

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III,
Hämatologie und Onkologie des Klinikums rechts der Isar der
Technischen Universität München

Leitung: Prof. Dr. Florian Bassermann

**Der Einfluss von A20 in T-Zellen auf die
Differenzierung regulatorischer T-Zellen im Thymus
und die Entwicklung einer akuten Graft-versus-Host
Erkrankung**

Dissertation zum Erwerb des
Doktors der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.)
an der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München

vorgelegt von
Vera Marieke Otten
aus Köln
2022



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Der Einfluss von A20 in T-Zellen auf die Differenzierung regulatorischer T-Zellen im Thymus und die Entwicklung einer akuten Graft-versus-Host Erkrankung

Vera Marieke Otten

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Dirk H. Busch

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hendrik Poeck
2. apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen

Die Dissertation wurde am 28.04.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.08.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Überblick	4
2. Einleitung.....	5
2.1 Klinische Bedeutung hämatopoetischer Stammzelltransplantationen.....	5
2.2 Akute Graft-versus-Host Erkrankung	5
2.2.1 Pathogenese der akuten GvHD	7
2.2.2 Therapieoptionen	8
2.3 NF-κB	9
2.4 A20	10
2.4.1 Konditionaler Knockout von A20.....	11
2.5 Immuntoleranz und regulatorische T-Zellen.....	14
2.5.1 Entstehung natürlicher Tregs im Thymus.....	15
2.5.2 Rolle von NF- κ B bei der Entstehung natürlicher regulatorischer T-Zellen	17
3. Wissenschaftliche Fragestellung und Zielsetzung	17
3.1 Die Rolle von A20 für die Entstehung und das Überleben regulatorischer T-Zellen	17
3.2 Der Einfluss von A20 auf das Zellüberleben und die Aktivierung konventioneller T-Zellen im Rahmen der Graft-versus-Host Erkrankung	18
4. Methodik	19
4.1 Charakterisierung der Rolle von A20 in der Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus und das Zellüberleben	19
4.2 Untersuchung der Rolle von A20 im Rahmen der akuten Graft-versus-Host Erkrankung.....	21
5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Originalarbeiten	22
5.1 „A20 Restrains Thymic Regulatory T Cell Development“	22
5.2 „A20 deletion in T cells modulates acute graft-versus-host disease in mice“	24
6. Bezug zur bestehenden Literatur und Schlussfolgerungen	25
7. Abkürzungsverzeichnis	33
8. Abbildungsverzeichnis.....	35
9. Literaturverzeichnis.....	36
10. Anhänge.....	41
10.1 Publikationsverzeichnis	41
10.1.1 Publikationen in peer-reviewed Journalen als Erstautor	41
10.1.2 Publikationen in peer-reviewed Journalen als Co-Autor	41
10.2 Danksagung	42
10.3 Originalpublikationen	43

1. Überblick

Um den menschlichen Organismus vor Infektionen mit pathogenen Erregern oder auch Tumorerkrankungen zu schützen, ist ein funktionierendes Immunsystem unerlässlich. Im Gegenzug kann eine überschießende Aktivierung des Immunsystems die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen bewirken. Verschiedene Mechanismen können hierbei zu einer Störung des fein ausbalancierten Immunsystems führen, beispielsweise erworbene Immunschwächen wie die durch das HI-Virus verursachte AIDS-Erkrankung. Andererseits können auch Erbkrankheiten zu seltenen und schweren kombinierten Immundefizienzen (SCID – severe combined immunodeficiency) führen. Darüber hinaus können medizinische Behandlungen in einer vorübergehenden oder langfristigen Immunschwäche resultieren. Hierunter fallen medikamentöse Behandlungen mit Steroiden oder Immunsuppressiva, die hemmend in die Signalwege der Immunzellen eingreifen. Auch im Zusammenhang mit modernen Therapiekonzepten, wie z.B. der hämatopoetischen Stammzelltransplantation, wird das Immunsystem geschwächt. Sowohl durch die beabsichtigte Ablation des Knochenmarks des Patienten als auch durch die gleichzeitige Gabe von medikamentösen Immunsuppressiva kommt es zu einer in der Regel mehrere Monate bestehenden Immunsuppression, die den Empfänger vor allem in den ersten Monaten nach Transplantation für eine Infektion mit pathogenen Keimen anfällig macht. Bei allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation besteht im weiteren Verlauf ein zusätzliches Risiko durch die Entwicklung einer Graft-versus-Host Erkrankung (Nakasone et al., 2015). Bei dieser Erkrankung, die einer Autoimmunerkrankung ähnelt, kommt es zur Schädigung des Empfängerorganismus durch allogene Spender-T-Zellen.

Grundsätzlich kann es bei der Entwicklung der verschiedenen Immunzellen zur Entstehung autoreaktiver Zellen kommen und zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen. Im Falle der T-Zellen sorgen neben einem strengen Selektionsprozess für T-Lymphozyten im Thymus spezialisierte regulatorische T-Zellen für eine Unterdrückung einer überschießenden Immunreaktion.

Das Verständnis über die Funktionsweise des Immunsystems, das Zusammenwirken der zellulären und humoralen Bestandteile und therapeutische Interventionsmöglichkeiten hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Trotzdem sind viele Details der Entstehung und Funktionsweise regulatorischer T-Zellen und der Pathogenese der GvHD noch unverstanden und machen weitere Forschung in diesen Bereichen notwendig.

2. Einleitung

2.1 Klinische Bedeutung hämatopoetischer Stammzelltransplantationen

Die Indikation zur allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation besteht prinzipiell für bestimmte Verlaufsformen maligner hämatopoetischer Erkrankungen wie zum Beispiel die akute myeloische oder lymphatische Leukämie, einige Lymphomerkrankungen, aber auch nicht-maligne Erkrankungen wie die aplastische Anämie, vor allem wenn der erwartete Therapieerfolg den einer alternativen Behandlung und die durch die Transplantation verursachten Nebenwirkungen und Komplikationen übertrifft. Oft ist die allogene Stammzelltransplantation die einzige kurative Therapieoption.

Entscheidend für ein möglichst geringes Komplikationsrisiko ist die Auswahl des Spenders anhand des Grades der HLA-Kompatibilität. Bevorzugt werden Geschwister auf ihre HLA-Identität getestet, findet sich dort kein geeigneter Spender wird in Datenbanken nach möglichen Fremd Spendern gesucht oder aber auf haploidente Spender (Eltern, Kinder, Geschwister) ausgewichen.

Die Stammzellen werden aus dem peripheren Blut von Familien- oder Fremd Spendern, dem Knochenmark direkt oder aus der Nabelschnur gewonnen und im Anschluss an eine Konditionierungstherapie als Infusion auf den Empfänger übertragen. Die Konditionierungstherapie dient der Induktion einer Immunsuppression, der Vermeidung einer Transplantatabstoßung, der Elimination maligner Zellen und der Ablation des Empfänger Knochenmarks. Man unterscheidet myeloablative, nicht-myeloablative und intensitätsreduzierte Regime, die mit verschiedenen Chemotherapeutika und alternativ oder gemeinsam mit einer Ganzkörperbestrahlung erfolgen. Durch die Einführung dosisreduzierter Regime konnte die Zahl der Stammzelltransplantationen deutlich gesteigert werden und auch für multimorbide Patienten oder ältere Patienten aufgrund der reduzierten Toxizität als Therapieoption etabliert werden (Sureda et al., 2015).

2.2 Akute Graft-versus-Host Erkrankung

Die akute Graft-versus-Host Erkrankung ist eine systemische Entzündungsreaktion, die bei ca. 40% der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation mit HLA-kompatiblen Zellen von Verwandten und über 50% bei HLA-kompatiblen nicht Verwandten oder einem Mismatch

auftritt (Jagasia et al., 2012). Sie ist für 15-30% der Todesfälle nach einer allo-SZT verantwortlich (Ferrara et al., 2009).

Hauptmanifestationsorgane der akuten GvHD sind der Darm, die Leber und die Haut. Die klinische Präsentation ist vielfältig, aber klassische Symptome umfassen Gewichtsverlust, wässrige Diarrhoen und schmerzhafte abdominelle Krämpfe, einen Anstieg der Transaminasen, eine Hepatitis, ein makulopapulöses Exanthem an exponierten Hautstellen und ein Nierenversagen.

Im Zentrum der Graft-versus-Host-Erkrankung stehen T-Zellen des Spenders, die im Transplantat enthalten sind. So konnte gezeigt werden, dass eine vorangehende T-Zell-Depletion die Entstehung einer GvHD effektiv verhindern kann (Korngold et al., 1978), aber mit einer verzögerten Immunrestitution und einer erhöhten Rezidivrate der Grunderkrankung durch eine Abnahme des Graft-versus-leukemia-Effektes (Martin et al., 1985) einhergeht.

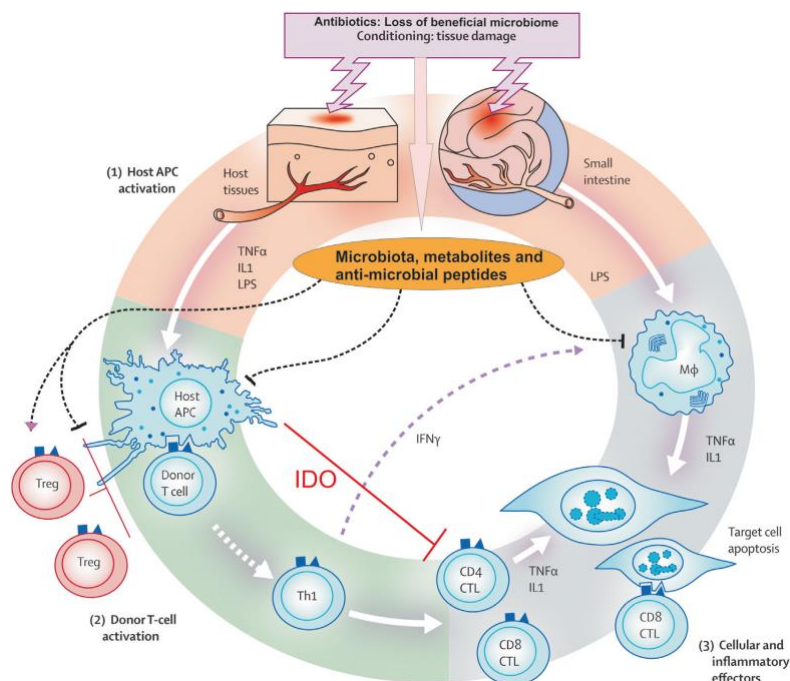


Abb. 1: Pathophysiologie der akuten Graft-versus-Host Erkrankung (Ghimire et al., 2017)

Stadienhafter Ablauf der Erkrankung: 1. Gewebeschädigung durch Konditionierungstherapie; 2. Aktivierung allogener Spender-T-Zellen durch Präsentation von Empfänger-Antigenen an MHC-Molekülen; 3. Schädigung des Empfängerorganismus durch humorale und zelluläre Schädigung

2.2.1 Pathogenese der akuten GvHD

Die Entstehung der akuten GvHD wird in drei verschiedene Phasen unterteilt:

(1) Initial kommt es durch die Konditionierungstherapie zu einer Gewebsschädigung und zur Ausschüttung von Zellbestandteilen wie z.B. Hitzeschockproteinen, ATP (Wilhelm et al., 2010) und Harnsäure aus geschädigten Zellen (Jankovic et al., 2013). Zudem führt die Schädigung der Darmschleimhaut und somit der intestinalen Barriere zu einer Translokation bakterieller Bestandteile wie LPS (Hill et al., 2000; Xun et al., 1994) und bakterieller DNA (Calcaterra et al., 2008) aus dem Darmlumen in die Blutstrombahn. Diese sogenannten DAMPs (damage associated molecular patterns) und PAMPs (pathogen associated molecular patterns) stimulieren antigenpräsentierende Zellen durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren und anderen pattern recognition receptors (PPRs) und führen zur Synthese und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, hier vor allem $\text{TNF } \alpha$ und IL-1 (Hill et al., 1999) und zur Hochregulation von kostimulatorischen und antigenpräsentierenden Molekülen (Brennan et al., 2015). Dabei können antigenpräsentierende Zellen sowohl des Spenders als auch des Empfängers und nicht-hämatopoetische antigenpräsentierende Zellen zu diesem Prozess beitragen (Koyama et al., 2011).

(2) Naive T-Zellen des Spenders, die sich im Transplantat befinden, werden im Empfänger durch die von antigenpräsentierenden Zellen prozessierten und an MHC-Molekülen präsentierten Empfängerantigene über die Bindung des TCR aktiviert und zur Proliferation angeregt. Entscheidend für diesen Vorgang ist unter anderem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die Antigenbindung am TCR führt zur Rekrutierung der Proteinkinase C an die Zellmembran und zu ihrer Aktivierung durch Diacylglycerin. Es folgt die Phosphorylierung von Carma1, einem Gerüstprotein, das mit den Proteinen Bcl10 und MALT1 einen Komplex bildet. Dieser Komplex wiederum aktiviert den I κ B-Kinase Komplex aus IKK α , IKK β und IKK γ (Matsuzawa et al., 2015), der I κ B (Inhibitor of NF- κ B) phosphoryliert, sodass NF- κ B freigesetzt wird und im Nukleus die Transkription von IL-2 und CD25 und somit die Proliferation von Empfänger-T-Zellen initiieren kann.

(3) Unter dem Einfluss verschiedener Zytokine entstehen aus den naiven T-Zellen Effektor-T-Zellen, die durch die Synthese und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IFN- γ (Brok et al., 1998), TNF- α (Piguet et al., 1987) und IL-1 (Abhyankar et al., 1993) und durch direkte Zell-Zell-Interaktion zur Schädigung von Zielgeweben wie dem Darm, der Haut oder der Leber führen.

2.2.2 Therapieoptionen

Insgesamt stellt die Behandlung der akuten GvHD weiterhin ein großes Problem dar, weil es meist zu einem schlechten Ansprechen auf eine Therapie mit Immunsuppressiva, hauptsächlich Calcineurin-Inhibitoren und Kortikosteroiden, kommt. Zudem beruht der Effekt der allogenen Stammzelltransplantation auf dem Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL), der durch eine intensive immunsuppressive Therapie vermindert wird und damit ein Rezidiv der malignen Grunderkrankung (Rubio et al., 2015) begünstigt.

Zur Therapie einer manifesten akuten GvHD kommen vor allem Lymphozyten-depletierende Medikamente wie Kortikosteroide, Antithymozyten-Globulin, der CD52-Antikörper Alemtuzumab und Cyclophosphamid sowie Antimetabolite wie Mycophenolat-Mofetil und Methotrexat zum Einsatz. Falls Patienten auf diese Medikamente nicht oder nur unzureichend ansprechen, besteht die Möglichkeit der off-label-Gabe von Substanzen wie dem anti-TNF- α -Antikörpern Etanercept (Lutz et al., 2016).

Ein weiterer Ansatz besteht in der Hemmung des JAK/STAT-Signalweges, der in T-Zellen durch die inflammatorischen Moleküle IL-6 und IL-23 aktiviert wird und mit dem Wirkstoff Ruxolitinib durch die kombinierte Blockade von JAK 1 und 2 gehemmt werden. Im Mausmodell konnte durch den Einsatz von Ruxolitinib der Serumspiegel von TNF- α gesenkt sowie eine verminderte Proliferation allogener T-Zellen und eine Senkung der Mortalität gezeigt werden. Darüberhinaus konnte eine Wirksamkeit auch in Patienten mit einer akuten Steroid-refraktären GvHD gezeigt werden (Spoerl et al., 2014), sodass Ruxolitinib im Rahmen eines individuellen Heilversuchs als off-label Substanz Verwendung fand (Zeiser et al., 2015; Zeiser et al., 2020).

Ein neuer Therapieansatz ist die Transfusion regulatorischer T-Zellen, die im murinen Modell der aGvHD einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf zeigen konnten (Taylor et al., 2002); (Hoffmann et al., 2002) und bereits in ersten klinischen Studien untersucht wurde (Di Ianni et al., 2011; Trzonkowski et al., 2009). Dabei scheint die Transfusion CD4⁺CD25⁺ Tregs nicht mit einem Verlust des GvL-Effektes einherzugehen (Edinger et al., 2003).

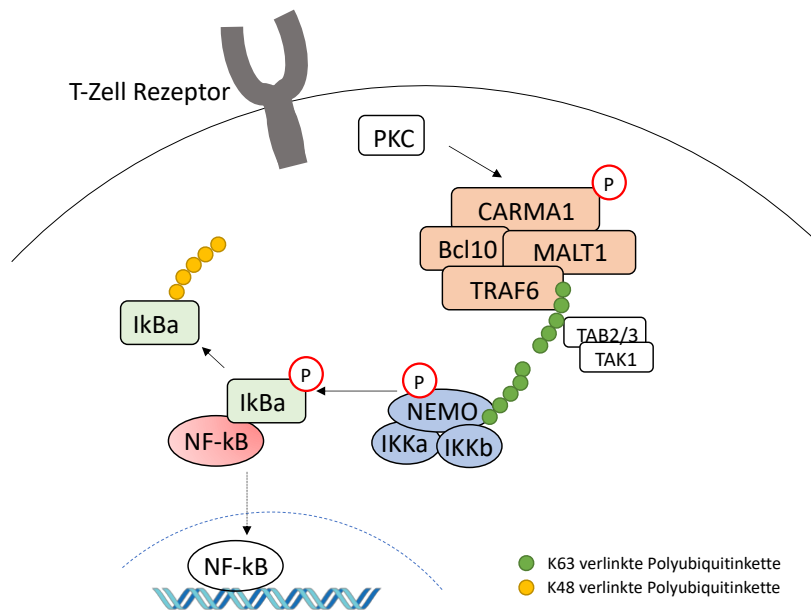


Abb. 2: NF-κB-Signalweg in T-Zellen

Die Bindung des passenden Antigens führt zur Aktivierung der Proteinkinase C an der Zellmembran und zur konsekutiven Bildung eines Proteinkomplexes aus Carma1, Bcl10, MALT1 und der E3-Ligase TRAF6. Die Polyubiquitinierung von TRAF6 und NEMO bewirkt die Phosphorylierung des IκB-Kinase Komplexes durch die Serin-Threonin-Kinase TAK1 und dadurch die Freisetzung von NF-κB.

2.3 NF-κB

Wie bereits oben erwähnt, spielen Signalwege, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führen, eine zentrale Rolle in der Pathogenese der GvHD. Er wird in nahezu allen tierischen Zellen exprimiert und kann durch verschiedene Rezeptoren und intrazelluläre Signalmoleküle aktiviert werden. Es handelt sich um Homo- bzw. Heterodimere aus Proteinen der Rel-Familie (RelA, RelB und c-Rel), die neben der für alle NF-κB gemeinsamen Rel-Homologie-Domäne auch eine Transaktivierungsdomäne an ihrem C-Terminus besitzen, und den NF-κB-Proteinen im engeren Sinne (p50, p52). Diese liegen in den meisten Zellen in einer inaktiven Form gebunden an Proteine, die Inhibitor of κB (IκB) genannt werden, vor.

Kommt es zur Aktivierung von Zellrezeptoren wie den TLRs, TNFR oder auch dem TCR kommt es über eine intrazelluläre Signalkaskade schlussendlich zur Aktivierung der IκB Kinase und durch diese zur Phosphorylation und Degradation von IκB, sodass NF-κB freigesetzt wird und in den Zellkern migriert, wo es seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben kann (Gilmore, 2006).

Eine Störung dieses Signalweges ist unter anderem mit der Entstehung chronisch-entzündlicher Erkrankungen, Immundefizienz und Krebserkrankungen assoziiert (G. Courtois et al., 2006).

Eine strenge Kontrolle von NF- κ B ist für einen reibungslosen Ablauf von Immunreaktionen und den Schutz des Organismus vor zum einen überschießenden Antworten des Immunsystems und zum anderen mangelhaften Reaktionen auf Stress und Pathogene zwingend notwendig. In diesem Zusammenhang hat das Protein A20 als Inhibitor von NF- κ B in den letzten Jahren vermehrt an Bedeutung gewonnen und ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung.

