieren Dt [78-81]. Als einzelne Polypeptidkette synthetisiert [82], kann Dt *in vitro* durch Trypsinverdau der durch eine Disulfidbrücke verbundenen Untereinheiten in zwei Fragmente gespalten werden (Dt-A und Dt-B) [82, 83]. Das Toxin bindet über die Dt-B-Untereinheit an den Dt-Rezeptor und wird über eine rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. In der Zelle wird Dt-A im sauren Milieu des späten Endosoms abgespalten und in das Zytoplasma transloziert [84, 85]. Dt-A katalysiert die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2 (EF-2), was zu einer Inhibition der Proteinbiosynthese durch Translokationshemmung und damit zur Apoptose führt [86-88]. Der humane Diphtherietoxinrezeptor (DtR) wurde als membranständige Form des Heparin bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors (HB-EGF) identifiziert [89]. Während HB-EGF Vorstufen aus toxinsensitiven Spezies wie Mensch oder Affe Dt-B mit einer hohen Affinität binden [90], ist die Interaktion von HB-EGF Vorstufen der Maus mit Dt  $10^3$ - $10^5$ -fach niedriger [91]. Die Ursache liegt im Austausch von Aminosäuren in der äußeren Region des murinen HB-EGF [92, 93].

## 1.5 Das DEREK-Mausmodell



DEREG (von engl. **Depletion of regulatory T-Cells** [94]) Mäuse tragen auf der Oberfläche von  $T_{reg}$ -Zellen den humanen Diphtherietoxin-Rezeptor (DtR), welcher mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) markiert ist. Hierzu wurde ein bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) konstruiert, welches im *Foxp3*-Lokus für ein Fusionsprotein aus humanem DtR und GFP kodiert. Folglich wird das Fusionsprotein unter Kontrolle des *foxp3*-Promotors nur in  $T_{reg}$ -Zellen transkribiert. Das DEREK-Mausmodell erlaubt deshalb die einfache Identifizierung und Charakterisierung von  $T_{reg}$ -Zellen über die GFP-Expression. Zusätzlich ist eine gezielte Depletion der  $T_{reg}$ -Zellen durch eine Behandlung der Maus mit Dt möglich. Ein großer Vorteil der Depletion mittels Dt ist, dass die Zelle in die Apoptose geführt und sie nicht unmittelbar zerstört wird [95, 96]. Damit unterliegt sie dem regelhaften Abbau einer nicht mehr funktionsfähigen Körperzelle, sodass keine proinflammatorischen Signale ausgesendet werden. Die Depletion als solche kann daher als immunologisch neutral angesehen werden [97].

Mit dem DtR-System sind unterschiedliche transgene Mäuse generiert worden. Beispielhaft soll hier die CD11c-DtR-Maus beschrieben werden, um potentielle Probleme dieser Modelle

zu demonstrieren. Das CD11c-DtR-Modell zielt auf eine spezifische Depletion von CD11c<sup>+</sup> DC ab. Eine wiederholte systemische Dt-Applikation resultiert aber im Tod der Mäuse [98]. Es wird vermutet, dass die Letalität durch eine DtR-Expression in nicht hämatopoetischen Zellen verursacht wird, da auch CD11c-DtR Mäuse mit Wt-Knochenmark nach mehrfacher Injektion sterben [99] beziehungsweise Wt-Mäuse mit CD11c-DtR Knochenmark weniger sensitiv sind [100]. Weiterhin wurde berichtet, dass metallophile Makrophagen der Milz [101] sowie Alveolarmakrophagen depletiert werden [102]. Auch andere Immunzellsubpopulationen, die eine geringe CD11c-Expression aufwiesen (CD8<sup>+</sup> Zellen [98, 100], B-Zellen [100], Plasmazellen [103], NK-Zellen [104]), waren gegenüber Dt-Injektion sensitiv. Diese Befunde zeigen die eminente Wichtigkeit eines geeigneten Promotors, der hochspezifisch nur in der zu depletierenden Zellpopulation aktiv ist.

Im DEREK-Modell scheint ein „Kollateralschaden“ der Dt-Depletion von untergeordneter Bedeutung im Vergleich zum CD11c-Modell zu sein. Zwar gibt es Hinweise auf eine Expression von *Foxp3* in nichthämatopoetischen Zellen [105-107], jedoch kann man von einer nur sehr geringen *Foxp3*-Expression in diesen Geweben ausgehen. Auch Ergebnisse aus Experimenten mit der Scurfy-Maus bestätigen eine auf T<sub>reg</sub>-Zellen beschränkte Expression von Foxp3 [108]. Es besteht daher die begründete Annahme, dass mit der Foxp3-DtR transgenen Maus ein Modell etabliert wurde, welches eine grundlegende Analyse der Funktion von T<sub>reg</sub>-Zellen ermöglicht. Die Nützlichkeit dieses Mausmodells erwies sich unter anderem in diversen Fragestellungen innerhalb der Tumor- [109], Allergie- [110] und Infektionsforschung [111].

## **1.6 *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell**

Die Infektion der Maus mit dem fakultativ intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* bietet ein gut definiertes Infektionsmodell, in dem sowohl der Infektionsverlauf als auch die antibakterielle Immunantwort und hier insbesondere die T-Zellantwort gut charakterisiert sind [112, 113]. In der frühen Phase der Immunantwort, die durch Zellen des angeborenen Immunsystems bestimmt wird, zeichnen sich Granulozyten und dann vor allem Makrophagen für die Begrenzung der Bakterienreplikation verantwortlich. In der späten Phase der Immunantwort sind die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen des adaptiven Immunsystems für die Eradikation der Bakterien essentiell. Zu Gedächtniszellen differenzierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bieten einen deutlichen Schutz bei erneuter Infektion.

# 2 Materialien und Methoden\*

## 2.1 Chemikalien und Reagenzien

BFA (Brefeldin A)	Sigma (Steinheim)
BSA (Bovines Serum Albumin)	SERVA (Heidelberg)
FCS (Fötales Kälber Serum, von engl. <i>fetal calf serum</i> )	PAA (Pasching)
NRS (Natives Rattenserum)	Jackson Immuno Research (Baltimore)
Percoll Auftrennlösung	BIOCHROM AG (Berlin)
Saponin	Sigma (Steinheim)
TSB (Tryptische Soja Bouillon)	BD (Heidelberg)

Alle Standardchemikalien stammen von Serva (Heidelberg), Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe).

## 2.2 Puffer und Lösungen

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, von engl. <i>phosphate buffered saline</i> ) (Pulver)	Sigma (Steinheim)
1x PBS (Lösung)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Saponinpuffer	in PBS
	0,1% (w/v) BSA
	0,3% (w/v) Saponin
Erylysepuffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl
	10 mM KHCO <sub>3</sub>
	100µM EDTA
	pH ~7.2

### 2.3 Stimulationssubstanzen

LLO <sub>190-201</sub> -Peptid (Listeriolysin O)	NEKYAQAYPNVS, JPT, Berlin
OVA <sub>257-264</sub> -Peptid (Ovalbumin)	SIINFEKL, JPT, Berlin
PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat)	Sigma (Steinheim)
Ionomycin	Sigma (Steinheim)

### 2.4 Medien und Medienzusätze

RPMI 1640	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Gentamycin	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Glutamin	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
RPMI komplett	zu RPMI 1640:
	10 % FCS
	2 mM Glutamin
	50 mg/ml Gentamycin
	50 μM β-Mercaptoethanol
TSB-Medium	Zu 1L destilliertem Wasser:
	20 g TSB
	30 g Bacto Agar

### 2.5 Sonstige Materialien

Die Standardlabormaterialien (wie zum Beispiel Plastikpipetten und Reaktionsröhrchen) stammen von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickenhäusen), Nunc (Langenselbold), BD (Heidelberg), Millipore (Billerica) und Eppendorf (Hamburg).

### 2.6 Geräte

<b>FACS-Gerät</b>	
BD FACS Canto II	BD (Heidelberg)
<b>Photometer</b>	
Multilabel Counter 1420 Victor3™	PerkinElmer (Rodgau)

Bei den Geräten für Zell- und Bakterienkultur, sowie für Zell- und Bakterienaufreinigung handelt es sich um Standardlaborgeräte.

## 2.7 Mauslinien

C57BL/6	Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA)
DEREG C57BL/6	Prof. Dr. Tim Sparwasser (Hannover)[94]
DEREG BALB/c	Prof. Dr. André Gessner (Erlangen)

Alle Mäuse wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gezüchtet. Zucht sowie Durchführung der Versuche erfolgten nach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes (Tierversuchsanträge: G06/074 und G09/021). Die verwendeten Tiere waren überwiegend zwischen 8 und 14 Wochen alt und wurden gleichmäßig nach Geschlecht und Alter sortiert auf die Gruppen verteilt.

## 2.8 Bakterienstämme und Infektion der Mäuse

<i>Listeria monocytogenes</i> Stamm EGD ( <i>Lm</i> EGD)	bereitgestellt durch Dr. S.H.E. Kaufmann (Berlin)
<i>Listeria monocytogenes</i> Stamm OVA ( <i>Lm</i> OVA)	bereitgestellt durch Dr. H. Shen (Philadelphia) [114]

Die verwendeten Mäuse wurden mit  $2,5 \times 10^4$  *Lm* EGD oder mit  $5 \times 10^4$  *Lm* OVA i.v. infiziert. Die Bakterien wurden in einem Volumen von 200  $\mu$ L PBS in eine der lateralen Schwanzvenen der Maus injiziert. Die Bakterienstocks wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Im Inokulum wurde die Infektionsdosis durch sequentielles Ausplattieren kontrolliert.

## 2.9 Bestimmung der Bakterienlast

Nach der Organentnahme wurden Leber und Milz einzeln in mit 1 ml sterilem PBS gefüllte Kunststoffbeutel gegeben. Die Organe wurden zu einer homogenen Suspension zerdrückt und in einer seriellen Verdünnung auf TSB (Tryptische Soja Bouillon) Agar ausplattiert. Nach 1-3 Tagen bei einer Inkubationstemperatur von  $30^\circ\text{C}$  wurden die auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien (CFU; engl. *colony forming unit*) ausgezählt.

## **2.10 Depletion der $T_{reg}$ -Zellen mit Diphtherietoxin**

Diphtherietoxin (Cat #322326, 1 mg Calbiochem) wurde in sterilem PBS in Aliquots zu je 10 µg Dt in 100 µL PBS gelöst, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und nur einmal zur Injektion wieder aufgetaut. 1 µg oder 2,5 µg Dt, jeweils in 250 µL sterilem PBS gelöst, wurden der Maus intraperitoneal injiziert. Es wurden zwei unterschiedliche Chargen Dt verwendet (Charge 1: #D00024793, Charge 2: #D00092160).

## **2.11 Isolation von Lymphozyten aus Organen der Maus**

Die Milzzellen und Leberzellen wurden nach dem laborinternen Standardprotokoll aufgereinigt [115]. Die Mäuse wurden mit einem Gemisch aus  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  sowie einem zusätzlichen Genickbruch getötet. Milz und Leber wurden steril entnommen, in 5 mL bzw. 20 mL PBS aufgenommen, und wie folgend beschrieben aufgereinigt. Die Leber wurde zusätzlich vor der Entnahme mit 5 mL PBS perfundiert.

### **2.11.1 Aufreinigung der Lymphozyten aus der Milz**

Die Milz wurde zusammen mit dem PBS auf ein Sieb ( $\varnothing$  200 µm) in eine Petrischale gegeben. Mit dem Kolben einer Spritze wurde die Milz in dem Sieb zerdrückt und homogenisiert. Das Sieb wurde mit 5 mL PBS gespült und die Zellsuspension 5 min bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 mL PBS resuspendiert und über einen 70 µm Zellsieb filtriert. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 250 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zur Erythrozytenlyse in 3 mL Erylysepuffer resuspendiert und 3 min inkubiert. Es wurden 12 mL PBS mit 0.2% BSA zugegeben und die Suspension wurde 5 min bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 mL PBS resuspendiert und diese Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung eingesetzt.

### **2.11.2 Aufreinigung der Lymphozyten aus der Leber**

Die Leber wurde zusammen mit dem PBS auf ein Sieb in eine Petrischale gegeben. Mit dem Kolben einer Spritze wurde die Leber in dem Sieb zerdrückt und homogenisiert. Das Sieb wurde mit 20 mL PBS gespült und die Zellsuspension über einen 70 µm Zellsieb filtriert. Die filtrierte Zellsuspension wurde 5 min bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 mL 40% Percoll Auftrennlösung in RPMI aufgenommen und auf 3 mL 70% Percoll Auftrennlösung in RPMI geschichtet. Dieser Gradient wurde 20 min bei 530 g ohne Bremse zentrifugiert. Der obere rosa-farbige Ring, der Zelltrümmer und Hepatozyten

enthält, wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Lymphozyten in der Interphase wurden in ein 50 mL Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und 5 min bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zur Erythrozytenlyse in 3 mL Erylysepuffer resuspendiert und 3 min inkubiert. Es wurden 12 mL PBS mit 0.2% BSA zugegeben und 5 min bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in der überbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und diese Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung eingesetzt.

## 2.12 Zellzahlbestimmung

Die Konzentration der Zellen in einer Zellsuspension kann mittels eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) bestimmt werden. Die Zellsuspension wurde zur Färbung der T-Zellen 1:10 in Trypanblau-Lösung verdünnt und an dem Rand der Zählkammer in die Zählkammer pipettiert. In mindestens einem der großen Quadrate wurden die Zellen gezählt und der Mittelwert  $\bar{x}$  berechnet. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach der Formel:

$$x = \bar{x} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnung} \text{ mL}^{-1}$$

## 2.13 Antikörper

Antikörper gegen	Fluorochrom	Klon	Firma
CD4	APC-eFluor 780	RM4-5	eBioscience (San Diego)
CD4	APC	RM4-5	BD Bioscience (Heidelberg)
CD4	PerCP	RM4-5	BD Bioscience (Heidelberg)
CD8 $\alpha$	PerCP	53-6.7	BD Bioscience (Heidelberg)
CD8 $\alpha$	PE-Cy7	53-6.7	eBioscience (San Diego)
F4/80	Alexa Fluor 647	BM8	eBioscience (San Diego)
Gr1 (Ly6C+Ly6G)	eFluor450	RB6-8C5	eBioscience (San Diego)
Gr1 (Ly6C+Ly6G)	Pacific Blue	RB6-8C5	Institut für Immunologie (UKE Hamburg)
CD11b	PE	M1/70	BD Bioscience (Heidelberg)
IL-17A	PE	TC11-18H10	BD Bioscience (Heidelberg)
IFN- $\gamma$	V450	XMG1.2	BD Bioscience (Heidelberg)
TNF- $\alpha$	Cy5	MP6-XT22	eBioscience (San Diego)
TNF- $\alpha$	PE-Cy7	MP6-XT22	BD Bioscience (Heidelberg)

CD16+CD32	ungekoppelt	2.4G2	Institut für Immunologie (UKE Hamburg)
-----------	-------------	-------	---

## 2.14 Stimulation der T-Zellen

Die Stimulation der T-Zellen erfolgte in FACS-Röhrchen. Es wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz vorgelegt. Die Zellen wurden entweder mit Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) und Ionomycin (Iono) oder mit den Peptiden LLO<sub>189-201</sub> und OVA<sub>257-264</sub> stimuliert. Eine unstimulierte Kontrolle wurde als Referenzwert mitgeführt. PMA und Iono dienen der polyklonalen Stimulation von T-Zellen. LLO<sub>189-201</sub> aktiviert Listeriolysin-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen, während OVA<sub>257-264</sub> Ovalbumin-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert. Diese Peptide stellen immundominante Epitope aus *Lm* OVA dar, die in C57BL/6 Mäusen starke T-Zellantworten induzieren. Die immundominanten Peptide erlauben die Analyse der spezifischen T-Zellantwort in der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit *Lm* OVA. Die Stimulation erfolgte jeweils in einem Gesamtvolumen von 1 mL RPMI 1640 komplett (siehe 2.4.). Die folgende Tabelle zeigt in welchen Mengen die Stimulationssubstanzen eingesetzt wurden.

Stimulationssubstanz	Endkonzentration
PMA	50 ng/ $\mu$ L
Iono	1 $\mu$ M
LLO <sub>189-201</sub>	$10^{-5}$ M
OVA <sub>257-264</sub>	$10^{-6}$ M

Nach Zugabe der Stimulationssubstanzen wurde 30 min bei 37°C inkubiert und dann der Exozytosestopper Brefeldin A (Endkonzentration: 10  $\mu$ g/mL) zugegeben. Dadurch wird eine intrazelluläre Färbung der durch die Stimulationssubstanzen angeregten Syntheseprodukte ermöglicht. Es wurde weitere 3,5 h bei 37°C inkubiert [113].

## 2.15 FACS-Färbung

Für die FACS-Färbungen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ L vorgelegt. Vor der FACS-Färbung muss die Oberfläche der Zellen blockiert werden, damit unspezifische Bindungen der Antikörper verhindert werden. Pro Ansatz wurden 1  $\mu$ L NRS (natives Rattenserum) und 0,5  $\mu$ L F<sub>c</sub>-Block (anti-CD16/CD32 Antikörper) in 20  $\mu$ L PBS verdünnt, zu den Zellen

gegeben und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. NRS blockiert unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Oberfläche der Zellen. Der F<sub>c</sub>-Block bindet spezifisch und blockiert F<sub>c</sub>-Rezeptoren und verhindert, dass diese den F<sub>c</sub>-Teil der Antikörper binden.

### **2.15.1 Extrazelluläre FACS-Färbung**

Für die extrazelluläre FACS-Färbung wurden die gewünschten Antikörper pro Ansatz in 20 µL PBS verdünnt (Endkonzentration abhängig vom Antikörper: 0,1-1 µg/Ansatz), auf die Zellen gegeben, die Suspension im Vortex-Gerät durchmischt und 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und direkt zur Messung eingesetzt.

### **2.15.2 Intrazelluläre FACS-Färbung**

Nach der extrazellulären Färbung wurden pro Ansatz 200 µL 2% PFA in PBS zugegeben. Die Suspension wurde 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,2% BSA in PBS gewaschen. Die intrazelluläre Blockierung erfolgte durch 1 µL NRS und 0,5 µL F<sub>c</sub>-Block in 20 µL Saponinpuffer. Es wurde 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Für die intrazelluläre FACS-Färbung wurden die gewünschten Antikörper pro Ansatz in 20 µL Saponinpuffer verdünnt, auf die Zellen gegeben und die Suspension wurde 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, resuspendiert und im FACS gemessen.

## **2.16 FACS-Messung**

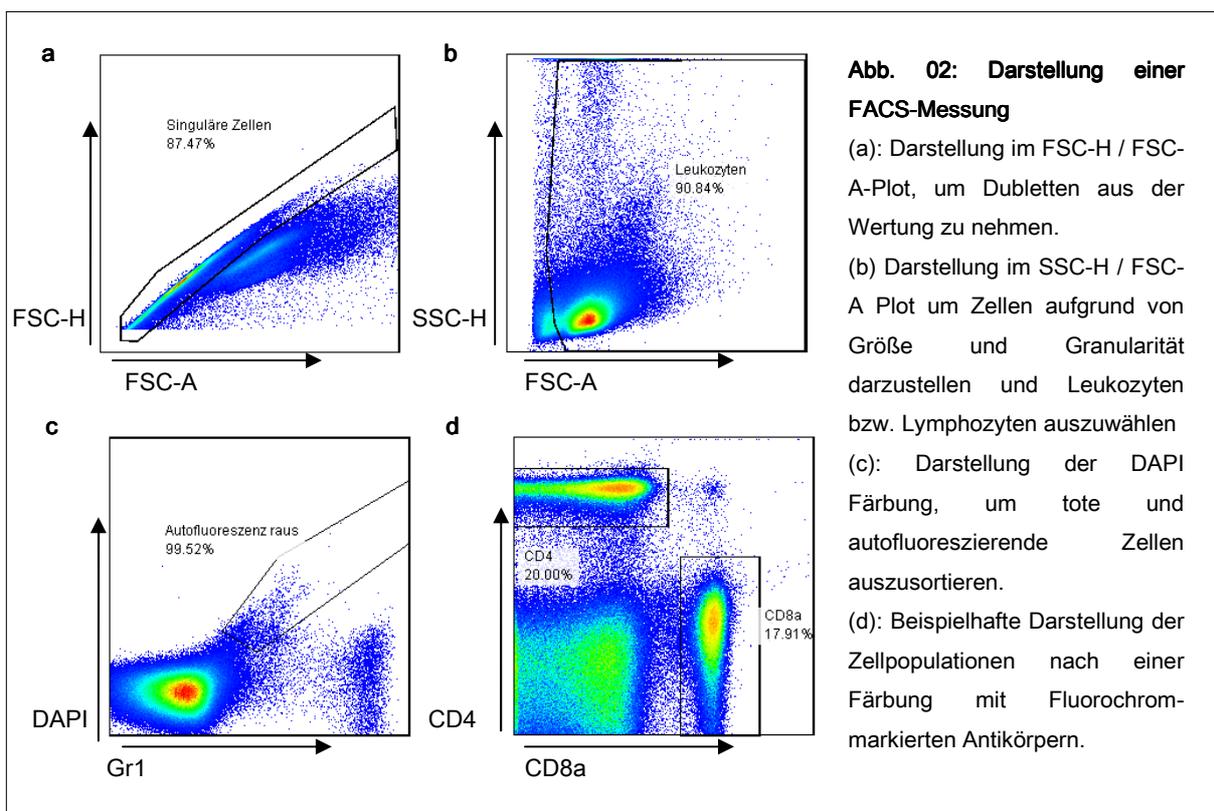
### **2.16.1 FACS – *Fluorescence activated cell sorting* – Durchflusszytometrie**

Die FACS-Technologie ermöglicht es, Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und ihrer intrazellulären sowie extrazellulären Moleküle zu unterscheiden. Die Zellen werden wie oben beschrieben für die extrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle (2.15.1) oder für die intrazelluläre Färbung mit Antikörpern gegen intrazelluläre Moleküle (2.15.2), wie zum Beispiel Zytokine, inkubiert. Diese Antikörper sind an ein Fluorochrom gekoppelt, das bei Anregung durch einen Laser das Licht in einer spezifischen Wellenlänge emittiert. Im FACS-Gerät werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom linear angeordnet und durch die Detektionszelle gespült. Hier werden die Zellen mit unterschiedlichen Lasern angeregt und die Fluoreszenzqualität wie auch die -intensität detektiert. Jede Zellpopulation besitzt aufgrund der Bindung verschiedener Fluorochrom-gekoppelter Antikörper ein

individuelles Fluorochromprofil, das später eine Identifikation ermöglicht. Zusätzlich werden das seitliche Streulicht (SSC, Seitwärtsstreulicht, proportional zur Granularität der Zelle) und das leicht gebrochene Durchlicht (FSC, Vorwärtsstreulicht, proportional zur Größe der Zelle) gemessen.

## 2.16.2 FACS – Durchführung und Auswertung der Ergebnisse

Vor der ersten Messung müssen die Fluorochrome gegeneinander kompensiert werden, um falsch-positive Signale auszuschließen, die sich durch die Überlagerung der Emissionswellenlängen einiger dieser Farben ergeben. Hierzu wurde jedes verwendete Fluorochrom und ungefärbte Zellen einzeln gemessen. Hiermit können falsch-positive Signale, die bei den Einzelfärbungen in fremde Kanäle strahlen, erkannt und von den echten Signalen abgezogen werden. Die verwendete Software BD DIVA ermöglicht eine automatische Kompensation der Signale, die manuell nachbearbeitet werden kann. Nach der Kompensation kann die Messung der zu untersuchenden Proben begonnen werden.



