

To be or not to be a Treg

Epigenetische Regulation der Foxp3-Expression in regulatorischen T-Zellen

Regulatorische T-Zellen: neue therapeutische Hoffnungsträger

Regulatorische T-Zellen (Tregs) besitzen suppressorische Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, Immunreaktionen zu verhindern oder gar abzuschalten. Durch diese Funktion sind sie essenzielle Kontrolleure eines ausbalancierten Immunsystems. Fehlen sie, entstehen schwere Autoimmunerkrankungen durch überschießende Immunreaktionen. Sind sie in zu großer Zahl vorhanden, können sie effektive Immunantworten gegen Tumoren oder Krankheitserreger unterdrücken. Da die Tregs im Gegensatz zu den derzeit eingesetzten Immunsuppressiva antigenspezifisch wirken, werden für die Therapie von Autoimmunerkrankungen oder Graft-versus-Host-Disease sowie für die Akzeptanz von Allograften große Hoffnungen in diese T-Zell-Subpopulation gesetzt. Transfer von *in vitro* generierten oder expandierten Tregs oder auch die *In-vivo*-Modulation von endogenen Tregs wären mögliche Wege einer therapeutischen Nutzung.

Bei Tregs handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von T-Lymphozyten, die allein durch ihre suppressorischen Eigenschaften charakterisiert wird. Zu den Tregs gehören auch Tr1- und Th3-Zellen, welche im Verlauf von Immunreaktionen induziert werden können und welche die suppressorischen Zytokine Interleukin-10 und „transforming growth factor β “ (TGF- β) sezernieren. Die wahrscheinlich größte und am besten untersuchte Gruppe sind die natürlich vorkom-

menden CD25⁺CD4⁺-Tregs (nTregs), die in diesem Artikel behandelt werden. Sie stellen 5–10% aller CD4⁺-T-Zellen in gesunden Individuen und exprimieren den Transkriptionsfaktor Foxp3, der sowohl für die suppressorische Kapazität als auch für die Zugehörigkeit zur Treg-Linie essenziell ist. Der molekulare zellkontaktabhängige Wirkmechanismus von Tregs ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

Thymus vs. Peripherie: Entwicklung und Induktion von Tregs

Wie andere T-Zell-Populationen entstehen auch nTregs im Thymus aus eingewanderten Vorläufer-T-Zellen des Kno-

chenmarks und werden positiv selektioni-ert. Ihre T-Zell-Rezeptoren weisen eine erhöhte Affinität für Selbst-Antigene auf, die jedoch noch unterhalb der Schwelle für die negative Selektion liegt. Gegen Ende der Reifung wird die Expression von Foxp3 initiiert, und die reifen nTregs verlassen den Thymus, um durch die Peripherie zu zirkulieren (Abb. 1).

Studien zeigen, dass Foxp3⁺-Tregs *in vivo* auch in der Peripherie aus naiven Foxp3⁻-T-Zellen entstehen können

In den letzten Jahren wurde durch mehrere Studien gezeigt, dass Foxp3⁺-Treg *in vivo*