2.4 A20

A20 oder tumor necrosis factor α -induced protein (TNFAIP3) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das in ruhenden Zellen in minimaler Konzentration vorliegt.

A20 ist eines der Moleküle, das an unterschiedlichen Stellen in den NF- κ B-Signalweg eingreifen und ihn beenden kann (Wertz et al., 2004). Die Transkription des A20-Gens wird durch verschiedene NF- κ B-aktivierende Signale und Bindung von NF- κ B an den A20-Promotor induziert (Krikos et al., 1992). A20 agiert damit in einer negativen Feedbackschleife. Die Aktivität von A20 wiederum wird vor allem durch Spaltung und posttranslationale Modifikation reguliert, sodass die intrazellulären Signalwege, in denen A20 eine Rolle spielt, als sehr dynamische Prozesse verstanden werden müssen (Coornaert et al., 2008; Wertz et al., 2004).

Wesentlich für die Funktion von A20 sind die OTU-Domäne (Bosanac et al., 2010) am N-Terminus und die sieben Zinkfingerdomänen am C-Terminus, die mit Ubiquitinmolekülen interagieren können. Die Markierung von Proteinen mit Ubiquitinketten, die über das Lysin an der 48. Stelle verbunden sind (Verstrepen et al., 2010), führt zum Abbau im Proteasom, wohingegen Proteine, die mit Ubiquitinketten markiert sind, die über das Lysin an der 63. Stelle (K63) verbunden sind, in Signalwegen rekrutiert werden können (Ohtake et al., 2017). Die Ubiquitinierung von Proteinen ist ein mehrschrittiger enzymatischer Prozess, an dem E1-Enzyme (aktivierend), E2-Enzyme (konjugierend) und E3-Ligasen beteiligt sind. Mehrere E3-Ligasen sind am NF- κ B-Signalweg beteiligt und vermitteln die Übertragung von Ubiquitinmolekülen auf ihre Zielproteine (Gilles Courtois et al., 2018).

Die OTU-Domäne des A20-Proteins besitzt Deubiquitinierungsaktivität und kann K63-verbundene Ubiquitinmoleküle abspalten und somit den Protein-Protein-Kontakt zu im Signalweg folgenden Proteinen unterbinden. Die Zinkfingerdomäne ZnF4 hingegen kann K48-verbundene Ubiquitinketten an Proteine binden und ihre Degradierung im Proteasom initiieren (Bosanac et al.; Wertz et al., 2004).

Verschiedene Rezeptoren an der Zelloberfläche führen schlussendlich zur Translokation von NF- κ B in den Nukleus und zur Transkription der Zielgene und in vielen dieser Signalwege konnte eine Regulation durch A20 bereits gezeigt werden (Catrysse et al., 2014). Dazu gehören unter anderem der durch TNF- α induzierte TNFR1-Signalweg (Wertz et al., 2004) und Signalwege der durch IL-1 oder LPS stimulierten TLR (Boone et al., 2004; Heyninck et al., 1999). Die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors führt nach Bildung des Komplexes aus Carma1, Bcl-10 und MALT1 zur Übertragung von K63-verbundenen Polyubiquitinketten auf MALT1 und Aktivierung des IKK-Komplexes sowie Freisetzung von NF- κ B. A20 kann Polyubiquitinketten von MALT1 abspalten und die NF- κ B-Signalkaskade somit unterbrechen (Duwel et al., 2009).

Der Verlust von A20 in allen Körperzellen führt in der Maus zu einem eindrücklichen Phänotyp: die Tiere sind deutlich kleiner als gleichaltrige Wildtyp-Tiere, sind kachektisch und sterben innerhalb weniger Wochen an einer schweren Multiorganentzündung. Histologisch findet sich ein erhöhter Anteil CD3⁺CD44⁺ aktivierter T-Zellen, Granulozyten und Makrophagen in den betroffenen Geweben. Die Gabe von TNF- α führt in Wildtyp-Tieren zu einer vermehrten Expression von A20 in allen Geweben, in A20^{-/-} Mäusen hingegen innerhalb von Stunden zum Tod (Lee, 2000).

2.4.1 Konditionaler Knockout von A20

Da sich eine differenzierte Untersuchung von A20 aufgrund des Phänotyps des kompletten Knockouts schwierig darstellt, wurden verschiedene konditionale Knockout-Modelle generiert. Mithilfe des Cre/lox-Systems (Sauer, 1998) und der von der Arbeitsgruppe um Geert van Loo kreierte Maus, die ein konditionales A20-Allel trägt, können spezifische Deletionen in einzelnen Zellreihen erzielt werden. Hierzu wurden LoxP-Sequenzen um Exon IV und V des murinen A20-Gens durch homologe Rekombination eingefügt, sodass die Cre-Rekombinase die DNA an diesen Stellen zerschneiden und somit die Expression des Gens verhindern kann (Vereeke 2010). Durch die Kreuzung mit Tieren, die die Cre-Rekombinase unter bestimmten

Promotern, wie z.B. CD4, exprimieren, können so Tiere mit einem konditionalen Knockout erzeugt werden.

Der Knockout von A20 in myeloischen Zellen führt in $Tnfaip3^{LysM-KO}$ Mäusen zu einem der rheumatoiden Arthritis ähnlichen Phänotyp mit einer Entzündung der Gelenke und einem positiven Nachweis von anti-Kollagen II-Antikörper sowie erhöhten Werten für Th17-T-Zellen, IL-1b, IL-6 und TNF- α (Matmati et al., 2011) im Blut.

Der B-Zell-spezifische A20-Knockout in $Tnfaip3^{CD19-KO}$ -Mäusen führt zu einer Zunahme unreifer B-Zellen, einer insgesamt erhöhten Zellularität der Milz und Lymphknoten und erhöhten Serumwerten für IgM und IgA. Die Aktivierungsmarker der B-Zellen B7.1/CD80, B7.2/CD86, MHC-II, CD25 und Fas sind auf naiven A20-defizienten Zellen bereits leicht erhöht und werden bei Aktivierung durch verschiedene Stimuli vergleichsweise stärker exprimiert. Im Serum von $Tnfaip3^{CD19-KO}$ -Mäusen fanden sich erhöhte Werte für IL-6 und anti-Cardiolipin-IgG, aber keine für den systemischen Lupus erythematodes typischen antinukleären Antikörper (Chu et al., 2011; Dieguez-Gonzalez et al., 2009). A20-defiziente B-Zellen zeigen nach Stimulation von CD40, einem kostimulatorischen Rezeptor der TNFR-Superfamilie auf B-Zellen, eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-x und eine erhöhte Resistenz gegenüber dem durch Fas vermittelten programmierten Zelltod (Tavares et al., 2010).

In $Tnfaip3^{CD11c-KO}$ -Mäusen mit einem spezifischen Knockout von A20 in dendritischen Zellen (DCs) fanden sich verschiedene Phänotypen: Hammer et al. konnten eine entzündliche Veränderung der Darmschleimhaut zeigen (Hammer et al., 2011), während Kool et al. eine Lupus-ähnliche Erkrankung mit ds-DNA-Antikörpern, Nephritis, Antiphospholipidsyndrom, Lymphadenopathie und Splenomegalie vorfanden (Kool et al., 2011). A20-defiziente DCs exprimieren vermehrt kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86, CD40 und MHC-II, produzieren erhöhte Mengen IL-6, TNF- α und IL-12 und bewirken somit eine verstärkte T-Zell-Antwort auf Fremdartigene sowie eine effektivere Antitumorantwort (Song et al., 2008).

In intestinalen Epithelzellen (IEC) scheint A20 einen Schutz der Zellen vor TNF- α -induzierter Apoptose zu bieten, die intestinale Barrierefunktion aufrechtzuerhalten und damit der Translokation bakterieller Bestandteile vorzubeugen. Mäuse mit einem IEC-spezifischen A20-Knockout zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber DSS-induzierter Colitis und reagierten mit einer systemischen Entzündungsreaktion durch bakterielle Translokation über die Darmwand und einer erhöhten Mortalität (Vereecke et al., 2010).

In Tieren mit einem konditionalen Knockout von A20 in peripheren T-Zellen (maT-Cre, 80% der CD8⁺ T-Zellen, 50% der CD4⁺ T-Zellen) zeigten diese einen aktivierten Phänotyp (CD44^{high}CD62L^{low}), es fanden sich entzündliche Infiltrate in Leber und Lunge und die Serumspiegel von IL-17, TNF- α und IFN- γ waren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren erhöht. Nach TCR-Stimulation produzierten A20-defiziente CD8⁺ T-Lymphozyten mehr IL-2 und IFN- γ und zeigten eine anhaltende Expression der NF- κ B-Proteine c-Rel und RelA/p65, die mit einer Abnahme von I κ B α im Zytoplasma korrelierte (Giordano et al., 2014). Darüberhinaus war die Ausbildung von CD8⁺ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen nach einer Immunisierung mit TCR-spezifischem Antigen in A20^{CD4-KO}-Mäusen beeinträchtigt (Just et al., 2016).

In CD4⁺ T-Zellen führt ein Mangel an A20 zum vorzeitigen Sterben aktivierter Zellen durch RIPK3-abhängige Nekroptose und die Deletion von RIPK3 konnte A20^{-/-}-Mäuse zumindest partiell vor dem perinatalen Tod bewahren (Onizawa et al., 2015; Just et al., 2016), sodass dieser Mechanismus den Phänotyp des kompletten A20-Knockout wenigstens teilweise erklärt. In dem Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, einer T-Zell-abhängigen Autoimmunerkrankung, wird durch die Impfung mit dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) eine der Multiplen Sklerose vergleichbare Erkrankung ausgelöst. In A20^{CD4-KO}-Mäusen konnten nach der Impfung mit dem MOG-Peptid klinisch weniger ausgeprägte motorische Symptome und histologisch geringere lymphozytäre Infiltrate festgestellt werden und die Anzahl aktivierter A20-defizienter CD4⁺ T-Zellen war im Vergleich zu Kontrollen vermindert (Onizawa et al., 2015).

In den NKT1- und NKT2-Subpopulationen der Killer T-Zellen konnte gezeigt werden, dass A20 wichtig für die Proliferation, Differenzierung und das Überleben zu sein. A20-defiziente NKT-Zellen sind im Steady-State hyperaktiviert und sezernieren vergleichsweise größere Mengen proinflammatorischer Zytokine bei Bindung des T-Zell-Rezeptors (Drennan et al., 2016).

In T-Zellen hat A20 somit insgesamt eine entscheidende Funktion für das Überleben der Zelle, einerseits durch den Schutz vor Nekroptose und andererseits durch die Förderung von Autophagie.

In genomweiten Assoziationsstudien konnten gewisse Mutationen im A20-Gen oder in benachbarten Regionen mit dem Auftreten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Wellcome Trust Case Control, 2007), Zöliakie (Trynka et al., 2009) und Rheumatoider Arthritis (Dieguez-Gonzalez et al., 2009) assoziiert werden. Weitere mit A20-Mutationen assoziierte Erkrankungen sind die Psoriasis (Nair et al., 2009)

und B-Zell-Lymphome wie die Lymphome der Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (Deenick et al.), Hodgkin-Lymphome und das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (Kato et al., 2009).

2.5 Immuntoleranz und regulatorische T-Zellen

Die Aufgabe des adaptiven Immunsystems besteht darin, gezielte Reaktionen auf entartete Zellen und Pathogene zu erzeugen und somit eine zielgerichtete Erregerabwehr zu bewirken. Um den sich ständig verändernden Antigenen zu begegnen, durchlaufen Lymphozyten den Prozess der somatischen Rekombination, bei dem eine im Prinzip endlose Anzahl und Vielfalt an Antigenrezeptoren gebildet wird. Dieser Vorgang schafft die Basis einer gezielten Immunreaktion, birgt gleichzeitig aber auch die Gefahr der Entstehung autoreaktiver Antigenrezeptoren und somit für Autoimmunerkrankungen (Rudensky, 2005).

Um Reaktionen gegen körpereigene Antigene zu verhindern, gibt es verschiedene Toleranzmechanismen. Die zentrale Toleranz beschreibt die Selektion autoreaktiver Lymphozyten während ihrer Entwicklung in den primären lymphatischen Organen, für die T-Zellen im Thymus und die B-Zellen im Knochenmark. Kommt es zur Bindung körpereigener Peptide durch Vorläuferzellen der B- und T-Zell-Reihe, sterben diese durch Apoptose. Da einige autoreaktive Zellen der Selektion entkommen, existieren Mechanismen, um diese in der Peripherie zu eliminieren, man spricht von der peripheren Toleranz. Um diese aufrecht zu erhalten, bedarf es einer spezialisierten Gruppe der T-Lymphozyten, den regulatorischen T-Zellen (Tregs).

Diese Zellen machen ca. 2-4% der CD4⁺ T-Zellen im Blut des Menschen aus (Baecher-Allan et al., 2004) und sind charakterisiert durch die starke Expression des intranukleären Transkriptionsfaktors Foxp3 (Hori et al., 2003), des cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (Bisikirska et al., 2005; Takeshi Takahashi et al., 2000) und des IL-2-Rezeptors CD25 (Sakaguchi et al., 1995) an ihrer Zelloberfläche. Man unterscheidet natürliche Tregs (nTregs), die im Thymus aus doppelt positiven Thymozyten entstehen und induzierte Tregs (iTregs), die in der Peripherie durch Antigenkontakt aus naiven CD4⁺ T-Zellen entstehen. Regulatorische T-Zellen besitzen die Fähigkeit andere Immunzellen wie Effektor-T-Zellen oder dendritische Zellen zu hemmen und somit eine autoreaktive oder prolongierte Immunantwort zu unterdrücken.

Foxp3 gilt als spezifischer Marker für regulatorische T-Zellen und ist entscheidend für die Entwicklung, Aufrechterhaltung und Funktion dieser Zellen (Hori et al., 2003). Eine fehlerhafte

Funktion regulatorischer T-Zellen aufgrund von Mutationen im humanen Foxp3-Gen ist mit dem IPEX-Syndrom (immundysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome) assoziiert, bei dem es bereits in der Kindheit zu einer generalisierten Autoimmunität mit Manifestationen in verschiedenen Organen kommt (Bennett et al., 2001). Da sowohl Mäuse mit einer Keimbahndeletion von Foxp3 (scurfy mice) als auch solche mit einem T-Zell-spezifischen Foxp3-Knockout ein IPEX-ähnliches Krankheitsbild zeigen, wird ein Mangel an regulatorischen T-Zellen für den Phänotyp verantwortlich gemacht (Fontenot et al., 2005).

Regulatorische T-Zellen verrichten ihre suppressive Funktion durch verschiedene Mechanismen. Dazu gehört die Ausschüttung inhibitorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β , deren Rollen in verschiedenen Krankheitsmodellen mit zum Teil sehr unterschiedlichen Ergebnissen untersucht wurden und zumindest teilweise redundant erscheinen (Vignali et al., 2008). Durch die Sekretion von Granzym B, das vor allem von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziert wird und durch die Aktivierung der Caspase-Kaskade und der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien zytolytisch wirkt (Lord et al., 2003), können regulatorische T-Zellen die Apoptose von Effektor-T-Zellen und B-Zellen induzieren (Gondek et al., 2005). Ein weiterer möglicher Mechanismus über den Tregs ihren hemmenden Effekt auf Effektor-T-Zellen ausüben ist die lokale Depletion von IL-2, das diese benötigen, um zu proliferieren und das von regulatorischen T-Zellen mit sehr hoher Affinität gebunden werden kann (Pandiyani et al., 2007). Mithilfe der Intravitalmikroskopie konnten außerdem direkte Zell-Zell-Kontakte zwischen Tregs und dendritischen Zellen *in vivo* gezeigt werden und es wird vermutet, dass dadurch das Priming naiver T-Zellen begrenzt wird (Tang et al., 2005). Regulatorische T-Zellen sind darüber hinaus in der Lage, die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf dendritischen Zellen und somit das zweite Aktivierungssignal für T-Zellen zu verringern (Cederbom et al., 2000).

2.5.1 Entstehung natürlicher Tregs im Thymus

Natürliche Tregs entstehen im Thymus aus den gleichen Vorläuferzellen wie konventionelle T-Zellen und sind zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz unverzichtbar. In klassischen murinen Thymektomie-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Ablation natürlicher

Tregs durch Entfernung des Thymus im Alter von drei Tagen zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen führt, die allein durch induzierte Tregs nicht verhindert werden können (Sakaguchi et al., 1995).

Reife T-Lymphozyten entstehen aus doppelt positiven Thymozyten, die von pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark abstammen. Thymus-Epithelzellen präsentieren an Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) bzw. humanes Leukozytenantigen (HLA) gebundene Selbstantigene. Während der positiven Selektion wird sichergestellt, dass die Antigenrezeptoren der Thymozyten fähig sind, an körpereigene MHC gebundene Antigene zu erkennen und somit ein Pool immunkompetenter T-Zellen entsteht (Allen, 1994). Ob eine Zelle MHC-I oder MHC-II-gebundene Peptide bindet, entscheidet darüber hinaus, ob sie zu einem einzelpositiven CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten wird (Teh et al., 1988). Positiv selektierte Thymozyten migrieren in das Thymusmark, wo im Rahmen der negativen Selektion autoreaktive Zellen aussortiert werden. Die dort in den Hassall-Körperchen angelegten Epithelzellen präsentieren unter dem Transkriptionsfaktor AIRE (Derbinski et al., 2005) Antigene, die spezifisch für Gewebe außerhalb des Thymus sind (TRAs – tissues restricted antigens). Kommt es zur Bindung eines Selbstantigen-MHC-Komplexes durch eine CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zelle, entscheidet die Affinität des TCR darüber, ob eine T-Zelle stirbt oder ein ausreichendes Überlebenssignal erhält. T-Zellen, die eine starke Bindung mit einem Selbstantigen eingehen und somit ein hohes autoreaktives Potenzial besitzen, werden apoptotisch. Dieser Prozess wird auch als klonale Deletion bezeichnet. Zellen, die eine schwache Affinität zeigen, überleben und verlassen den Thymus als naive T-Lymphozyten. Man geht davon aus, dass Zellen mit einer hohen Affinität, aber nur transienter TCR-Stimulation zu regulatorischen T-Zellen werden (Lio et al., 2008) und dass kostimulatorische Signale eine entscheidende Rolle in der Differenzierung der T-Lymphozyten spielen, da es in Mäusen mit einer CD28-Deletion zu einer vermehrten klonalen Deletion kommt (Salomon et al., 2000).

Verschiedene Publikationen haben einen zweischrittigen Prozess der Differenzierung natürlicher CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen aus doppelt positiven Thymozyten vorgeschlagen, bei dem es nach einer initialen starken TCR-Aktivierung und Hochregulierung des IL-2-Rezeptors zu einer Phosphorylierung von STAT5 unter dem Einfluss von IL-2 kommt und folglich zur Expression von Foxp3 und anderen Treg-charakterisierenden Genen (Burchill et al., 2006; Lio et al., 2008).

2.5.2 Rolle von NF- κ B bei der Entstehung natürlicher regulatorischer T-Zellen

Die Bindung des T-Zell-Rezeptors führt zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, wobei insbesondere dem NF- κ B-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Entstehung natürlicher Tregs im Thymus zugeschrieben wird (Oh et al., 2017). Eine Störung im Signalweg des T-Zell-Rezeptors, beispielsweise durch den Knockout von Carma1, PKC oder IKK β , verursacht eine Reduktion an funktionsfähigen Treg-Zellen ohne die Entwicklung und Funktion konventioneller T-Zellen merklich zu beeinflussen (Gupta et al., 2008; Medoff et al., 2009; Schmidt-Supprian et al., 2004). Auch der Verlust der NF- κ B-Untereinheiten c-Rel und p50 geht mit einer Verminderung der Anzahl an Tregs einher, was die essentielle Rolle dieser Transkriptionsfaktoren in der Entstehung regulatorischer T-Zellen unterstreicht (Isomura et al., 2009; Long et al., 2009; Ruan et al., 2009).