Es gelingt nicht immer alle Zellen für die Messung im Flüssigkeitsstrom voneinander zu trennen, sodass bei der Auswertung zuerst die Dubletten, die als eine Zelle gemessen wurden,

aus der Auswertung genommen werden. Dies erfolgte durch die Darstellung im FSC-H / FSC-A-Plot (Abb. 02 a). Folgend wurden die ausgewählten einzelnen Zellen im SSC-H / FSC-A-Plot angezeigt (Abb. 02 b), welcher Informationen über die Granularität und Größe der Zellen darstellt. Dieser ermöglicht es die Lymphozyten und anderen Leukozyten in relativ abgegrenzten Populationen zu visualisieren. Durch eine Auswahlregion um die Lymphozyten oder Leukozyten, ist es nun möglich andere Signale, wie zum Beispiel tote Zellen und Erythrozyten, elektronisch von der weiteren Auswertung auszuschließen. Als letzter Schritt vor der Analyse der Oberflächenmoleküle werden die noch in der Auswahl der Leukozyten enthaltenen toten und autofluoreszierenden Zellen aus der zu untersuchenden Population herausgenommen. Dies erfolgt durch den Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid), den tote Zellen aufgrund einer nicht mehr intakten Zellmembran aufnehmen und der in die DNA interkaliert (Abb. 02 c).

In der anstehenden Untersuchung werden die Zellpopulationen anhand der Verteilung und Stärke der Fluorochromsignale unterteilt. Die vorher mit dem Fluorochrom markierten Antikörper geben dabei Aufschluss über die jeweilige Zelle, an die sie gebunden haben (Abb. 02 d).

Als Analysegerät diente das FACS Canto II (BD Lifesciences, Heidelberg), die Auswertung der FACS-Messung erfolgte mit der FlowJo-Software (Tree Star, Ashland USA).

## **2.17 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Das SDS-Gel (engl. *sodium dodecyl sulfate*) wurde mit dem NOVEX NuPAGE Elektrophorese-System (invitrogen) durchgeführt. Es wurden 12% Bis-TRIS-Gele und MES-Puffer verwendet.

10  $\mu$ L der zu untersuchenden Probe wurden mit 5  $\mu$ L 4  $\times$  Probenpuffer und 2,5  $\mu$ L 10  $\times$  Reduktionsmittel versetzt und 10 min bei 75°C inkubiert. Neben den zu untersuchenden Proben wurde ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 200V für 30 bis 45 min durchgeführt. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Dazu wurde das Gel dreimal in ca. 100 mL Aqua dest. und einmal mit dem blauen Coomassie-Farbstoff in der Mikrowelle aufgeköcht. Das Gel wurde mindestens 15 min bei RT geschüttelt und bis zur gewünschten Bandenintensität mit Wasser und Zellstoff entfärbt. Das Gel wurde in einer Zellophan Membran getrocknet und dokumentiert.

## **2.18 TNF- $\alpha$ ELISA**

Zur Durchführung des TNF- $\alpha$  ELISA wurde das DuoSet® ELISA Development System von R&D Systems (DY410) verwendet.

Flachboden 96-Napfplatten (Nunc-Immuno Plate Maxisorp™) wurden mit TNF- $\alpha$  Fang-Antikörpern beschichtet (0,8  $\mu\text{g/mL}$  PBS, jeweils 50  $\mu\text{L}$  pro Napf). Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurde dreimal mit 200  $\mu\text{L}$  PBS (0,1% Tween) gewaschen und anschließend mit 150  $\mu\text{L}$  PBS 1% BSA blockiert. Nach 4 Stunden bei 4°C wurde die Platte dreimal mit PBS (0,1% Tween) gewaschen. Es folgte die Doppelbestimmung, bei der je 100  $\mu\text{L}$  der Probe pro Napf eingesetzt wurden. Parallel wurde eine Standardkurve zur Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen durchgeführt. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, dreimal mit PBS (0,1% Tween) gewaschen und mit 50  $\mu\text{L}$ /Napf eines Biotin-Detektionsantikörpers (75 ng/mL PBS) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (0,1% Tween) wurde 50  $\mu\text{L}$  Streptavidin-HRP-Lösung/Napf (engl. *Horseradish Peroxidase*, R&D Systems, Part No 890803) hinzugegeben und die Platte 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (0,1% Tween) wurden 100  $\mu\text{L}$ /Napf 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma) pipettiert und bis zu 20 min inkubiert (je nach Geschwindigkeit des Farbumschlags). Der Farbumschlag wurde mit 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Platte bei 450 nm im Multilabel Counter 1420 Victor3™ (PerkinElmer, Rodgau) gemessen.

## **2.19 Limulus Amöbozyten Lysat-Test**

Es wurde der Limulus Amöbozyten Lysat-Test QCL-1000 von Cambrex nach dem Standardprotokoll der Firma verwendet. In diesem Test wird ein Proenzym aus den Limulus-Amöbozyten Zelllysaten (LAL) in Gegenwart von Endotoxin aktiviert und spaltet dann von einem chromogenen Substrat das im Photometer detektierbare p-Nitroanilin ab.

Dieser Test ist ein quantitativer Test für das Endotoxin gramnegativer Bakterien. Der Probe wird LAL zugegeben und die Lösung bei 37 °C 10 min inkubiert. Die Substratlösung wird dann zur LAL-Probe hinzugegeben und das Gemisch bei 37 °C 6 min inkubiert. Die Reaktion wird mit Stopplösung (25% Essigsäure) beendet.

Bei einer LPS-positiven Probe ist ein gelber Farbumschlag zu beobachten. Die Absorption wurde bei 450 nm im Photometer gemessen. Die LPS-Konzentration der Probe wurde mit einer Standardkurve berechnet.

## **2.20 TLR/NOD Analysen**

Die Analysen wurden von PD Dr. Holger Heine im Forschungszentrum Borstel durchgeführt. Die Durchführung der Analysen ist in Inamura *et al.* 2006 beschrieben [116]. Das Grundprinzip des Versuchsansatzes beruht auf einer Stimulation von Mustererkennungsrezeptoren (TLR: engl. *Toll-like* Rezeptor, NOD: Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne). HEK293-Zellen wurden mit verschiedenen TLR- oder NOD-Proteinen transfiziert, die jeweils eine Subklasse mikrobieller Strukturen erkennen. Nach Inkubation dieser Zellen mit den zu testenden Substanzen wird die Aktivierung der Zellen anhand ihrer IL-8-Produktion gemessen. Aus der Höhe der IL-8-Antwort kann auf die Konzentration des untersuchten Antigens geschlossen werden.

## **2.21 Phagozytosestest**

Es wurde der Phagotest der Firma Orpegren verwendet.  $2 \times 10^7$  FITC-markierte *E. coli*-Bakterien wurden zu  $1 \times 10^6$  Milzzellen in ein FACS-Röhrchen gegeben. Bei 37°C wurde die Zellsuspension in einem Wasserbad für 30 min inkubiert. Eine gleichartig zusammengestellte Negativkontrolle blieb während dieser Zeit bei 4 °C auf Eis. Nach Ablauf der 30 min wurden die Zellen zur Negativkontrolle ins Eis gestellt. 200 µL Quenching Lösung wurden zu beiden Suspensionen gegeben. Mithilfe dieser Quenching Lösung ist es möglich Anhaftung von Internalisation zu unterscheiden, da die Fluoreszenz von außerhalb der Zelle liegenden *E. coli* durch die Quenching Lösung maskiert wird. Dies bewirkt, dass nur internalisierte *E. coli* in den FITC-Kanal strahlen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, extrazellulär gefärbt und im FACS analysiert.

## **2.22 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, USA) sowie SPSS 19 (IBM Corporation, New York, USA) durchgeführt. Als statistische Tests wurden ein Log-Rank-Test und ein ANOVA in Kombination mit einem Bonferroni-Posttest verwendet. Die Analysen in einem allgemeinen linearen Modell wurden in Kooperation mit Frau Susanne Sehner des Instituts für Biometrie des UKE durchgeführt. In den Graphiken zeigt \* eine Signifikanz zum Niveau  $p < 0,05$  an, \*\* zu  $p < 0,01$  und \*\*\* zu  $p < 0,001$ .

**\*Anmerkung:**

Die Abschnitte 2.1-2.9 und 2.11-2.17 des Teils „Material und Methoden“ wurden teilweise aus der Masterarbeit „*Die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 in der Immunantwort gegen Listeria monocytogenes*“ von Frau Kira Heesch, AG Mittrücker, übernommen.

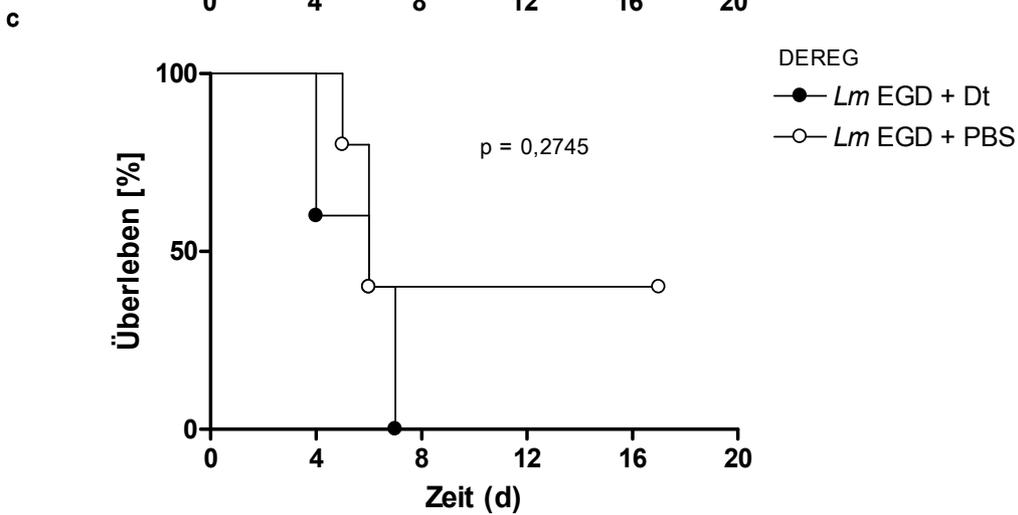
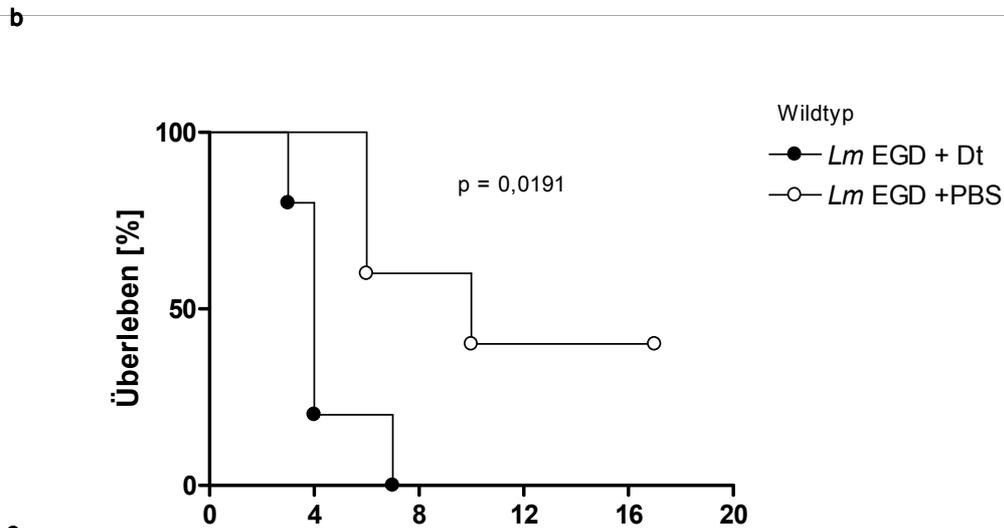
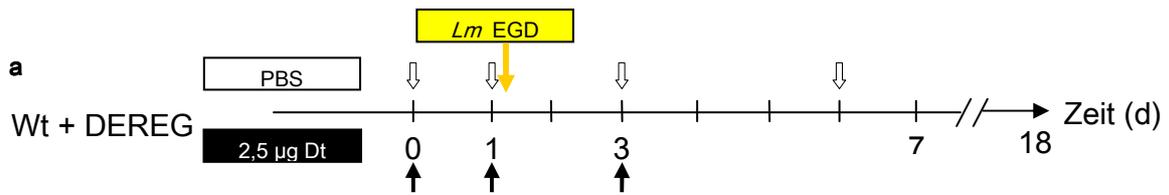
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Wirkungen von Diphtherietoxin auf Mechanismen des angeborenen Immunsystems

#### 3.1.1 Einfluss von Diphtherietoxin auf die Suszeptibilität von Mäusen gegenüber *Listeria monocytogenes*

In der hier vorliegenden Dissertationsschrift sollte der Verlauf der Listerieninfektion im DEREK-Mausmodell untersucht werden. Deshalb war es erforderlich, die Verträglichkeit der gleichzeitigen Gabe von Listerien und Dt in der Maus zu testen. Um für die folgenden Experimente Nebenwirkungen mit größerer Sicherheit ausschließen zu können, wurde eine relativ hohe Dt-Dosis von 2,5 µg verwendet. Diese Dosis liegt etwa 2,5fach über der Dt-Konzentration, die in der Erstbeschreibung der DEREK-Maus verwendet wurde [94]. C57BL/6 DEREK- und Wildtyp-Mäuse wurden mit  $3 \times 2,5 \mu\text{g}$  Dt (Charge 1) oder als Kontrolle mit PBS behandelt (Abb. 3a). An Tag 1 erhielten die Tiere  $2,5 \times 10^4$  *Lm* EGD. Diese *Lm* EGD-Dosis liegt leicht über der LD<sub>50</sub> für C57BL/6-Tieren von etwa  $1 \times 10^4$ . Der Versuchsansatz erlaubt daher eine sensitive Analyse der toxischen Wirkung von Dt, sowohl auf die frühe angeborene als auch auf die späte erworbene Immunantwort.

Ohne Dt-Gabe zeigten beide Mauslinien gegenüber einer Infektion mit *Lm* EGD eine ähnliche Suszeptibilität, in beiden Gruppen starben etwa die Hälfte der Tiere. Die Dt-Injektion führte in den DEREK-Tieren, aber überraschenderweise auch in den Wildtyp-Tieren, zu einer deutlich höheren Sensibilität gegenüber Listerien. In beiden Mauslinien starben nach Dt-Gabe alle Tiere, wobei sich in den Wildtyp-Tieren im Vergleich zu den DEREK-Mäusen sogar eine verkürzte Überlebenszeit zeigte (Abb.3). Dies bedeutet, dass eine Dt-Injektion nicht als neutrale Behandlung angesehen werden darf. Weiterhin ergibt sich die Frage nach den Mechanismen der Dt-Wirkung in den Wildtyp-Tieren.



**Abb. 03 Letale Wirkung der Kombination von *Lm* EGD mit Diphtherietoxin**

Jeweils fünf C57BL/6 DEREK- und Wildtyp-Mäuse wurden mit *Lm* EGD ( $2,5 \times 10^4$ , d1) und  $3 \times 2,5 \mu\text{g}$  Dt (d0, d1, d3) injiziert. Als Negativkontrolle für Dt diente PBS. Die Tiere wurden täglich kontrolliert und moribunde Tiere getötet. (a) Versuchsaufbau, (b) Überlebenskurve der Wildtyp-, und (c) der DEREK-Tiere

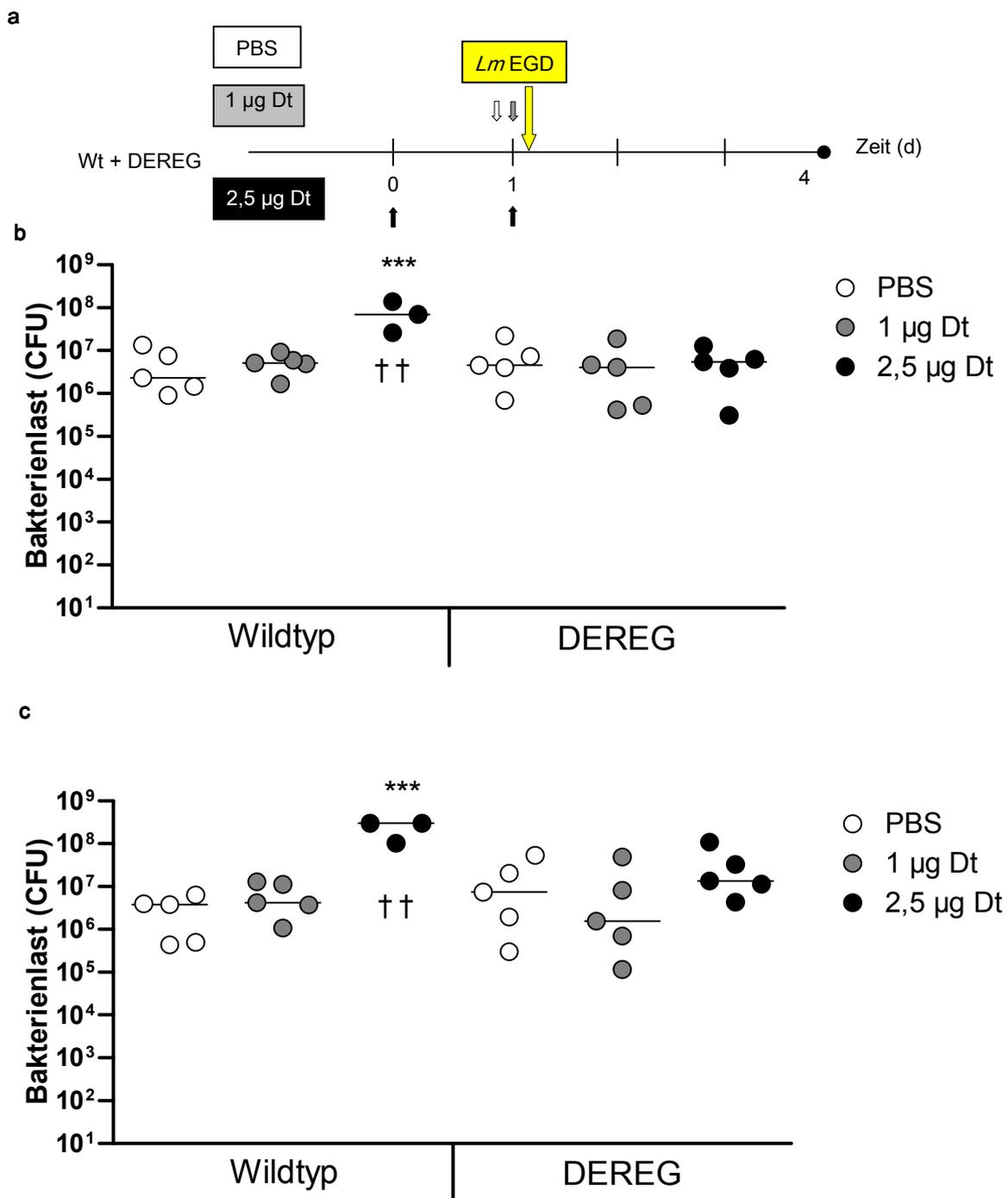
### 3.1.2 Effekt von Diphtherietoxin auf die Listerienlast in Mäusen

Nachdem gezeigt wurde, dass Mäuse nach einer gleichzeitigen Injektion mit Listerien und Diphtherietoxin eine erhöhte Sterblichkeit aufwiesen, wurde in diesem Experiment untersucht, ob die Dt-Behandlung zu einer verminderten Bakterienkontrolle führt oder ob die erhöhte Sterblichkeit unabhängig von der Bakterienlast hauptsächlich auf der Dt-Wirkung selbst beruht.

BALB/c-Wildtyp und DEREK-Mäuse wurden in jeweils drei Gruppen aufgeteilt: Zwei Gruppen wurden mit unterschiedlichen Dt-Dosen (Charge 2) behandelt, eine Negativkontrollgruppe mit PBS. Die Dt-Injektionsgruppen unterteilten sich in eine Gruppe mit einer Dosis von  $2 \times 2,5 \mu\text{g Dt}$  und eine Gruppe mit  $1 \times 1 \mu\text{g Dt}$  (Abb. 04a). Alle Tieren erhielten  $2,5 \times 10^4 Lm$  EGD Organismen i.v. an Tag 1. Drei Tage nach der Infektion (d4) wurden Milz und Leber entnommen und die Bakterienlast bestimmt. Zwei Wildtyp-Tiere, die mit  $2 \times 2,5 \mu\text{g Dt}$  behandelt worden waren, starben vor dem Analysezeitpunkt.

Wildtyp- und DEREK-Tiere zeigten in der Milz und Leber drei Tage nach Infektionsbeginn vergleichbare Bakterientiter. Die Injektion von  $1 \times 1 \mu\text{g Dt}$  hatte keine Auswirkungen auf die Kontrolle der Bakterien. Die Gabe  $2 \times 2,5 \mu\text{g Dt}$  führte in den Wildtyp-Mäusen, nicht aber in den DEREK-Mäusen, zu einem signifikanten Anstieg der Bakterientiter.

Prinzipiell sind diese Beobachtungen im Einklang mit dem vorherigen Experiment. Eine hohe Dt-Dosis hat einen negativen Effekt auf die Kontrolle der Listerien, was auf eine verminderte bzw. gestörte Immunantwort gegenüber den Bakterien schließen lässt. In den DEREK-Mäusen wird der toxische Dt-Einfluss möglicherweise durch die  $T_{\text{reg}}$ -Zelldepletion kompensiert.