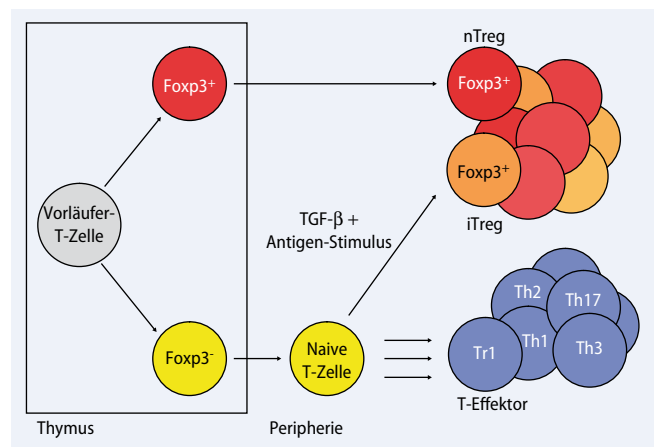


Abb. 1 ▲ Entstehung von Foxp3⁺-Tregs. Natürliche Foxp3⁺-Tregs (nTreg) entstehen aus Vorläufer-T-Zellen im Thymus als stabile Linie. Foxp3⁻-Thymozyten verlassen den Thymus als antigenunerfahrene (naive) T-Zellen und differenzieren nach entsprechender antigenspezifischer Stimulation zu T-Effektor-Zellen unterschiedlichen Typs. Durch einen schwachen Antigenstimulus in Anwesenheit von TGF- β können sie sich auch zu Foxp3⁺-Tregs mit suppressorischen Eigenschaften entwickeln (induzierte Tregs: iTreg)

Z Rheumatol 2007 · 66:417–420
DOI 10.1007/s00393-007-0192-2
© Springer Medizin Verlag 2007

J.K. Polansky · J. Huehn

To be or not to be a Treg. Epigenetische Regulation der Foxp3-Expression in regulatorischen T-Zellen

Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen (Tregs) bergen aufgrund ihrer potenten immunsuppressiven Eigenschaften ein großes therapeutisches Potenzial für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Der Großteil dieser Zellen exprimiert den Transkriptionsfaktor Foxp3, der für die Entwicklung und Funktion der Tregs essenziell ist. Hier diskutieren wir die Ergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, in der wir zeigen konnten, dass die permanente Foxp3-Expression in stabilen Tregs durch epigenetische Mechanismen kontrolliert ist – eine Beobachtung, welche eine signifikante Bedeutung für den therapeutischen Einsatz von Tregs in der Klinik hat.

Schlüsselwörter

DNA-Methylierung · Epigenetische Genregulation · Foxp3 · Induzierte regulatorische T-Zellen · TGF- β

To be or not to be a Treg. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells

Abstract

Regulatory T cells (Treg) harbor great therapeutic potential for the treatment of autoimmune diseases due to their potent suppressive capacity. The majority of these cells express the transcription factor Foxp3, which is critical for both development and function of Treg. We discuss here our recent data indicating a contribution of epigenetic regulation for the permanent expression of Foxp3 in stable Treg a finding that is of significant importance if Treg are devised for clinical applications.

Keywords

DNA methylation · Epigenetic gene regulation · Foxp3 · Induced regulatory T cells · TGF- β

auch in der Peripherie aus antigenunerfahrenen (naiven) konventionellen Foxp3⁻-T-Zellen entstehen können. Für diese Konversion war ein schwacher subimmunogener Antigenstimulus essenziell; TGF- β scheint dabei ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Der Anteil dieser konvertierten Tregs am gesamten Treg-Pool sowie ihre Lebensdauer und die Bedingungen ihrer Entstehung sind bisher noch weitgehend ungeklärt (■ Abb. 1).

Durch T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung in der Anwesenheit von TGF- β können auch *in vitro* Foxp3⁺-T-Zellen mit suppressorischer Aktivität aus *ex vivo* isolierten Foxp3⁻-CD4⁺-T-Zellen generiert werden (induzierte Treg: iTreg). Diese Methode ist vor allem für therapeutische Zwecke interessant, da hier ggf. Donorzellen direkt aus einem Patienten isoliert und nach Konvertierung und Expansion in großer Anzahl und ohne Akzeptanzprobleme in denselben Patienten retransfundiert werden könnten.

Stabile Foxp3⁺-Tregs: unter epigenetischer Kontrolle

Der Erfolg einer *In-vitro*-Konvertierung wird gemeinhin an der erworbenen Foxp3-Expression gemessen, die die Erlangung von suppressorischer Kapazität bedingt. Wie wir jedoch in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit feststellen konnten, ist die so erworbene Foxp3-Expression nicht stabil, und der Großteil an iTregs, die in Abwesenheit von TGF- β *in vitro* restimuliert wurden, verlor die Foxp3-Expression und damit auch seine suppressive Funktion. Denkt man an einen klinischen Einsatz, könnte genau diese Situation nach dem Transfer von iTregs in Patienten eintreten.