3. Wissenschaftliche Fragestellung und Zielsetzung

Die Funktion von A20 als Inhibitor von NF- κ B wurden in den letzten 20 Jahren intensiv erforscht und es konnten verschiedene molekulare Mechanismen der Funktionsweise von A20 und die Bedeutung für einzelne Zellpopulationen beschrieben werden. Als zentraler Signalweg in der Entwicklung und Differenzierung von T-Lymphozyten und in ihrer Funktion als wichtige Akteure im Immunsystem, galt dem NF- κ B-Signalweg von jeher eine große Aufmerksamkeit. Er steuert die Transkription proinflammatorischer Zytokine und antiapoptotischer Proteine und spielt somit eine entscheidende Rolle für die Funktion und Proliferation von T-Zellen in Entzündungsprozessen. Durch die Deletion von A20 und der folglich Enthemmung von NF- κ B konnten in murinen Modellen zum Teil schwerwiegende Krankheiten ausgelöst und in genomweiten Assoziationsstudien konnten Fehlfunktionen oder ein Mangel an A20 mit diversen Autoimmun- und Krebserkrankungen assoziiert werden. In präklinischen Untersuchungen wurden antiinflammatorische Effekte von A20 sowie ein positiver Einfluss auf das Zellüberleben festgestellt.

3.1 Die Rolle von A20 für die Entstehung und das Überleben regulatorischer T-Zellen

Der Einfluss des NF- κ B-Signalweges in der Differenzierung unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen ist nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. In den letzten zwei

Jahrzehnten sind die regulatorischen T-Zellen als eine Gruppe von T-Helferzellen, die die periphere Toleranz aufrechterhalten und Immunantworten regulieren, hervorgetreten.

Ein Mangel oder eine verminderte Funktionsfähigkeit dieser spezialisierten Zellen ist mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen assoziiert (siehe Abschnitt 2.2). Der NF- κ B-Signalweg spielt in der Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus eine entscheidende Rolle und Störungen dieses Signalweges können mit Immundefizienz, Autoimmun- und Tumorerkrankungen einhergehen.

In verschiedenen zellspezifischen A20-Knockout-Modellen konnte die Entstehung von Autoimmunreaktionen und ein Einfluss auf das Zellüberleben beobachtet werden. Für CD8⁺ T-Zellen konnte eine gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine, für CD4⁺ T-Zellen ein Schutz vor Nekroptose und damit ein positiver Effekt auf das Zellüberleben gezeigt werden. (siehe Abschnitt 2.3.1).

Die Rolle von A20 in regulatorischen T-Zellen wurde bisher hingegen noch nicht untersucht und birgt interessante Aspekte im Hinblick auf die Assoziation dieses Proteins mit humanen Erkrankungen.

Daraus leiten sich insbesondere folgende Fragen ab:

1. Hat A20 durch die Hemmung von NF- κ B einen Einfluss auf die Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus?
2. Wenn ja, welche Mechanismen sind für diese Einflussnahme verantwortlich?
3. Wird das Zellüberleben regulatorischer T-Zellen durch die Deletion von A20 verändert?
4. Beeinflusst die Deletion von A20 die Funktionsfähigkeit regulatorischer T-Zellen *in vitro* oder *in vivo*?

3.2 Der Einfluss von A20 auf das Zellüberleben und die Aktivierung konventioneller T-Zellen im Rahmen der Graft-versus-Host Erkrankung

Als Transkriptionsfaktor spielt NF- κ B eine zentrale Rolle in der Pathogenese der GvHD und reguliert das Überleben und die Aktivität der Spender-T-Zellen. Durch Antigenbindung am T-Zell-Rezeptor kommt es zur Induktion von NF- κ B und infolgedessen zur Proliferation und Differenzierung naiver Spender-T-Zellen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, die das NF- κ B-Protein c-Rel nicht exprimieren, keine GvHD auslösen, der GvL-Effekt aber erhalten bleibt (Yu et al., 2013; Shono et al., 2014).

Als Inhibitor von NF- κ B greift das Protein A20 hemmend in den NF- κ B-Signalweg ein und begrenzt in CD8⁺ T-Zellen einerseits die Zellaktivierung und schützt andererseits vor einem frühzeitigen Zelltod. In CD4⁺ T-Zellen fördert es die Autophagie und sichert die Zellen vor dem nekroptotischen Zelltod, sodass es hier ebenfalls eine antiapoptotische Wirkung zeigt (siehe Abschnitt 2.3.1).

Im murinen Th17-abhängigen Krankheitsmodell der autoimmunen Enzephalomyelitis führte ein Mangel an A20 in CD4⁺ T-Zellen durch eine ungehemmte Nekroptose zu einer Reduktion der Entzündungsaktivität.

Für andere Zellarten wie B-Zellen oder dendritische Zellen konnte ein Mangel von A20 mit einer erhöhten Neigung zu inflammatorischen Reaktionen assoziiert werden.

Daraus ergibt sich in diesen Zellen eine antiinflammatorische Rolle von A20, die im Kontrast zur Förderung des Zellüberlebens und damit einer vielleicht sogar proinflammatorischen Wirkung in T-Zellen steht.

Das Verständnis der Rolle von A20 in T-Zellen und in T-Zell-abhängigen Erkrankungen wie der akuten GvHD ist aber nach wie vor unvollständig, sodass die folgenden Fragen resultieren:

1. Welchen Effekt hat die Deletion von A20 auf die Aktivierung und die Funktion von T-Effektorzellen unter den inflammatorischen Bedingungen im Rahmen der Graft-versus-Host Erkrankung?
2. Wird das Zellüberleben T-Effektorzellen durch die Deletion von A20 verändert?

4. Methodik

4.1 Charakterisierung der Rolle von A20 in der Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus und das Zellüberleben

Um die Rolle von A20 in regulatorischen T-Zellen zu untersuchen, wurden transgene Mäuse mit einer homozygoten T-Zell-spezifischen Deletion von A20 verwendet, die im Folgenden A20^{CD4-KO} genannt werden. Dieser konditionale Knockout wurde durch die Kreuzung von A20^{fl/fl}-Mäusen (Vereecke et al., 2010) mit CD4Cre-transgenen Mäusen (Schroeder et al., 2011) generiert und zeigt eine normale Entwicklung (siehe 2.4.1).

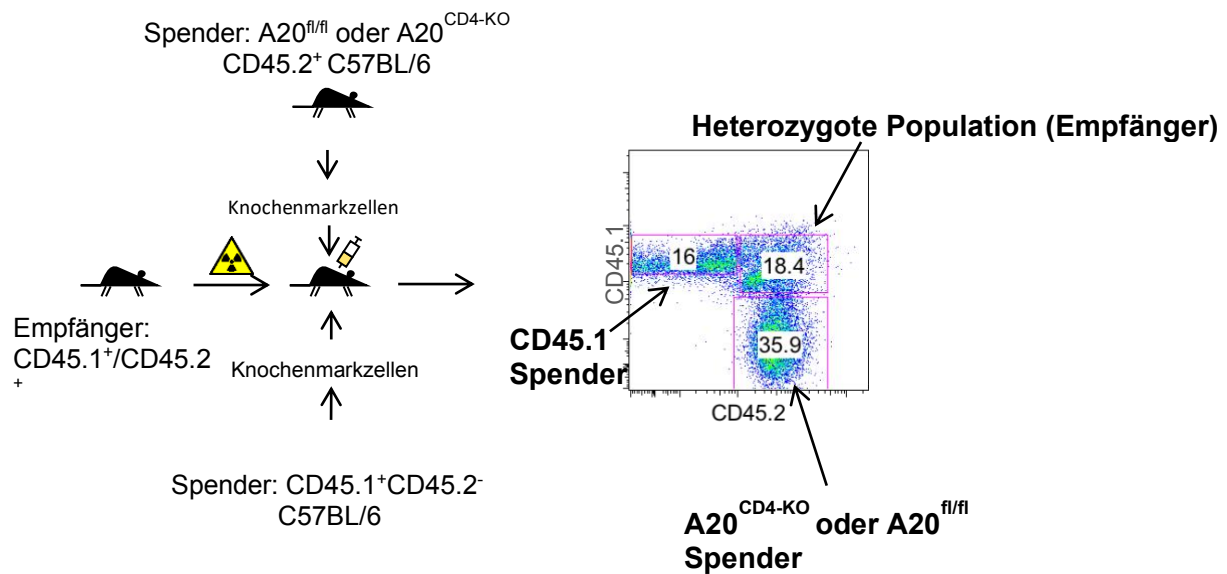


Abb. 3: Kompetitives Engraftment-Experiment

Heterozygote CD45.1⁺/CD45.2⁺ C57BL/6-Mäuse wurden letal bestrahlt und anschließend mit Knochenmarkzellen aus CD45.1⁺ C57BL/6 und CD45.2⁺ A20^{fl/fl}- oder A20^{CD4-KO}-Mäusen zu gleichen Anteilen rekonstituiert. Nach 90 Tagen wurden die Knochenmarkzellen isoliert und durchflusszytometrisch auf ihre Expression von CD45.1 und CD45.2 untersucht, um die Herkunft der Zellen zu bestimmen.

Zur Unterscheidung eines intrinsischen Effektes von A20 von einem möglicherweise durch ein verändertes Zytokinmilieu in A20^{CD4-KO}-Mäusen verursachten Einfluss auf die Entwicklung regulatorischer T-Zellen im Thymus, wurde ein kompetitives Engraftment-Experiment durchgeführt. Hierzu wurden heterozygote CD45.1/CD45.2-Mäuse letal bestrahlt und anschließend mit CD45.1⁺ Knochenmarkszellen aus Wildtyp-Tieren und CD45.2⁺ Knochenmarkszellen aus A20^{CD4-KO}-Tieren im Verhältnis von 1:1 transplantiert. Nach zwölf Wochen wurden die Knochenmarkzellen der Knochenmark-Chimären durchflusszytometrisch untersucht und anhand der Färbung der genetischen Marker CD45.1 und CD45.2 sowie weiterer charakteristischer Moleküle wie CD4, CD25 und FoxP3 konnte eine Zuordnung der Zellen zu den Stammzellen, aus denen sie hervorgegangen sind, erfolgen. Dieser Ansatz erlaubt eine Aussage darüber, ob ein Knochenmark-Kompartiment, in diesem Fall also das aus A20^{CD4-KO}-Spendertieren einen Entwicklungsvorteil besitzt (s. Abb. 3).

Für die Analyse der suppressiven Funktion regulatorischer T-Zellen *in vitro* wurde ein Treg-Suppressions-Assay gewählt. Hierbei wird die Proliferation konventioneller T-Zellen durch TCR-Stimulation mit bestrahlten dendritischen Zellen und anti-CD3-Antikörper in Gegenwart von regulatorischen A20-defizienten und A20-Wildtyp T-Zellen über einen Zeitraum von 72h

gemessen. Die Proliferationsrate wurde durchflusszytometrisch mithilfe einer Farbstoffverdünnung bestimmt.

Die suppressive Kapazität regulatorischer T-Zellen wurde *in vivo* mithilfe des Modells der akuten Graft-versus-Host Erkrankung analysiert, da ein positiver Effekt dieser Zellen auf den Krankheitsverlauf und das Überleben von verschiedenen Gruppen gezeigt werden konnte (Taylor, 2002; Edinger, 2003). Dazu erfolgte die Gabe aufbereiteter Tregs aus A20^{fl/fl}- und A20^{CD4-KO}-Tieren zusammen mit der Injektion von Knochenmarks- und konventionellen T-Zellen. Analysiert wurde der Einfluss auf das Gesamtüberleben und die Krankheitsaktivität wie unter 4.2 beschrieben.

4.2 Untersuchung der Rolle von A20 im Rahmen der akuten Graft-versus-Host Erkrankung

Um die Rolle von A20 in konventionellen T-Zellen zu untersuchen, wurde ein gut etabliertes murines Modell der akuten Graft-versus-Host Erkrankung verwendet. In diesem Modell wird durch die Transplantation von Knochenmark und konventionellen T-Zellen in zuvor letal bzw. myeloablativ bestrahlte Tiere mit unterschiedlichen MHC-Allelen eine systemische Entzündungsreaktion induziert, die entscheidend von der Aktivierung und Proliferation der Spender-T-Zellen abhängt. In unserem Modell wurden T-Zellen aus C57/Bl6 (H²b)-Tieren mit oder ohne T-Zell-spezifische Deletion von A20, Knochenmarkszellen aus Wildtyp C57/Bl6 (H²b)-Tieren und BALB/c (H²d) als Empfängertiere verwendet.

Die Krankheitsaktivität wurde durch die Erhebung eines klinischen GvHD-Scores (Gewicht, Fellbeschaffenheit, Körperhaltung) im Verlauf beschrieben.

Mithilfe durchflusszytometrischer Messmethoden wurde zum einen anhand spezifischer Oberflächenmoleküle der Anteil bestimmter T-Zell-Subtypen in GvHD-Organen wie Milz und Darm bestimmt. Zum anderen konnte durch intrazelluläre Zytokinfärbung, z.B. von IFN- γ , die Aktivität von Effektor-T-Zellen ermittelt werden.

Histologische Analysen der Milz und Darms als klassische GvHD-Zielorgane wurden zur Erhebung des histologischen GvHD-Scores und der lymphozytären Infiltration durchgeführt.

In vitro kann die GvHD mithilfe einer mixed lymphocyte reaction dargestellt werden. Hierzu werden dendritische Zellen aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen gezüchtet und mit T-Zellen aus A20^{fl/fl} oder A20^{CD4-KO}-Tieren kultiviert.

Nach fünf Tagen wurden der Anteil lebendiger Zellen CD4⁺-T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und somit auf die Proliferation und das Zellüberleben geschlossen.

Um eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige T-Zellstimulation *in vivo* zu induzieren, erfolgte eine einmalige Injektion von Lipopolysaccharid in naive A20^{CD4-KO}-Tiere und A20^{fl/fl}-Kontrolltiere, einem höchst immunogenen Bestandteil bakterieller Zellwände, das zu einer systemischen Entzündungsreaktion durch Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen, Neutrophilen und Monozyten und die Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen in der Leber führt. Nach 24h wurde die absolute Zahl CD4⁺ T-Zellen in der Milz im Vergleich zu unbehandelten Tieren gemessen.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Originalarbeiten

5.1 „A20 Restrains Thymic Regulatory T Cell Development“

In dieser Arbeit zeigen wir, dass A20 eine wichtige Rolle als Inhibitor von NF-κB bei der Differenzierung und Entwicklung regulatorischer T-Zellen im Thymus zukommt. In Mäusen mit einer A20-Defizienz in CD4⁺ T-Zellen fanden wir einen stark erhöhten Anteil CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen, der sich bereits im Alter von 12 Tagen nachweisen ließ. In den Thymi der A20^{CD4-KO}-Tiere zeigte sich zudem eine vergleichsweise erhöhte Zahl an CD4⁺CD25⁺GITR⁺FoxP3⁻ Treg-Vorläuferzellen, sodass hier ein Mechanismus zugrunde liegen muss, der der Expression von Foxp3 vorausgeht.

Da A20 ein Inhibitor von NF-κB ist und insbesondere die c-Rel-Untereinheit eine wichtige Rolle in der Entwicklung FoxP3⁺ Tregs im Thymus spielt (Isomura, 2010), untersuchten wir die Aktivität der NF-κB -Untereinheit RelA (p65) und die Translokation von c-Rel in den Nukleus. Die Aktivierung von RelA in A20-defizienten natürlichen Tregs war erhöht, wohingegen die Translokation der Untereinheit c-Rel in den Zellkern im Vergleich zu Wildtyp Tregs leicht vermindert war. Diese Unterschiede zeigten sich auch in Abwesenheit externer Stimuli.

Durch *in vitro* Stimulation regulatorischer T-Zellen, die durchflusszytometrisch aus A20^{CD4-KO} und A20^{fl/fl}-Tieren gewonnen wurden, mit anti-CD3, anti-CD28 und IL-2 konnte eine

gesteigerte Expansion A20-defizienter Tregs als Ursache der größeren Treg-Population ausgeschlossen werden. Zudem ließ sich *in vitro* durch Kultivierung von naiven CD62L^{high}CD44^{low} T-Zellen mit TGF- β und IL-2 eine sogar verminderte Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen in der A20^{CD4-KO}-Gruppe erzielen. Durch die Injektion von EdU, einem Nukleosidanalogen, das in die DNA eingebaut wird und durchflusszytometrisch zur Messung der Zellteilungsrate bestimmt werden kann, ließ sich auch *in vivo* keine gesteigerte Proliferationsrate A20-defizienter Tregs im Thymus feststellen. Zudem analysierten wir die Expression von Ki-67 als weiteren Proliferationsmarker und konnten auch hier keinen Unterschied zwischen FoxP3⁺ Thymozyten in A20^{fl/fl} und A20^{CD4-KO}-Tieren feststellen. Ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die Apoptoserate, durchflusszytometrisch gemessen an der Rate der Caspase-3⁺ Zellen an FoxP3⁺ Treg-Zellen im Thymus. Anders als in konventionellen T-Zellen hat ein Mangel an A20 in regulatorischen T-Zellen also keinen wesentlichen Einfluss auf die Proliferations- und Apoptoseraten.

Mithilfe des oben beschriebenen kompetitiven Engraftment-Experiments konnten wir *in vivo* einen zellintrinsic Entwicklungsvorteil in A20-defizienten T-Zellen ermitteln. Hierzu wurde letal bestrahlten Mäusen Knochenmark in einem Verhältnis von je 50% von zum einen Wildtyp-Tieren und zum anderen A20^{CD4-KO} oder A20^{fl/fl}-Tieren transplantiert. Nach 3 Monaten zeigten die Empfänger des A20-defizienten Knochenmarks einen höheren Anteil regulatorischer T-Zellen in Milz und Thymus, von dem wiederum ein höherer Anteil aus der Population der A20-defizienten Knochenmarkzellen hervorgegangen war.

Interessanterweise zeigten A20-defiziente Thymozyten und regulatorische T-Zellen im Thymus eine verminderte Abhängigkeit von IL-2, das eine wichtige Rolle für das Zellüberleben im Hinblick auf die FoxP3-induzierte Apoptose hat, während Kontrolltiere mit einer Abnahme dieser Populationen im Thymus nach Gabe eines IL-2-depletierenden Antikörpers reagierten. Um die Funktionalität A20-defizienter Tregs zu untersuchen, wurde *in vitro* ein Treg-Suppressions-Assay durchgeführt. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und A20-defizienten Tregs in der Fähigkeit die Proliferation von Effektor-T-Zellen zu unterdrücken. *In vivo* konnten A20-defiziente Tregs effizient eine durch Effektor-T-Zellen vermittelte Graft-versus-Host Disease nach allogener Stammzelltransplantation supprimieren, sodass ein Mangel an A20 die Funktionalität nicht wesentlich einzuschränken scheint.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass A20 die Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus limitiert und in Verbindung mit dem antiapoptotischen Effekt in konventionellen T-Zellen eine eher proinflammatorische Wirkung besitzt.

Als eine der Erstautorinnen der Publikation „A20 Restrains Thymic Regulatory T Cell Development“ half ich bei der experimentellen Planung, führte einen Großteil der Experimente für die Studie durch, analysierte die daraus gewonnenen Ergebnisse und half bei der Verfassung des Manuskriptes.

5.2 „A20 deletion in T cells modulates acute graft-versus-host disease in mice“

In dieser Arbeit zeigen wir, dass A20 eine wichtige Funktion einerseits für das Überleben und andererseits im Prozess der Aktivierung von T-Zellen hat.

In vitro konnten wir eine höhere Sterblichkeit konventioneller A20-defizienter T-Zellen im Vergleich zu A20^{fl/fl}-Zellen nach TCR-Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern, vor allem in den ersten 24 Stunden der Zellkultur zeigen. Bereits zum Zeitpunkt der Isolation aus der Milz fiel ein höherer Anteil toter Zellen in der A20^{CD4-KO}-Population auf, der mit einer Amin-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Mithilfe der allogenen mixed lymphocyte reaction konnte nach fünf-tägiger Stimulation durch allogene dendritische Zellen eine geringere absolute Anzahl CD4⁺ Effektor-T-Zellen in der A20^{CD4-KO}-Gruppe festgestellt werden. Um den Einfluss eines Mangels an A20 *in vivo* darstellen zu können, wurde das Krankheitsmodell der GvHD ausgewählt. Die Transplantation A20-defizienter T-Zellen verursachte eine deutlich mildere Graft-versus-Host-Erkrankung und die Mortalität war deutlich reduziert. Der Anteil an Spender-T-Zellen in Milz, Dünn- und Dickdarm war bei Empfängern A20-defizienter T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation stark vermindert, der Anteil IFN- γ -produzierender T-Zellen an den nachweisbaren Spender-T-Zellen hingegen vergleichsweise deutlich gesteigert. Zu einem frühen Zeitpunkt nach der Transplantation konnten wir anhand erhöhter TNF α -Spiegel bei Empfängern A20-defizienter T-Zellen eine stärkere systemische Entzündungsreaktion nachweisen, die sich im Krankheitsverlauf umkehrte.