**Abb. 04: Erhöhte Bakterienlast in Mäusen nach 2 × 2,5 µg Dt-Injektion**

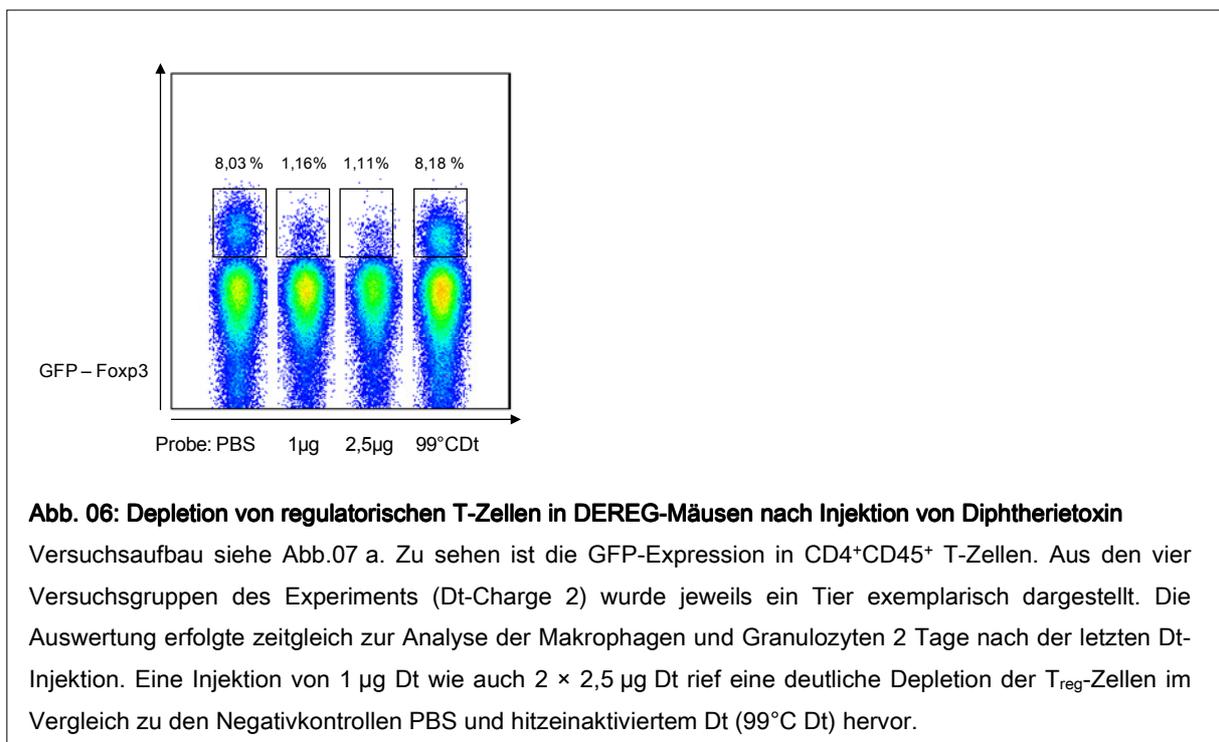
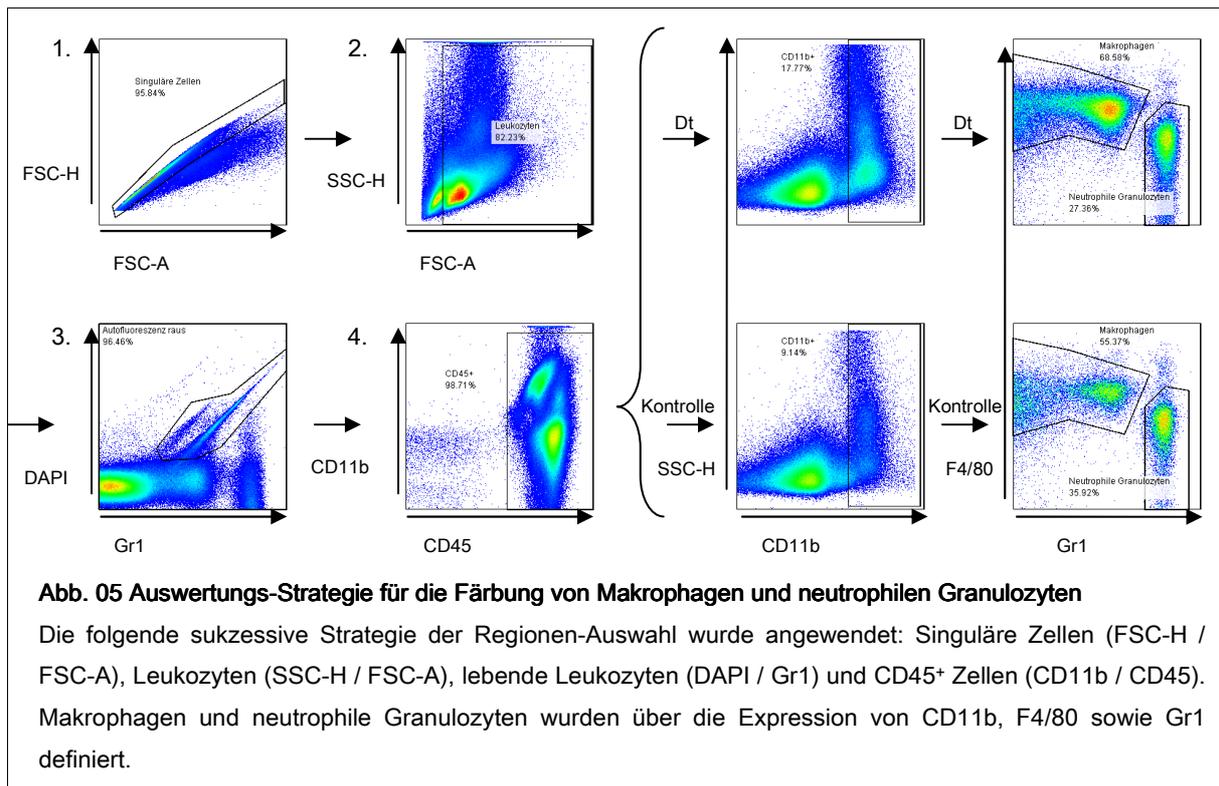
BALB/c-Wildtyp und DEREK-Mäuse wurden in jeweils drei Gruppen aufgeteilt: Zwei Gruppen wurden mit unterschiedlichen Dt-Dosen: 1 × 1 µg Dt (d1) oder 2 × 2,5 µg Dt (d0, d1) behandelt, eine Negativkontrollgruppe mit PBS. Allen Tieren wurde zusätzlich eine Dosis von 2,5 × 10<sup>4</sup> *LmEGD* i.v. injiziert. Es wurde Milz und Leber entnommen (d4) und die Bakterienlast bestimmt.

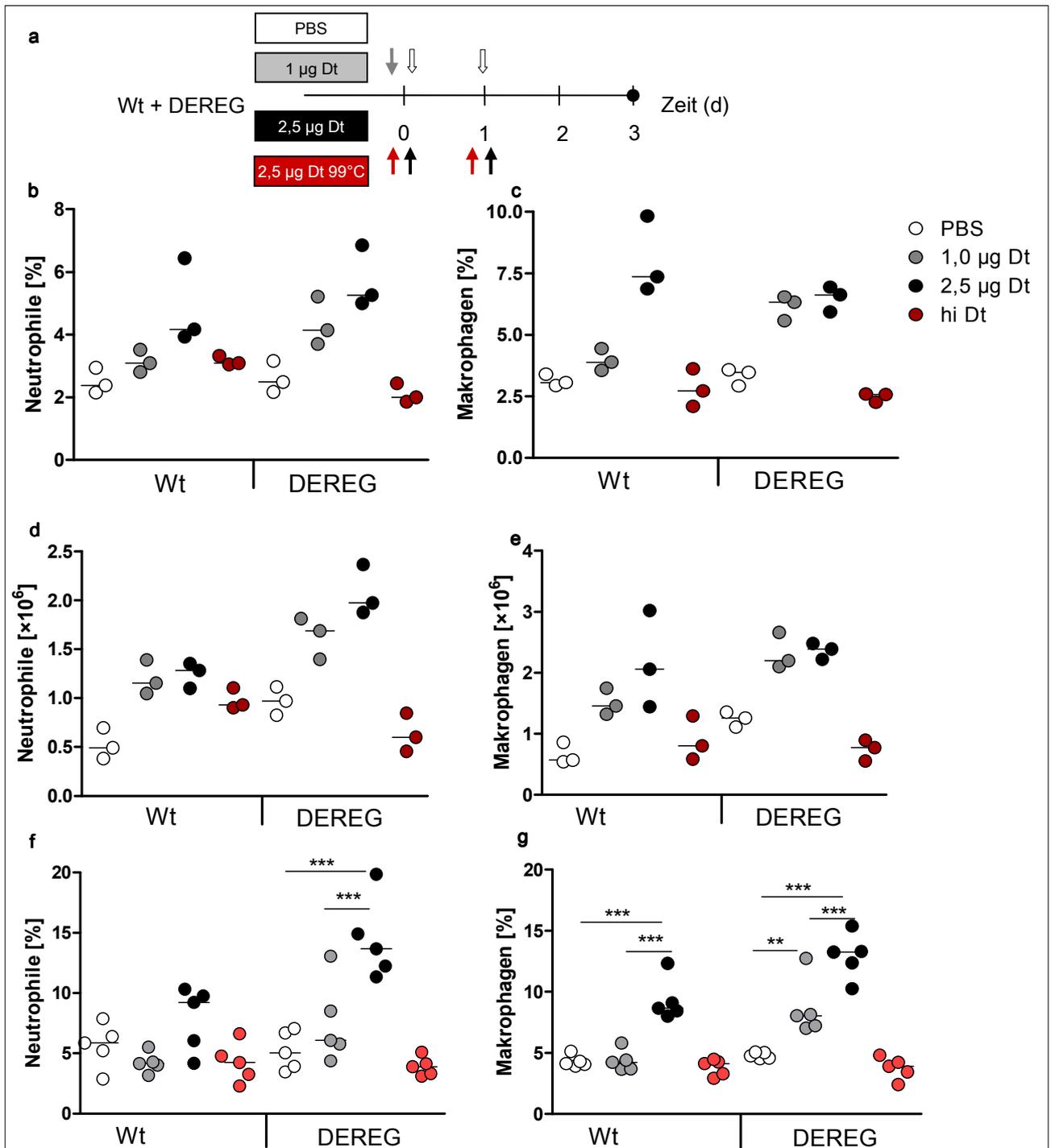
(a) Versuchsaufbau (b+c) *LmEGD* Titer drei Tage nach der Infektion (d4) in der Milz (b) und Leber (c) Ein ANOVA mit einem Bonferroni-Posttest wurde zur statistischen Analyse verwendet. Zum Zeitpunkt der Analyse bereits verstorbene Tiere wurden mit einem Kreuz markiert. Die Querbalken markieren den Median.

### 3.1.3 Wirkungen einer Diphtherietoxininjektion auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten

Im folgenden Versuch wurde analysiert, welchen Einfluss die T<sub>reg</sub>-Zelldepletion in DEREK Mäusen auf Zellen der angeborenen Immunantwort hat. Gleichzeitig sollte geklärt werden, in welchem Umfang eine von der T<sub>reg</sub>-Zelldepletion unabhängige Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten stattfindet. Auch in dieser Versuchsserie wurde eine relativ hohe Dt-Dosis ( $2 \times 2,5 \mu\text{g Dt}$ ) sowie die in der Erstpublikation der DEREK-Tiere beschriebene Dosis ( $1 \times 1 \mu\text{g Dt}$ ) verwendet [94]. Das Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander mit unterschiedlichen Dt-Chargen des gleichen Anbieters durchgeführt (Calbiochem Charge 1: # D00024793 und Charge 2: #D00092160).

C57BL/6 Wildtyp- und DEREK-Mäuse wurden mit den oben genannten Dosen an Dt behandelt. Die Negativkontrollen erhielten entweder denaturiertes Dt (30min auf 99°C erhitzt) oder PBS (Abb. 05 a). An Tag 3 wurden die myeloiden Zellen der Milz mit Antikörpern gegen CD11b, F4/80 und Gr1 analysiert. CD11b ist auf allen myeloiden Zellen vorhanden. F4/80 ist ein Mitglied der transmembranen Epidermal Growth Factor 7 Familie und spezifisch für Makrophagen und Subpopulationen von dendritischen Zellen [117]. Gr1 bindet Ly6G, ein Glycosylphosphatidylinositol-verankertes Protein, das hauptsächlich auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, sowie Ly6C, welches ebenso auf neutrophilen Granulozyten zu finden ist [118]. Makrophagen wurden als CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Gr1<sup>niedrig</sup> und neutrophile Granulozyten als CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>niedrig</sup> Gr1<sup>hochpositiv</sup> Zellen definiert. Zusätzlich wurden die toten Zellen mit dem DNA-Farbstoff DAPI und alle Leukozyten durch einen anti-CD45-Antikörper markiert (Abb. 05-07).





**Abb. 07: Akkumulation von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nach Injektion von Dt**

C57BL/6 Wildtyp- und DEREK-Mäusen wurde 1 × 1 µg Dt (d0) oder 2 × 2,5 µg Dt (d0, d1) injiziert. Als Negativkontrollen dienten PBS sowie hitzeinaktiviertes Dt (hi Dt: 2,5 µg Dt 30 min 99°C, je d0, d1). Es wurden zwei unterschiedliche Dt-Chargen eingesetzt. Es zeigte sich eine dosis- und chargenabhängige Akkumulation von Makrophagen sowie Neutrophilen in relativen wie auch absoluten Zellzahlen.

(a) Versuchsaufbau, (b-e) Dt-Charge 1, (f-g) Dt-Charge 2; (b+f) Neutrophile (CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup> Gr1<sup>hochpostiv</sup>) innerhalb der CD45<sup>+</sup> Leukozyten, (c+g) Makrophagen (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Gr1<sup>niedrig</sup>) innerhalb der CD45<sup>+</sup> Leukozyten, (d) Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten pro Milz, (e) Gesamtzahl der Makrophagen pro Milz. Gezeigt sind die Ergebnisse von individuell analysierten Tieren. Ein ANOVA mit einem Bonferroni-Posttest wurde zur statistischen Analyse verwendet. Die Querbalken markieren den Median.

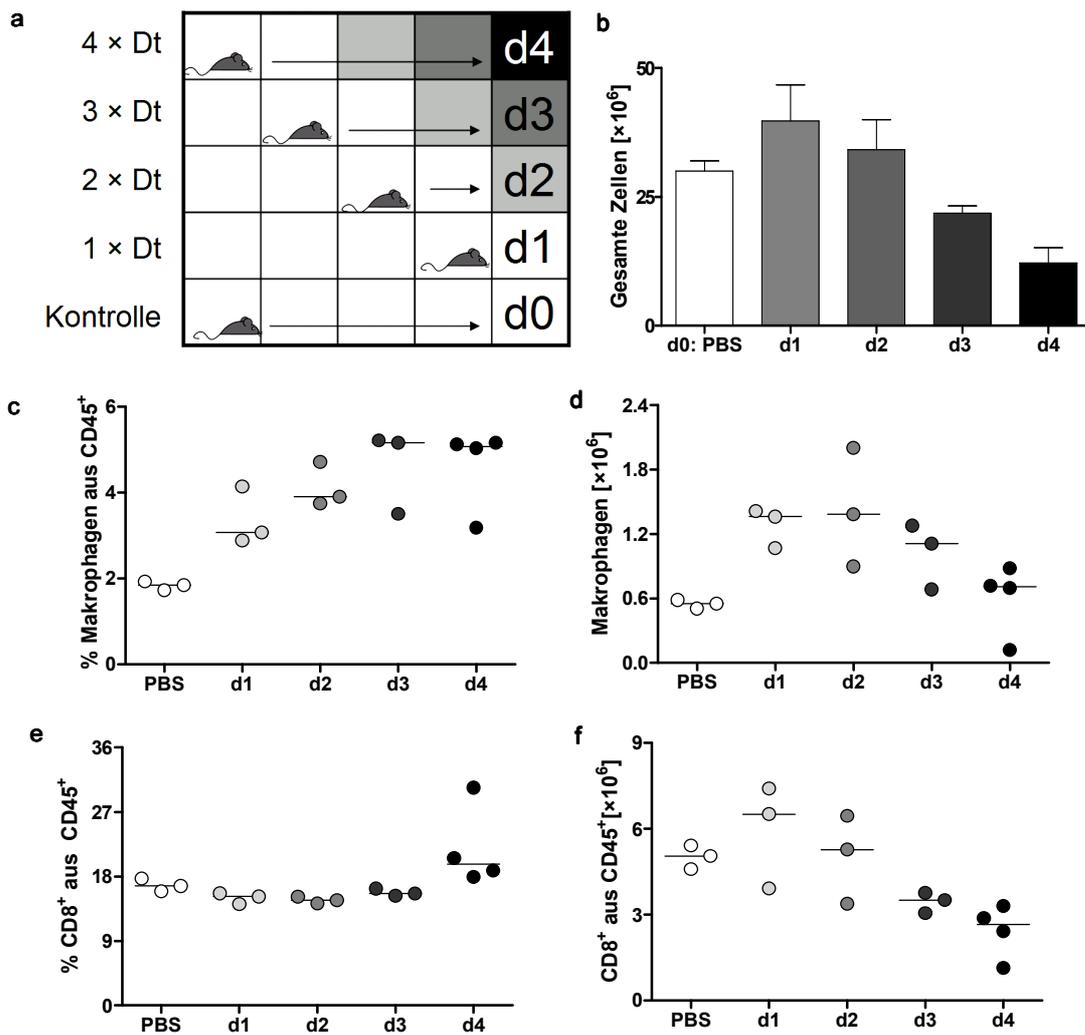
Es zeigte sich eine vom Maustyp wie auch von der Charge und Menge des Dt beeinflusste relative wie auch absolute Akkumulation von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Bei den mit Charge 1 behandelten Tieren war unabhängig vom Maustyp bereits ab einer Dosis von  $1 \times 1 \mu\text{g Dt}$  eine Akkumulation von Makrophagen und Neutrophilen zu beobachten. Bei der höheren Dosis von  $2 \times 2,5 \mu\text{g Dt}$  trat die Zellakkumulation unabhängig von Charge und Maustyp auf. Beide Chargen verursachten eine tendenziell höhere Population an Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in DEREK-Mäusen als in Wt-Tieren.

Die Ergebnisse dieser Experimente legen dar, dass Dt in Abhängigkeit von der Charge und der Menge des verabreichten Dt zu einer Akkumulation von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten führt. Die tendenziell erhöhte Akkumulation dieser Zelltypen in DEREK-Mäusen ist wahrscheinlich durch die parallel einhergehende Depletion von regulatorischen T-Zellen bedingt.

### 3.1.4 Zeitlicher Verlauf der Dt-Wirkung auf Immunzellen

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass an d3 nach Dt-Injektion eine relative wie auch absolute Akkumulation an Makrophagen vorlag. Trotz der erhöhten Zahl an Makrophagen wurde eine erhöhte Sterblichkeit nach gleichzeitiger Injektion von Dt und Listerien beobachtet. Ein möglicher Grund wäre eine überschießende ineffektive Immunantwort, der sich eine generelle Beeinträchtigung des Organismus der Maus mit einem Einbrechen der Immunzellpopulationen anschließen könnte. In diesem Experiment sollte deshalb der zeitliche Verlauf der Immunzellpopulationsfrequenzen nach Dt-Gabe verfolgt werden.

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (Ausnahme  $4 \times \text{Dt}$ : 4 Mäuse) wurden unterschiedlich lange mit einer täglichen Dosis von  $2,5 \mu\text{g Dt}$  behandelt. Die Tiere unterteilten sich in Gruppen zu je drei Mäusen, die einmal (Gruppe d1), zweimal (Gruppe d2), dreimal (Gruppe d3) oder viermal (Gruppe d4) mit Dt behandelt wurden. Die Milz wurde am Tag nach der letzten Injektion entnommen und mittels FACS die Verteilung von Makrophagen ( $\text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+$   $\text{Gr1}^{\text{niedrig}}$ ) Granulozyten ( $\text{CD11b}^+ \text{F4/80}^{\text{niedrig}} \text{Gr1}^{\text{hochpositiv}}$ ) sowie von  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in Bezug auf die  $\text{CD45}^+$  Leukozyten ermittelt (Auswertungsstrategie für die Färbung siehe Abb. 05).



**Abb. 08: Veränderungen der Zellzahlen in der Milz nach viermaliger Dt-Injektion**

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden unterschiedliche lange mit einer täglichen Dosis von 2,5  $\mu\text{g}$  Dt injiziert. Die Gruppen unterteilten sich in eine Gruppe mit einer Injektion von 1  $\times$  2,5  $\mu\text{g}$  Dt an d0, 2  $\times$  2,5  $\mu\text{g}$  Dt (d0, d1) und 3  $\times$  2,5  $\mu\text{g}$  Dt (d0, d1, d2) sowie einer Gruppe mit 4  $\times$  2,5  $\mu\text{g}$  Dt (d0, d1, d2, d3) (Abb. 08a). Eine Negativkontrollgruppe wurde mit PBS behandelt (d0, d1, d2, d3). Die Milz wurde einen Tag nach der letzten Injektion entnommen.

(a) Versuchsaufbau, (b) Gesamtzellzahl in der Milz, (c) Makrophagen (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Gr1<sup>niedrig</sup>) innerhalb der CD45<sup>+</sup>-Leukozyten, (d) Gesamtzahl der Makrophagen pro Milz, (e) CD8<sup>+</sup> Lymphozyten innerhalb der CD45<sup>+</sup>

Leukozyten, (f) Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten pro Milz. Die Querbalken markieren den Median.

Am Entnahmetag zeigten die Mäuse mit einer viermaligen Injektion eine deutliche Krankheitssymptomatik (moribunde Erscheinung), was in dieser Gruppe mit einem rapiden Gewichtsverlust von 12% innerhalb der letzten 2 Tage einherging (Durchschnittsgewicht: d2:19,9 g; d4: 17,5 g). In der mit PBS behandelten Kontrollgruppe zeigte sich keine

Gewichtsabnahme. Die Dt-Gabe führte nach einem Tag zu einem Anstieg der Milzzellularität und ab d2 wieder zu einer Abnahme der Zellzahl. An d4 war die Zellzahl deutlich unter den Werten der Kontrolltiere (Abb. 08b). Diese Veränderungen der Gesamtzellzahlen spiegelten sich in allen gemessenen Populationen des Immunsystems wider: In den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten wie auch in den Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zeigte sich nach einem anfänglichen Anstieg ab d2 eine Abnahme der absoluten Zellzahlen (Daten beispielhaft gezeigt für CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Makrophagen Abb.08 d/f). In relativen Werten (% der CD45<sup>+</sup> Zellen) konnte für Makrophagen und Granulozyten zwar ein Anstieg mit einem Plateau ab d2 detektiert werden, der aber durch den generellen Zellverlust kompensiert wurde. Diese Ergebnisse bestätigen und erweitern die Resultate der vorhergehenden Versuche: Dt führt in höheren Konzentrationen in C57BL/6-Mäusen zu einer Akkumulation von Makrophagen und Granulozyten. Die Auswirkungen von Dt sind im weiteren Verlauf ein für den Organismus der Maus schädigender Vorgang, der sich in Gewichtsverlust und einer deutlichen Abnahme der Gesamtzellzahl der Milz äußert.

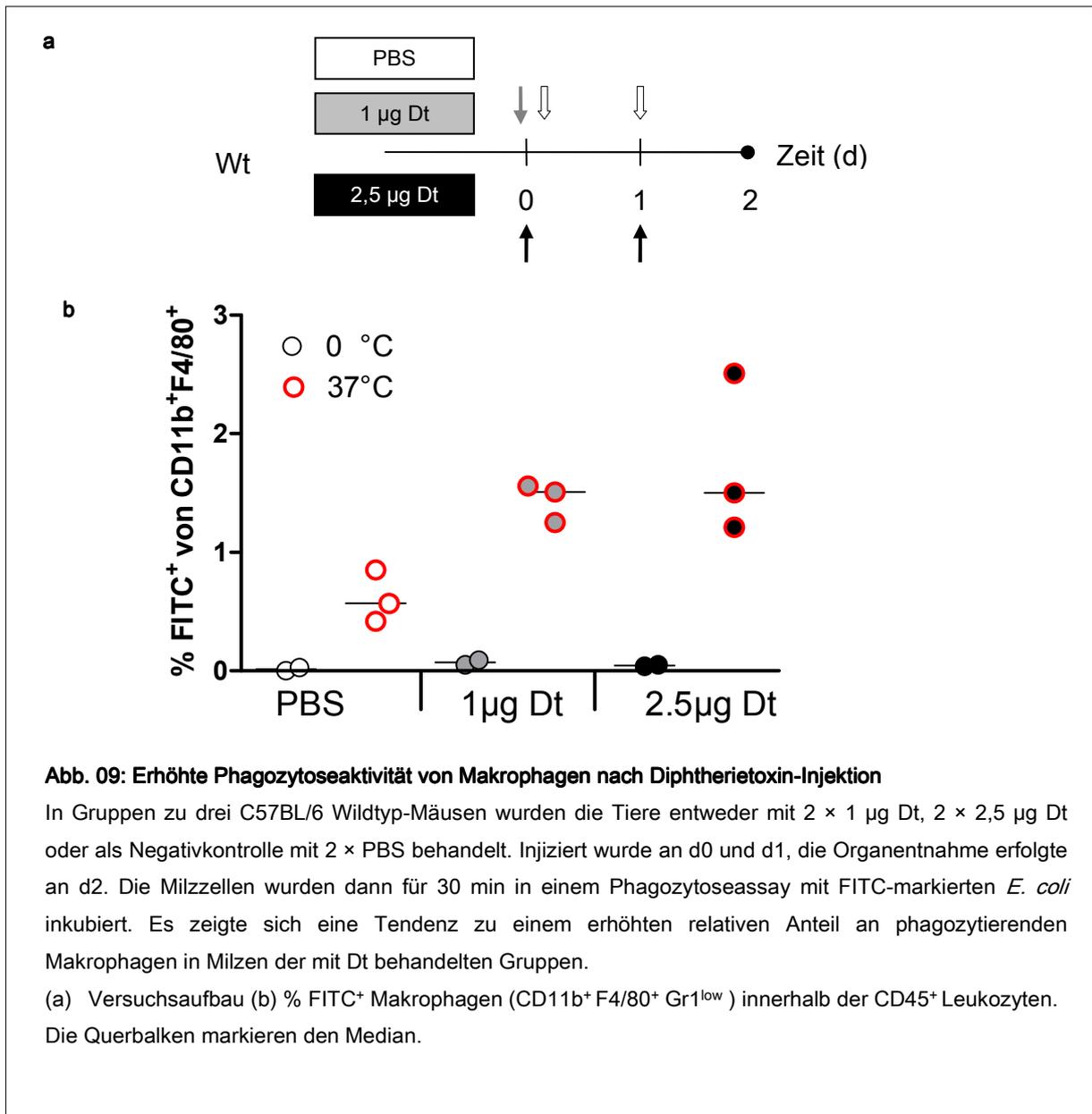
### **3.1.5 Einfluss von Diphtherietoxin auf die Phagozytoseaktivität von Makrophagen**

Im folgenden Experiment wurde die Phagozytoseaktivität von Makrophagen nach Diphtherietoxin-Injektion analysiert. Die Effizienz der Phagozytose erlaubt Rückschlüsse auf die Funktion und den Aktivierungsgrad der Makrophagen. Indirekt gibt dieser Ansatz daher auch Hinweise auf mögliche Mechanismen der verminderten Listerienkontrolle und der erhöhten Sterblichkeit nach Dt-Gabe aufgrund einer eingeschränkten Funktion der Makrophagen.