Im Gegensatz zu den iTregs konnte bei nTregs zu keiner Zeit nach Transfer *in vivo* oder während einer Kultur *in vitro* ein Verlust der Foxp3-Expression beobachtet werden. Es scheint sich hierbei also um eine stabile Linie zu handeln, bei der Treg-spezifische Charakteristika wie die Foxp3-Expression an die Tochterzellen weitergegeben werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Foxp3-Expression in nTregs durch epigenetische Mechanismen fixiert sein könnte.

Unter Epigenetik werden Genregulationsmechanismen zusammengefasst, die nicht von der DNA-Sequenz abhängig sind (wie z. B. Promotor- und Enhancer-Elemente), sondern die durch die Chromatinstruktur bedingt werden (■ Abb. 2). Ein wichtiger Parameter hierbei ist die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren. Liegt die genomische DNA zu dicht gepackt vor, können die Gene in diesem Bereich nicht adressiert werden, man spricht von einem ruhenden Zustand („silenced state“), der z. B. auch bei der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosome in weiblichen Säugern auftritt. Bedingt wird dies u. a. durch Methylierung von CpG-Motiven in der DNA, die dann von Methyl-CpG-bindenden Proteinen gebunden werden und durch Formation bestimmter Protein-DNA-Komplexe eine Kondensierung des Chromatins herbeiführen. Erst nach Auflockerung dieser dichten Struktur kann solch eine Region wieder transkriptionell aktiv werden („active state“). Der aktive Zustand ist durch das Fehlen von DNA-Methylierung sowie durch bestimmte Histon-Modifizierungen wie z. B. Acetylierung und Methylierung charakterisiert (■ Abb. 2). Sowohl die DNA-Methylierung als auch die Modifikation von Histonen sind reversibel, sie werden jedoch im jeweiligen Zustand bei der Zellteilung auf die Tochterzelle übertragen. Die Aktivität von epigenetisch regulierten Loci einer Population bleibt somit über Generationen hinweg erhalten.

► Die konservierte Region TSDR im *foxp3*-Locus ist in nTreg selektiv demethyliert

Eine *In-silico*-Sequenz-Analyse des *foxp3*-Locus ergab 3 hoch konservierte Regionen im 5'-nichtkodierenden Bereich vor dem Translationsstart, von denen insbesondere eine viele CpG-Motive enthält.

Die Analyse des Methylierungsstatus dieser Region ergab, dass in nTregs alle CpG-Motive demethyliert sind, während sie in konventionellen Foxp3⁻-CD4⁺-T-Zellen zu 100% methyliert waren (■ Abb. 3).

Auch in aktivierten konventionellen T-Zellen konnte keine Demethylierung festgestellt werden. Aufgrund dieser dif-

Abb. 2 ▶ DNA-Methylierung von CpG-Motiven als epigenetischer Mechanismus der Genregulation