Da ein Mangel an A20 in konventionellen T-Zellen im inflammatorischen Milieu der GvHD eine initiale Hyperaktivierung der Zellen verursacht, konnte durch eine Steigerung der Dosis der transplantierten T-Zellen um den Faktor 4 der ursprüngliche Phänotyp umkehrt werden und

es kam zu einer gesteigerten Morbidität und Mortalität in der Gruppe der Tiere, die einen Mix aus CD4⁺ und CD8⁺ A20-defizienten T-Zellen erhielten.

Auch eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige Stimulation von T-Zellen, die durch die peritoneale Injektion von LPS erfolgte, führte in A20^{CD4-KO}-Tieren zu einem Abfall der absoluten Zahl CD4⁺ T-Lymphozyten in der Milz, wohingegen A20^{fl/fl}-Tiere eine leichte Zunahme dieser Zellpopulation zeigte.

Insgesamt konnten wir demonstrieren, dass A20 in CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle für das Zellüberleben, sowohl nach TCR-abhängiger als auch im Kontext einer T-Zell-Rezeptor-unspezifischen Aktivierung des Immunsystems, hat. Durch eine fehlende NF-κB-Inhibierung kommt es initial zu einer Hyperaktivierung, die bei entsprechender Steigerung der Zahl der konventionellen T-Zellen im Transplantat auf 2x10⁶ den milderen GvHD-Verlauf, den Empfänger der Standarddosis von 5x10⁵ T-Zellen zeigen, umkehren kann.

Als eine der Erstautorinnen der Publikation "A20 deletion in T cells modulates acute graft-versus-host disease in mice" half ich bei der experimentellen Planung, führte einen Großteil der Experimente für die Studie durch, analysierte die daraus gewonnenen Ergebnisse und half bei der Verfassung des Manuskriptes.

6. Bezug zur bestehenden Literatur und Schlussfolgerungen

Einige andere Gruppen konnten bereits zeigen, dass die Deletion des NF-κB-Inhibitors A20 in T-Zellen zu einem vermehrten Zelltod aktivierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen führt (Just et al., 2016; Matsuzawa et al., 2015; Onizawa et al., 2015). So konnten Onizawa et al. zeigen, dass die Zellteilungsrate A20-defizienter T-Zellen nach TCR-Stimulation *in vitro* zwar erhöht, die Rate vitaler Zellen aber vermindert ist. Eine erhöhte Konzentration proinflammatorischer Zytokine und ein Entwicklungsdefekt dieser Zellen als Ursache des vorzeitigen Zelltodes konnten aber ausgeschlossen werden.

In unserem murinen aGvHD-Modell zeigte sich nach der Transplantation A20^{-/-} CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen trotz starker TCR-Aktivierung und gesteigerter Effektor-Funktion der T-Zellen ein Überlebensvorteil der Empfänger A20-defizienter T-Zellen und eine verminderte Infiltration

von GvHD-Zielorganen, die durch einen vorzeitigen Tod der Spenderzellen erklärt werden können.

Interessanterweise konnten wir diesen Effekt durch Gabe einer höheren T-Zell-Dosis umkehren. Es zeigte sich ein erhöhter Anteil IFN- γ -produzierender Zellen an den A20^{-/-} Spender-T-Zellen in Milz und Darm, sodass wir von einer initial gesteigerte Effektorfunktion der A20^{-/-} T-Zellen ausgehen. In einem Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes* konnten Just et al. ebenfalls eine gesteigerte Effektorfunktion A20^{-/-} CD8⁺ T-Zellen beobachten (Just et al., 2016), die der verminderten negativen Rückkopplung der NF- κ B-Aktivität zugeschrieben werden kann. Im Einklang damit zeigten sich in unserem Modell zunächst höhere TNF α -Spiegel im Blut jener Mäuse, die A20^{-/-} T-Zellen erhalten hatten. An Tag 30 nach Transplantation zeigten diese Tiere dann aber einen niedrigen TNF α -Spiegel im Vergleich zu Kontrolltieren.

Auch eine TCR-abhängige Stimulation *in vitro* und eine TCR-unabhängige Stimulation mit LPS *in vivo* führten zu einer Reduktion von A20^{-/-} CD4⁺ T-Zellen, die *in vivo* wahrscheinlich durch antigenpräsentierende Zellen vermittelt wird.

Insgesamt lässt sich also vermuten, dass durch die Transplantation einer höheren Dosis A20-defizienter Effektor-T-Zellen entweder eine gesteigerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch die Enthemmung von NF- κ B vorliegt oder durch den massiven Zellzerfall eine Hyperinflammation entsteht, die zu einem ausgedehnten Gewebeschaden führt, der sich auch durch das frühzeitige Sterben der Zellen nicht mehr ausgleichen lässt.

In den letzten Jahren wurde die antiapoptotische Rolle von A20 intensiv untersucht und es konnte gezeigt werden, dass A20 eine von seiner inhibitorischen Wirkung auf NF- κ B unabhängige, zum Teil nicht-enzymatische Aktivität ausüben kann, um Zellen vor verschiedenen Arten des programmierten Zelltodes zu schützen. So schützt A20 intestinale Epithelzellen (Vereecke et al., 2010), embryonale Fibroblasten (Priem et al., 2019) und NK-Zellen (Vetters et al., 2019) vor TNF-induzierter Apoptose. In konventionellen A20-defizienten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen konnten Onizawa et al. eine vermehrte Assoziation von RIPK1-RIPK3-Komplexen nachweisen und durch den Einsatz des RIPK1-Inhibitors Necrostatin-1 das Zellüberleben und die Expansion der Zellen nach TCR-Stimulation wiederherstellen. T-Zellen

werden durch A20 also vor allem vor einer Caspase-unabhängigen Nekroptose geschützt (Onizawa et al., 2015).

Ein weiterer Mechanismus mit dem A20 T-Zellen vor dem Zelltod schützt ist durch die Induktion von Autophagie, einem Prozess, der zum Zellmetabolismus und zum Abbau intrazellulärer Abfallprodukte beiträgt. In A20-defizienten T-Zellen konnte eine verminderte TCR-induzierte Autophagosomenbildung gemessen werden, die auf eine gesteigerte mTOR-Aktivierung in diesen Zellen zurückgeführt werden konnte (Matsuzawa et al., 2015).

Für regulatorische T-Zellen konnten wir durch die Bestimmung von EdU und Ki-67 nachweisen, dass es keinen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die Proliferations- und Apoptoserate zwischen A20^{-/-} und A20^{+/+} Treg Zellen im Thymus *in vivo* gibt. A20^{-/-} Foxp3⁻ CD4⁺ Thymozyten hingegen zeigten interessanterweise deutlich erhöhte Werte der aktivierten Caspase 3 und eine erniedrigte EdU-Inkorporation im Vergleich zu Wildtyp Zellen, sodass diese Zellen von A20 vor Apoptose geschützt werden.

In unserem GvHD-Modell besteht durch die Konditionierungstherapie ein stark inflammatorisches Milieu, das eine ausgeprägte TCR-Aktivierung bewirkt. Wahrscheinlich ist ein Zusammenspiel der verschiedenen zuvor genannten Mechanismen für das rasche Sterben der Effektor-T-Zellen im Rahmen der GvHD-Induktion mit A20-defizienten T-Zellen verantwortlich.

Durch die Untersuchung von Mäusen mit einem konditionalen Knockout von A20 in CD4⁺ T-Zellen konnten wir einen erhöhten Anteil FoxP3⁺CD4⁺ regulatorischer T-Zellen in diesen Tieren feststellen.

Guckel et al. postulieren basierend auf ihrer Untersuchung transgener Mäuse mit einer mutierten Form von IκBα in Thymozyten, die zu einer Retention von NF-κB im Zytoplasma führt, dass ein zellintrinsischer Effekt eine Reduktion der CD25⁺Foxp3⁺CD4⁺ Treg-Zellen bewirkt. Sie konnten zeigen, dass dieser Phänotyp genau wie in unseren kompetitiven Engraftment-Experimenten nicht durch den Mangel an extrinsischen Signalen wie Zytokinen oder Rezeptorliganden erklärt werden kann (Guckel et al., 2011). In einer anderen Studie konnte die NF-κB-Aktivität durch die Einführung eines konstitutiv aktiven IKKβ-Transgens gesteigert werden und übereinstimmend mit unseren Erkenntnissen fanden sich deutlich gesteigerte Treg-Zahlen und eine absolut verminderte Anzahl CD4⁺ konventioneller T-Zellen (Long et al., 2009).

Unter den fünf NF- κ B-Untereinheiten hat c-Rel in der Entwicklung regulatorischer T-Zellen eine entscheidende Bedeutung, da die Deletion von c-Rel mit einer Reduktion natürlicher Treg-Zellen einhergeht, während ein Mangel an p50 (NF- κ B1) keinen Einfluss auf die Anzahl dieser Zellen im Thymus und in der Milz hat (Deenick et al., 2010).

Der TNF-Rezeptor GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) wird durch TCR-Bindung induziert und zeigt eine hohe Expression vor allem auf CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (McHugh et al., 2002). GITR wird bereits von Foxp3⁻ Treg-Vorläuferzellen exprimiert (Lio et al., 2008) und die Stärke der Expression ist abhängig von der Affinität des TCR gegenüber seinem Antigen. Die Abwesenheit von GITR geht mit einem Verlust reifer Foxp3⁺ Treg-Zellen einher und die Kostimulation von GITR auf CD25⁻Foxp3^{low} Treg-Vorläuferzellen führt zu einer dosisabhängigen Zunahme reifer Treg-Zellen und einer Abnahme der notwendigen TCR-Affinität während der negativen Selektion (Mahmud et al., 2014). In unseren Experimenten zeigte sich zum einen ein größerer Anteil GITR⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ Treg-Vorläuferzellen in den Thymi der A20^{CD4-KO}-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren und zum anderen war die Expression von GITR auf A20-defizienten Treg-Vorläuferzellen gesteigert.

In c-Rel^{-/-} Tieren ist die Population der CD25⁺GITR^{hi}Foxp3⁻CD4⁺ Treg-Vorläuferzellen deutlich vermindert, während andere T-Zell-Subgruppen normal entwickelt sind (Grigoriadis et al., 2011). Trotz der wesentlichen Rolle von c-Rel für die Entwicklung natürlicher Treg-Zellen fanden wir in A20^{-/-} CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs eine verminderte nukleäre Translokation, was darauf hindeuten könnte, dass NF- κ B vor allem in die frühe Phase der Differenzierung in Foxp3⁻ Vorläuferzellen eingreift. Entsprechend war der Anteil GITR-exprimierender CD25⁺Foxp3⁻CD4⁺ Treg-Vorläuferzellen in A20^{CD4-KO}-Tieren erhöht.

Es wird vermutet, dass eine intermediäre TCR-Affinität über die c-Rel-abhängige Induktion antiapoptotischer Proteine wie Bcl-xL CD4⁺ Thymozyten während der negativen Selektion vor der Apoptose schützt und somit zur Entstehung von regulatorischen T-Zellen beiträgt (Fulford et al., 2015).

In RelA^{-/-} T-Zellen konnte eine verminderte GITR-Expression nachgewiesen werden (Zhan et al., 2008). Denkbar ist in diesem Zusammenhang eine vermehrte GITR-Expression aufgrund der enthemmten NF- κ B-Wirkung und daraus resultierend eine Zunahme der Treg-Population bei einem Mangel an A20 in T-Zellen. Wir konnten eine gesteigerte Aktivität der NF- κ B-Untereinheit RelA in unseren A20^{-/-} Treg Zellen beobachten, übereinstimmend zu der

Beobachtung deutlich reduzierter Treg-Zahlen in Knochenmarkchimären, die mit $rela^{-/-}$ Stammzellen rekonstituiert wurden (Isomura et al., 2009). Der Knockout von IKK β führt zu einer ausgeprägteren Reduktion natürlicher Treg-Zellen als der Mangel an c-Rel allein. Das zeigt, dass nicht die Untereinheit c-Rel allein, sondern auch andere, aber nicht alle NF- κ B-Untereinheiten im gleichen Maße, an der Entwicklung dieser Zellen beteiligt sind (Fulford et al., 2015), was die Notwendigkeit einer differenzierten Aktivierung bzw. Translokation der verschiedenen NF- κ B-Moleküle unterstreicht.

Die Induktion von Foxp3 wird durch die common gamma chain (γ c)-Rezeptor-bindenden Interleukine 2 und 15 vermittelt, die den JAK3-STAT5-Signalweg aktivieren. Long et al. konnten zeigen, dass c-Rel direkt an die CNS3-Sequenz im Foxp3-Locus bindet, eine Enhancer-Region, die von anderen Transkriptionsfaktoren nur im demethylierten Zustand gebunden werden kann (Long et al., 2009). Eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch die Bindung des TCR könnte den Foxp3-Promoter in Treg-Vorläuferzellen somit durch eine epigenetische Veränderung auf die Zytokin-abhängige Induktion vorbereiten. In Tet2/Tet3-Doppelknockout-Mäusen, denen die demethylierenden Enzyme Tet2 und Tet3 fehlen und regulatorische Regionen der DNA methyliert bleiben, zeigte sich in dem Zusammenhang eine instabile Foxp3-Expression und ein Verlust der suppressiven Funktion regulatorischer T-Zellen (Yue et al., 2016).

Durch die Injektion eines neutralisierenden anti-IL-2 Antikörpers konnten wir zeigen, dass $A20^{-/-}$ Treg-Zellen im Thymus im Kontrast zu Wildtyp-Treg-Zellen zum Überleben nicht auf IL-2 angewiesen sind und dass sich diese Differenz nicht auf einen Unterschied in der Expression des IL-2-Rezeptors zurückführen ließ. Interessanterweise zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl an Thymozyten sechs Tage nach IL-2-Blockade, weder in $A20$ -defizienten noch in $A20^{+/+}$ -Tieren.

In Mäusen mit einem Knockout der Alpha- oder Betakette des IL-2-Rezeptors fanden Fontenot et al. lediglich eine mäßige Reduktion in der Populationsgröße der Foxp3⁺CD4⁺ Tregs. Die Abwesenheit Foxp3⁺ Treg-Zellen in Mäusen mit einem kompletten Knockout der common gamma chain ($Il2rg^{-/-}$), die Bestandteil vieler Interleukin-Rezeptoren ist, lässt vermuten, dass andere common gamma chain Zytokine einen Mangel an IL-2 in der Entwicklung regulatorischer T-Zellen kompensieren können (Fontenot et al., 2005). Letztendlich bleibt

unklar, ob der Unterschied der Treg-Populationen in diesem Experiment auf eine vermehrte IL-2-unabhängige Differenzierung natürlicher Tregs oder einen Überlebensvorteil bereits zuvor unter IL-2 entstandener A20^{-/-} Tregs zurückzuführen ist.

Lio und Hsieh haben ein zweistufiges Modell der Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus vorgeschlagen, nach dem es zunächst einer TCR-Aktivierung zur Entstehung CD25⁺FoxP3⁻ Zellen bedarf und im zweiten Schritt unter dem Einfluss von IL-2 und anderer common gamma chain-Zytokine zur Expression von FoxP3 kommt (Lio et al., 2008). Auf Basis dieses Modells wäre es möglich, dass eine enthemmte NF-κB-Aktivität zu einem deutlich erhöhten Anteil CD25⁺FoxP3⁻ Zellen führt und somit auch eine geringere Konzentration von IL-2 zu einem hohen Anteil regulatorischer T-Zellen ausreicht.

Darüber hinaus scheint IL-2 vor allem für die periphere Treg-Homöostase wichtig zu sein, da sowohl in thymektomierten als auch in Wildtyp-Tieren die Zahl zirkulierender Treg-Zellen nach Gabe eines anti-IL-2-Antikörpers vermindert waren (Setoguchi et al., 2005).

Interessanterweise konnten wir nur einen geringen Einfluss von IL-2 auf die Expansion A20^{-/-} regulatorischer T-Zellen *in vitro* feststellen. Im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen zeigten sie zudem eine deutlich verminderte Proliferation nach TCR-Stimulation in Gegenwart von IL-2.

Die Induktion eines Treg-Phänotyps in naiven CD62L⁺CD4⁺ T-Zellen kann *in vitro* durch die Stimulation des T-Zell-Rezeptors mithilfe der Zytokine IL-2 und TGF-β erfolgen (Chen et al., 2003). In einer solchen Differenzierungskultur zeigten A20^{-/-} T-Zellen eine verminderte Konversion von einem naiven zu einem regulatorischen Phänotyp.

Insgesamt ist der erhöhte Anteil Foxp3⁺CD4⁺ Tregs in A20^{CD4-KO}-Tieren damit am ehesten auf eine gesteigerte Entstehung natürlicher Tregs im Thymus durch einen zellintrinsic, von äußeren Einflüssen wie IL-2 unabhängigen Effekt zu erklären.

NF-κB spielt nicht nur in der Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus eine Rolle, sondern auch in der Aufrechterhaltung ihrer suppressiven Funktion. So konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von RelA und c-Rel in reifen Treg-Zellen mit einer Reduktion dieser Zellen einhergeht und *in vivo* eine ausreichende suppressive Wirkung verhindert (Oh et al., 2017). Der alleinige Verlust von c-Rel hingegen führte nicht zu einer signifikanten Abnahme der Treg-Funktion (Isomura et al., 2009; Oh et al., 2017). Die Treg-spezifische Expression einer konstitutiv aktiven Form der IKKβ konnte zwar die Anzahl regulatorischer T-Zellen deutlich steigern, sie ging aber mit einer Minderung der suppressiven Kapazität dieser Zellen *in vitro*

einher (Long et al., 2009). Die Autoren führten diesen Effekt auf die enthemmte NF- κ B-Aktivität in ihrem Modell zurück. Damit übereinstimmend wurde eine Abnahme der Treg-Funktion durch starke TCR-Bindung und CD28-Kostimulation *in vitro* beobachtet (T. Takahashi et al., 1998). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verschiedenen NF- κ B-Untereinheiten zum Teil redundante Rollen in der Induktion von Zielgenen spielen könnten und die Aktivierung von NF- κ B über andere Rezeptoren als den T-Zell-Rezeptor die Funktionsfähigkeit natürlicher Treg-Zellen unterstützt.

In unseren Experimenten ließ sich im Hinblick darauf weder *in vitro* im Rahmen eines Treg-Suppressionsassays noch *in vivo* durch die Gabe A20^{-/-} Tregs im GvHD-Modell eine nennenswerte Abnahme der suppressiven Funktion durch den Mangel an A20 feststellen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Rolle der E2-Ligase Ubc13, die eine Polyubiquitinierung und Aktivierung der IKK β und damit eine NF- κ B-Aktivierung bewirkt. Ihr Treg-spezifischer Knockout führt zur Ausbildung einer Autoimmunerkrankung mit Splenomegalie, Lymphadenopathie und lymphozytären Infiltraten in nicht-lymphatischen Organen, ähnlich wie der Treg-spezifische Knockout von IKK β (Chang et al., 2012), sodass eine verminderte Aktivierung von NF- κ B für diesen Phänotyp ursächlich scheint. Sowohl in dendritischen Zellen und Makrophagen als auch in MEF-Zellen konnte eine Interaktion von A20 mit der E2-Ligase Ubc13 gezeigt werden, die zu einem Abbau von Ubc13 und damit einer Hemmung der nachfolgenden Signalkaskade führte (Shembade et al., 2010). Eine Einflussnahme A20 auf die Funktion regulatorischer T-Zellen ist über diesen Mechanismus denkbar.