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden mit unterschiedlich hohen Dosen Dt behandelt, eine Negativkontrollgruppe mit PBS. Die Dt-Injektionsgruppen unterteilten sich in eine Gruppe mit einer Injektionsdosis von  $2 \times 2,5 \mu\text{g}$  Dt und eine Gruppe mit  $1 \times 1 \mu\text{g}$  Dt (Abb. 09). An d3 wurde die Milz entnommen. FITC-markierte *E. coli* wurden zu  $1 \times 10^6$  Milzzellen in ein FACS-Röhrchen gegeben und der Phagozytostest wurde nach Protokoll durchgeführt. Zur Charakterisierung der Makrophagen dienten wie bereits in 3.1.3 beschrieben anti-CD11b, anti-F4/80 sowie anti-Gr1 Antikörper. Zusätzlich wurden Antikörper gegen CD45 zur Identifikation der Leukozytenpopulation verwendet. In der Makrophagenpopulation (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>Gr1<sup>niedrig</sup>) wurde der Anteil an FITC<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen. Im FACS zeigten die Makrophagen der Mäuse, die eine Dt-Injektion erhalten hatten, einen deutlich sichtbare Tendenz zu einem erhöhten Anteil an FITC<sup>+</sup> Zellen

im Vergleich zu den mit PBS behandelten Kontrolltieren, was gleichzusetzen ist mit einer verstärkten Aufnahme von *E. coli*-Bakterien. Diese erhöhte Phagozytoserate lässt sowohl bei 1 µg als auch bei 2,5 µg Dt auf eine stärkere Aktivierung schließen.

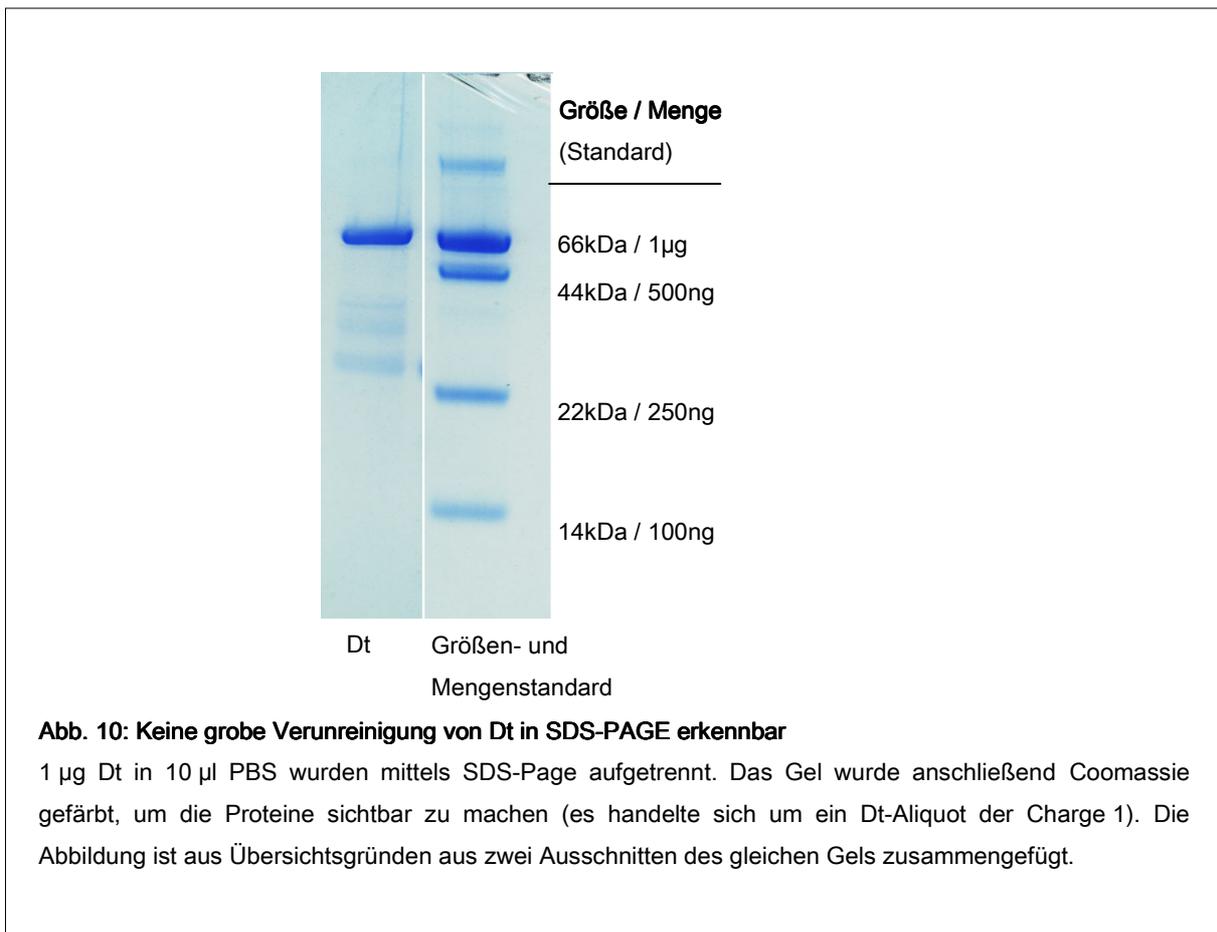
Mit diesem Versuch kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Suszeptibilität nach gleichzeitiger Injektion von Listerien und Dt auf einer verminderten Phagozytoseaktivität der Makrophagen basiert. Vielmehr scheint Dt die Makrophagen sogar zu aktivieren.



## 3.2 Untersuchung von Diphtherietoxin auf Verunreinigungen

### 3.2.1 SDS-PAGE

Die bisherigen Experimente zeigten eine Aktivierung von Makrophagen als Folge der Dt-Injektion. Um auszuschließen, dass diese Aktivierung auf potentiellen Verunreinigungen des Dt beruht wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Für einen ersten Überblick über mögliche grobe Verunreinigungen des Dt wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt.



Die SDS-PAGE ergab eine dominante Bande bei etwa 65 kDa und 3 schwache Banden zwischen 30 kDa und 40 kDa. Die Hauptbande liegt im Bereich von Diphtherietoxin mit einem kalkulierten Molekulargewicht zwischen 58 und 62 kDa [82, 119]. Die Identität der drei anderen Banden, die jeweils deutlich weniger als 100 ng enthielten, ist nicht eindeutig zu identifizieren. Eine Möglichkeit wäre, dass es sich um Zerfallsprodukte des Toxins handelt. Die untere und die obere Bande könnten die A- und B-Fragmente repräsentieren ( $M_r$  21 kDa bzw. 38-40 kDa) [120, 121]. Da das Toxin aus Kulturüberständen von *Corynebacterium*

*diphtheriae* gewonnen wird, sind Verunreinigungen mit anderen Bakterienproteinen oder Medienbestandteilen nicht auszuschließen. Diese Beobachtung stimmt auch mit den Angaben der Firma Merck/Calbiochem zur Reinheit des Dt überein, die ähnliche Verunreinigungen beschreibt.

### **3.2.2 Limulus Amöbozyten Lysat-Test**

Folgend sollte eine potentielle Verunreinigung mit Endotoxin bestimmt werden. Obwohl *Corynebacterium diphtheriae* grampositiv ist und demnach kein Lipopolysaccharid (LPS) aufweist, sollte der Test Endotoxinverunreinigungen ausschließen, die zum Beispiel im Rahmen der Aufreinigung und Aliquotierung auftreten können.

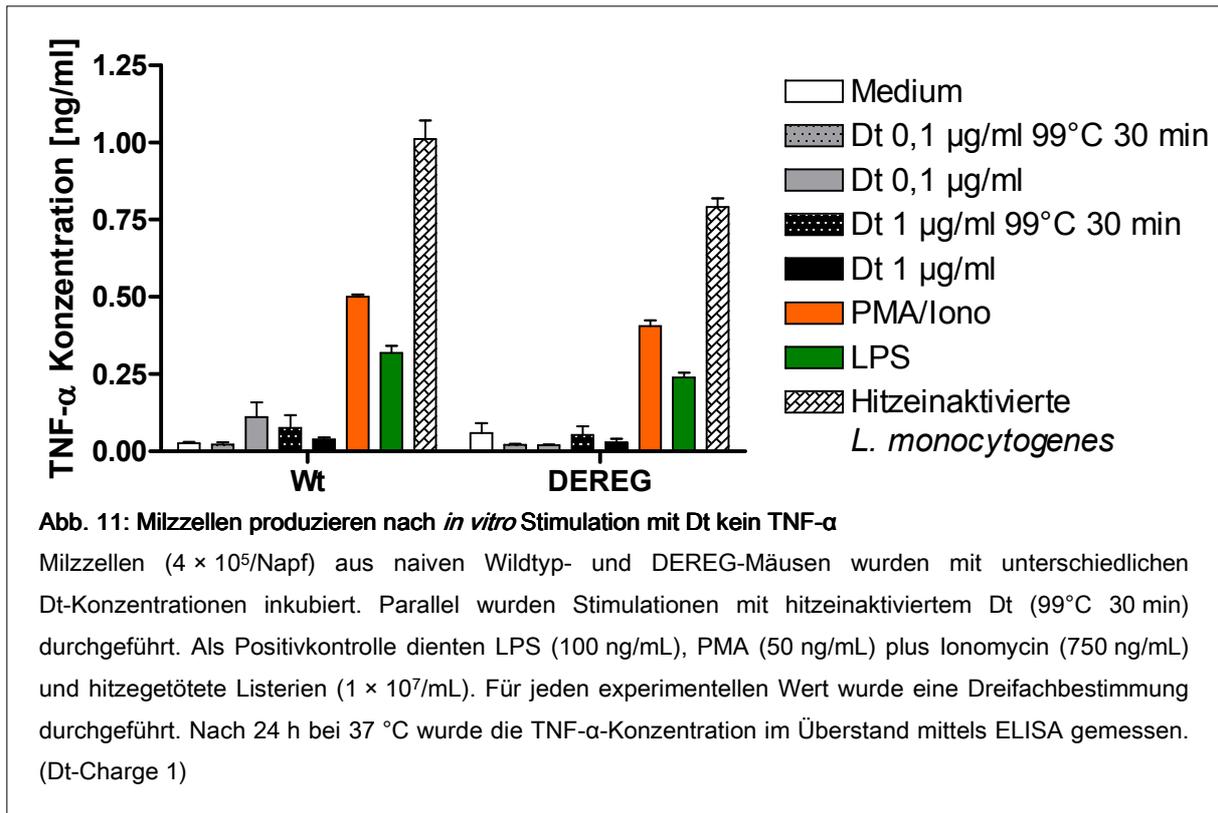
In unseren Dt-Stocklösungen wurde eine Konzentration von ca. 5 Endotoxin Einheiten/mL (EU/mL) für Charge 1 und ca. 10,9 EU/mL für Charge 2 detektiert. Dies entspricht Konzentrationen von 1 ng/mL bzw. 2,2 ng/mL Endotoxin. Da maximal 250 µL einer 10-fachen Verdünnung der Dt-Stocklösung verwendet wurde, wurden ungefähr 25 pg bzw. 55 pg Endotoxin pro Injektion gespritzt. Dies sollte deutlich unter der Aktivierungsschwelle von Makrophagen liegen (10 ng pro Maus mit einem Körpergewicht von 20 g) [122].

Durch das Ergebnis der Limulus Amöbozyten Lysat-Tests wurde eine Aktivierung der Makrophagen aufgrund einer LPS-Verunreinigung mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen.

### **3.2.3 TNF- $\alpha$ Synthese nach *in vitro* Stimulation mit Diphtherietoxin**

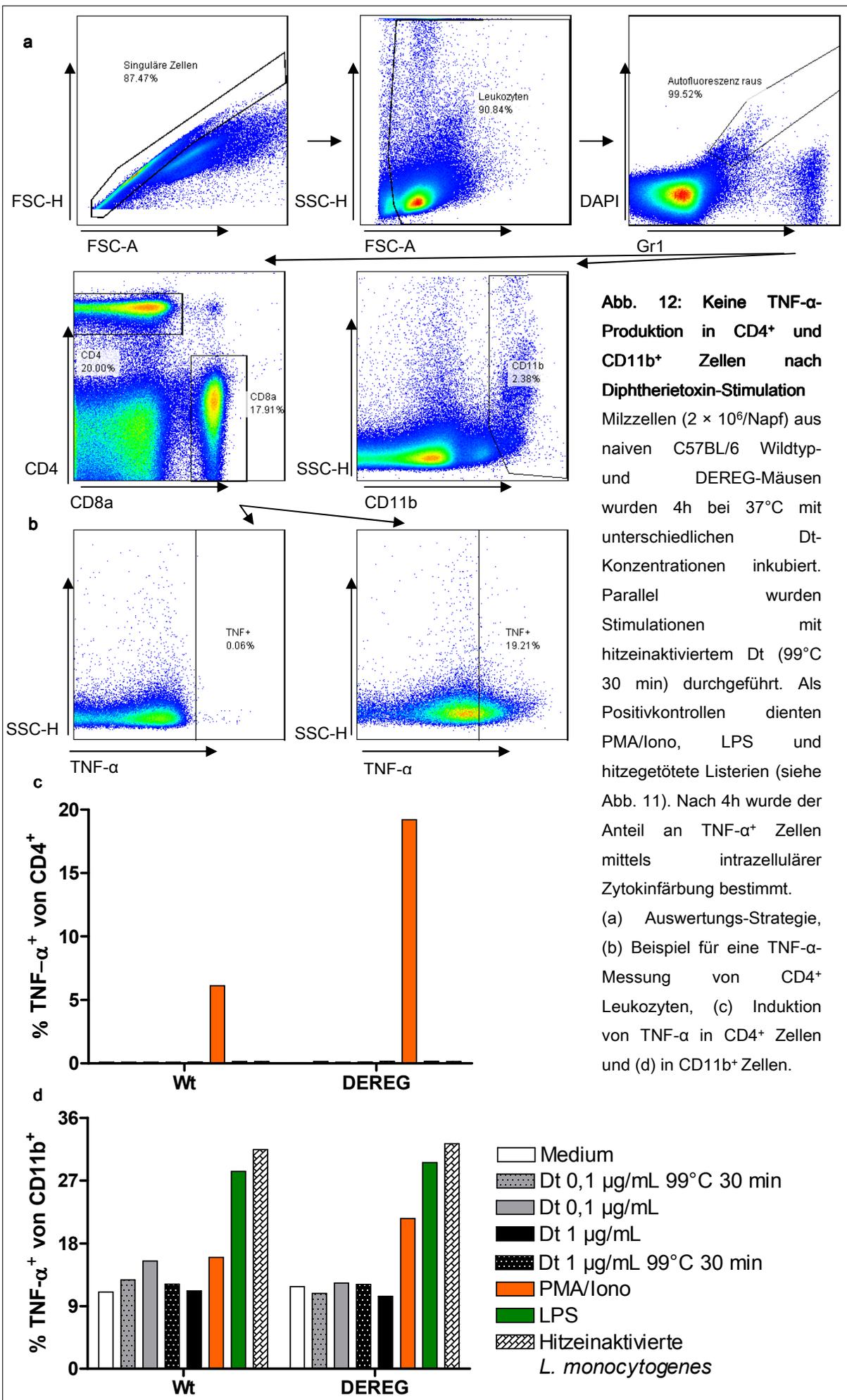
Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob Dt selbst oder in der Dt-Lösung enthaltene Verunreinigungen stimulatorisch auf naive Milzzellen wirken. Als Maß für die Aktivierung der Zellen wurde die Produktion von TNF- $\alpha$  nach einer *in vitro* Inkubation mit Dt gemessen. Im gleichen Ansatz wurde mittels intrazellulärer Zytokinfärbung untersucht, welche Zellpopulation TNF- $\alpha$  synthetisiert. Milzzellen aus naiven C57BL/6 Wildtyp- und DEREK-Mäusen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an Dt inkubiert. Um eine direkte toxische Wirkung des Dt auszuschließen, wurde eine Probe mit hitzeinaktiviertem Dt kultiviert. Dieser Ansatz diente auch der Differenzierung eines direkten Dt-Effekts von der Wirkung von hitzestabilen Verunreinigungen, z.B. von mikrobiellen Zellwandbestandteilen. Als Positivkontrollen wurden hitzeinaktivierte Listerien, LPS oder eine Kombination aus Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Calciumionophor (Ionomycin) verwendet. Nach 24 h Inkubation wurde der Überstand mittels ELISA auf TNF- $\alpha$  hin untersucht (Abb. 11).

Sowohl das native als auch das hitzeinaktivierte Dt führten in keiner der eingesetzten Konzentrationen zu einer TNF- $\alpha$ -Produktion über dem Hintergrundniveau. Im Gegensatz dazu waren alle drei Kontrollen positiv. Die in Abb. 11 dargestellten Ergebnisse wurden mit Dt-Charge 1 gemessen. Eine Durchführung mit Charge 2 ergab vergleichbare Resultate. Zusätzlich wurde die Auswirkung einer gleichzeitigen Stimulation mit Dt und hitzeinaktivierten Listerien untersucht. Es stellte sich kein nennenswerter Unterschied zu einer Listerien-Stimulation ohne Dt heraus (Daten nicht gezeigt).



Der gleiche Stimulationsansatz wurde verwendet, um zu untersuchen welche Zellen TNF- $\alpha$  produzieren. Hierzu wurden Milzzellen nur für 4 h inkubiert und die Sekretion von TNF- $\alpha$  durch die Zugabe von Brefeldin A verhindert. Das in den Zellen angereicherte TNF- $\alpha$  wurde dann durch eine intrazelluläre Zytokinfärbung nachgewiesen. In Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe wurde 4 h als optimaler Zeitpunkt für diesen Versuchsaufbau identifiziert. In der Auswertung wurde der Anteil von TNF- $\alpha^+$  Zellen innerhalb der CD4 $^+$ , der CD8 $^+$  und CD11b $^+$  Zellen bestimmt.

In den CD4 $^+$  (Abb. 12) wie auch den CD8 $^+$  Zellen (Daten nicht gezeigt) konnte nach Dt-Stimulation keine TNF- $\alpha$  Synthese nachgewiesen werden. Die als Positivkontrolle verwendete polyklonale T-Zellstimulation durch PMA/Iono induzierte aber eine deutliche TNF- $\alpha$ -Produktion, wodurch eine generelle Fähigkeit der Zellen zur TNF- $\alpha$ -Synthese



nachgewiesen wurde. Die CD11b<sup>+</sup> Zellen reagierten auf die TLR-Liganden enthaltenden Positivkontrollen, nämlich hitzegetötete Listerien und LPS, mit einer TNF- $\alpha$ -Produktion. Auch hier zeigte sich in den mit Dt stimulierten Ansätzen keine nachweisbare TNF- $\alpha$ -Produktion. Weiterhin war der Anteil an toten Zellen (Annexin V<sup>+</sup>, DAPI<sup>+</sup>) nach Dt-Stimulation nicht höher als in den Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Die fehlende Zunahme an toten Zellen nach Dt-Stimulation stimmt mit bisher publizierten *in vitro* Ergebnissen überein, die eine relative Unempfindlichkeit muriner Zellen gegenüber Dt aufzeigen [90-93].

Unklar ist der Grund für die größere Frequenz an TNF- $\alpha$  produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach polyklonaler Stimulation von DEREK-Zellen. Die Messungen der TNF- $\alpha$ -Produktion von CD11b<sup>+</sup> Zellen ergaben keine nennenswerten Unterschiede zwischen DEREK- und Wildtyp-Mäusen.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass weder Dt selbst noch eine potentielle Verunreinigung des Dt *in vitro* zu einer in Form von TNF- $\alpha$ -Produktion messbaren Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie CD11b<sup>+</sup> Zellen führte. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Stimulation von Makrophagen oder anderen Zellen durch eine Dt-Verunreinigung. Das Ergebnis legt außerdem nahe, dass die *in vivo* Akkumulation von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sehr wahrscheinlich nicht auf eine direkte Aktivierung dieser Zellen durch Dt zurückzuführen ist.