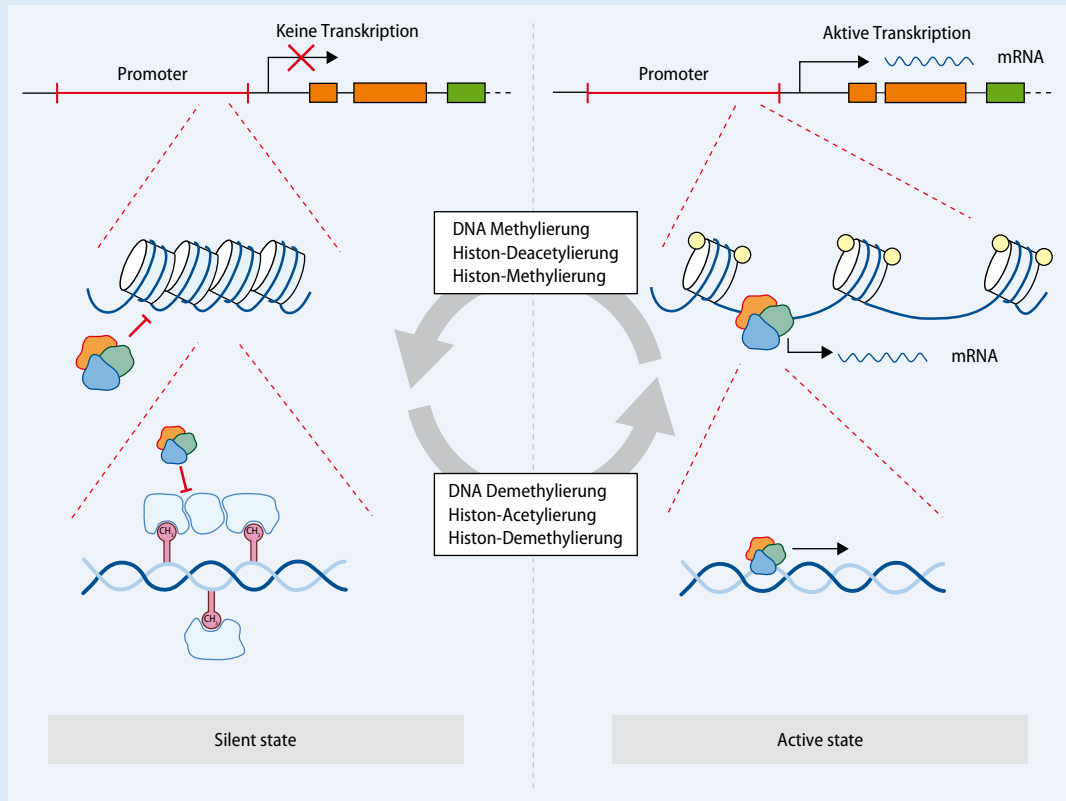
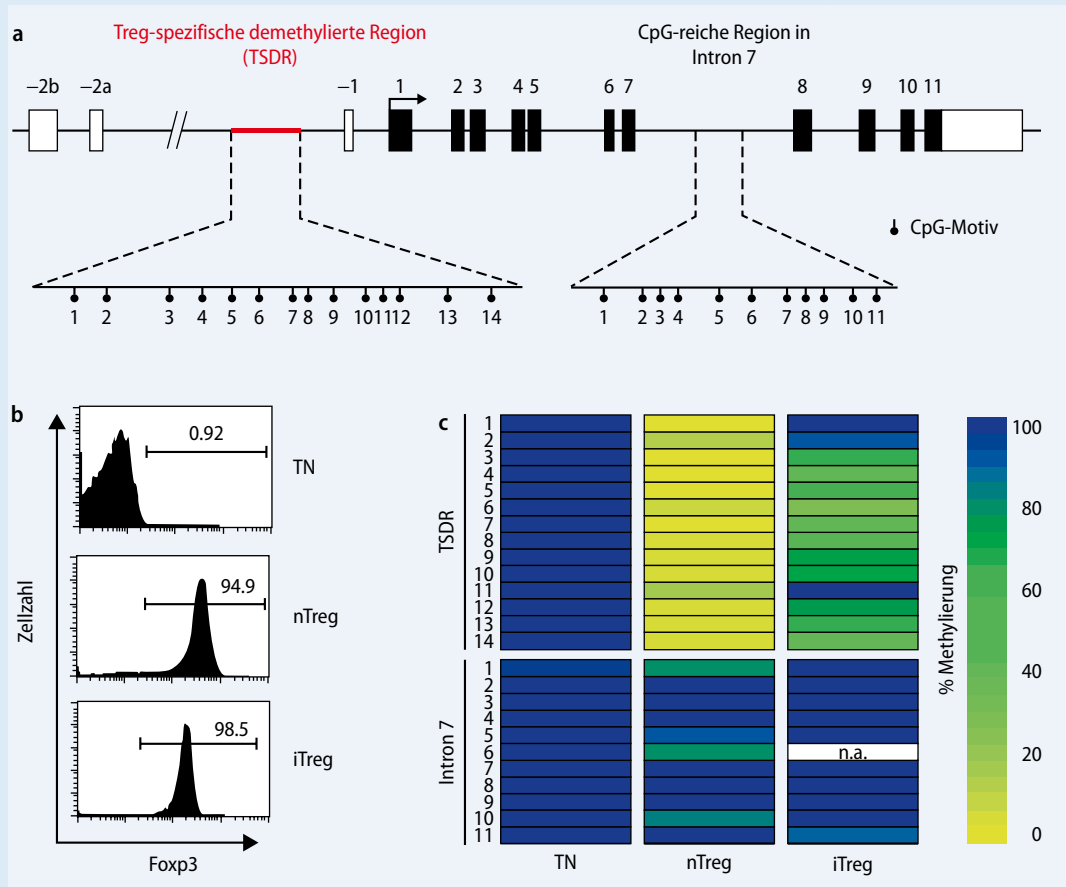