Durch seine vielfältige Wirkweise spielt A20 in verschiedenen Zellarten unterschiedliche Rollen. In konventionellen T-Zellen trägt es zum Zellüberleben bei und ermöglicht somit eine effiziente Immunantwort. Andererseits limitiert es die Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus und scheint somit insgesamt einen eher proinflammatorischen Effekt auszuüben.

Eine ähnliche Funktion hat das durch das Cylindromatosis-Gen kodierte deubiquitinierende Protein CYLD, das ebenfalls hemmend in den NF- κ B-Signalweg eingreift. Es konnte gezeigt werden, dass CYLD durch die Deubiquitinierung des Proteins Lck die Rekrutierung von Zap70 im TCR-Signalweg ermöglicht und die Differenzierung doppelpositiver zu einzelpositiven T-Lymphozyten im Thymus steuert (W. W. Reiley et al., 2006). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen für A20 zeigen Mäuse, die eine Variante von CYLD exprimieren, die keine

Bindungsstellen für TRAF2 und NEMO besitzt (CYLD^{ex7/8}), eine Reduktion CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie und eine deutliche vergrößerte nTreg-Population. Genau wie bei A20-defizienten Tregs ist die Expression von CD25 vermindert. Interessanterweise ist die suppressive Funktion von CYLD^{ex7/8} Tregs *in vitro* und *in vivo* im Gegensatz zu A20-defizienten Tregs vermindert und wird durch die Autoren unter anderem auf die verminderte CYLD-abhängige Expression von CTLA-4 zurückgeführt (Reissig et al., 2012). Ein Zusammenhang zwischen A20 und CTLA-4 ist bisher nicht bekannt. Zudem könnte dieser Unterschied durch eine unterschiedliche NF-κB-Regulation erklärt werden: A20 terminiert die NF-κB-Aktivität (Catrysse et al., 2014) während CYLD eine spontane NF-κB-Aktivierung verhindert (W. Reiley et al., 2005).

Zusammenfassend zeigt A20 in verschiedenen T-Zell-Populationen unterschiedliche Wirkungen, die sowohl die Differenzierung im Thymus als auch die Aufrechterhaltung der Populationen in der Peripherie und ihre Funktion betreffen. A20 limitiert die Entstehung regulatorischer T-Zellen im Thymus und schützt konventionelle CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten vor dem Zelltod. Durch verschiedene Ansatzpunkte von A20 im NF-κB-Signalweg und durch von NF-κB unabhängige katalytische und nicht-enzymatische Interaktionen in anderen Immunrezeptor-Signalwegen scheint es zur Feinregulierung der T-Zell-Antwort als Reaktion auf verschiedene Stimuli zu fungieren.

Unsere Daten tragen zum Verständnis der vielseitigen Wirkung von A20 in T-Zellen und der Rolle von A20 und anderen regulatorischen Proteinen im NF-κB-Signalweg in der Differenzierung der T-Lymphozyten im Thymus bei.

Ob A20 in der Zukunft als möglicher Angriffspunkt auch z.B. im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation therapeutisch genutzt werden kann, hängt entscheidend von der weiteren Erforschung seiner Rolle in den verschiedenen Stadien der Differenzierung, Aktivierung und Funktion der unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen ab. Einige Arbeitsgruppen haben hierzu bereits erste Untersuchungen durchgeführt. So konnte durch Deletion von A20 in reifen CD8⁺ T-Lymphozyten eine gesteigerte Anti-Tumor-Antwort in einem murinen Melanom-Modell erreicht werden (Giordano et al., 2014).

7. Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Aquired Immune Deficiency Syndrome
AIRE	Autoimmune regulator
AKT = PKB	Protein kinase B
Allo-SZT	Allogene Stammzelltransplantation
ANA	Antinukleäre Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl	B-cell lymphoma/leukemia protein
Carma1	CARD-containing MAGUK protein 1
CNS	conserved non-coding sequence
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CYLD	CYLD lysine 63 deubiquitinase
DAMP	damage associated molecular patterns
DC	Dendritische Zelle
ds-DNA	Doppelstrang-DNA
DSS	Dextran sulfate sodium
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
Fas	first apoptosis signal receptor
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
GITR	glucocorticoid-induced TNFR-related protein
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft versus leukemia
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
IEC	Intestinale Epithelzellen
IFN- γ	Interferon- γ
IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M
IKK	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IL	Interleukin
IPEX	immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
I κ B	Inhibitor of nuclear factor kappa-B
JAK	Januskinase
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue
MALT1	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NKT	Natürliche Killer T-Zelle
OTU	Ovarian tumor
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKC	Proteinkinase C

PRR	Pattern recognition receptor
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RIPK3	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3
RNA	Ribonukleinsäure
SCID	Severe combined immunodeficiency
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBI	Total body irradiation
TCR	T cell receptor
TGF- β	Transforming growth factor β
TLR	Toll like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFAIP3	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF	TNF receptor associated factors
Tregs	Regulatorische T-Zellen
- iTregs	- induzierte regulatorische T-Zellen
- nTregs	- natürliche regulatorische T-Zellen

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologie der akuten Graft-versus-Host Erkrankung.....	Seite 5
Abbildung 2: NF- κ B-Signalweg in T-Zellen.....	Seite 8
Abbildung 3: Kompetitives Engraftment-Experiment.....	Seite 19

9. Literaturverzeichnis

- Abhyankar, S., Gilliland, D. G. & Ferrara, J. L. (1993). Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft versus host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation*, *56*(6), 1518-1523.
- Allen, P. M. (1994). Peptides in positive and negative selection: a delicate balance. *Cell*, *76*(4), 593-596.
- Baecher-Allan, C., Viglietta, V. & Hafler, D. A. (2004). Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Seminars in Immunology*, *16*(2), 89-98.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., et al. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, *27*, 20.
- Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J. A. & Herold, K. C. (2005). TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(10), 2904-2913.
- Boone, D. L., Turer, E. E., Lee, E. G., Ahmad, R. C., Wheeler, M. T., Tsui, C., et al. (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol*, *5*(10), 1052-1060.
- Brennan, T. V., Rendell, V. R. & Yang, Y. (2015). Innate Immune Activation by Tissue Injury and Cell Death in the Setting of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*, *6*(101).
- Brok, H. P., Vossen, J. M. & Heidt, P. J. (1998). IFN-gamma-mediated prevention of graft-versus-host disease: pharmacodynamic studies and influence on proliferative capacity of chimeric spleen cells. *Bone Marrow Transplant*, *22*(10), 1005-1010.
- Burchill, M. A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B. R. & Farrar, M. A. (2006). IL-2 Receptor -Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, *178*(1), 280-290.
- Calcaterra, C., Sfondrini, L., Rossini, A., Sommariva, M., Rumio, C., Menard, S., et al. (2008). Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease. *J Immunol*, *181*(9), 6132-6139.
- Catrysse, L., Vereecke, L., Beyaert, R. & van Loo, G. (2014). A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol*, *35*(1), 22-31.
- Cederbom, L., Hall, H. & Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European Journal of Immunology*, *30*(6), 1538-1543.
- Chang, J. H., Xiao, Y., Hu, H., Jin, J., Yu, J., Zhou, X., et al. (2012). Ubc13 maintains the suppressive function of regulatory T cells and prevents their conversion into effector-like T cells. *Nat Immunol*, *13*(5), 481-490.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., et al. (2003). 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*, *198*(12), 1875-1886.
- Chu, Y., Vahl, J. C., Kumar, D., Heger, K., Bertossi, A., Wojtowicz, E., et al. (2011). B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood*, *117*(7), 2227-2236.
- Coornaert, B., Baens, M., Heynink, K., Bekaert, T., Haegman, M., Staal, J., et al. (2008). T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat Immunol*, *9*.
- Courtois, G. & Fauvarque, M.-O. (2018). The Many Roles of Ubiquitin in NF-kB Signaling. *Biomedicines*, *6*(2), 43.
- Courtois, G. & Gilmore, T. D. (2006). Mutations in the NF-kB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, *25*, 6831.
- Deenick, E. K., Elford, A. R., Pellegrini, M., Hall, H., Mak, T. W. & Ohashi, P. S. (2010). c-Rel but not NF-kappaB1 is important for T regulatory cell development. *Eur J Immunol*, *40*(3), 677-681.
- Derbinski, J., Gäbler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenahn, M., et al. (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med*, *202*(1), 33-45.
- Di Ianni, M., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Castellino, F., Bonifacio, E., et al. (2011). Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*, *117*(14), 3921-3928.
- Dieguez-Gonzalez, R., Calaza, M., Perez-Pampin, E., Balsa, A., Blanco, F. J., Canete, J. D., et al. (2009). Analysis of TNFAIP3, a feedback inhibitor of nuclear factor-kappaB and the neighbor intergenic 6q23 region in rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Res Ther*, *11*(2), R42.
- Drennan, M. B., Govindarajan, S., Verheugen, E., Coquet, J. M., Staal, J., McGuire, C., et al. (2016). NKT sublineage specification and survival requires the ubiquitin-modifying enzyme TNFAIP3/A20. *J Exp Med*, *213*(10), 1973-1981.
- Duwel, M., Welteke, V., Oeckinghaus, A., Baens, M., Kloo, B., Ferch, U., et al. (2009). A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains. *J Immunol*, *182*(12), 7718-7728.

- Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., Drago, K., Fathman, C. G., Strober, S., et al. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*, 9(9), 1144-1150.
- Ferrara, J. L. M., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *The Lancet*, 373(9674), 1550-1561.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*, 6, 1142.
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G. & Rudensky, A. Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 22(3), 329-341.
- Fulford, T. S., Ellis, D. & Gerondakis, S. (2015). Understanding the Roles of the NF-kappaB Pathway in Regulatory T Cell Development, Differentiation and Function. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 136, 57-67.
- Ghimire, S., Weber, D., Mavin, E., Wang, X. N., Dickinson, A. M. & Holler, E. (2017). Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. *Front Immunol*, 8, 79.
- Giordano, M., Roncagalli, R., Bourdely, P., Chasson, L., Buferne, M., Yamasaki, S., et al. (2014). The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(30), 11115-11120.
- Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. (2005). Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4⁺CD25⁺ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *The Journal of Immunology*, 174(4), 1783-1786.
- Grigoriadis, G., Vasanthakumar, A., Banerjee, A., Grumont, R., Overall, S., Gleeson, P., et al. (2011). c-Rel Controls Multiple Discrete Steps in the Thymic Development of Foxp3+ CD4 Regulatory T Cells. *PLoS One*, 6(10), e26851.
- Guckel, E., Frey, S., Zaiss, M. M., Schett, G., Ghosh, S. & Voll, R. E. (2011). Cell-intrinsic NF-kappaB activation is critical for the development of natural regulatory T cells in mice. *PLoS One*, 6(5), e20003.
- Gupta, S., Manicassamy, S., Vasu, C., Kumar, A., Shang, W. & Sun, Z. (2008). Differential requirement of PKC-theta in the development and function of natural regulatory T cells. *Mol Immunol*, 46(2), 213-224.
- Heyninck, K. & Beyaert, R. (1999). The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF-kappaB activation at the level of TRAF6. *FEBS Lett*, 442(2-3), 147-150.
- Hill, G. R. & Ferrara, J. L. (2000). The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 95(9), 2754-2759.
- Hill, G. R., Teshima, T., Gerbitz, A., Pan, L., Cooke, K. R., Brinson, Y. S., et al. (1999). Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *J Clin Invest*, 104(4), 459-467.
- Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C. G. & Strober, S. (2002). Donor-type CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Journal of Experimental Medicine*, 196(3), 389-399.
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057-1061.
- Isomura, I., Palmer, S., Grumont, R. J., Bunting, K., Hoyne, G., Wilkinson, N., et al. (2009). c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J Exp Med*, 206(13), 3001-3014.
- Jankovic, D., Ganesan, J., Bscheider, M., Stickel, N., Weber, F. C., Guarda, G., et al. (2013). The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. *J Exp Med*, 210(10), 1899-1910.
- Just, S., Nishanth, G., Buchbinder, J. H., Wang, X., Naumann, M., Lavrik, I., et al. (2016). A20 Curtails Primary but Augments Secondary CD8(+) T Cell Responses in Intracellular Bacterial Infection. *Sci Rep*, 6, 39796.
- Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., et al. (2009). Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*, 459(7247), 712-716.
- Kool, M., van Loo, G., Waelput, W., De Prijck, S., Muskens, F., Sze, M., et al. (2011). The ubiquitin-editing protein A20 prevents dendritic cell activation, recognition of apoptotic cells, and systemic autoimmunity. *Immunity*, 35(1), 82-96.
- Korngold, R. & Sprent, J. (1978). Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp Med*, 148(6), 1687.
- Koyama, M., Kuns, R. D., Olver, S. D., Raffelt, N. C., Wilson, Y. A., Don, A. L., et al. (2011). Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med*, 18(1), 135-142.
- Krikos, A., Laherty, C. D. & Dixit, V. M. (1992). Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem*, 267(25), 17971-17976.

- Lee, E. G. (2000). Failure to Regulate TNF-Induced NF-kappa B and Cell Death Responses in A20-Deficient Mice. *Science*, 289(5488), 2350-2354.
- Lio, C. W. & Hsieh, C. S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*, 28(1), 100-111.
- Long, M., Park, S. G., Strickland, I., Hayden, M. S. & Ghosh, S. (2009). Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity*, 31(6), 921-931.
- Lord, S. J., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S. & Bleackley, R. C. (2003). Granzyme B: a natural born killer. *Immunological Reviews*, 193(1), 31-38.
- Lutz, M. & Mielke, S. (2016). New perspectives on the use of mTOR inhibitors in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and graft-versus-host disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 82(5), 1171-1179.
- Mahmud, S. A., Manlove, L. S., Schmitz, H. M., Xing, Y., Wang, Y., Owen, D. L., et al. (2014). Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat Immunol*, 15(5), 473-481.
- Martin, P., Hansen, J., Buckner, C., Sanders, J., Deeg, H., Stewart, P., et al. (1985). Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood*, 66(3), 664-672.
- Matmati, M., Jacques, P., Maelfait, J., Verheugen, E., Kool, M., Sze, M., et al. (2011). A20 (TNFAIP3) deficiency in myeloid cells triggers erosive polyarthritis resembling rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 43.
- Matsuzawa, Y., Oshima, S., Takahara, M., Maeyashiki, C., Nemoto, Y., Kobayashi, M., et al. (2015). TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting MTOR and promoting autophagy. *Autophagy*, 11(7), 1052-1062.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., et al. (2002). CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells. *Immunity*, 16(2), 311-323.
- Medoff, B. D., Sandall, B. P., Landry, A., Nagahama, K., Mizoguchi, A., Luster, A. D., et al. (2009). Differential requirement for CARMA1 in agonist-selected T-cell development. *Eur J Immunol*, 39(1), 78-84.
- Nair, R. P., Duffin, K. C., Helms, C., Ding, J., Stuart, P. E., Goldgar, D., et al. (2009). Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet*, 41(2), 199-204.
- Nakasone, H., Fukuda, T., Kanda, J., Mori, T., Yano, S., Kobayashi, T., et al. (2015). Impact of conditioning intensity and TBI on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 50(4), 559-565.
- Oh, H., Grinberg-Bleyer, Y., Liao, W., Maloney, D., Wang, P., Wu, Z., et al. (2017). An NF-kappaB Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity*, 47(3), 450-465 e455.
- Ohtake, F. & Tsuchiya, H. (2017). The emerging complexity of ubiquitin architecture. *The Journal of Biochemistry*, 161(2), 125-133.
- Onizawa, M., Oshima, S., Schulze-Topphoff, U., Osés-Prieto, J. A., Lu, T., Tavares, R., et al. (2015). The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. *Nat Immunol*, 16(6), 618-627.
- Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 8(12), 1353-1362.
- Piguet, P. F., Grau, G. E., Allet, B. & Vassalli, P. (1987). Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J Exp Med*, 166(5), 1280-1289.
- Priem, D., Devos, M., Druwe, S., Martens, A., Slowicka, K., Ting, A. T., et al. (2019). A20 protects cells from TNF-induced apoptosis through linear ubiquitin-dependent and -independent mechanisms. *Cell Death Dis*, 10(10), 692.
- Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E. & Sun, S. C. (2005). Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I kappa B kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 25(10), 3886-3895.
- Reiley, W. W., Zhang, M., Jin, W., Losiewicz, M., Donohue, K. B., Norbury, C. C., et al. (2006). Regulation of T cell development by the deubiquitinating enzyme CYLD. *Nat Immunol*, 7(4), 411-417.
- Reissig, S., Hovelmeyer, N., Weigmann, B., Nikolaev, A., Kalt, B., Wunderlich, T. F., et al. (2012). The tumor suppressor CYLD controls the function of murine regulatory T cells. *J Immunol*, 189(10), 4770-4776.
- Ruan, Q., Kameswaran, V., Tone, Y., Li, L., Liou, H. C., Greene, M. I., et al. (2009). Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity*, 31(6), 932-940.
- Rubio, M. T., Labopin, M., Blaise, D., Socie, G., Contreras, R. R., Chevallier, P., et al. (2015). The impact of graft-versus-host disease prophylaxis in reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplant in acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*, 100(5), 683-689.

- Rudensky, A. (2005). Foxp3 and dominant tolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1461), 1645-1646.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. (1995). 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. *The Journal of Immunology*, 155(3), 1151-1164.
- Salomon, B., Lenschow, D. J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., et al. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 12(4), 431-440.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*, 14(4), 381-392.
- Schmidt-Supprian, M., Tian, J., Grant, E. P., Pasparakis, M., Maehr, R., Ovaa, H., et al. (2004). Differential dependence of CD4+CD25+ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(13), 4566-4571.
- Schroeder, M. A. & DiPersio, J. F. (2011). Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech*, 4(3), 318-333.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, 201(5), 723-735.
- Shembade, N., Ma, A. & Harhaj, E. W. (2010). Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*, 327(5969), 1135-1139.
- Song, X. T., Evel-Kabler, K., Shen, L., Rollins, L., Huang, X. F. & Chen, S. Y. (2008). A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression. *Nat Med*, 14(3), 258-265.
- Spoerl, S., Mathew, N. R., Bscheider, M., Schmitt-Graeff, A., Chen, S., Mueller, T., et al. (2014). Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease. *Blood*, 123(24), 3832-3842.
- Sureda, A., Bader, P., Cesaro, S., Dreger, P., Duarte, R. F., Dufour, C., et al. (2015). Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplantation*, 50, 1037.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., et al. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*, 10(12), 1969-1980.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., et al. (2000). Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25+Cd4+Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. *J Exp Med*, 192(2), 303-310.
- Tang, Q., Adams, J. Y., Tooley, A. J., Bi, M., Fife, B. T., Serra, P., et al. (2005). Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol*, 7, 83.
- Tavares, R. M., Turer, E. E., Liu, C. L., Advincula, R., Scapini, P., Rhee, L., et al. (2010). The ubiquitin modifying enzyme A20 restricts B cell survival and prevents autoimmunity. *Immunity*, 33(2), 181-191.
- Taylor, P. A., Lees, C. J. & Blazar, B. R. (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*, 99(10), 3493-3499.
- Teh, H. S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Bluthmann, H., et al. (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature*, 335(6187), 229-233.
- Trynka, G., Zhernakova, A., Romanos, J., Franke, L., Hunt, K. A., Turner, G., et al. (2009). Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF-kappaB signalling. *Gut*, 58(8), 1078-1083.
- Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juscinska, J., Dobyszek, A., Krzystyniak, A., Marek, N., et al. (2009). First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol*, 133(1), 22-26.
- Vereecke, L., Sze, M., Mc Guire, C., Rogiers, B., Chu, Y., Schmidt-Supprian, M., et al. (2010). Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *J Exp Med*, 207(7), 1513-1523.
- Verstrepen, L., Verhelst, K., van Loo, G., Carpentier, I., Ley, S. C. & Beyaert, R. (2010). Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochem Pharmacol*, 80(12), 2009-2020.
- Vetters, J., van Helden, M. J., Wahlen, S., Tavernier, S. J., Martens, A., Fayazpour, F., et al. (2019). The ubiquitin-editing enzyme A20 controls NK cell homeostasis through regulation of mTOR activity and TNF. *J Exp Med*, 216(9), 2010-2023.
- Vignali, D. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8(7), 523-532.