### **3.2.4 Stimulation von TLR2-, TLR4-, NOD1- und NOD2-Reporterzellen mit Diphtherietoxin**

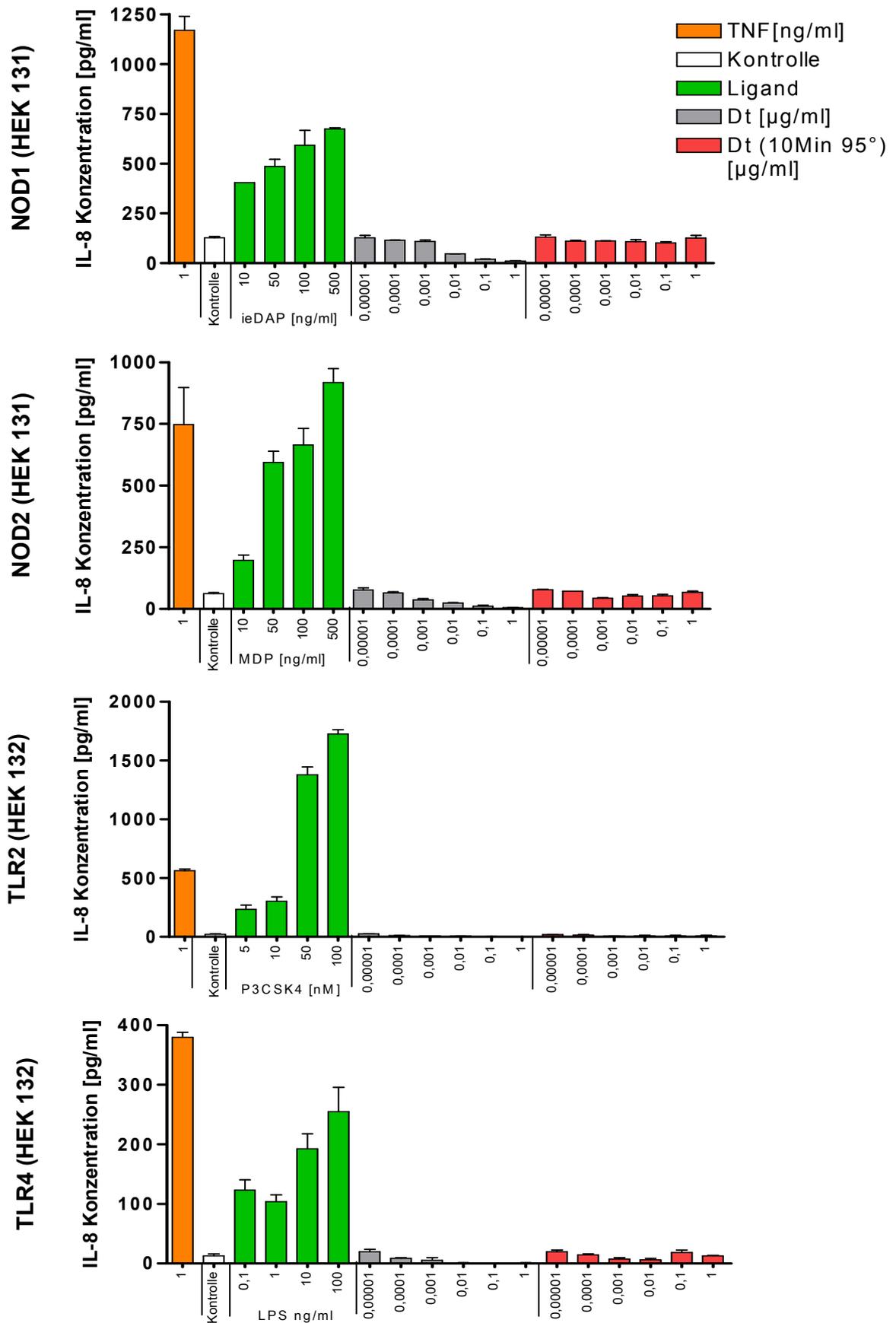
Parallel zur Stimulation der Milzzellen wurden Experimente unter Verwendung von Zellen mit definierter Expression von „*Toll-like*“ Rezeptoren (TLR2 und TLR4) und Nukleotidbindenden Oligomerisationsdomänen Proteinen (NOD1 und NOD2) durchgeführt. Diese Auswahl der Rezeptoren deckt die Erkennung eines breiten Spektrums an konservierten Strukturen grampositiver und gramnegativer Bakterien ab, wodurch die wichtigsten bakteriellen Verunreinigungen nachgewiesen werden können. Diese Experimente fanden im Rahmen einer Kooperation mit PD Dr. Holger Heine aus dem Forschungszentrum Borstel statt.

Humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen, von engl. *human embryonic kidney cells*) wurden mit TLR2, TLR4, NOD1 und NOD2 transfiziert. Als Maß für die Aktivierung dieser Reporterzellen nach Stimulation mit Dt wurde die IL-8-Konzentration bestimmt. Aufgrund der humanen Herkunft der HEK-Reporterzellen induziert Dt bis zu einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{g/mL}$  in diesen Zellen Apoptose. Aus diesem Grund wurde Dt bis auf  $10^{-6}$   $\mu\text{g/ml}$

titriert. Ab einer Dt-Konzentration von 1 ng/mL war keine Apoptose mehr nachweisbar, sodass ab diesem Wert eine erfolgreiche Messung der Dt-Wirkung möglich war. Weitere Ansätze wurden mit verschiedenen Konzentrationen von hitzeinaktiviertem Dt durchgeführt, um hitzestabile Verunreinigungen zu erfassen.

Als von den transfizierten Rezeptoren unabhängige Positivkontrolle wurden die Zellen mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Die jeweiligen Liganden wurden als rezeptorspezifische Positivkontrollen eingesetzt. Dies waren N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteinylseryl-(lysyl)(3)-lysin (P3CSK4) für TLR2, Lipopolysaccharid (LPS) für TLR4, D-glutamyl-meso-diaminopimelische Säure (ieDAP) für NOD1 sowie Muramyl-dipeptid (MDP) als spezifische Positivkontrolle für NOD2.

Weder das native noch das hitzeinaktivierte Dt löste in einer der transfizierten Zelllinien eine IL-8-Produktion aus. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation durch die jeweiligen Positivkontrollen zu einer deutlichen Aktivierung der Zellen. Die Dt-Lösung enthielt keine hitzestabilen Liganden für die getesteten Rezeptoren. Auch hitzelabile Liganden konnten ausgeschlossen werden, wobei hier die Einschränkung gilt, dass durch die Toxizität des Dt nur Ansätze mit weniger als 1 ng/mL möglich waren. Weil die verwendeten TLR- und NOD-Rezeptoren ein sehr breites Spektrum an bakteriellen Strukturen abdecken, ist eine bakterielle Verunreinigung sehr unwahrscheinlich. Das Ergebnis unterstützt das Resultat des vorherigen Experiments, in dem nachgewiesen wurde, dass Dt keine TNF- $\alpha$  Produktion in murinen Milzzellen induziert. Beide Experimente legen nahe, dass Dt in den von uns zur Injektion verwendeten Lösungen sehr wahrscheinlich keine direkte aktivierende Wirkung auf Zellen des Immunsystems hat.



**Abb. 13: Keine IL-8-Produktion nach Diphtherietoxin-Inkubation in transfizierten HEK-Reporterzellen**  
 Mit TLR2, TLR4, NOD1 sowie NOD2 transfizierte HEK-Zellen wurden mit Dt in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Es konnte keine IL-8-Produktion nach Dt-Stimulation gemessen werden.

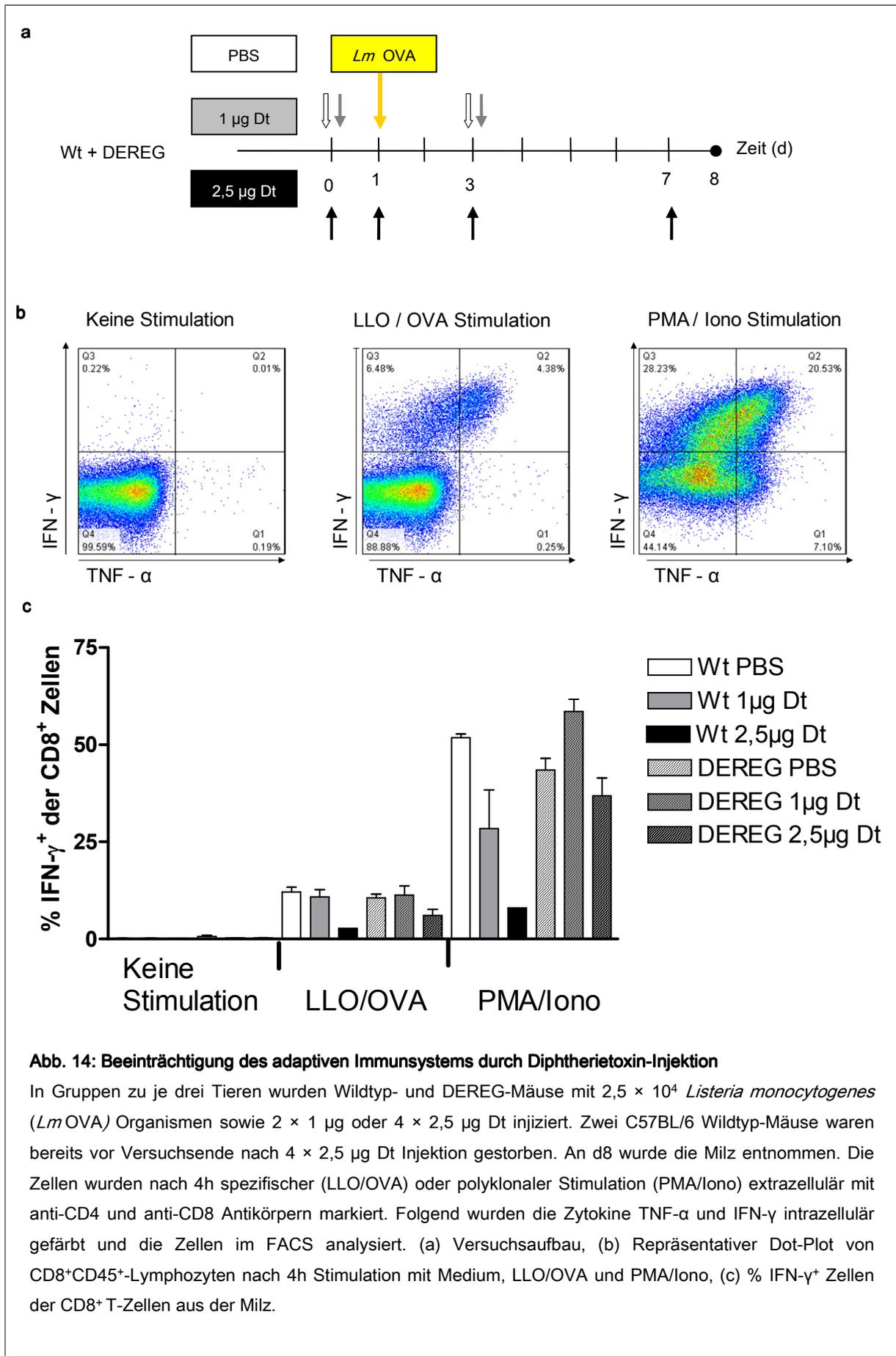
### **3.3 Wirkungen einer Dt getriggerten $T_{reg}$ -Depletion auf Mechanismen des adaptiven Immunsystems**

#### **3.3.1 Wirkungen einer von Beginn der Infektion durchgeführten $T_{reg}$ -Depletion auf das adaptive Immunsystem**

Nachdem ein deutlicher Dt-Effekt auf das angeborene Immunsystem der Mäuse gezeigt werden konnte, sollte auch der Einfluss auf die adaptive Immunantwort untersucht werden. Auch hier wurden C57BL/6 Wildtyp- und DREG-Mäuse zum Vergleich herangezogen, um die Auswirkungen der durch die Dt-Injektion ausgelösten  $T_{reg}$ -Zelldepletion von den unspezifischen Dt-Effekten zu unterscheiden.

C57BL/6 Wildtyp- und DREG-Mäuse wurden mit zwei unterschiedlichen Dt-Dosen behandelt, eine Negativkontrollgruppe mit PBS. Es wurde die Dt-Charge 1 verwendet. Die Dt-Injektionsgruppen unterteilten sich in eine Gruppe mit einer Injektionsdosis von  $4 \times 2,5 \mu\text{g}$  Dt und eine Gruppe mit  $2 \times 1 \mu\text{g}$  Dt. An d1 erhielten alle Tiere  $2,5 \times 10^4$  *Lm* OVA-Organismen (Abb. 14a). An Tag 8 wurden die Milz-Lymphozyten analysiert. Nach einer vierstündigen Stimulation mit immundominanten Peptiden (CD4: LLO<sub>189-201</sub>; CD8: OVA<sub>257-264</sub>) oder nach polyklonaler Stimulation mit einem Phorbolster und einem Calciumionophor (PMA/Iono) wurde die TNF- $\alpha$  / IFN- $\gamma$  Expression der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels FACS bestimmt. (Abb. 14b). Die Frequenz an Zytokin-positiven CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit den Peptiden dient als Maß für die Stärke der T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes*. Die Zytokinproduktion nach polyklonaler Aktivierung gibt einen generellen Überblick zum Differenzierungszustand der gesamten T-Zellpopulation unabhängig von der Spezifität.

Zwei Mäuse aus der Wildtyp Gruppe mit  $4 \times 2,5 \mu\text{g}$  Dt starben vor Versuchsende. Es ist anzunehmen, dass diese Mäuse an den Folgen der hohen Dosis Dt alleine oder an einem Zusammenspiel mit der Listerien-Infektion gestorben waren. Auch die überlebende Maus dieser mit  $4 \times 2,5 \mu\text{g}$  Dt behandelten Gruppe und die Tiere der entsprechenden Gruppe an DREG-Mäusen zeigten extrem schwere Krankheitssymptome (moribunde Erscheinung). Da alle Tiere der anderen Gruppen keine Auffälligkeiten infolge der Infektion zeigten, ist davon auszugehen, dass Dt in dieser Konzentration die Mäuse so stark beeinträchtigt, dass keine Kontrolle der Infektion mehr möglich ist.



Nach einer Injektion von  $4 \times 2,5 \mu\text{g}$  Dt wurde nur noch ein verschwindend geringer Prozentsatz an  $\text{IFN-}\gamma^+ \text{CD8}^+$  T-Zellen gemessen, der spezifisch gegen Listerien gerichtet war. Auch nach polyklonaler Stimulation mit PMA/Iono reduzierte sich der Anteil an  $\text{IFN-}\gamma^+ \text{CD8}^+$  T-Zellen in Wildtyp- und DEREK-Tieren im Vergleich zur niedrigeren Dt-Dosis von  $2 \times 1 \mu\text{g}$  Dt deutlich. Diese Ergebnisse der Mäuse aus der mit  $4 \times 2,5 \mu\text{g}$  Dt infizierten Gruppe sind allerdings alle unter dem Aspekt des moribunden Zustandes der Tiere zu interpretieren und wahrscheinlich hauptsächlich hierauf zurückzuführen.

Im Gegensatz dazu konnte nach einer Injektion einer niedrigeren Dosis Dt von  $2 \times 1 \mu\text{g}$  Dt für die listerienspezifische T-Zellantwort (Stimulation mit LLO und OVA-Peptiden) in beiden Mauslinien kein signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich ein starker Effekt auf die Zytokinproduktion nach polyklonaler PMA/Iono-Stimulation, die in DEREK- und Wildtyp-Mäusen diametral zueinander ausfiel: Die Frequenz an  $\text{IFN-}\gamma^+ \text{CD8}^+$  T-Zellen war im Vergleich zur Kontrolle in Wildtyp-Tieren verringert, während sie in DEREK-Tieren erhöht war. Diese erhöhte Frequenz an Zytokinproduzenten ist sehr wahrscheinlich durch die Depletion von  $T_{\text{reg}}$ -Zellen und die dadurch verlorenen suppressiven Effekte dieser Zellen zu erklären. Für  $\text{CD4}^+$ T-Zellen zeigte sich ein ähnlicher, aber weniger stark ausgeprägter Trend (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend legt das Ergebnis dieses Versuches dar, dass eine hohe Dosis Dt von  $4 \times 2,5 \mu\text{g}$  Dt die Maus so schwer beeinträchtigt, dass keine kontrollierte Immunantwort mehr möglich ist. Bei einer Dosis von  $2 \times 1 \mu\text{g}$  Dt sind die toxischen Dt-Effekte nicht mehr dominant, was eine Analyse der Auswirkungen einer  $T_{\text{reg}}$ -Zellepletion auf das adaptive Immunsystem ermöglicht. Unter diesen Bedingungen beobachteten wir weder in den Wildtyp- noch in den DEREK-Tieren eine Veränderung der spezifischen T-Zellantwort nach Dt-Injektion, die Depletion der  $T_{\text{reg}}$ -Zellen hatte daher hierauf keinen offensichtlichen Effekt. Im Gegensatz dazu hatte Dt einen deutlichen Einfluss auf die Gesamtzahl der Zytokinproduzenten. Die Dt-Gabe führte in den DEREK-Tieren zu einer Zunahme an Zytokin-positiven Zellen, was auf eine fehlende Suppression hindeutet. Die schwächere Antwort in den Dt behandelten Wildtyp-Tieren könnte hingegen das Resultat der Dt-Toxizität sein.

### **3.3.2 Wirkungen einer im Verlauf der Infektion durchgeführten $T_{\text{reg}}$ -Depletion auf das adaptive Immunsystem**

Unsere Ergebnisse zeigten, dass das angeborene Immunsystem von der Depletion der  $T_{\text{reg}}$ -Zellen aber auch von einer potentiellen Toxizität des Dt beeinflusst wird. In den

folgenden Experimenten wurde daher Dt einmalig und erst an Tag 5 der Infektion gegeben. Zu diesem Zeitpunkt ist durch Mechanismen des angeborenen Immunsystems die Listerienreplikation in der Plateauphase oder bereits am Abnehmen. Der Einfluss von Dt auf das angeborene Immunsystem bzw. eine Depletion der  $T_{reg}$ -Zellen sollte daher nur noch von geringer Bedeutung für die Kontrolle der Bakterien sein. Im Gegensatz dazu sind die T-Zellen in einer Phase der Expansion und es stellt sich die Frage, ob  $T_{reg}$ -Zellen diese Expansion beeinflussen. In dieser Serie von Experimenten wurden die Tiere nur einmal mit 1  $\mu$ g Dt injiziert, da in dem vorhergehenden Versuch bei mehrmaliger Gabe von 1  $\mu$ g noch toxische Dt-Effekte beobachtet wurden. Der Versuchsansatz wurde dreimal wiederholt.

C57BL/6 Wildtyp- und DEREK-Mäuse wurden mit  $5 \times 10^4$  *Lm* OVA infiziert und mit 1  $\times$  1  $\mu$ g Dt an Tag 5 behandelt. Eine Negativkontrollgruppe mit PBS wurde mitgeführt (Abb. 14 a). Es wurde die Dt-Charge 2 verwendet. An Tag 10 wurden Leber und Milz entnommen und die daraus isolierten Zellen wie oben beschrieben stimuliert und gefärbt.

Alle Mäuse überlebten bis zum Versuchsende und keines der Tiere zeigte ein moribundes Erscheinungsbild. Diese niedrige Dosis, die keine sichtbaren Nebenwirkungen verursachte, ermöglichte es daher, DEREK- und Wildtyp-Mäuse miteinander zu vergleichen und die Auswirkungen des fehlenden Einflusses von  $T_{reg}$ -Zellen zu untersuchen. Um eventuelle Unterschiede zwischen den Versuchen zu berücksichtigen wurden diese als Confounder mit in ein allgemeines lineares Modell aufgenommen. Die Anteile der  $IFN-\gamma^+$   $TNF-\alpha^+$   $CD4^+$  wie auch  $CD8^+$  Lymphozyten, jeweils bezogen auf die Gesamtheit der im FACS gemessenen  $CD4^+$ - sowie  $CD8^+$ -Zellen, nach PMA/Iono und LLO/Ova Stimulation wurden analysiert. Dabei wurde untersucht, inwieweit sich die Werte zwischen den Maustypen, Organen, Zelltypen, der Behandlung mit Dt oder PBS, sowie den einzelnen Kombinationen dieser Einflussgrößen unterscheiden

Die DEREK-Mäuse wiesen nach spezifischer wie auch polyklonaler Stimulation eine signifikante Steigerung ( $p < 0,001$ ) der aktivierten Lymphozyten nach Dt-Injektion auf.

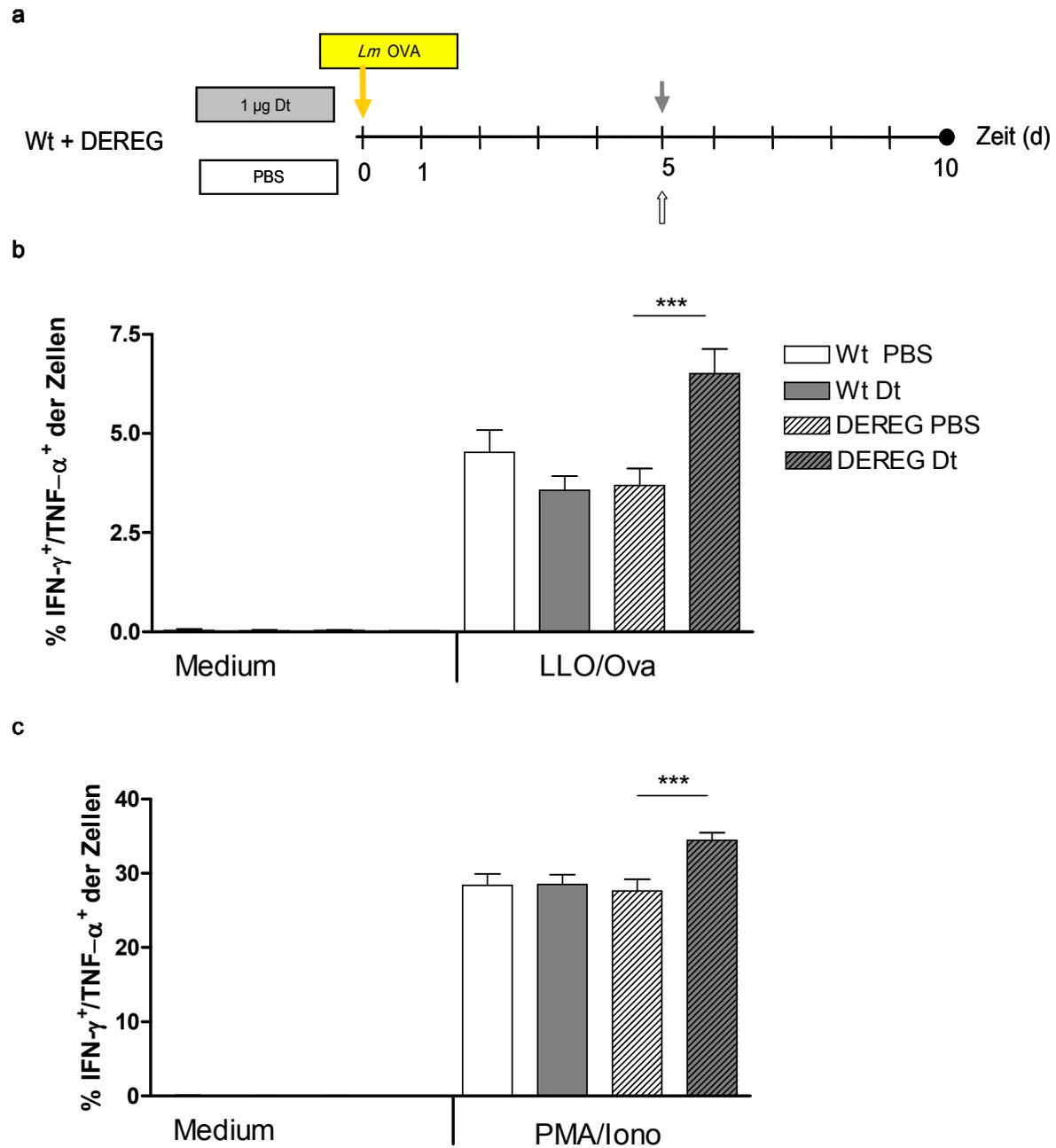
Die Odds-Ratio ergab für DEREK-Mäuse, die mit Dt behandelt worden waren, nach spezifischer Stimulation im Vergleich zu den PBS-Kontrollen einen Wert von 1,846 mit einem 95% Konfidenzintervall von [1,422; 2,397] bei einer Signifikanz von  $p < 0,001$ . Für die gleichen Tiere zeigte sich nach polyklonaler Stimulation ein Odds-Ratio von 1,362 mit einem 95% Konfidenzintervall von [1,17; 1,586] bei einem p-Niveau  $< 0,001$ . Das bedeutet, dass eine  $T_{reg}$ -Zelldepletion in den DEREK-Tieren, von Störfaktoren bereinigt, zu einer 1,8 fach erhöhten Population an aktivierten Lymphozyten führt, die spezifisch auf LLO/Ova reagieren

beziehungsweise zu einer 1,4-fach erhöhten Population, die polyklonal aktiviert werden können.

Diese Werte stellen den globalen Effekt dar, unabhängig vom Organ und der Lymphozyten-Population. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Wildtyp-Tieren keine signifikante Veränderung der Immunantwort nach Dt-Gabe. Das Signifikanzniveau lag nach polyklonaler Stimulation bei  $p = 0,660$  und nach spezifischer Stimulation bei  $p = 0,139$ .