Abb. 3 ▶ Die Treg-spezifische demethylierte Region (TSDR) zeigt differenzielle Methylierungsmuster in naiven T-Zellen, nTreg und iTreg. **a** Schemat. Übersicht des murinen *foxp3*-Locus. *Linie* = Introns, *Rechtecke* = Exons (ausgefüllte Rechtecke = kodierende Exone), *Pfeil* = Translationsstart. Zwei konservierte Regionen sind eingezeichnet, deren CpG-Motive (*Stecknadelköpfe*) auf ihren Methylierungsstatus untersucht wurden (siehe c). *Zahlen* = Position der CpG-Motive im untersuchten Bereich. **b** Durchflusszytometrie. Analyse der Foxp3-Expression von Foxp3⁻-naiven T-Zellen (TN), Foxp3⁺-nTreg und TGF- β -induzierten Foxp3⁺-iTreg. *Zahlen* = Prozent. Anteil der Foxp3⁺-Zellen in der analys. Population. **c** Methylierungsstatus der TSDR und einer weiteren CpG-reichen Region in Intron 7 in den in b abgebildeten Populationen. Nur nTregs zeigen einen komplett demethylierten Zustand der TSDR. Jedes *Rechteck* = individuelles CpG-Motiv; der Grad der Methylierung ist farblich kodiert (*n.a.* nicht analysiert)



ferenziellen Methylierung bezeichnen wir dieses Element als Treg-spezifische demethylierte Region (TSDR). Auch die Histon-Modifikationen lassen auf eine epigenetische Regulation der Foxp3-Expression schließen: In nTreg konnten wir durch Chromatin-Immünpräzipitation die TSDR mit acetyliertem Histon 3 und methyliertem Histon 4 assoziiert finden, welches in Foxp3⁻-CD4⁺-Zellen nicht der Fall war.

Interessanterweise zeigen iTreg trotz vergleichbarer Foxp3-Expressionslevel lediglich eine partielle Demethylierung der TSDR (■ **Abb. 3**). Wie oben bereits erwähnt, ist in diesen Zellen die Foxp3-Expression jedoch instabil und geht ohne kontinuierliches instruktives TGF-β-Signal wieder verloren. Daher liegt der Schluss nahe, dass die komplette Demethylierung der TSDR eine essenzielle Voraussetzung für eine anhaltende Foxp3-Expression und somit für anhaltende suppressorische Aktivität ist. Die Analyse des TSDR-Methylierungsstatus stellt daher auch einen besseren Marker für stabile Treg-Populationen dar als die reine Erfassung der Foxp3-Expression. Dies ist vor allem im humanen System von großer Bedeutung, da dort im Gegensatz zur Maus transiente Foxp3-Expression auch in aktivierten konventionellen T-Zellen auftritt und somit die Unterscheidung dieser Zellen von echten Tregs problematisch ist.