- Wellcome Trust Case Control, C. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145), 661-678.
- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., et al. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling. *Nature*, 430, 694.
- Wilhelm, K., Ganesan, J., Müller, T., Dürr, C., Grimm, M., Beilhack, A., et al. (2010). Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med*, 16, 1434.
- Xun, C., Thompson, J., Jennings, C., Brown, S. & Widmer, M. (1994). Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2- incompatible transplanted SCID mice. *Blood*, 83(8), 2360-2367.
- Yue, X., Trifari, S., Aijo, T., Tsagaratou, A., Pastor, W. A., Zepeda-Martinez, J. A., et al. (2016). Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity. *J Exp Med*, 213(3), 377-397.
- Zeiser, R., Burchert, A., Lengerke, C., Verbeek, M., Maas-Bauer, K., Metzelder, S. K., et al. (2015). Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey. *Leukemia*, 29(10), 2062-2068.
- Zeiser, R., von Bubnoff, N., Butler, J., Mohty, M., Niederwieser, D., Or, R., et al. (2020). Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*, 382(19), 1800-1810.
- Zhan, Y., Gerondakis, S., Coghill, E., Bourges, D., Xu, Y., Brady, J. L., et al. (2008). Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Expression by T Cells Is Reciprocally Regulated by NF- κ B and NFAT. *The Journal of Immunology*, 181(8), 5405-5413.

10. Anhänge

10.1 Publikationsverzeichnis

10.1.1 Publikationen in peer-reviewed Journalen als Erstautor

Julius C. Fischer, Vera Otten, Katja Steiger, Martina Schmickl, Julia Slotta-Huspenina, Rudi Beyaert, Geert van Loo, Christian Peschel, Marc Schmidt-Supprian, Hendrik Poeck, Tobias Haas and Silvia Spoerl.

A20 deletion in T cells modulates acute graft-versus-host disease in mice
European Journal of Immunology. 2017 Nov;47(11):1982-1988

Julius C. Fischer, Vera Otten, Maike Kober, Christoph Drees, Mark Rosenbaum, Martina Schmickl, Simon Heidegger, Rudi Beyaert, Geert van Loo, Xian C. Li, Christian Peschel, Marc Schmidt-Supprian, Tobias Haas, Silvia Spoerl and Hendrik Poeck.

A20 restrains thymic regulatory T cell development
The Journal of Immunology. 2017 Oct 1;199(7):2356-2365.

10.1.2 Publikationen in peer-reviewed Journalen als Co-Autor

Julius C. Fischer, Michael Bscheider, Gabriel Eisenkolb, Chia-Ching Lin, Alexander Wintges, Vera Otten, Caroline Lindemans, Simon Heidegger, Martina Rudelius, Sébastien Monette, Kori A. Porosnicu Rodriguez, Marco Calafiore, Sophie Liebermann, Chen Liu, Stefan Lienenklaus, Siegfried Weiss, Ulrich Kalinke, Jürgen Ruland, Christian Peschel, Yusuke Shono, Melissa Docampo, Enrico Velardi, Robert Jenq, Alan M. Hanash, Jarrod A. Dudakov, Tobias Haas, Marcel R.M. van den Brink and Hendrik Poeck.

RIG-I/MAVS and STING signaling promote gut integrity during irradiation- and immune-mediated tissue injury
Science Translational Medicine. 2017 Apr 19;9.

Spoerl S, Mathew NR, Bscheider M, Schmitt-Graeff A, Chen S, Mueller T, Verbeek M, Fischer J, Otten V, Schmickl M, Maas-Bauer K, Finke J, Peschel C, Duyster J, Poeck H, Zeiser R, von Bubnoff N.

Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease
Blood. 2014 Jun 12;123(24):3832-42

10.2 Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich in all den Jahren trotz wiederholter Rückschläge immer uneingeschränkt und liebevoll unterstützt haben und ohne die ich diese Arbeit nicht hätte fertigstellen können.

Für die enge Betreuung, die Einführung in die Grundlagen der wissenschaftlichen Arbeit und Themastellung, möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Silvia Spörl bedanken. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Hendrik Poeck und Tobias Haas haben mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen und die Rahmenbedingungen für das Projekt gestellt und immer wieder wichtige Impulse gegeben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Julius Fischer, ohne dessen stetige Unterstützung, Hilfestellung in allen Aspekten der Experimente und anhaltende Motivation ich nie so weit gekommen wäre. Auch Martina Schmickl stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und hat in allen Situationen Ruhe bewahrt.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Zusammenarbeit und die vielen schönen Momente im und außerhalb des Labores bedanken. Wir haben gemeinsam viele Rückschläge eingesteckt und viele Erfolge gefeiert.



A20 Restrains Thymic Regulatory T Cell Development

This information is current as of April 11, 2022.

Julius Clemens Fischer, Vera Otten, Maike Kober, Christoph Drees, Marc Rosenbaum, Martina Schmickl, Simon Heidegger, Rudi Beyaert, Geert van Loo, Xian Chang Li, Christian Peschel, Marc Schmidt-Supprian, Tobias Haas, Silvia Spoerl and Hendrik Poeck

J Immunol 2017; 199:2356-2365; Prepublished online 25 August 2017;
doi: 10.4049/jimmunol.1602102
<http://www.jimmunol.org/content/199/7/2356>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2017/08/24/jimmunol.1602102.DCSupplemental>

References This article **cites 53 articles**, 21 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/199/7/2356.full#ref-list-1>

Why *The JI*? Submit online.

- **Rapid Reviews! 30 days*** from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

**average*

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscription>

Permissions Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/alerts>

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852
Copyright © 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



A20 Restrains Thymic Regulatory T Cell Development

Julius Clemens Fischer,^{*,1} Vera Otten,^{*,1} Maike Kober,^{*} Christoph Drees,^{*} Marc Rosenbaum,[†] Martina Schmickl,^{*} Simon Heidegger,^{*} Rudi Beyaert,^{‡,§} Geert van Loo,^{‡,§} Xian Chang Li,^{¶,||} Christian Peschel,^{*} Marc Schmidt-Supprian,^{*} Tobias Haas,^{*,2} Silvia Spoerl,^{*,2} and Hendrik Poeck^{*,2}

Maintaining immune tolerance requires the production of Foxp3-expressing regulatory T (T_{reg}) cells in the thymus. Activation of NF-κB transcription factors is critically required for T_{reg} cell development, partly via initiating Foxp3 expression. NF-κB activation is controlled by a negative feedback regulation through the ubiquitin editing enzyme A20, which reduces proinflammatory signaling in myeloid cells and B cells. In naive CD4⁺ T cells, A20 prevents kinase RIPK3-dependent necroptosis. Using mice deficient for A20 in T lineage cells, we show that thymic and peripheral T_{reg} cell compartments are quantitatively enlarged because of a cell-intrinsic developmental advantage of A20-deficient thymic T_{reg} differentiation. A20-deficient thymic T_{reg} cells exhibit reduced dependence on IL-2 but unchanged rates of proliferation and apoptosis. Activation of the NF-κB transcription factor RelA was enhanced, whereas nuclear translocation of c-Rel was decreased in A20-deficient thymic T_{reg} cells. Furthermore, we found that the increase in T_{reg} cells in T cell-specific A20-deficient mice was already observed in CD4⁺ single-positive CD25⁺ GITR⁺ Foxp3⁻ thymic T_{reg} cell progenitors. T_{reg} cell precursors expressed high levels of the tumor necrosis factor receptor superfamily molecule GITR, whose stimulation is closely linked to thymic T_{reg} cell development. A20-deficient T_{reg} cells efficiently suppressed effector T cell-mediated graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, suggesting normal suppressive function. Holding thymic production of natural T_{reg} cells in check, A20 thus integrates T_{reg} cell activity and increased effector T cell survival into an efficient CD4⁺ T cell response. *The Journal of Immunology*, 2017, 199: 2356–2365.

T cell-mediated immune tolerance requires induced and naturally derived regulatory T (T_{reg}) cells, the latter generated during thymic T cell selection. Foxp3 is a master transcription factor for the development and function of T_{reg} cells, and defective Foxp3 expression results in severe autoimmune phenotypes in mice and men (1, 2). Although the regulation of naturally derived T_{reg} cell development is still incompletely understood (3), it is clear that TCR stimulation along with signals from common γ -chain (γ c) receptor-linked cytokines IL-2 and IL-7 are essential to induce Foxp3 expression and T_{reg} cell development (4). Upon TCR engagement, protein kinase C and the Carma1/Bcl10/Malt1 protein complex are recruited to finally induce NF-κB transcription factor activity, key regulator of lymphocyte differentiation, expansion, activation, and survival (5, 6). Mice bearing defects in the TCR signaling pathway (including TAK1, Bcl10, CARMA1, protein kinase C θ , and IKK2) show selective impairments in

development and function of T_{reg} cells, whereas conventional T cell development seems to be less affected (7–12). Furthermore, mice deficient for γ c receptors, which transmit signaling initiated by homeostatic cytokines such as IL-2 and whose expression is regulated by various mechanisms including the NF-κB pathway, also lack T_{reg} cells (13–15). The NF-κB transcription factor c-Rel is highly expressed in thymic T_{reg} cells and directly promotes transcription of Foxp3 in the thymus. Accordingly, T_{reg} cell numbers are strongly reduced in the absence of the NF-κB family proteins p50 and c-Rel (16–18). One of the key regulators of both NF-κB activation and TCR signaling is the ubiquitin editing enzyme A20, which limits NF-κB signaling after activation by TNF, IL-1/TLRs, and the TCR (19). Consistent with this, A20-deficient mice are hypersensitive to LPS and TNF exposure, and die perinatally because of severe inflammation and multiorgan failure (20). Lineage-specific A20 deficiency in various

*Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität, 81675 Munich, Germany; ¹Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität, 81675 Munich, Germany; ²Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, B-9052 Ghent, Belgium; ³Inflammation Research Center, VIB, B-9052 Ghent, Belgium; ⁴Immunobiology & Transplant Science Center, Houston Methodist Hospital, Texas Medical Center, Houston, TX 77030; and ⁵Department of Surgery, Weill Cornell Medical College of Cornell University, New York, NY 10065

¹J.C.F. and V.O. contributed equally to this work.

²T.H., S.S., and H.P. contributed equally to this work.

ORCIDs: 0000-0002-6951-3416 (J.C.F.); 0000-0002-0822-694X (M.S.); 0000-0001-6394-5130 (S.H.); 0000-0002-5704-582X (R.B.); 0000-0002-8427-4775 (G.v.L.); 0000-0002-5981-2762 (X.C.L.); 0000-0003-0547-2886 (C.P.); 0000-0001-8986-5198 (T.H.); 0000-0002-3065-1467 (S.S.).

Received for publication December 14, 2016. Accepted for publication July 31, 2017.

This work was supported by Else-Kröner-Fresenius-Stiftung Grants 2015_A06 (to S.S.) and 2012_A61 (to H.P.), Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant PO 1575/3-1 (to H.P.), German Cancer Aid Grant 111620 (to H.P. and S.H.), the European Hematology Association (to H.P.), the TUM Medical Graduate Center (to V.O.), Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 1054 Project A02 to M.K., C.D., and M.S.-S.), and a

fellowship of the Kommission für Klinische Forschung von Technische Universität Zentrum Medizin (to S.S.).

J.C.F. designed, performed, and analyzed experiments, introduced V.O. into laboratory techniques, and wrote the manuscript; V.O. performed, analyzed, and helped to design experiments; M.K. helped to design, performed, and analyzed experiments; M.R. performed and analyzed experiments; C.D. and M.S. helped to perform experiments; C.D. and M.S.-S. provided critical input; S.H., R.B., G.v.L., X.C.L., and C.P. provided further help; S.S. designed, performed, and analyzed experiments; T.H., S.S., and H.P. wrote the manuscript and guided the study.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Tobias Haas, Dr. Silvia Spoerl, and Dr. Hendrik Poeck, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Klinikum rechts der Isar, 81675 Munich, Germany. E-mail addresses: tobias.haas@tum.de (T.H.), silvia.spoerl@tum.de (S.S.), and hendrik.poeck@tum.de (H.P.)

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: allo-HSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; BM, bone marrow; γ c, common γ -chain; CD4SP, CD4 single-positive; EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; GVHD, graft-versus-host disease; iT_{reg}, induced T_{reg}; TBI, total body irradiation; T_{reg}, regulatory T; WT, wild type.

Copyright © 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/17/\$35.00

cell types such as B cells, dendritic cells, intestinal epithelial cells, and hepatocytes results in autoimmunity, higher susceptibility to inflammatory diseases, or hepatocellular carcinoma (21–25), and clinical studies link genetic A20 polymorphisms to human autoimmune and lymphoproliferative disorders (26–30). In T cells, TCR activation and CArnal/Bcl10/Malt1 complex formation is followed by K63-linked polyubiquitination of MALT1, resulting in I κ B kinase complex activation and NF- κ B signaling. A20 cleaves the polyubiquitin chains from MALT1, thus suppressing NF- κ B activation. In return, MALT1 also has a proteolytic activity, which can inactivate A20 (31, 32). In CD8⁺ T cells, A20 deletion leads to sustained expression of the NF- κ B family members c-Rel/RelA and increased production of proinflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF, and IL-2 (33). In CD4⁺ T cells, A20 is essential for survival and expansion by promoting autophagy and protecting from necroptotic cell death (34, 35). Intriguingly, unrestricted necroptosis in A20-deficient CD4⁺ cells affects both the Th1 and the Th17 compartment, leading to reduced inflammation in a CD4⁺ T cell-dependent model of autoimmune encephalomyelitis (34). In NKT cell sublineages NKT1 and NKT2, A20 was also shown to restrict TCR-dependent activation and survival, thereby controlling NKT cell differentiation (36). However, the role of A20 for T_{reg} cell differentiation, central modulators of inflammatory responses in vivo, remains unexplored. In this article, we demonstrate that A20 regulates the de novo generation of naturally derived T_{reg} cells in the thymus in a cell-intrinsic fashion independent of γ C-cytokine IL-2 signaling. This developmental advantage could be attributed to enhanced emergence of thymic T_{reg} cell progenitors. Importantly, the functionality of A20-deficient T_{reg} cells is unchanged in vitro and in the prevention of lethal allogeneic T cell activity in a preclinical model of graft-versus-host disease (GVHD).

Materials and Methods

Animals

Mice with cell type-specific deficiency of A20 in T cells were generated by breeding A20^{F/F} mice (25) with CD4Cre transgenic mice (37) as previously described (38). C57BL/6 (H-2Kb, Thy-1.2) and BALB/c (H-2Kd, Thy-1.2) mice were purchased from Janvier Labs. Mice were between 6 and 12 wk of age at the onset of experiments if not indicated otherwise. Animal protocols were approved by the local regulatory agency (Regierung von Oberbayern, Munich, Germany).

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and GVHD

Allogeneic bone marrow (BM) transplantations were performed as previously described (39). In brief, female, 6- to 8-wk-old BALB/c recipients were lethally irradiated with total body irradiation (TBI; 2 \times 4.5 Gy). Directly after the second irradiation step mice received 5 \times 10⁶ T cell-depleted C57BL/6 wild type (WT) BM cells for reconstitution. T cell depletion of freshly isolated BM cells was performed using CD90.2 microbeads (Miltenyi Biotec). In addition, some mice received 2 \times 10⁵ CD8⁺ T cells and 2 \times 10⁵ CD4⁺ CD25⁻ effector T cells with or without 6 \times 10⁵ CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} cells as indicated in the figure legends. All T cell subsets were isolated from complete splenocytes using the T_{reg} cell isolation kit (Miltenyi Biotec) and the CD8 T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions.

Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation and competitive T cell development

CD45.1⁺ CD45.2⁺ (double-positive) C57BL/6 WT mice were used for competitive T cell development experiments. Conditioning therapy of C57BL/6 recipient mice before the syngeneic BM transplantation was performed as previously described (40). After conditioning therapy (2 \times 5.5 Gy), recipient mice received 2.5 \times 10⁶ T cell-depleted C57BL/6 WT CD45.1⁺ CD45.2⁻ BM cells. In addition, recipient mice received either 2.5 \times 10⁶ A20^{F/F} CD4^{cre-} or 2.5 \times 10⁶ A20^{F/F} CD4^{cre+} T cell-depleted C57BL/6 BM cells, expressing only CD45.2, but not CD45.1. Mice were analyzed 3 mo after transplantation. Exact ratios of transplanted and engrafted CD45.1⁺ and CD45.2⁺ BM cells were determined by analysis of

CD45.1 and CD45.2 expression of CD4⁻ CD8⁻ cells. The engraftment ratio was calculated for all transplanted animals separately. Further analysis of cell subsets was normalized to this ratio.

Flow cytometry and Abs

All Abs were purchased from eBioscience, BioLegend, and Miltenyi Biotec. For cell viability analysis, a near-infrared Live/Dead reagent (Molecular Probes; Thermo Fisher Scientific) was used according to the manufacturer's instructions. The following Abs were used for cell surface or intracellular staining and flow cytometric analysis: CD4 (GK 1.5/RM4-5), CD8 (53-6.7), CD25 (PC61.5), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), c-Rel (REA397), Foxp3 (FJK16s), GTR (DTA-1), and KI-67 (16A8). Cells were stained in PBS supplemented with 2.5% BSA using fluorochrome-conjugated Abs against specific cell surface markers in different dilutions for 20 min at 4°C. For Foxp3 staining, the Foxp3/transcription factor staining buffer set (eBioscience) was used according to the manufacturer's instructions. Active caspase-3 stain was performed directly before further viability and cell surface staining using the CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. In vivo cell proliferation was analyzed using the Click-iT Plus EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The assay was performed 24 h after i.p. injection of EdU. Treatment dose of EdU (50 mg/kg per mouse) was used as previously described (41). Analyses of cell populations were performed by flow cytometry with a FACSCanto II (BD). Data analysis was performed using FlowJo software (Tree Star). Flow cytometry sorting was performed with a FACSAria III (BD Biosciences). The anti-mouse IL-2 Ab (JES6-1A12; BioXCell) was used to neutralize IL-2 in vivo. In indicated experiments, 500 μ g of anti-IL-2 was injected i.p. 6 and 3 d before analysis.

Imaging flow cytometry

Thymocytes were subjected to MACS-based depletion of CD8⁺ T cells (CD8 microbeads; Miltenyi Biotec). Cells were then either left untreated or were stimulated with 100 nM PMA (Sigma) and 1 μ M ionomycin (Calbiochem) for 30 min at 37°C, 5% CO₂. Extracellular and intracellular Foxp3 staining was performed as described earlier. Intracellular c-Rel staining was performed overnight. DAPI (Thermo Fisher Scientific) was applied as a nuclear stain subsequent to Ab stainings. Stained cell suspensions were acquired on an ImageStreamX Mark II (Amnis; Merck Millipore) imaging flow cytometer. Data analysis was performed using the wizard for nuclear translocation of the IDEAS software (Amnis), where determination of nuclear translocation is based on a similarity score that quantifies the correlation of nuclear stain and translocation probe intensities. High correlation and thus high similarity scores represent strong nuclear translocation, whereas low scores are indicative of cytoplasmic localization (42).

Phospho-NF- κ B p65 (S536) phosphoflow

Cells were either left untreated or were stimulated with 100 nM PMA (Sigma-Aldrich) and 1 μ M ionomycin (Calbiochem) for 30 min at 37°C, 5% CO₂. After washing the cells with PBS, live/dead cell staining was performed with a fixable viability dye (eBioscience) followed by surface staining. Cells were fixed with 2% PFA for 40 min, permeabilized by two washes with Perm/Wash buffer (eBioscience), and stained overnight with anti-Foxp3 and anti-phospho-NFKBp65 (Ser536) (93H1; Cell Signaling) Abs. After two washes with Perm/Wash buffer, cells were stained with an allophycocyanin-labeled anti-rabbit IgG Ab (A10931; Invitrogen).

Isolation of CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} cells with magnetic cell sorting

CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} cells were isolated from splenic single-cell suspensions using the MACS T_{reg} cell isolation kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions.