Anhand der im FACS bestimmten %-Werte und der in der Neubauer-Kammer ermittelten Gesamtzahl an aus den Organen isolierten Lymphozyten wurde die Gesamtzahl an  $\text{IFN-}\gamma^+ \text{TNF-}\alpha^+$  Lymphozyten berechnet: Eine  $T_{\text{reg}}$ -Zelldepletion führte in absoluten Zahlen zu einer erhöhten Lymphozytenpopulation in der Leber und in zwei der drei Versuche auch in der Milz (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass bei Verwendung der niedrigen Dosis von  $1 \times 1 \mu\text{g Dt}$  und einer Injektion zu einem späteren Zeitpunkt der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* keine unspezifischen Nebeneffekte in Wt-Mäusen mehr erkennbar sind. Eine aussagekräftige Analyse der  $T_{\text{reg}}$ -Zellfunktion war möglich. Die  $T_{\text{reg}}$ -Zelldepletion führte in DEREK-Mäusen zu einer signifikant erhöhten Frequenz an  $\text{IFN-}\gamma^+ \text{TNF-}\alpha^+$  Lymphozyten. Diese verstärkte Immunantwort war unabhängig vom Organ und der Spezifität der T-Lymphozyten und zeigte sich nach listerienspezifischer wie auch polyklonaler Stimulation.



**Abb. 15: Die T<sub>reg</sub>-Depletion führt zu einer verstärkten Immunantwort gegen *L. monocytogenes***

C57BL/6 Wildtyp- und DEREg-Mäuse wurden in jeweils zwei Gruppen à 4 Mäuse aufgeteilt. Alle Tiere wurden an d 0 mit  $5 \times 10^4$  *Lm* OVA infiziert. Zusätzlich wurde einer Gruppe  $1 \times 1 \mu\text{g}$  Dt (d5) injiziert, der Negativkontrollgruppe PBS. Es wurde die Dt-Charge 2 verwendet. An d 10 wurden Leber und Milz entnommen und wie in Abb. 14 beschrieben mit LLO/OVA sowie PMA/Iono stimuliert und gefärbt.

(a) Versuchsaufbau (b+c) % IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>-Lymphozyten der Leber und Milz nach 4h Stimulation mit LLO/OVA (b) oder PMA/Iono (c). Die Daten wurden aus drei unabhängigen Versuchsdurchführungen zusammengefügt. Die Graphen zeigen versuchsübergreifend die Mittelwerte mit der Standardabweichung. Die dargestellten Signifikanzangaben basieren auf der statistischen Analyse in einem allgemeinen linearen Modell und beziehen sich auf den Vergleich der Mittelwerte bei Berücksichtigung aller Störfaktoren.

### **3.4 Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen produzieren inflammatorische Zytokine nach Listerieninfektion**

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde nachgewiesen, dass es eine Anpassungsreaktion von T<sub>reg</sub>-Zellen auf Entzündungen gibt. Dies geschah im Sinne einer Herunterregulation der Foxp3 Expression [63], aber auch eine Veränderung des Zytokinprofils in T<sub>reg</sub>-Zellen hin zur Produktion von IFN- $\gamma$  wurde beschrieben [64]. Diese Beobachtung sollte in der Listerieninfektion untersucht und mögliche Änderungen im Zytokinprofil, insbesondere für inflammatorische Zytokine, analysiert werden.

C57BL/6 DREG-Mäuse wurden mit  $2 \times 10^5$  *Lm* OVA behandelt, eine nicht infizierte Negativkontrolle wurde mitgeführt. An Tag 9 nach Infektion wurden die Milz-Lymphozyten spezifisch (LLO/OVA) oder polyklonal (PMA/Iono) stimuliert und mittels FACS die Frequenzen an TNF- $\alpha^+$  und IFN- $\gamma^+$  CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt (Abb. 16).

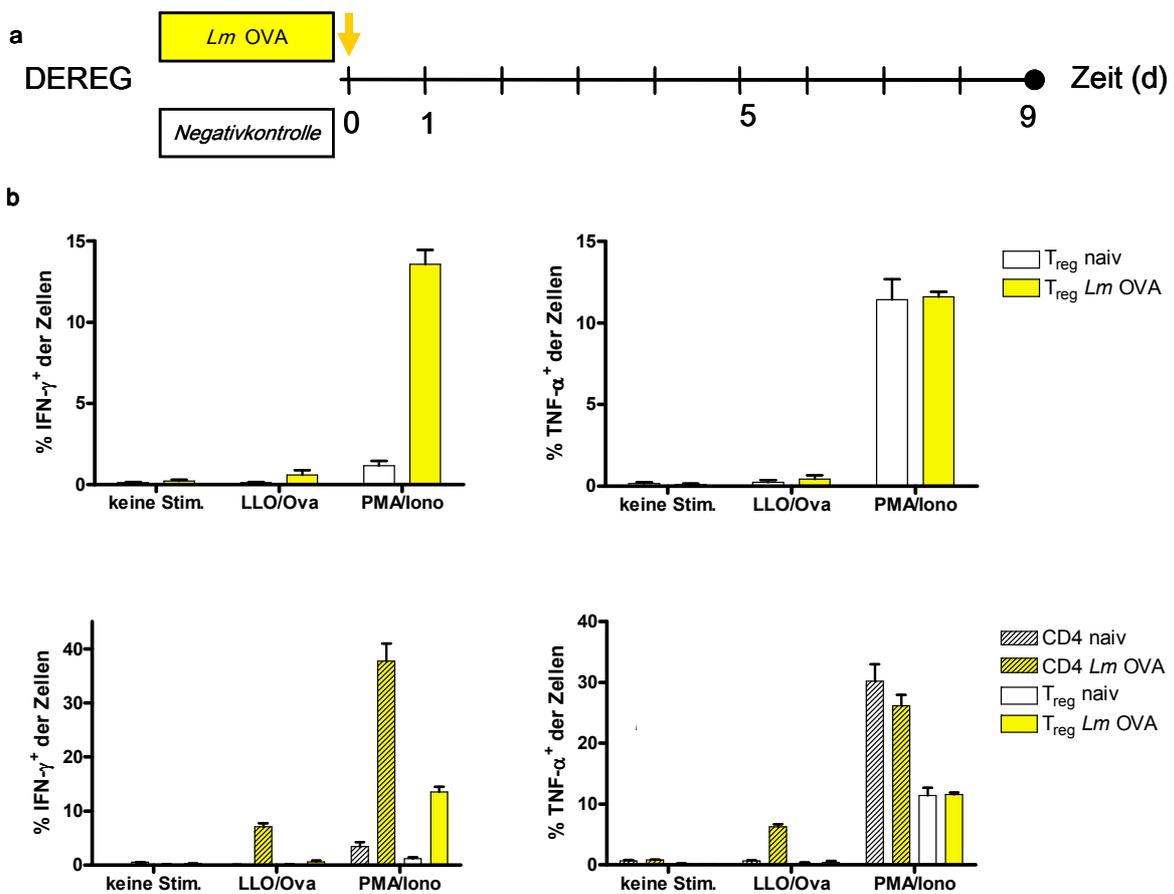
Erwartungsgemäß reagierten Foxp3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen mit einer starken IFN- $\gamma$  Antwort auf die Listerieninfektion. Im Gegensatz zu naiven Tieren, in denen sich kaum IFN- $\gamma$  positive Zellen fanden, konnte nach Infektion bei spezifischer LLO/OVA-Stimulation eine deutliche Population von mehr als 5% an IFN- $\gamma^+$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden. Für CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergab sich ein ähnliches Bild (nicht gezeigt). Auch in den regulatorischen Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen aus infizierten Mäusen war eine, obgleich deutlich schwächer ausgeprägte IFN- $\gamma^+$ -Population nachweisbar. Auch wiesen T<sub>reg</sub>-Zellen nach Infektion mit *Lm* OVA eine massiv erhöhte generelle Fähigkeit zur IFN- $\gamma$  Synthese auf. Dies zeigte sich in einer etwa zehnfachen Steigerung der Frequenz an IFN- $\gamma^+$  T<sub>reg</sub>-Zellen nach PMA/Iono Stimulation im Vergleich zu nichtinfizierten Tieren. Weiterhin wiesen die untersuchten Organe unabhängig von der Infektion eine relativ konstant bleibende Population von etwa 10% an TNF- $\alpha^+$  T<sub>reg</sub>-Zellen nach PMA/Iono-Stimulation auf. Eine listerienspezifische TNF- $\alpha$  Synthese, konnte im Gegensatz zu IFN- $\gamma$  in regulatorischen Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen nicht demonstriert werden. Die Fähigkeit von T<sub>reg</sub>-Zellen zur TNF- $\alpha$  Synthese konnte in weiteren Versuchen, in denen andere Antikörper gegen TNF- $\alpha$  verwendet wurden, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

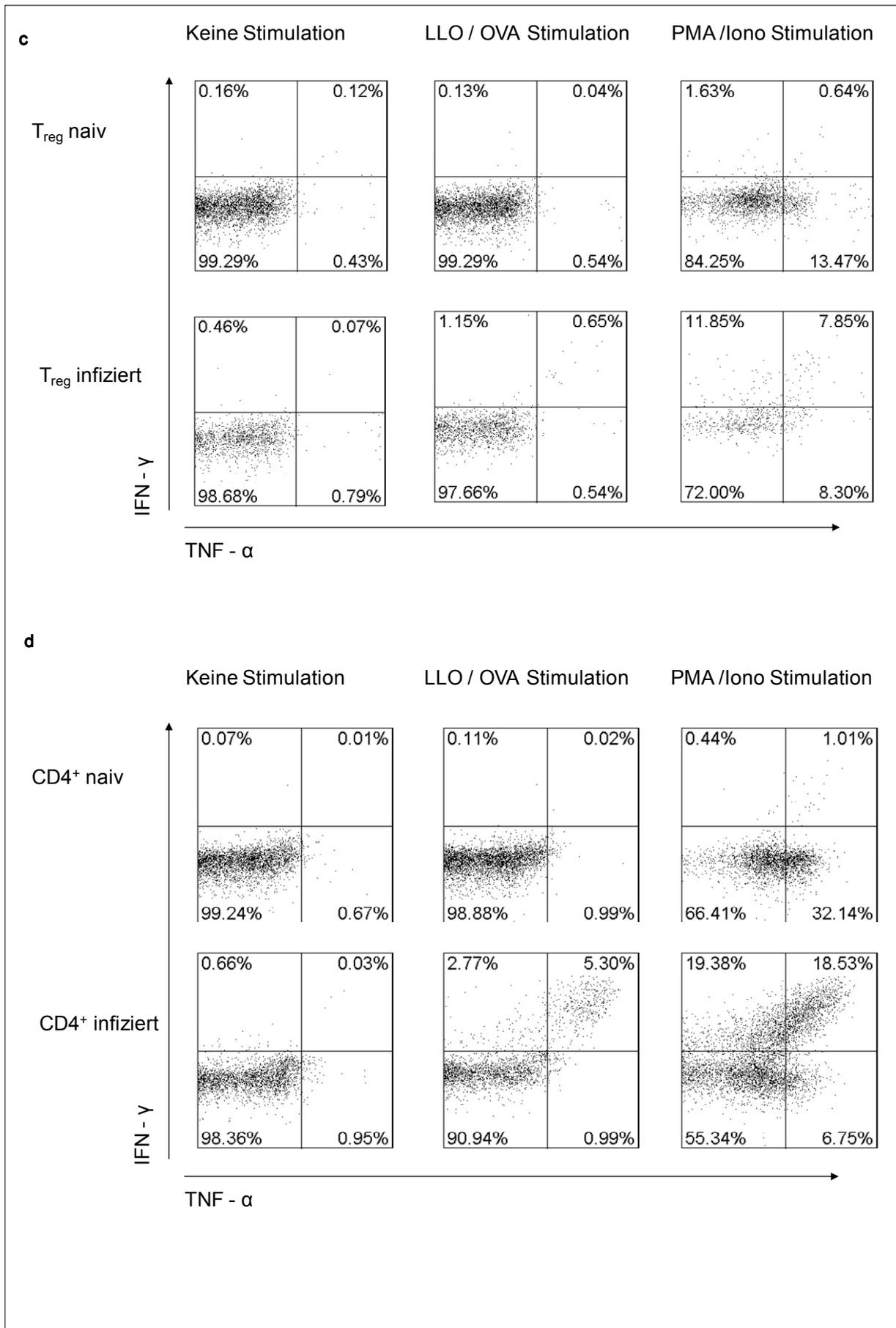
Die Ergebnisse sind konform mit einer bereits vorhandenen Untersuchung [64], dass regulatorische T-Zellen nicht auf die Synthese von immunsupprimierenden Zytokinen beschränkt sind, sondern im Falle einer Infektion auch IFN- $\gamma$  produzieren können. Weiterhin erweiterten die hier aufgezeigten Resultate diese publizierten Daten um die Fähigkeit von T<sub>reg</sub>-Zellen zur TNF- $\alpha$  Synthese.

**Abb. 16: Regulatorische T-Zellen produzieren inflammatorische Zytokine**

Es wurden zwei Gruppen à 3 C57/BL6 DEREK-Mäusen gebildet und eine Gruppe mit  $2,5 \times 10^5$  *Listeria monocytogenes* (*Lm* OVA) infiziert. An d9 wurden die Frequenzen an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>-Zellen in den Milzen von beiden Gruppen nach PMA/Iono und LLO/OVA-Stimulation gemessen. Es zeigte sich in den Effektor-T-Zellpopulationen wie auch in den T<sub>reg</sub>-Zellen nach Infektion ein höherer Anteil an IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen. Für regulatorische T-Zellen konnte weiterhin eine TNF- $\alpha$  Synthese demonstriert werden.

(a) Versuchsaufbau (b) % IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu Foxp3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>T-Zellen. (c) Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach 4h Stimulation (d) Alle CD4<sup>+</sup>Lymphozyten nach 4h Stimulation





# 4 Diskussion

## **4.1 Diphtherietoxin-Rezeptor gesteuerte Zellablationsmodelle: Schwierigkeiten der Interpretation**

Die spezifische Zellablation durch Dt in Mausmodellen ist ein relativ neues Konzept, das seit den letzten Jahren vermehrt Anwendung findet. Nach der ersten Veröffentlichung von Saito *et al.* 2001 [123] folgten unterschiedliche Modelle von zellspezifischer *in vivo* Depletion mithilfe eines Diphtherietoxin gesteuerten Zelltodes. Prominente Beispiele sind das CD11c-[98], das hier verwendete DEREK-Mausmodell [94] oder das ebenfalls in der Analyse von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen angewendete Depletionsmodell aus der Arbeitsgruppe Rudensky [124]. Durch einen gewebespezifischen Promotor soll der Diphtherietoxinrezeptor (DtR) nur in der zu depletierenden Zielzelle exprimiert werden. Die notwendige hohe Gewebespezifität des Promotors stellt ein grundsätzliches Problem dar, wie bereits in der Einleitung am Beispiel des CD11c-DtR-Modell ausgeführt wurde (siehe hierzu 1.5). Auch für den beim DEREK-Mausmodell verwendeten Promotor des *foxp3* Gens gibt es mehrere Veröffentlichungen, die die alleinige Expression in T<sub>reg</sub>-Zellen infrage stellen. Es wurden Ergebnisse veröffentlicht, dass *foxp3* als Tumorsuppressorgen in Maus und Mensch sowohl in der Prostata [125] als auch in der Brust [126] agiert. Weiterhin wird die Foxp3-Expression im Thymus kontrovers diskutiert [30, 106, 107]. Ein *foxp3*-Defekt in Thymusstromazellen könnte auch für die Autoimmunsymptomatik der Scurfy-Maus verantwortlich sein. Eine fehlerhafte Thymusfunktion könnte zu einer Lymphopenie und einer daraus resultierenden homöostatischen Proliferation führen, in deren Rahmen autoreaktive Lymphozyten entstehen können [105, 106, 127-131]. Die Foxp3-Expression im Thymusepithel, insbesondere als Ursache des Scurfy-Phänotyps, ist aber umstritten. Einige Arbeitsgruppen, unter anderem um Rudensky und Sparwasser, können keine Foxp3-Expression in nicht-hämatopoetischen Zellen nachweisen. Nach ihren Analysen, gestützt von den Ergebnissen mehrerer Arbeitsgruppen, reicht ein Transfer von T<sub>reg</sub>-Zellen alleine aus, um den Defekt zu beheben [25, 29, 108, 132-135].

Unabhängig von der Gewebespezifität des Foxp3-Promotors wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein zusätzliches, generelles Problem von Mausmodellen beschrieben, die eine Form des Dt-vermittelten Zelltodes verwenden. Diphtherietoxin scheint nicht den neutralen Status zu haben, der ihm in den meisten Publikationen zugeordnet wird. Die hier dargelegten Versuche zeigen, dass Dt ab einer bestimmten Dosis Auswirkungen auf das angeborene und

adaptive Immunsystem hat. In Abhängigkeit von der Charge kann eine Dt-Injektion schon ab Konzentrationen von 1 µg Dt einen beträchtlichen Einfluss auf Immunantworten haben und in höheren Dosen ( $4 \times 2,5 \mu\text{g Dt}$ ) im Zusammenhang mit einer Listerieninfektion sogar letal wirken.

#### **4.2 Die toxische Wirkung von Diphtherietoxin beruht nicht auf Verunreinigungen**

Eine wichtige Frage ist, ob Kontaminationen des Dt für die toxischen Effekte in Wildtyp-Mäusen verantwortlich sind. Eine mögliche Verunreinigung mit zum Beispiel Endotoxin bzw. Lipopolysaccharid (LPS), einer häufigen Kontamination von aufgereinigten Proteinen aus Bakterienkulturen, könnte die hier beobachteten Effekte erklären. Ein dadurch ausgelöster septischer Schock, mit TNF- $\alpha$  als dem hauptverantwortlichen Zytokin, kann zu einer dramatischen Gewichtsabnahme bis hin zum Tod führen [136-138]. Auch reichen schon sehr geringfügige Kontaminationen mit LPS, um Makrophagen zu aktivieren [122], welche darauf TNF- $\alpha$  synthetisieren. TNF- $\alpha$  stimuliert die Produktion von GM-CSF (engl. *granulocyte monocyte colony-stimulating factor*) [139], was wiederum zu einer erhöhten Freisetzung von Monozyten aus dem Knochenmark führt. Die beobachteten Auswirkungen der Dt-Injektion, angefangen bei einer vergrößerten und aktivierteren Makrophagenpopulation bis hin zu einer verstärkten Letalität, könnten daher auch ein Artefakt einer Endotoxinkontamination sein.

Eine SDS-Gel-Analyse des Dt wies keine groben Verunreinigungen auf. Der folgende Endotoxin-Test (Limulus Amöbozyten Lysat-Test) ergab für beide verwendeten Dt-Chargen eine LPS-Konzentration unter der Makrophagenaktivierungsgrenze. Eine in Kooperation mit Dr. Holger Heine (Forschungszentrum Borstel) durchgeführte Analyse auf TLR2-, TLR4- sowie NOD1- und NOD2-Liganden erwies sich ebenfalls als negativ. Auch eine *in vitro* Stimulation von Milzzellen mit Dt ergab keine erhöhte TNF- $\alpha$ -Produktion. Die TNF- $\alpha$  Produktion wurde dabei als sensitiver Indikator für eine Verunreinigung mit Endotoxin verwendet [140]. Insgesamt konnte in keinem Test eine immunologisch aktive Substanz in Dt nachgewiesen werden, die die toxischen Effekte erklären würde. Es ist daher davon auszugehen, dass die Nebenwirkungen auf dem Toxin selbst und nicht auf Kontaminationen beruhen.

### **4.3 Die Dt-Injektion hat einen toxischen Effekt auf den Organismus der Maus**

Unsere Daten zeigen, dass eine Dt-Injektion einen erheblichen Einfluss auf die Maus hat. So kam es nach einer Injektion von  $2 \times 2,5 \mu\text{g}$  Dt unabhängig von Maustyp und Charge in mehreren Versuchen zu einer Akkumulation von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Die Wirkung von Dt variierte dabei je nach Charge, so wurde bei einer der Chargen in Wt-Tieren sogar für eine Injektion von  $1 \mu\text{g}$  ein Effekt auf Makrophagen demonstriert (Abb. 07). Neben einer Akkumulation wurde auch ein erhöhter Aktivierungsstatus der Makrophagen nach Dt-Injektion beobachtet (Abb. 09). Weiterhin zeigte sich ein genereller toxischer Dt-Effekt: Nach einer Behandlung von Wildtyptieren mit einer relativ hochdosierten Injektion von  $2,5 \mu\text{g}$  Dt an vier konsekutiven Tagen verminderte sich die absolute Zellzahl in der Milz deutlich und die Tiere wurden moribund (Abb. 08). Auch bei einer Kombination einer mehrmaligen Dt-Injektion mit einer Listerieninfektion entwickelten sie eine erhöhte Suszeptibilität gegen *L. monocytogenes*, was sich in einem Sterben vor Versuchsende oder erhöhten Bakterientitern zeigte (Abb. 03, Abb. 04, Abb.14). Im Einklang mit unseren Ergebnissen publizierten bereits 1982 Pappenheimer *et al.*, dass eine Injektion von ca.  $10 \mu\text{g}$  Dt bei einer Maus mit einem Gewicht von 20 g innerhalb von sieben Tagen letal wirkt [90]. Entsprechend zeigten unsere Mäuse, die sukzessive vier Dosen von  $2,5 \mu\text{g}$  Dt erhalten hatten, ein moribundes Erscheinungsbild. Dies bedeutet, dass bereits eine geringfügige Erhöhung der Standarddosis extrem toxisch wirken kann. Weiterhin veröffentlichten Meyer zu Hörste *et al.* für ein Neuroinflammationsmodell, dass eine Dt-Injektion, wenn sie mit einer Immunisierung kombiniert wird, einen letalen Ausgang hat [141]. Dieser Effekt konnte unabhängig vom Dt-Hersteller (Merck, List Biological Laboratories, Sigma-Aldrich) und in unterschiedlich hohen Dosen ( $1 \mu\text{g}$ ,  $0,5 \mu\text{g}$  sowie  $0,1 \mu\text{g}$  pro Maus) demonstriert werden.

Diese beschriebene und von uns bestätigte Toxizität von Dt steht im Widerspruch zu vielen Publikationen, die Dt wie eine neutrale Substanz behandeln. Verschiedene Gründe könnten diese Diskrepanz erklären. Meyer zu Hörste *et al.* analysieren einen größeren Zeitraum (bis zu 12 Tagen). Im Gegensatz dazu wird in vielen Studien, die keine Toxizität von Dt beschreiben, meistens nur eine kurze Beobachtungspanne verwendet (Lahl *et al.* 7 Tage [94], Saito *et al.* 5 Tage [123], Jung *et al.* 1 Tag [98]). Langfristige Nebenwirkungen bleiben daher verborgen. Zusätzlich werden Nebeneffekte einer Dt-Injektion wahrscheinlich nicht wahrgenommen, da in den Publikationen jeweils nur die durch die spezifische Zelldepletion beeinflussten

Parameter analysiert werden und häufig kein oder nur wenig Augenmerk auf für die Studie irrelevante Immuneffekte gelegt wird.

Unspezifische Wirkungen von Dt sind auch bei niedrigeren Dosen nachweisbar, insbesondere wenn man Zellen des angeborenen Immunsystems untersucht. Eine Bedingung für eine letale Wirkung bei niedriger Dt-Dosis scheint die Kombination von starken Adjuvantien mit einer Dt-Injektion zu sein. In den Experimenten von Meyer zu Hörste *et al.* konnte selbst bei einer Gabe von 0,1 µg Dt/Maus und einem Adjuvans (Komplettes Freundesches Adjuvans plus Pertussis Toxin) ein letaler Effekt nachgewiesen werden, obwohl die Dt-Dosis selbst in etwa der niedrigsten verwendeten Dosis aus den oben genannten Veröffentlichungen entspricht (Jung *et al.*: 4 ng/g Körpergewicht,  $\cong$  0,1 µg/Maus) [141]. Ein ähnlicher Synergismus würde auch die hohe Letalität bei einer Kombination von Dt mit einer Listerieninfektion erklären (Abb. 03, Abb. 14).