Regulation der Foxp3-Expression: Essenzielle Voraussetzung für einen therapeutischen Einsatz von Tregs

Tregs bergen durch ihre suppressorische Aktivität ein großes Potenzial für neue antigenspezifische Therapieansätze bei Autoimmunerkrankungen, die bisher lediglich mit antigenunspezifisch wirkenden Immunsuppressiva behandelt werden können. Hierfür könnten Tregs *in vivo* moduliert, expandiert oder induziert werden. Technisch einfacher wäre wahrscheinlich eine *In-vitro*-Expansion und Konversion von *ex vivo* CD4⁺-T-Zellen zu Foxp3⁺-Tregs, die dann in die Patienten zurückgeführt werden können, ohne das Risiko einer Alloreaktion eingehen zu müssen. Für einen solchen therapeutischen Einsatz von Tregs ist es jedoch essenziell, die Physiologie und Entwicklung

dieser Zellen verstanden zu haben. Die Induktion und der Transfer von instabilen Foxp3⁺-T-Zellen, die evtl. im Patienten wieder zu Foxp3⁻-T-Zellen re-konvertieren und somit ihre Suppressorfunktion verlieren könnten, wäre wenig hilfreich und könnte unter Umständen sogar zur Verschlechterung des Krankheitsbildes führen. Trotz der großen Anstrengungen, die weltweit unternommen werden, ist bisher noch weitgehend unklar, welches die Determinanten für eine stabile Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 sind und wie sie evtl. *in vitro* nachgestellt werden könnten. Untersuchungen zur funktionellen Rolle des differenziell methylierten Elements TSDR im *foxp3*-Locus könnten hierbei weitere wichtige Erkenntnisse liefern. Sollten in Zukunft weitere Protokolle zur *In-vivo*- oder *In-vitro*-Induktion oder Modulation von Tregs entwickelt werden, kann die Überprüfung des Demethylierungsstatus der TSDR als Qualitätskontrolle der entstandenen Treg-Population herangezogen werden, um die therapeutische Nutzbarkeit dieser Zellen sicherzustellen.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. J. Huehn
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Experimentelle Immunregulation, c/o Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
Charitéplatz 1, 10117 Berlin
huehn@drfz.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Floess S, Freyer J, Siewert C et al. (2007) Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5: e38
2. Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its Mediators. *Trends Biochem Sci* 31: 89–97
3. Tang Q, Bluestone JA (2006) Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev* 212: 217–237
4. Zheng Y, Rudensky AY (2007) Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 8: 457–462

Urtikaria – Top-10 DRG nicht ohne Grund

Die Urtikaria gehört zu den häufigsten dermatologischen Krankheitsbildern. Sie zählt zu den 10 häufigsten Hauptdiagnosen der meisten dermatologischen Fachabteilungen (Top-10 DRG).

Urtikaria ist allerdings nicht gleich Urtikaria. Die Differenzierung der verschiedenen Urtikariasubtypen mittels geeigneter diagnostischer Maßnahme ist wesentliche Voraussetzung für die Auswahl einer adäquaten Therapie.

Das Themenheft der Fachzeitschrift „Der Hautarzt“ Ausgabe 4/2007 bietet einen umfassenden Überblick über moderne diagnostische und therapeutische Strategien, stellt neue Erkenntnisse aus den Bereichen der Urtikariaforschung dar und gibt Einblick in nationale und internationale Infopoints für Fachpersonal und Patienten.

Aus dem Inhalt:

- Pathogenese, moderne Diagnostik und Therapie
- Klassifikation und Differenzialdiagnose
- Nationale und internationale Infopoints für Fachpersonal und Patienten

Bestellen Sie diese Ausgabe zum Preis von EUR 29,- unter
Springer Distribution Center
Kundenservice Zeitschriften
Haberstraße 7
69126 Heidelberg
Tel.: +49 (0) 6221/345-4303
Fax: +49 (0) 6221/345-4229
subscriptions@springer.com
www.DerHautarzt.springer.de