T_{reg} cell suppression assay

MACS-sorted CD4⁺ CD25⁻ T effector cells were cultured in RPMI 1640 medium in a 96-well plate at a concentration of 1 \times 10⁵ cells per well. Soluble anti-CD3 (1 μ g/ml; clone 2C11; BD Pharmingen) and irradiated APCs were used in a 1:2 ratio. APCs as stimulator cells were prepared from syngeneic mice by depleting the CD4⁺ T cell fraction using anti-CD4 microbeads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). For suppression, CD4⁺ CD25⁺ MACS-sorted A20^{F/F} CD4^{cre+} or A20^{F/F} CD4^{cre-} T_{reg} cells were added at the indicated ratio to A20^{F/F} CD4^{cre-} T effector cells. Proliferation of CD4⁺ CD25⁻ T effector cells was analyzed using the CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The percentage of proliferating cells was analyzed after 72 h.

T_{reg} cell expansion and differentiation of naive CD4⁺ T cells *in vitro*

***T_{reg}* cell expansion.** T_{reg} cells (CD4⁺ CD25⁺) were prepared by FACS or MACS isolation. Cells were activated with anti-murine CD3 (1 μg/ml; clone 17A2; BioLegend) plus soluble anti-murine CD28 (1 μg/ml; clone 37.51; BioLegend) with or without 50 international units human IL-2 (PeproTech) after precoating of 96-well tissue culture plates (Sigma-Aldrich) with 10 μg/ml F(ab')₂ fragment of IgG H+L (Jackson ImmunoResearch). In indicated experiments, cells were activated with soluble beads preloaded with CD3 and CD28 Abs according to the manufacturer's instructions (130-095-925; Miltenyi Biotec). At indicated time points after activation (days 4 and 8), intracellular Foxp3 was stained and T_{reg} cells were counted. Cell number was determined with flow cytometry cell counting beads according to the manufacturer's instructions (Thermo Fischer Scientific).

Differentiation of naive CD4⁺ T cells. Naive CD4⁺ T cells (CD62L⁺ CD44⁻) were prepared by FACS; sorted cells were activated with anti-murine CD3 (0.2 μg/ml) plus soluble anti-murine CD28 (1 μg/ml). Generation of induced T_{reg} (iT_{reg}) cells was performed in the presence of 10 ng/ml human TGF-β1 (R&D Systems) with or without 50 international units human IL-2. CD4⁺ T cells were cultured under polarizing conditions (for 4 d), and cell polarization was assessed by intracellular Foxp3 staining. Cell number was determined as described above.

Statistics

GraphPad Prism version 6 was used for statistical analysis. Survival was analyzed using the log-rank test. Differences between means of experi-

mental groups were analyzed using the one- or two-tailed unpaired Student *t* test, corresponding to the distribution shape of our observations. We used ordinary one-way ANOVA for multiple comparisons and always performed Dunnett's test for multiple-test corrections. The applied statistical tests are indicated in the figure legends. For visual clarity, data are shown as mean ± SEM throughout.

Results

Increased numbers of T_{reg} cells in mice with T cell-specific A20 deletion

To investigate the role of A20 in T cells, we analyzed A20^{F/F} CD4^{Cre+} mice, which specifically lack A20 in T cells. The population of Foxp3⁺ T_{reg} cells was quantitatively enlarged in thymus, spleen, and inguinal lymph nodes of naive A20^{F/F} CD4^{Cre+} mice (CD4 A20^{-/-}) as compared with A20^{F/F} CD4^{Cre-} mice (CD4 A20^{+/+}) (Fig. 1A–E, Supplemental Fig. 1A). At the same time, the total thymic CD4⁺ and CD8⁺ T cell population was not significantly different between CD4 A20^{-/-} mice and controls. In the spleen, both total CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations were reduced in CD4 A20^{-/-} mice (Fig. 1B, 1D, Supplemental Fig. 1B, 1C), which is in line with previous observations (38). To exclude a bias of age on the development of T_{reg} cells (43), we analyzed splenocytes of young (12-d-old) and adult (50-d-old) CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice. We found

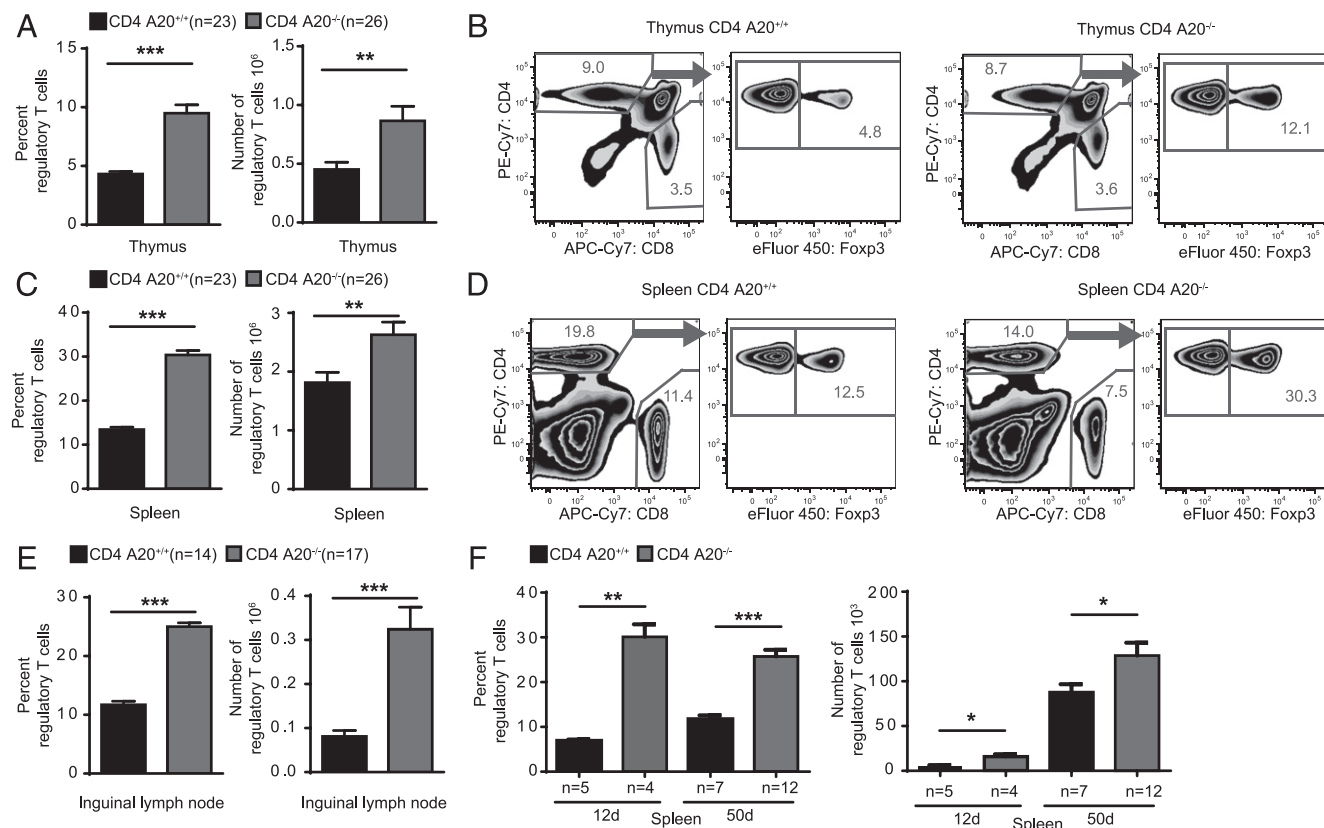


FIGURE 1. Increased numbers of T_{reg} cells in mice lacking A20 specifically in T cells. (A) Thymocytes of adult A20^{F/F} CD4^{Cre-} (CD4 A20^{+/+}) and A20^{F/F} CD4^{Cre+} (CD4 A20^{-/-}) mice were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-Foxp3, and live/dead reagent. The population of Foxp3⁺ T_{reg} cells of live CD4⁺ CD8⁻ cells was determined by flow cytometry (left panel), and total T_{reg} cell number was calculated (right panel). Pooled data of five independent experiments are shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted. (B) Gating strategy and representative FACS plots of the experiments depicted in (A). (C) Splenocytes of adult CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice were stained as in (A). The population of Foxp3⁺ T_{reg} cells of live CD4⁺ cells was determined by flow cytometry (left panel), and total T_{reg} cell number was calculated (right panel). Pooled data of five independent experiments are shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted. (D) Gating strategy and representative FACS plots of the experiments depicted in (C). (E) Lymph node cells of adult CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice were stained as in (A). The Foxp3⁺ T_{reg} cell fraction of all live CD4⁺ cells was determined by flow cytometry. Pooled data of three independent experiments are shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted. (F) Splenocytes of 12- and 50-d-old CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice were analyzed for CD4 and Foxp3 expression by flow cytometry. T_{reg} cell fractions of live CD4 cells and absolute T_{reg} cell numbers are shown. Pooled data of three independent experiments are shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted. Data were analyzed using ordinary one-way ANOVA for multiple comparisons or one- and two-tailed unpaired *t* test. Data are presented as mean ± SEM. Significance was set at **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

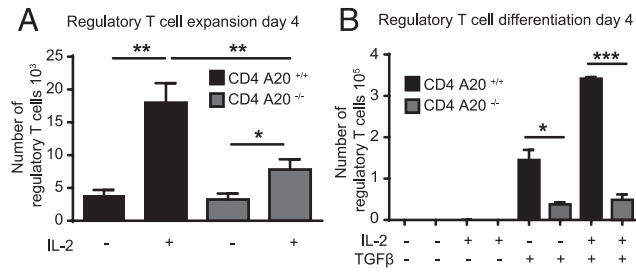


FIGURE 2. A20-deficient T cells show reduced T_{reg} cell expansion and differentiation in vitro. **(A)** A total of 50 × 10³ FACS-sorted A20^{+/+} and A20^{-/-} CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} cells was cultured in vitro in the presence of plate-bound anti-CD3 and soluble anti-CD28 with or without IL-2 for 4 d, and absolute numbers of live cells were determined. One representative of three independent experiments is shown. **(B)** A total of 40 × 10³ CD4⁺ CD62L^{high} CD44^{low} A20^{+/+} and A20^{-/-} T cells was cultured in vitro in the presence of plate-bound anti-CD3 and soluble anti-CD28, ± IL-2 and ± TGF-β for 4 d. Conversion toward a T_{reg} cell phenotype was determined by intracellular Foxp3 staining, and absolute numbers of live cells were determined. One representative of three independent experiments is shown. Data were analyzed using ordinary one-way ANOVA for multiple comparisons and two-tailed unpaired *t* test. Data are presented as mean ± SEM. Significance was set at **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

frequencies and absolute numbers of T_{reg} cells to be significantly increased in both young and adult mice (Fig. 1F).

A20-deficient T cells show reduced T_{reg} cell expansion and differentiation in vitro

To investigate whether this absolute increase of peripheral T_{reg} cell numbers in CD4 A20^{-/-} mice was due to enhanced sensitivity of

T_{reg} cells to external proliferation signals, we stimulated FACS-purified CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} cells from CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice in vitro with anti-CD3, anti-CD28, and IL-2 (44). Although IL-2 induced a significant increase in the absolute numbers of both control and A20-deficient T_{reg} cells after 4 or 8 d of culture, the in vitro expansion of A20-deficient T_{reg} cells was significantly less pronounced (Fig. 2A, Supplemental Fig. 2A). Next, we wanted to know whether enhanced sensitivity to peripheral differentiation signals of T_{reg} cells was responsible for the enlarged T_{reg} cell population in CD4 A20^{-/-} mice. However, stimulation of FACS-purified CD62L^{high} CD44^{low} naive T cells with anti-CD3, anti-CD28, and either TGF-β alone or TGF-β and IL-2 resulted in decreased proportions and absolute numbers of A20-deficient compared with control T_{reg} cells (Fig. 2B, Supplemental Fig. 2B). In summary, the sensitivity to expansion or differentiation signals of A20-deficient T_{reg} cells or CD4⁺ T cells in vitro was reduced compared with controls, and thus could not explain the increase of total T_{reg} cell numbers in CD4 A20^{-/-} mice.

A20 deficiency in T cells drives thymic T_{reg} cell development cell-intrinsically

We assumed that an intrinsic effect could account for increased T_{reg} cell development and enhanced T_{reg} cell numbers in CD4 A20^{-/-} animals. To test this hypothesis, we established a model of competitive BM engraftment and T cell development in which CD45.1⁺ CD45.2⁺ double-positive C57BL/6 recipient mice were lethally irradiated (TBI) to eradicate the recipient hematopoietic system. Then T cell-depleted BM cells mixed in a 1:1 ratio from both CD45.1 (WT) and CD45.2 (either CD4 A20^{+/+} or CD4 A20^{-/-}) donors (Fig. 3A) were introduced for hematopoietic reconstitution.

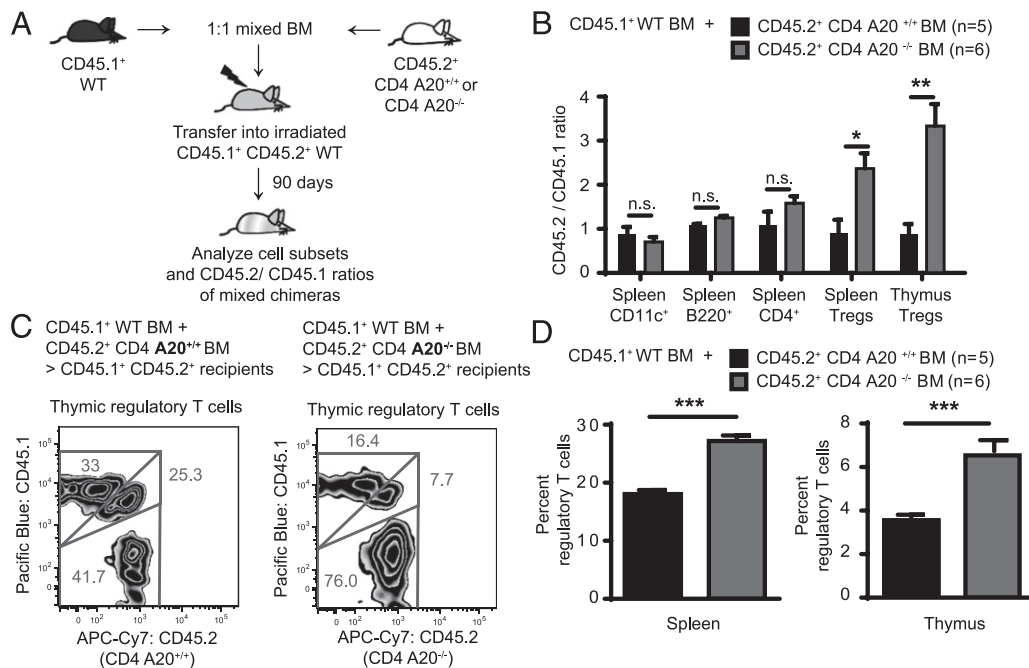


FIGURE 3. A20 deficiency in T cells drives thymic T_{reg} cell development cell-intrinsically. **(A)** CD45.1⁺ CD45.2⁺ double-positive C57BL/6 recipient mice received 11 Gy TBI and were then transplanted with 2.5 × 10⁶ T cell-depleted C57BL/6 WT BM expressing only CD45.1. In addition, recipient mice received either 2.5 × 10⁶ CD4 A20^{+/+} or 2.5 × 10⁶ CD4 A20^{-/-} T cell-depleted C57BL/6 BM, both expressing only CD45.2. **(B)** Three months after transplantation, numbers and frequencies of CD11c⁺ dendritic cells, B220⁺ B cells, CD4⁺ T cells, and CD4⁺ CD8⁻ Foxp3⁺ T_{reg} cells were determined in thymus and spleen of corresponding animals by FACS analysis. CD45.1 and CD45.2 expression of cell subsets were analyzed, and CD45.2/CD45.1 ratios were calculated. Residual recipient cells were identified (CD45.1⁺ CD45.2⁺ double-positives) and were excluded from the calculation. One representative of two independent experiments is shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted. **(C)** Gating strategy and representative FACS plots of thymic T_{reg} cells of the analysis depicted in (B). **(D)** Percentage of Foxp3⁺ T_{reg} cells of CD4⁺ CD8⁻ cells were determined in thymus and spleen of recipient mice that were transplanted as described in (A). One representative of two independent experiments is shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted. Experiments were analyzed using two-tailed unpaired *t* test. Data are presented as mean ± SEM. Significance was set at **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

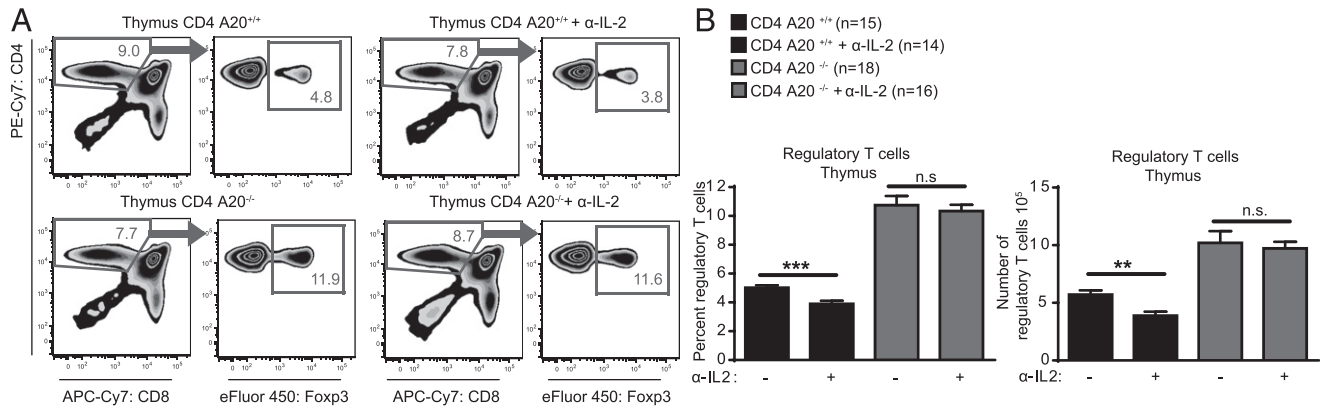
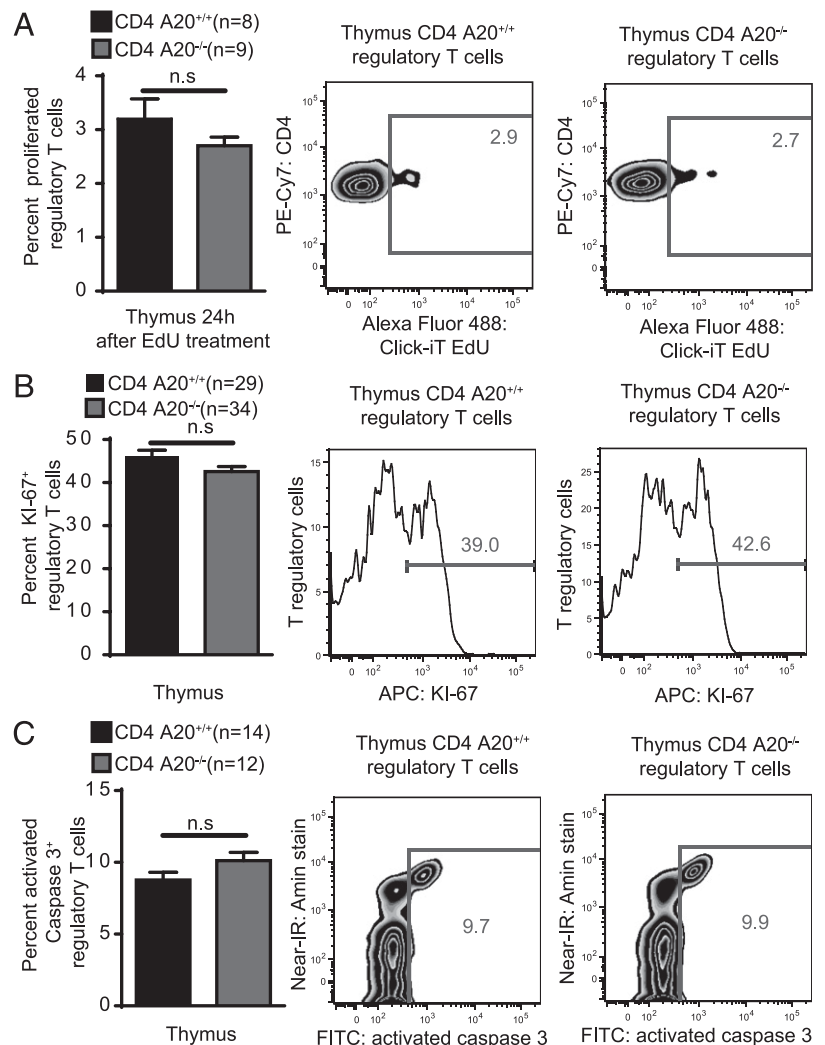


FIGURE 4. A20 deficiency reduces the dependence of thymic T regulatory cells on IL-2. **(A)** CD4 A20^{+/+} or CD4 A20^{-/-} mice were injected i.p. with anti-IL-2 neutralizing Ab and analyzed 6 d after first treatment. One group of each genotype was left without anti-IL-2 treatment as control. Thymocytes were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-Foxp3, and live/dead reagent, and the population of Foxp3⁺ T_{reg} cells of live CD4⁺ CD8⁻ cells was determined by flow cytometry. Shown are the gating strategy and representative FACS plots of thymic T_{reg} cells. **(B)** Experiments and analyses as described in (A). (Left panel) Frequency of Foxp3⁺ T_{reg} cells of CD4⁺ CD8⁻ cells. (Right panel) Absolute number of Foxp3⁺ CD4⁺ CD8⁻ T_{reg} cells. Pooled data of three independent experiments are shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted. Experiments were analyzed using two-tailed unpaired *t* test. Data are presented as mean ± SEM. Significance was set at ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001.