Zusammenfassend zeigt sich, dass Dt *in vivo* deutlich toxischer wirkt, als es die *in vitro* Daten vermuten lassen (*in vitro* sind murine Zellen etwa  $10^5$  mal resistenter gegenüber Dt als humane Zellen [91, 93]). Wahrscheinlich führt die Dt-Injektion durch die Schädigung von murinen Zellen zu einer Entzündungsreaktion, in deren Rahmen Makrophagen aktiviert werden (Abb. 07, 09). Grundsätzlich bedeuten unsere Ergebnisse, dass ohne entsprechende Wildtypkontrollen auf Dt-Injektion basierende Ergebnisse nicht zu interpretieren sind.

#### **4.4 Auswirkung einer Dt getriggerten $T_{reg}$ -Zelldepletion auf das angeborene Immunsystem**

Unsere Ergebnisse besagen, dass eine Dt-Injektion in Abhängigkeit von Charge, Maustyp und Höhe der verabreichten Dt-Dosis einen Effekt auf das angeborene Immunsystem hat. Während eine hochdosierte Injektion unabhängig vom Maustyp eine deutliche Erhöhung der Makrophagen- und neutrophilen Granulozytenpopulationen zur Folge hatte, führte die Verwendung einer niedrigeren Dosis in erster Linie in DEREK-Mäusen zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Eine Dosis von  $1 \times 1$  µg Dt erlaubte den Einfluss von  $T_{reg}$ -Zellen insbesondere auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten zu untersuchen.

Während in Wildtyp-Mäusen die Frequenz an Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nach Dt-Injektion maximal das Niveau der PBS-Kontrolle aufwies, zeigten DEREK-Mäuse nach Depletion der  $T_{reg}$ -Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle eine deutliche Akkumulation dieser Zellen.

Dass  $T_{reg}$ -Zellen neben ihrer Regulation des adaptiven Immunsystems auch einen Einfluss auf das angeborene Immunsystem haben, wurde bereits mehrfach beschrieben.  $T_{reg}$ -Zellen

inhibieren das LPS-induzierte Überleben von neutrophilen Granulozyten [142], sie kontrollieren natürliche Killer T-Zellen [143, 144] und hemmen die DC-Aktivierung [145, 146]. Auch wurde eine Beeinflussung der Makrophagenpolarisation zu M2 Makrophagen publiziert, die eher immunregulatorische Funktionen ausfüllen [2]. Die logische Konsequenz, dass ein Wegfall der Hemmung durch T<sub>reg</sub>-Zellen zur Proliferation bzw. Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems führt, wurde bisher für DCs [124] sowie für neutrophile Granulozyten demonstriert [147]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte dieser Befund für Makrophagen und neutrophile Granulozyten ergänzt beziehungsweise bestätigt werden. Nach einer T<sub>reg</sub>-Zelldepletion wurde eine deutliche Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in der Milz gemessen. Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigten DEREK-Tiere nach einer Depletion mit hohen Dt-Dosen eine erniedrigte Suszeptibilität gegenüber Listerien im Vergleich zu Wt-Tieren (Abb. 03, Abb. 04). Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass T<sub>reg</sub>-Zellen neben dem adaptiven auch das angeborene Immunsystem regulieren. Durchaus sinnvoll erscheint es, dass Zellen des angeborenen Immunsystems aufgrund der destruktiven Wirkungen, die sie unter anderem durch die Bildung von Proteasen oder Sauerstoffradikalen haben, von T<sub>reg</sub>-Zellen kontrolliert werden. Speziell iT<sub>reg</sub>S, die am Ort der Entzündung und damit einer lokalen Ansammlung von Immunzellen entstehen, wären hierfür prädestiniert. Weiterhin zu beantworten ist über welchen Mechanismus und wie umfassend T<sub>reg</sub>-Zellen das angeborene Immunsystem regulieren. Andererseits ist insbesondere nach diesen Ergebnissen, die T<sub>reg</sub>-Zellen einen noch größeren Einfluss auf die Immunantwort einräumen, zu klären, wie die Aktivität von T<sub>reg</sub>-Zellen kontrolliert wird.

#### **4.5 Auswirkung einer Dt getriggerten T<sub>reg</sub>-Zelldepletion auf das adaptive Immunsystem**

Mittlerweile ist allgemein akzeptiert, dass regulatorische T-Zellen einen inhibitorischen Einfluss auf das adaptive Immunsystem haben [6, 33]. In den hier vorliegenden Experimenten wurde im Rahmen einer Listerieninfektion untersucht, wie die Auswirkungen einer T<sub>reg</sub>-Zelldepletion die Immunantwort gegen *L. monocytogenes* beeinflussen. In zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen wurde eine Depletion zu einem frühen bzw. einem späten Zeitpunkt durchgeführt. Die frühe Depletion beeinflusst sowohl die angeborene als auch die Entstehung und den Verlauf der erworbenen Immunantwort. Die Dt-Injektion zu einem späten Zeitpunkt zielt insbesondere auf die Rolle von T<sub>reg</sub>-Zellen in der Kontrolle der Expansion und der Differenzierung der spezifischen T-Zellantwort ab. Durch eine Stimulation mit LLO und

Ova (immundominante Listerienpeptide) oder PMA/Iono (polyklonale Stimulation) und eine anschließende Zytokinanalyse wurden die Stärke der Immunantwort und der Differenzierungsgrad der T-Zellen bestimmt.

Im Experiment, in dem wir eine frühe Depletion durchführten (d0 und d3, es wurde hier aufgrund der Nebenwirkungen bei höherer Dosis nur die 1 µg Dt Injektion analysiert) waren die Ergebnisse nach polyklonaler und listerienspezifischer Stimulation verschieden (Abb. 14). Nach Stimulation mit LLO/Ova war kein Unterschied in der Population der IFN  $\gamma^+$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen T<sub>reg</sub>-depletierten Tieren und der Kontrolle zu sehen. Allerdings konnte ein starker Effekt auf die Zytokinproduktion nach polyklonaler PMA/Iono-Stimulation gemessen werden, der in DEREK- und Wildtyp-Mäusen gegensätzlich ausfiel: Die Frequenz an IFN- $\gamma^+$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen war im Vergleich zur Kontrolle in Wildtyp-Tieren verringert, während sie in DEREK-Tieren erhöht war. Diese nach T<sub>reg</sub>-Depletion in DEREK-Tieren erhöhte Frequenz fällt noch stärker ins Gewicht, da eventuelle Nebenwirkungen einer Dt-Injektion diese verringern würden.

Im zweiten Versuchsansatz wurde ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss von T<sub>reg</sub>-Zellen in der vom adaptiven System bestimmten späten Phase der Immunantwort gelegt. Eine einzelne Injektion von 1 µg Dt wurde am fünften Tag nach Versuchsbeginn durchgeführt. Alle Mäuse überlebten und es konnten keine unspezifischen Nebeneffekte von Dt in Wildtyp-Mäusen mehr nachgewiesen werden (Abb. 15). Dafür zeigte sich eine signifikant erhöhte Frequenz an IFN- $\gamma^+$  TNF- $\alpha^+$  T-Lymphozyten nach Dt-Injektion in DEREK-Mäusen, sowohl nach listerienspezifischer als auch nach polyklonaler Injektion. Dieses Ergebnis bezieht sich auf den globalen Effekt der T<sub>reg</sub>-Depletion, eingeschlossen sind sowohl CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie Leber und Milz.

Generell ist bekannt, dass T<sub>reg</sub>-Zellen einen deutlichen Einfluss auf die adaptive Immunantwort bei einer Listerieninfektion haben [148]. In den hier durchgeführten Versuchen ist es für die Interpretation wichtig, zwischen polyklonaler und listerienspezifischer Antwort zu unterscheiden. Die T-Zellpopulation, die durch PMA/Iono Stimulation zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen angeregt werden kann, erhöhte sich gleichermaßen in beiden Versuchsmodellen nach T<sub>reg</sub>-Zelldepletion, also unabhängig vom Zeitpunkt der Depletion. Wahrscheinlich werden durch die ausbleibende Hemmung Zellen aktiviert, die sonst von den regulatorischen T-Zellen kontrolliert werden, unabhängig von einer Spezifität gegen Listerien. Dies könnten zum Beispiel autoreaktive Zellen, listerien- aber nicht für LLO/Ova spezifische Zellen oder nicht durch Listerien aktivierte aber generell zur Zytokinproduktion fähige Bystander-Zellen sein. Ein möglicher Grund für diese generell

erhöhten Populationen von aktivierten T-Zellen nach  $T_{reg}$ -Zelldepletion wäre eine Erhöhung der IL-2-Konzentration, weil  $T_{reg}$ -Zellen nun nicht mehr über CD25 um IL-2 konkurrieren [149].

Im Gegensatz dazu zeigte sich nach listerienspezifischer Stimulation je nach Zeitpunkt der  $T_{reg}$ -Zelldepletion ein unterschiedlicher Effekt. Während eine Depletion zu Beginn der Infektion keinen sichtbaren Effekt hatte, war die Population der aktivierten  $IFN-\gamma^+$   $TNF-\alpha^+$  T-Lymphozyten nach Dt-Injektion an Tag 5 signifikant erhöht. Diese gegensätzlichen Resultate können mit zwei Unterschieden zwischen den Versuchsmodellen erklärt werden: Dem Zeitpunkt der Depletion (d1 und d3 vs d5) und dem Versuchsende (d8 vs d10). Der Zeitpunkt der Injektion hat zur Folge, dass zu Beginn der Infektion, der Phase des T-Zell-Primings, nur beim Versuchsmodell der späten Depletion  $T_{reg}$ -Zellen vorhanden sind. Da  $T_{reg}$ -Zellen erst 5 Tage nach der letzten Dt-Injektion wieder im peripheren Blut und immunologischen Organen zu messen sind [150], sind sie nach früher wie nach später Injektion jeweils bis zum Versuchsende depletiert. Dies legt nahe, dass  $T_{reg}$ -Zellen eine wichtige Rolle beim Priming der listerienspezifischen T-Zellen spielen, da bei ihrer Anwesenheit zu Beginn der Immunreaktion die T-Zellantwort stärker ausfällt.

Das Versuchsende zu unterschiedlichen Zeitpunkten ist ein weiterer möglicher Grund für das gegensätzliche Ausfallen der Versuche. An Tag 10 ist die klonale Expansion der spezifisch gegen Listerien gerichteten T-Zellen weiter vorangeschritten als an Tag 8. Hierdurch sind an Tag 10 deutlich mehr listerienspezifische T-Lymphozyten vorhanden als zwei Tage vorher. Wie groß die Auswirkungen der jeweiligen Manipulationen auf den Versuchsverlauf sind, muss in nachfolgenden Versuchen gezeigt werden, die sich nur in einer Variablen unterscheiden, entweder dem Beobachtungszeitraum oder dem Injektionszeitpunkt.

Durch die  $T_{reg}$ -Zelldepletion möglicherweise ausgelöste autoreaktive Prozesse konnten in unserem Infektionsmodell nicht nachgewiesen werden, was wahrscheinlich im kurzen Depletions- und Beobachtungszeitraum begründet lag. Alle Ergebnisse der unterschiedlichen Versuche zusammengenommen scheint eine Immunantwort gegen *L. monocytogenes* durch eine Depletion aber effektiver zu werden. Hinweise hierfür geben die Titer- und Überlebensdaten aus Experimenten mit einer hohen Dt-Dosis. In diesen zeigten  $T_{reg}$ -depletierte Mäuse eine niedrigere Suszeptibilität als die Wildtyp-Mäuse.

Zusammenfassend spielen  $T_{reg}$ -Zellen während der gesamten Phase der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* eine relevante Rolle. Wenn zur Phase der klonalen Expansion keine  $T_{reg}$ -Zellen vorhanden waren, kam es zu einer signifikanten Steigerung der spezifisch gegen Listerien gerichteten T-Lymphozyten. Zu Beginn der Infektion scheinen sie eher eine

unterstützende Rolle einzunehmen. Vom Infektionsverlauf unabhängig hemmen  $T_{reg}$ -Zellen die Proliferation von nicht-listerienspezifischen T-Zellen.

#### **4.6 *Foxp3*<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen sind in der Lage inflammatorische Zytokine zu produzieren**

In unterschiedlichen Mausmodellen wurde von  $Foxp3$ <sup>+</sup> T-Zellen mit antigenspezifischen T-Zellrezeptoren (TCR) berichtet, zum Beispiel OVA- [50], HCV- [151] oder tumorspezifische [152]  $T_{reg}$ -Zellen. Ein Nachweis von  $T_{reg}$ -Zellen, die nach spezifischer Stimulation mit einem Listerienpeptid Zytokine produzieren, ist daher nicht unerwartet. Auch auf die Produktion von  $IFN-\gamma$  durch  $T_{reg}$ -Zellen gibt es bereits Hinweise [153]. Oldenhove *et al.* demonstrierten, dass  $Foxp3$ <sup>+</sup> T-Zellen nach einer letalen *Toxoplasma gondii* Infektion, die eine starke  $T_H1$ -Polarisation hervorruft, den für die  $T_H1$ -Zellpopulation essentiellen Transkriptionsfaktor *t-bet* exprimieren. Einhergehend mit einer *t-bet*-Expression synthetisieren  $T_{reg}$ -Zellen in einer geringen Konzentration auch  $IFN-\gamma$  [64]. Weiterhin veröffentlichten Koch *et al.*, dass  $Foxp3$ <sup>+</sup>-Zellen nach  $IFN-\gamma$  Stimulation *t-bet* hochregulieren [154]. In der hier vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse ergänzt werden. Nach *Listeria monocytogenes* Infektion, die ebenfalls eine  $T_H1$ -Polarisation hervorruft [155] erhöhte sich in der Milz nach polyklonaler Stimulation die Frequenz an  $IFN-\gamma$ <sup>+</sup>  $T_{reg}$ -Zellen von durchschnittlich ungefähr 1% auf fast 14% (Abb. 17). Des Weiteren konnten wir  $T_{reg}$ -Zellen identifizieren, die auf eine Stimulation mit Listerienantigen mit einer  $IFN-\gamma$ -Synthese antworteten (0,6% nach Infektion im Gegensatz zur Negativkontrolle von 0,1%). Dies deutet darauf hin, dass die  $T_{reg}$ -Zellen auch im Listerien-Modell Eigenschaften der  $T_H1$ -polarisierten Immunantwort erwerben. Konform mit den Ergebnissen von Oldenhove *et al.* [64] war der Anteil an  $IFN-\gamma$ <sup>+</sup>  $T_{reg}$ -Zellen deutlich geringer als in der  $CD4$ <sup>+</sup> Gesamtpopulation.

Zusätzlich produzierten  $T_{reg}$ -Zellen nach polyklonaler PMA/Iono Stimulation  $TNF-\alpha$ . Dies schien unabhängig von einer Infektion zu sein. Im hier gezeigten Versuch waren durchschnittlich ca. 11% der  $T_{reg}$ -Zellen  $TNF-\alpha$ <sup>+</sup> (Abb. 17). Dass die  $TNF-\alpha$ -Synthese auf T-Effektorzellen zurückzuführen ist, die unspezifisch  $Foxp3$ <sup>+</sup> ausprägen, ist sehr unwahrscheinlich. Es wurde zwar publiziert, dass T-Effektorzellen des Menschen  $Foxp3$  exprimieren können [156], in der Maus wird  $Foxp3$  aber bisher als hochspezifisch für  $T_{reg}$ -Zellen eingestuft [24, 25, 33, 34]. Die  $TNF-\alpha$  Synthese von  $T_{reg}$ -Zellen ist unter einem

immunologischen Gesichtspunkt nicht abwegig. Rudensky und Mitarbeiter beobachteten, dass  $T_{reg}$ -Zellen den für die  $T_H2$ -Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktor IRF4 (von engl. *Interferon regulatory factor-4*) in Abhängigkeit von Foxp3 exprimierten [157]. Die IRF4-Expression war für  $T_{reg}$ -Zellen essentiell, um  $T_H2$  Antworten zu regulieren. Aus dieser Beobachtung leiteten sie die These ab, dass  $T_{reg}$ -Zellen bestimmte Transkriptionsfaktoren der jeweils zu supprimierenden Zellpopulation exprimieren, um diese besser regulieren zu können [157]. Diese These untermauert die Beobachtung, dass  $T_{reg}$ -Zellen nur fähig sind  $T_H17$ -Zellen zu kontrollieren, wenn sie ebenfalls den für die  $T_H17$ -Funktion notwendigen Transkriptionsfaktor Stat3 (von engl. *Signal transducer and activator of transcription 3*) ausprägen [158]. Oldenhove *et al.* zeigten aber auch, dass trotz der Expression eines Effektortranskriptionsfaktors, in diesem Fall *t-bet*, die suppressorischen Eigenschaften erhalten bleiben [64].  $TNF-\alpha$  wird von  $T_H1$  und  $T_H17$ -Zellen aber auch von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert, die jeweils Ziele von  $T_{reg}$ -Zellen sind. Im Kontext dieser Veröffentlichungen, dass  $T_{reg}$ -Zellen die jeweiligen Transkriptionsfaktoren der zu regulierenden Population exprimieren und in bestimmten Situation sogar ein entsprechendes Effektorzytokinprofil ausbilden können, scheint die hier demonstrierte Fähigkeit zur  $TNF-\alpha$ -Produktion schlüssig.

Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass  $TNF-\alpha$  unter bestimmten Umständen immunsuppressiv wirken kann und eine  $TNF-\alpha$ -Sekretion damit nicht dem Grundkonzept einer  $T_{reg}$ -Zelle widersprechen würde. Chen und Oppenheim schreiben, dass  $TNF-\alpha$   $T_{reg}$ -Zellen aktivieren kann [159]. In einem Diabetes-Modell hatte die Gabe von  $TNF-\alpha$  zu unterschiedlichen Zeitpunkten gegensätzliche Auswirkungen: In neugeborene Mäuse injiziert verschlimmerte es die Diabetessymptomatik und verringerte die Anzahl an  $CD25^+ CD4^+$  Zellen in der Milz. In adulten Tieren verbesserte es die Symptomatik und vergrößerte die Population der  $CD25^+ CD4^+$  Zellen in der Milz [160, 161]. Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass in einem adulten vollen  $T_{reg}$ -Kompartiment  $TNF-\alpha$  die  $T_{reg}$ -Zellen zur Proliferation stimuliert und die Immunbalance in Richtung Toleranz verschiebt, während im Neugeborenen vor allem die Effektorzellen angeregt werden [159]. Generell wird die Wirkung von  $TNF-\alpha$  auf die Ausbildung von Autoimmunität kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite fördert eine Überproduktion von  $TNF-\alpha$  in verschiedenen Mausmodellen die Autoimmunsymptomatik [162]. Auf der anderen Seite unterdrückt eine  $TNF-\alpha$  Injektion Typ1 Diabetes wie auch Lupus Nephritis und eine  $TNF-\alpha$ -Defizienz beschleunigt die Lupus Nephritis [161, 163, 164].

T<sub>reg</sub>-Zellen exprimieren mehr TNF-Rezeptor 2 auf der Oberfläche als CD4<sup>+</sup> Effektorzellen und eine Kostimulation von TNF- $\alpha$  und IL-2 kann die CD25- und Foxp3-Expression verstärken [165]. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Erkenntnis, dass der TNF-Rezeptor 2 die immunregulatorische Aktivität von TNF- $\alpha$  vermittelt, während der TNF-Rezeptor 1 für inflammatorische Effekte verantwortlich ist [166-168]. Aus der Expression von TNF- $\alpha$  und TNF-Rezeptor 2 ergibt sich sogar die Möglichkeit einer autokrinen oder parakrinen Stimulation von T<sub>reg</sub>-Zellen [165].

Generell häufen sich Hinweise, dass T<sub>reg</sub>-Zellen keine statische T-Zellpopulation sind. Vielmehr scheinen T<sub>reg</sub>-Zellen sich dem Milieu der Immunantwort anzupassen, um bei Infektionen T-Effektorzellen unterstützen zu können [64]. Unter bestimmten Umständen erwerben sie auch selbst T-Effektoreigenschaften, zum Beispiel von T<sub>H</sub>2-Zellen [169], folliculären T-Helferzellen [65], T<sub>H</sub>17-Zellen [62, 63] oder wie hier gezeigt von T<sub>H</sub>1-Zellen. Hierbei können sie sogar Antigenpezifitäten wie die jeweiligen Effektor-T-Zellen besitzen [50, 151, 152], was auch hier für *L. monocytogenes* demonstriert werden konnte. In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Fähigkeit von T<sub>reg</sub>-Zellen zur Produktion von IFN- $\gamma$  bestätigt werden. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass T<sub>reg</sub>-Zellen unabhängig von einer Infektion TNF- $\alpha$  synthetisieren können. Von Interesse ist, wie der Erwerb von T-Effektoreigenschaften reguliert wird und wie sich diese Antwort im zeitlichen Verlauf der Infektion darstellt.

## 4.6 Resümee und Ausblick

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Diphtherietoxin in Mäusen nicht neutral ist, sondern ganz im Gegensatz bereits in häufig verwendeten „Standarddosierungen“ zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt und die Vulnerabilität der Maus für eine Listerieninfektion erhöht. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es unabhängig von der Fragestellung angezeigt, in Wt-Kontrollen Dt-Nebeneffekte zu ermitteln, um sicherzustellen, dass die Beobachtungen alleine auf einer Depletion der jeweiligen Zielzelle beruhen.

Bei Verwendung einer niedrigeren Dosis war eine aussagekräftige Analyse der T<sub>reg</sub>-Zellfunktion möglich. T<sub>reg</sub>-Zellen spielen während der Infektion mit *L. monocytogenes* eine suppressive Rolle und hemmen sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem. Zum einen zeigte sich dies in einer erhöhten Frequenz an Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nach T<sub>reg</sub>-Zelldepletion. Zum anderen stieg insbesondere nach T<sub>reg</sub>-Zelldepletion in der Phase der klonalen Expansion der Anteil an aktivierten CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> Lymphozyten, der spezifisch gegen Listerien gerichtet war. Zu beantworten ist, über welchen Mechanismus und wie umfassend T<sub>reg</sub>-Zellen das Immunsystem regulieren und ob es überwiegend iT<sub>regS</sub> sind, die vor allem am Ort der Entzündung entstehen und dort diese Funktion ausführen könnten.

T<sub>reg</sub>-Zellen synthetisierten in unserem Infektionsmodell IFN- $\gamma$  und eine Subpopulation dieser IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen wies sogar eine Spezifität für bakterielle Antigene auf. Zusätzlich wurde gezeigt, dass T<sub>reg</sub>-Zellen eine generelle Fähigkeit zur TNF- $\alpha$ -Synthese besitzen, die aber nicht listerienspezifisch bzw. infektiionsabhängig zu sein scheint. Diese TNF- $\alpha$ -Synthese widerspricht nicht grundsätzlich der Aufgabe einer Suppressorzelle, da auch für dieses Zytokin gezeigt wurde, dass es immunmodulatorisch wirken kann. Hier ist nun von Interesse, ob es einen natürlichen Stimulus gibt, durch den T<sub>reg</sub>-Zellen TNF- $\alpha$  synthetisieren und ob eine funktionelle Bedeutung für diese Fähigkeit vorhanden ist. Für die IFN- $\gamma$  Synthese liegt eine Unterstützung der Immunabwehr bei schweren Infektionen nahe, auch wenn es zu untersuchen gilt, inwieweit die Ausprägung eines Effektorzytokinprofils von der Höhe und dem zeitlichen Verlauf der Infektion abhängig ist. Weiterhin ist nach diesen Resultaten, die T<sub>reg</sub>-Zellen einen noch größeren Einfluss auf die Immunantwort einräumen, zu klären, wie die Aktivität von T<sub>reg</sub>-Zellen selbst kontrolliert wird. Generell sind diese Ergebnisse ein weiteres Indiz dafür, dass T<sub>reg</sub>-Zellen mehr sind als einfache Suppressorzellen. Zu untersuchen ist, wie diese Funktionen mit den anderen Komponenten des Immunsystems ineinandergreifen und wo die Grenzen dieser Flexibilität der Zytokinproduktion von T<sub>reg</sub>-Zellen sind.

## 5 Zusammenfassung

Die gezielte Zelldepletion durch Diphtherietoxin (Dt)-Injektion in Mäusen mit gewebe- oder zellspezifischer Expression des humanen Diphtherietoxinrezeptors (DtR) ist eine elegante und verbreitete Methode zur *in vivo* Analyse immunologischer Prozesse. Das Modell beruht auf der Annahme, dass das DtR-Homolog der Maus Dt  $10^3$ - $10^5$ -fach schlechter bindet und dadurch murine Zellen durch Dt nicht beeinflusst werden. DEREG- (Depletion of regulatory T cells) Mäuse tragen ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) und den humanen DtR transgen auf regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ -Zellen). GFP erlaubt den einfachen Nachweis von  $T_{reg}$ -Zellen und durch die Gabe von Dt können gezielt  $T_{reg}$ -Zellen depletiert werden.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass Diphtherietoxin nicht den ihm von einigen Publikationen zugedachten neutralen Status besitzt, sondern abhängig von Charge und Dosis schwere Nebeneffekte erzeugte. Neben einer Akkumulation und Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten konnte eine eingeschränkte T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes* nach Dt-Applikation festgestellt werden. Eine hohe Dt-Dosis führte zu einer gesteigerten Suszeptibilität der Mäuse gegenüber einer Listerieninfektion und wirkte auch unabhängig von dieser zum Teil letal. Eine ausführliche Analyse des Dt in verschiedenen *in vitro* Assays ergab keine Hinweise auf eine Kontamination durch andere mikrobielle Bestandteile. Generell empfehlen diese Ergebnisse eine sehr vorsichtige Herangehensweise an Mausmodelle, die auf der Zelldepletion durch Dt basieren.

Bei Verwendung einer niedrigeren Dosis konnte eine aussagekräftige Analyse der  $T_{reg}$ -Zellfunktion durchgeführt werden.  $T_{reg}$ -Zellen unterdrückten sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem. Nach  $T_{reg}$ -Zelldepletion waren die Populationen der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten deutlich erhöht. Eine Behandlung mit *L. monocytogenes* und zusätzlicher  $T_{reg}$ -Zelldepletion zu Beginn und im Verlauf der Infektion ergab, dass insbesondere zum Zeitpunkt der klonalen Expansion der listerienspezifischen T-Zellen eine Dt-Injektion zu einer signifikanten Erhöhung der Frequenz dieser Population führte. Zusätzlich verursachte eine  $T_{reg}$ -Zelldepletion vom Infektionsverlauf unabhängig eine Akkumulation von polyklonal aktivierbaren T-Lymphozyten.

Foxp3<sup>+</sup>  $T_{reg}$ -Zellen besitzen die Fähigkeit, ein  $T_H1$ -Effektorzytokinprofil auszubilden. Hierbei war die IFN- $\gamma$ -Synthese von einer Infektion mit *L. monocytogenes* abhängig und es zeigten sich sogar listerienspezifische  $T_{reg}$ -Zellen, während das Differenzierungsvermögen von  $T_{reg}$ -Zellen zur TNF- $\alpha$ -Produktion infektionsunabhängig war.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serumalbumin
Cy-5	Cyanin-5
DC	Dendritische Zelle
DEREG	<i>Depletion of regulatory T-Cells</i>
Dt	Diphtherietoxin
DtR	Diphtherietoxinrezeptor
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht von engl. <i>forward scatter</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
LLO	Listeriolysin O
<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung von engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein <i>Complex</i>
PFA	Paraformaldehyd
SSC	Seitwärtsstreulicht von engl. <i>side scatter</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Wt	Wildtyp

## 7 Literaturverzeichnis

1. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
2. Liu, G., et al., *Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in mice*. Immunol Cell Biol. **89**(1): p. 130-42.
3. Denning, T.L., et al., *Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses*. Nat Immunol, 2007. **8**(10): p. 1086-94.
4. Hoves, S., et al., *Monocyte-derived human macrophages mediate anergy in allogeneic T cells and induce regulatory T cells*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2691-8.
5. Kenneth Murphy, P.T., Mark Walport, *Janeway's Immunobiology 7th Edition*. 2008.
6. Vignali DA, C.L., Workman CJ, *How regulatory T cells work*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**: p. 523-532.
7. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Infectious immunological tolerance*. Immunology, 1971. **21**(6): p. 903-14.
8. Littman, D.R. and A.Y. Rudensky, *Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 845-58.
9. Sakaguchi, S. and N. Sakaguchi, *Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease*. Int Rev Immunol, 2005. **24**(3-4): p. 211-26.
10. Sugihara, S., et al., *Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt-1 dull L3T4 bright normal T cells for the induction of thyroiditis*. J Immunol, 1988. **141**(1): p. 105-13.
11. Sakaguchi, S., et al., *Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease*. J Exp Med, 1985. **161**(1): p. 72-87.
12. Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka, *Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis*. J Exp Med, 1982. **156**(6): p. 1577-86.
13. Powrie, F. and D. Mason, *OX-22<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22<sup>low</sup> subset*. J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1701-8.
14. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
15. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 387-96.
16. Baecher-Allan, C., et al., *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
17. Allan, S.E., et al., *Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production*. Int Immunol, 2007. **19**(4): p. 345-54.
18. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.

19. Gambineri, E., T.R. Torgerson, and H.D. Ochs, *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*. *Curr Opin Rheumatol*, 2003. **15**(4): p. 430-5.
20. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 20-1.
21. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 68-73.
22. Ziegler, S.F., *FOXP3: not just for regulatory T cells anymore*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(1): p. 21-3.
23. Nik Tavakoli, N., et al., *Forkhead box protein 3: essential immune regulatory role*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(11): p. 2369-73.
24. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. *Science*, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
25. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 330-6.
26. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 337-42.
27. Fontenot, J.D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 329-41.
28. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(14): p. 5126-31.
29. Kim, J., et al., *Cutting edge: depletion of Foxp3+ cells leads to induction of autoimmunity by specific ablation of regulatory T cells in genetically targeted mice*. *J Immunol*, 2009. **183**(12): p. 7631-4.
30. Liston, A., et al., *Lack of Foxp3 function and expression in the thymic epithelium*. *J Exp Med*, 2007. **204**(3): p. 475-80.
31. Wang, J., et al., *Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(1): p. 129-38.
32. Gavin, M.A., et al., *Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(17): p. 6659-64.
33. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. *Cell*, 2008. **133**(5): p. 775-87.
34. Zheng, Y. and A.Y. Rudensky, *Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(5): p. 457-62.
35. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(7): p. 490-500.
36. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 626-35.
37. Bensinger, S.J., et al., *Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)/25(+) immunoregulatory T cells*. *J Exp Med*, 2001. **194**(4): p. 427-38.
38. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(4): p. 301-6.
39. Larkin, J., 3rd, et al., *CD4+CD25+ regulatory T cell repertoire formation shaped by differential presentation of peptides from a self-antigen*. *J Immunol*, 2008. **180**(4): p. 2149-57.

40. Sakaguchi, S., *Policing the regulators*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 283-4.
41. van Santen, H.M., C. Benoist, and D. Mathis, *Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells*. J Exp Med, 2004. **200**(10): p. 1221-30.
42. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
43. Sun, C.M., et al., *Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1775-85.
44. Curotto de Lafaille, M.A., et al., *Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 114-26.
45. Liu, Y., et al., *A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 632-40.
46. Cobbold, S.P., et al., *Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6003-10.
47. Coombes, J.L. and F. Powrie, *Dendritic cells in intestinal immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 435-46.
48. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
49. Mucida, D., et al., *Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid*. Science, 2007. **317**(5835): p. 256-60.
50. Mucida, D., et al., *Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1923-33.
51. Miller, A., et al., *Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 421-5.
52. Faria, A.M. and H.L. Weiner, *Oral tolerance*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 232-59.
53. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 646-55.
54. Ivanov, II, et al., *Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(4): p. 337-49.
55. Janson, P.C., et al., *FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1612.
56. Buckner, J.H., *Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 849-59.
57. Zhou, X., et al., *Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo*. Nat Immunol, 2009. **10**(9): p. 1000-7.
58. Komatsu, N., et al., *Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1903-8.
59. Huehn, J., J.K. Polansky, and A. Hamann, *Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 83-9.
60. Floess, S., et al., *Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells*. PLoS Biol, 2007. **5**(2): p. e38.

61. Polansky, J.K., et al., *DNA methylation controls Foxp3 gene expression*. Eur J Immunol, 2008. **38**(6): p. 1654-63.
62. Xu, L., et al., *Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6725-9.
63. Yang, X.O., et al., *Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 44-56.
64. Oldenhove, G., et al., *Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 772-86.
65. Tsuji, M., et al., *Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches*. Science, 2009. **323**(5920): p. 1488-92.
66. Hsieh, C.S., et al., *An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires*. Nat Immunol, 2006. **7**(4): p. 401-10.
67. Demengeot, J., et al., *Regulatory T cells in microbial infection*. Springer Semin Immunopathol, 2006. **28**(1): p. 41-50.
68. Wohlfert, E. and Y. Belkaid, *Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections*. J Clin Immunol, 2008. **28**(6): p. 707-15.
69. Kandulski, A., et al., *Naturally occurring regulatory T cells (CD4+, CD25high, FOXP3+) in the antrum and cardia are associated with higher H. pylori colonization and increased gene expression of TGF-beta1*. Helicobacter, 2008. **13**(4): p. 295-303.
70. Maizels, R., *Regulation of the immune system in metazoan parasite infections*. Novartis Found Symp, 2007. **281**: p. 192-204; discussion 204-9.
71. McSorley, H.J., et al., *Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite Brugia malayi*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6456-66.
72. Robertson, S.J. and K.J. Hasenkrug, *The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology*. Springer Semin Immunopathol, 2006. **28**(1): p. 51-62.
73. Li, S., et al., *Natural regulatory T cells and persistent viral infection*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 21-30.
74. Ward, S.M., et al., *Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection*. J Hepatol, 2007. **47**(3): p. 316-24.
75. Ebinuma, H., et al., *Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in hepatitis C virus infection*. J Virol, 2008. **82**(10): p. 5043-53.
76. Hall, C.H., et al., *HCV+ hepatocytes induce human regulatory CD4+ T cells through the production of TGF-beta*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12154.
77. Holmes, R.K., *Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene*. J Infect Dis, 2000. **181 Suppl 1**: p. S156-67.
78. Freeman, V.J., *Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of Corynebacterium diphtheriae*. J Bacteriol, 1951. **61**(6): p. 675-88.
79. Groman, N.B., *The relation of bacteriophage to the change of Corynebacterium diphtheriae from avirulence to virulence*. Science, 1953. **117**(3038): p. 297-9.
80. Groman, N.B., *Conversion by corynephages and its role in the natural history of diphtheria*. J Hyg (Lond), 1984. **93**(3): p. 405-17.
81. Holmes, R.K. and L. Barksdale, *Genetic analysis of tox+ and tox- bacteriophages of Corynebacterium diphtheriae*. J Virol, 1969. **3**(6): p. 586-98.
82. Greenfield, L., et al., *Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(22): p. 6853-7.

83. Tsuneoka, M., et al., *Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26461-5.
84. Draper, R.K. and M.I. Simon, *The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement*. J Cell Biol, 1980. **87**(3 Pt 1): p. 849-54.
85. Sandvig, K. and S. Olsnes, *Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH*. J Cell Biol, 1980. **87**(3 Pt 1): p. 828-32.
86. Honjo, T., Y. Nishizuka, and O. Hayaishi, *Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis*. J Biol Chem, 1968. **243**(12): p. 3553-5.
87. Robinson, E.A., O. Henriksen, and E.S. Maxwell, *Elongation factor 2. Amino acid sequence at the site of adenosine diphosphate ribosylation*. J Biol Chem, 1974. **249**(16): p. 5088-93.
88. Van Ness, B.G., J.B. Howard, and J.W. Bodley, *ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. NMR spectra and proposed structures of ribosyl-diphthamide and its hydrolysis products*. J Biol Chem, 1980. **255**(22): p. 10710-6.
89. Naglich, J.G., et al., *Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor*. Cell, 1992. **69**(6): p. 1051-61.
90. Pappenheimer, A.M., Jr., et al., *Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells*. J Infect Dis, 1982. **145**(1): p. 94-102.
91. Mekada, E., et al., *Methylamine facilitates demonstration of specific uptake of diphtheria toxin by CHO cell and toxin-resistant CHO cell mutants*. Biochem Biophys Res Commun, 1982. **109**(3): p. 792-9.
92. Mitamura, T., et al., *Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 27084-90.
93. Cha, J.H., J.S. Brooke, and L. Eidels, *Toxin binding site of the diphtheria toxin receptor: loss and gain of diphtheria toxin binding of monkey and mouse heparin-binding, epidermal growth factor-like growth factor precursors by reciprocal site-directed mutagenesis*. Mol Microbiol, 1998. **29**(5): p. 1275-84.
94. Lahl, K., et al., *Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 57-63.
95. Thorburn, J., A.E. Frankel, and A. Thorburn, *Apoptosis by leukemia cell-targeted diphtheria toxin occurs via receptor-independent activation of Fas-associated death domain protein*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 861-5.
96. Miyake, Y., et al., *Protective role of macrophages in noninflammatory lung injury caused by selective ablation of alveolar epithelial type II Cells*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 5001-9.
97. Bennett, C.L., et al., *Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity*. J Cell Biol, 2005. **169**(4): p. 569-76.
98. Jung, S., et al., *In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 211-20.
99. Zaft, T., et al., *CD11c<sup>high</sup> dendritic cell ablation impairs lymphopenia-driven proliferation of naive and memory CD8+ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6428-35.
100. Zammit, D.J., et al., *Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 561-70.

101. Probst HC, T.K., Odermatt B, Schwendener R, Zinkernagel RM, Van Den Broek M., *Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells*. Clin Exp Immunol., 2005. **141**(3): p. 398-404.
102. van Rijt, L.S., et al., *In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma*. J Exp Med, 2005. **201**(6): p. 981-91.
103. Hebel, K., et al., *Plasma cell differentiation in T-independent type 2 immune responses is independent of CD11c(high) dendritic cells*. Eur J Immunol, 2006. **36**(11): p. 2912-9.
104. Laouar, Y., et al., *Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 600-7.
105. Chen, G.Y., et al., *Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5163-6.
106. Chang, X., et al., *The Scurfy mutation of FoxP3 in the thymus stroma leads to defective thymopoiesis*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1141-51.
107. Tuovinen, H., et al., *Cutting edge: human CD4-CD8- thymocytes express FOXP3 in the absence of a TCR*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3651-4.
108. Huter, E.N., et al., *TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice*. Eur J Immunol, 2008. **38**(7): p. 1814-21.
109. Klages, K., et al., *Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma*. Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 7788-99.
110. Suttner, K., et al., *Genetic variants harbored in the forkhead box protein 3 locus increase hay fever risk*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(6): p. 1395-9.
111. Steeg, C., et al., *Limited role of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental cerebral malaria*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 7014-22.
112. Mittrucker, H.W., A. Kohler, and S.H. Kaufmann, *Substantial in vivo proliferation of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes during secondary Listeria monocytogenes infection*. Eur J Immunol, 2000. **30**(4): p. 1053-9.
113. Kursar, M., et al., *Organ-specific CD4+ T cell response during Listeria monocytogenes infection*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6382-7.
114. Foulds, K.E., et al., *Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1528-32.
115. Kursar, M., et al., *Differential requirements for the chemokine receptor CCR7 in T cell activation during Listeria monocytogenes infection*. J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1447-57.
116. Inamura, S., et al., *Synthesis of peptidoglycan fragments and evaluation of their biological activity*. Org Biomol Chem, 2006. **4**(2): p. 232-42.
117. Austyn, J.M. and S. Gordon, *F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage*. Eur J Immunol, 1981. **11**(10): p. 805-15.
118. Daley, J.M., et al., *Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(1): p. 64-70.
119. El Hage, T., P. Decottignies, and F. Authier, *Endosomal proteolysis of diphtheria toxin without toxin translocation into the cytosol of rat liver in vivo*. Febs J, 2008. **275**(8): p. 1708-22.
120. DeLange, R.J., R.E. Drazin, and R.J. Collier, *Amino-acid sequence of fragment A, an enzymically active fragment from diphtheria toxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(1): p. 69-72.

121. Lambotte, P., et al., *Primary structure of diphtheria toxin fragment B: structural similarities with lipid-binding domains*. J Cell Biol, 1980. **87**(3 Pt 1): p. 837-40.
122. Copeland, S., et al., *Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(1): p. 60-7.
123. Saito, M., et al., *Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(8): p. 746-50.
124. Kim, J.M., J.P. Rasmussen, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 191-7.
125. Wang, L., et al., *Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate*. Cancer Cell, 2009. **16**(4): p. 336-46.
126. Zuo, T., et al., *FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1275-86.
127. Brown, I.E., et al., *Homeostatic proliferation as an isolated variable reverses CD8+ T cell anergy and promotes tumor rejection*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4521-9.
128. Gattinoni, L., et al., *Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1616-26.
129. Wang, L.X., et al., *Interleukin-7-dependent expansion and persistence of melanoma-specific T cells in lymphodepleted mice lead to tumor regression and editing*. Cancer Res, 2005. **65**(22): p. 10569-77.
130. Goiman, E.V., et al., *Processes of homeostatic proliferation in the pathogenesis of autoimmune glomerulonephritis induced by chronic graft-versus-host reaction*. Bull Exp Biol Med, 2010. **149**(1): p. 54-6.
131. Chang, X., P. Zheng, and Y. Liu, *Homeostatic proliferation in the mice with germline FoxP3 mutation and its contribution to fatal autoimmunity*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2399-406.
132. Sather, B.D., et al., *Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1335-47.
133. Komatsu, N. and S. Hori, *Full restoration of peripheral Foxp3+ regulatory T cell pool by radioresistant host cells in scurfy bone marrow chimeras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 8959-64.
134. Dudda, J.C., et al., *Foxp3+ regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1559-65.
135. Smyk-Pearson, S.K., et al., *Rescue of the autoimmune scurfy mouse by partial bone marrow transplantation or by injection with T-enriched splenocytes*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 193-9.
136. Beutler, B., I.W. Milsark, and A.C. Cerami, *Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin*. Science, 1985. **229**(4716): p. 869-71.
137. Dankesreiter, S., et al., *Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF-alpha production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4804-11.
138. Cerami, A., et al., *Weight loss associated with an endotoxin-induced mediator from peritoneal macrophages: the role of cachectin (tumor necrosis factor)*. Immunol Lett, 1985. **11**(3-4): p. 173-7.
139. Munker, R., et al., *Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*. Nature, 1986. **323**(6083): p. 79-82.
140. Miller, L. and J.S. Hunt, *Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 5098-104.

141. Meyer Zu Horste, G., et al., *Active immunization induces toxicity of diphtheria toxin in diphtheria resistant mice--implications for neuroinflammatory models*. J Immunol Methods, 2010. **354**(1-2): p. 80-4.
142. Lewkowicz, P., et al., *Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7155-63.
143. Ralainirina, N., et al., *Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 144-53.
144. Azuma, T., et al., *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4516-20.
145. Misra, N., et al., *Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4676-80.
146. Veldhoen, M., et al., *Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 6202-10.
147. Lee, D.C., et al., *CD25+ natural regulatory T cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection*. J Virol, 2010. **84**(17): p. 8790-8.
148. Kursar, M., et al., *Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1585-92.
149. Maurus de la Rosa, S.R., Heike Dorninger, Alexander Scheffold, *Interleukin-2 is essential for CD4+ CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. **34**: p. 2480-2488.
150. Lahl, K., Sparwasser, T.. *In Vivo Depletion of FoxP3+ Tregs Using the DEREK Mouse Model*. Methods in Molecular Biology, 2011. **707**: p. 157-72.
151. Li, S., et al., *Analysis of FOXP3+ regulatory T cells that display apparent viral antigen specificity during chronic hepatitis C virus infection*. PLoS Pathog, 2009. **5**(12): p. e1000707.
152. Jandus, C., et al., *Tumor antigen-specific FOXP3+ CD4 T cells identified in human metastatic melanoma: peptide vaccination results in selective expansion of Th1-like counterparts*. Cancer Res, 2009. **69**(20): p. 8085-93.
153. Wei, G., et al., *Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 155-67.
154. Koch, M.A., et al., *The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 595-602.
155. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
156. Kmieciak, M., et al., *Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 89.
157. Zheng, Y., et al., *Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses*. Nature, 2009. **458**(7236): p. 351-6.
158. Chaudhry, A., et al., *CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner*. Science, 2009. **326**(5955): p. 986-91.
159. Chen, X. and J.J. Oppenheim, *TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells*. Curr Dir Autoimmun, 2010. **11**: p. 119-34.
160. Wu, A.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12287-92.

161. Jacob, C.O., et al., *Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(3): p. 968-72.
162. Kruglov, A.A., et al., *Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(3-4): p. 231-44.
163. Jacob, C.O. and H.O. McDevitt, *Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune 'lupus' nephritis*. Nature, 1988. **331**(6154): p. 356-8.
164. Kontoyiannis, D. and G. Kollias, *Accelerated autoimmunity and lupus nephritis in NZB mice with an engineered heterozygous deficiency in tumor necrosis factor*. Eur J Immunol, 2000. **30**(7): p. 2038-47.
165. Chen, X., et al., *Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 154-61.
166. Kassiotis, G. and G. Kollias, *Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination*. J Exp Med, 2001. **193**(4): p. 427-34.
167. Suvannavejh, G.C., et al., *Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis*. Cell Immunol, 2000. **205**(1): p. 24-33.
168. Ebach, D.R., T.E. Riehl, and W.F. Stenson, *Opposing effects of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in sepsis due to cecal ligation and puncture*. Shock, 2005. **23**(4): p. 311-8.
169. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 766-70.

## 8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuallererst bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans-Willi Mittrücker. Er stand mir stets Rat und Tat zur Seite, half auch am Wochenende im Labor aus, unterstützte mich in aller Ausführlichkeit beim Schreiben dieser Dissertation und hatte durchgehend im wahrsten Sinne des Wortes eine offene Tür für meine Fragen.

Dem ganzen Team des Instituts für Immunologie möchte ich für die familiäre und angenehme Atmosphäre danken, die ihren eigenen Teil zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat. Besonderen Dank aussprechen möchte ich Frau Valéa Schumacher, die mich in die Tiefen der Laborarbeit eingeführt hat, gerne auch schon in aller Herrgottsfrühe geholfen hat, damit das Experiment rechtzeitig fertig wurde und immer für einen reibungslosen Ablauf im Laboralltag gesorgt hat. Herrn Dr. Timo Lischke möchte ich herzlich für seine aufschlussreichen Hinweise zur Formulierung und Verbesserung dieser Dissertationsschrift sowie für seine Hilfe bei der Durchführung der Versuche danken.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Gisa Tiegs und Herrn Prof. Dr. med. Markus Glatzel möchte ich für die begleitende Betreuung dieser Arbeit danken.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Tim Sparwasser für das Bereitstellen der DEREK-Maus und bei Herrn PD Dr. rer. nat. Holger Heine für die freundliche Zusammenarbeit bei der Untersuchung des Diphtherietoxins auf TLR und NOD stimulierende Verunreinigungen sowie bei Frau Susanne Sehner für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Für die finanzielle Unterstützung während meiner Laborzeit möchte ich mich ganz herzlich bei der Deutschen Forschungsgesellschaft und hier dem Graduiertenkolleg 841 „Entzündung und Regeneration“ bedanken.

Meinen Eltern möchte ich für die fortwährende und liebevolle Unterstützung während meines gesamten Studiums danken.

# 9 Lebenslauf

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

# 10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....