In this model, tracing the genetic markers by FACS analysis allows to quantify whether one of the BM compartments transferred to the host at day 0 (WT plus CD4 A20^{+/+} or WT plus CD4 A20^{-/-}) would outperform another or would favor the development of

certain T cell or other immune cell subsets. Ninety days after transplantation, recipients that had received CD45.1 WT + CD45.2 CD4 A20^{+/+} BM showed CD45.2 and CD45.1 T_{reg} cell fractions with a balanced ratio. In contrast, recipients that had received CD45.1

FIGURE 5. Thymic A20-deficient T_{reg} cells show unchanged proliferation and apoptosis. **(A)** CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice were treated with 50 mg/kg EdU. Twenty-four hours after application, harvested thymocytes were stained with live/dead reagent, anti-CD4, anti-CD8, and anti-Foxp3, and EdU Click-iT staining was performed. The population of EdU⁺ T_{reg} cells of all Foxp3⁺ T_{reg} cells was determined by flow cytometry. Pooled data of two independent experiments are shown (left panel). Animal numbers per group (*n*) are depicted. Gating strategy and representative FACS plots of the experiments are shown (right panels). **(B)** Thymocytes of adult CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice were stained with live/dead reagent, anti-CD4, anti-CD8, anti-Foxp3, and anti-KI-67. The population of KI-67⁺ T_{reg} cells of all Foxp3⁺ T_{reg} cells was determined by flow cytometry. Pooled data of six independent experiments are shown (left panel). Animal numbers per group (*n*) are depicted. Gating strategy and representative histograms of the experiments are shown (right panels). **(C)** Thymocytes of adult CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice were incubated with an active caspase-3 staining reagent for 45 min and stained with live/dead reagent, anti-CD4, anti-CD8, and anti-Foxp3. The population of activated caspase-3⁺ T_{reg} cells of all Foxp3⁺ T_{reg} cells was determined by flow cytometry. Pooled data of three independent experiments are shown (left panel). Animal numbers per group (*n*) are depicted. Gating strategy and representative FACS plots of the experiments are shown (right panels). Experiments were analyzed using two-tailed unpaired *t* test. Data are presented as mean ± SEM. Significance was set at *p* < 0.05.

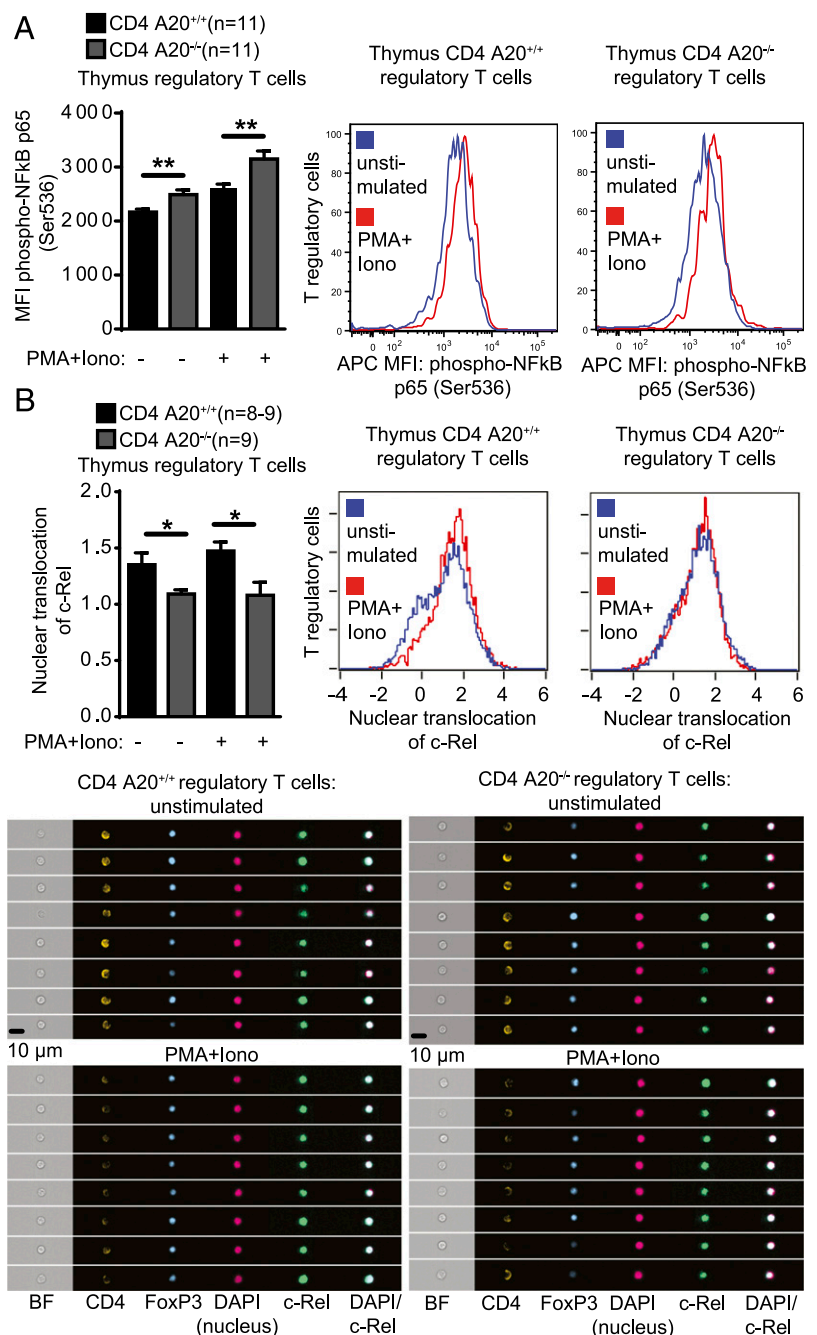


WT + CD45.2 CD4 A20^{-/-} BM showed an ~2.6-fold (spleen) and 3.8-fold (thymus) increased ratio between CD45.2⁺ A20^{-/-} and CD45.1 WT T_{reg} cell fractions (Fig. 3B, 3C). Ratios of CD45.2/CD45.1 populations of splenic dendritic cells, B cells, and total CD4⁺ T cells did not differ significantly between CD4 A20^{+/+} BM or CD4 A20^{-/-} BM (Fig. 3B). Accordingly, we found increased fractions of Foxp3⁺ T_{reg} cells within the CD4⁺ T cell compartment in spleen and thymus of mice that had received CD45.1 WT plus CD4 A20^{-/-} BM compared with mice that had received CD45.1 WT plus CD4 A20^{+/+} BM (Fig. 3D), whereas populations of CD11c⁺, B220⁺, and CD4⁺ T cells were similar in both cohorts (Supplemental Fig. 2C). Together with our findings that *in vitro* T_{reg} cell differentiation and expansion through common external stimuli were not enhanced in CD4 A20^{-/-} cells, these data suggest that early events in the BM or thymus favor T_{reg} cell development in CD4 A20^{-/-} mice via cell-intrinsic mechanisms.

A20 deficiency reduces the dependence of thymic T_{reg} cells on IL-2

IL-2 was shown to play a crucial role in thymic T_{reg} cell development by stabilizing the Foxp3⁺ phenotype and counterbalancing Foxp3-induced apoptosis (45). To investigate effects of IL-2 signaling on A20^{-/-} T_{reg} cells, we used *in vivo* application of an anti-IL-2 Ab that antagonizes effects of IL-2 (46). We injected anti-IL-2 into naive CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice, and analyzed T cell frequencies and numbers 6 d later. The number of total thymocytes and the frequency of CD4 single-positive (CD4SP) T cells were unchanged after 6 d in all groups (Fig. 4A, Supplemental Fig. 2D). However, frequencies and numbers of T_{reg} cells in the thymus of CD4 A20^{+/+} mice were significantly reduced 6 d after injection of anti-IL-2 (Fig. 4). In contrast, CD4 A20^{-/-} mice showed unchanged T_{reg} frequencies after neutralization of IL-2 (Fig. 4). We examined the expression of the integral

FIGURE 6. Thymic A20-deficient T_{reg} cells show enhanced RelA activation and reduced nuclear translocation of c-Rel. **(A)** Thymocytes of adult CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice were left unstimulated or stimulated with PMA and ionomycin (Iono) for 30 min and stained with live/dead reagent, anti-CD4, anti-CD8, anti-Foxp3, and anti-phospho-NF-κB p65. Median fluorescence intensity (MFI) of phospho-NF-κB of CD4⁺ CD8⁻ (CD4SP) Foxp3⁺ T_{reg} cells was determined by flow cytometry. Pooled data of two independent experiments are shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted (left panel). Representative histograms showing fluorescence intensity of phospho-NF-κB p65 of T_{reg} cells are shown (right panels). **(B)** CD8⁺ cell MACS-depleted thymocytes of CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice were left unstimulated or stimulated with PMA and Iono for 30 min; stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-Foxp3, anti-c-Rel, and DAPI; and acquired on an imaging flow cytometer. Nuclear translocation of CD4SP Foxp3⁺ T_{reg} cells was quantified based on the similarity score of c-Rel and nuclear image intensities. Pooled data of two independent experiments are shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted (left panel). Representative histograms show the nuclear translocation score of unstimulated and stimulated CD4SP Foxp3⁺ T_{reg} cell populations (right panels). Exemplary images are representative for the mean nuclear translocation score of indicated populations (lower panels). Experiments were analyzed using two-tailed unpaired *t* test. Data are presented as mean ± SEM. Significance was set at **p* < 0.05 and ***p* < 0.01.



IL-2R component IL-2RA (CD25) in the population of Foxp3⁺ CD4⁺ T_{reg} cells to test whether differences in IL-2R expression, which could possibly lead to altered sensitivity for IL-2, contributed to this phenotype. We found similar proportions of CD25⁺ and CD25⁻ Foxp3⁺ T_{reg} cells in CD4 A20^{+/+} or CD4 A20^{-/-} mice and marginally decreased CD25 expression levels of CD25⁺ Foxp3⁺ T_{reg} cells in CD4 A20^{-/-} mice (Supplemental Fig. 2E). Overall, these data indicate that the dependence of thymic T_{reg} cell development on IL-2 is reduced in the absence of A20.

Thymic A20-deficient T_{reg} cells show unchanged proliferation and apoptosis

We next wanted to analyze the role of A20 for T_{reg} proliferation and apoptosis *in vivo*. First, we treated CD4 A20^{-/-} and CD4 A20^{+/+} mice with EdU, a nucleoside analog that is incorporated into DNA during active DNA synthesis and can be analyzed by flow cytometry. We found similar frequencies of EdU⁺ thymic T_{reg} cells in CD4 A20^{-/-} and CD4 A20^{+/+} mice 24 h after EdU injection (Fig. 5A). We then tested the expression rate of the proliferation marker KI-67 (47) in thymic T_{reg} cells and again found no significant difference between CD4 A20^{-/-} and CD4 A20^{+/+} mice (Fig. 5B). Next, we determined the frequency of thymic T_{reg} cells that stain positive for activated caspase-3 to evaluate the role of apoptosis in T_{reg} cells but found no significant difference between CD4 A20^{-/-} and CD4 A20^{+/+} mice (Fig. 5C). In contrast, when analyzing Foxp3⁻, CD4SP thymic cells, we observed reduced frequencies of EdU⁺, similar frequencies of KI-67⁺, and increased frequencies of activated caspase-3⁺ cells in CD4 A20^{-/-} versus A20^{+/+} mice (Supplemental Fig. 3). Our data indicate that A20 does not regulate T_{reg} cell proliferation or apoptosis *in vivo* under the conditions tested in our study and suggest that these mechanisms are not responsible for the enlarged T_{reg} cell population in CD4 A20^{-/-} mice.

Thymic A20-deficient T_{reg} cells show enhanced RelA phosphorylation and reduced nuclear translocation of c-Rel

Because A20 was shown to be a central negative regulator of NF-κB activity in several cell types, we then asked whether deleting A20 in CD4⁺ T cells led to increased NF-κB activity in those cells. In fact, both Foxp3⁺ CD4SP thymic T_{reg} cells and Foxp3⁻ CD4SP thymic T cells displayed increased NF-κB activity as measured by p65 phosphorylation intensity after stimulation. In Foxp3⁺ CD4SP thymic T_{reg} cells, p65 phosphorylation intensity was already increased at baseline without stimulation, which was also the case for Foxp3⁻ CD4SP thymic T cells (Fig. 6A, Supplemental Fig. 4A). Because the NF-κB transcription factor c-Rel was shown to play a pronounced role in thymic T_{reg} cell development (17), we assessed c-Rel translocation to the nucleus of thymic T_{reg} cells on single-cell levels. Although c-Rel translocation was somewhat decreased in thymic Foxp3⁺ CD4SP A20^{-/-} T_{reg} cells compared with A20^{+/+} T_{reg} cells, thymic T_{reg} cells were characterized by a high degree of nuclear c-Rel translocation in both genotypes even in the absence of stimulation (Fig. 6B). Foxp3⁻ CD4SP thymic A20^{-/-} T cells also showed a trend for reduced nuclear c-Rel translocation (Supplemental Fig. 4B).

A20 limits development of thymic T_{reg} cell progenitors

Considering the observations that NF-κB transcription factors and especially c-Rel modulates various steps of T_{reg} cell development including the generation of thymic T_{reg} cell progenitors before Foxp3 expression (48), we examined thymic T_{reg} precursors in the absence of A20. Mice with A20^{-/-} T cells exhibited increased frequencies of CD25⁺ Foxp3⁻ CD4SP thymocytes, revealing an enhanced T_{reg} cell precursor compartment (Fig. 7A, 7B). Furthermore, we observed an increased fraction of GITR⁺ cells within this population, resulting in a ~2-fold increased T_{reg} cell progenitor (CD4SP CD25⁺ GITR⁺ Foxp3⁻) compartment (Fig. 7C). In addition, GITR expression of the CD25⁺ Foxp3⁻ CD4SP A20^{-/-} thymic

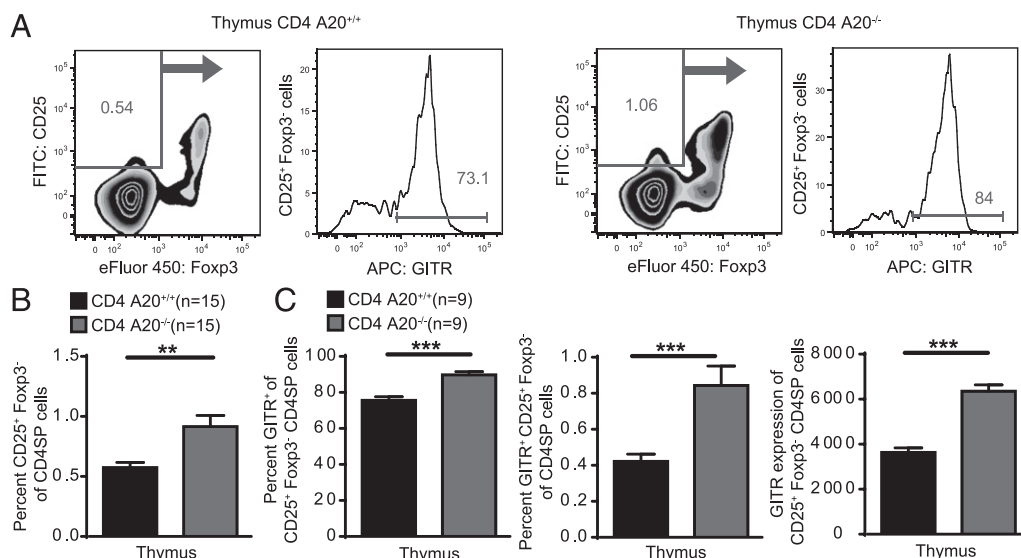


FIGURE 7. A20 limits development of thymic T_{reg} cell progenitors. **(A)** Thymocytes of adult CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-Foxp3, anti-GITR, and live/dead reagent. The population of CD4⁺ CD8⁻ CD25⁺ Foxp3⁻ GITR⁺ live cells was determined by flow cytometry. Gating strategy and representative FACS plots of cells that were previously gated on single, live CD4⁺ CD8⁻ (CD4SP) thymocytes are depicted. **(B)** Frequencies of CD25⁺ Foxp3⁻ of CD4SP live cells were determined by flow cytometry. Pooled data of three independent experiments are shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted. **(C)** Frequencies of GITR⁺ cells of CD25⁺ Foxp3⁻ CD4SP cells (left panel), frequencies of GITR⁺ CD25⁺ Foxp3⁻ of CD4SP live cells (middle panel), and mean GITR expression of CD25⁺ Foxp3⁻ CD4SP live cells (right panel) were determined by flow cytometry. Pooled data of two independent experiments are shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted. Experiments were analyzed using two-tailed unpaired *t* test. Data are presented as mean ± SEM. Significance was set at ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001.

T_{reg} precursors was enhanced compared with Foxp3-expressing T_{reg} cells (Fig. 7C, Supplemental Fig. 4C). This population increase at the T_{reg} precursor differentiation stage in CD4 A20^{-/-} mice suggests that early intrinsic mechanisms preceding Foxp3 expression are responsible for the developmental advantage of the CD4 A20^{-/-} versus CD4 A20^{+/+} T_{reg} cell population.

A20-deficient T_{reg} cells are functional

Having demonstrated that deleting A20 in CD4 T cells induces a specific T_{reg} cell population increase, we next analyzed whether A20-deficient T_{reg} cells are functional. In vitro, we found that CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} cells purified from CD4 A20^{+/+} or CD4 A20^{-/-} mice both efficiently suppressed proliferation of A20^{+/+} T effector cells to a similar extent (Fig. 8A, 8B). To analyze T_{reg} cell function in vivo, we used a model of major mismatch allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), in which the hematopoietic system of recipient mice is eradicated by TBI and then reconstituted with BM and T cells from allogeneic donors. Lethal effects of acute GVHD, mediated by allogeneic effector T cells, can be significantly reduced in this model by cotransplantation of T_{reg} cells (49). Survival of mice that received either A20^{+/+} or A20^{-/-} T_{reg} cells together with WT donor BM and T cells was similarly increased in both groups compared with controls that did not receive additional T_{reg} cells (Fig. 8C). This was attributable to the function of individual T_{reg} cells and not due to numerical changes throughout the course of the experiment, because the absolute number of T_{reg} cells in animals cotransplanted with effector and T_{reg} cells was not significantly different

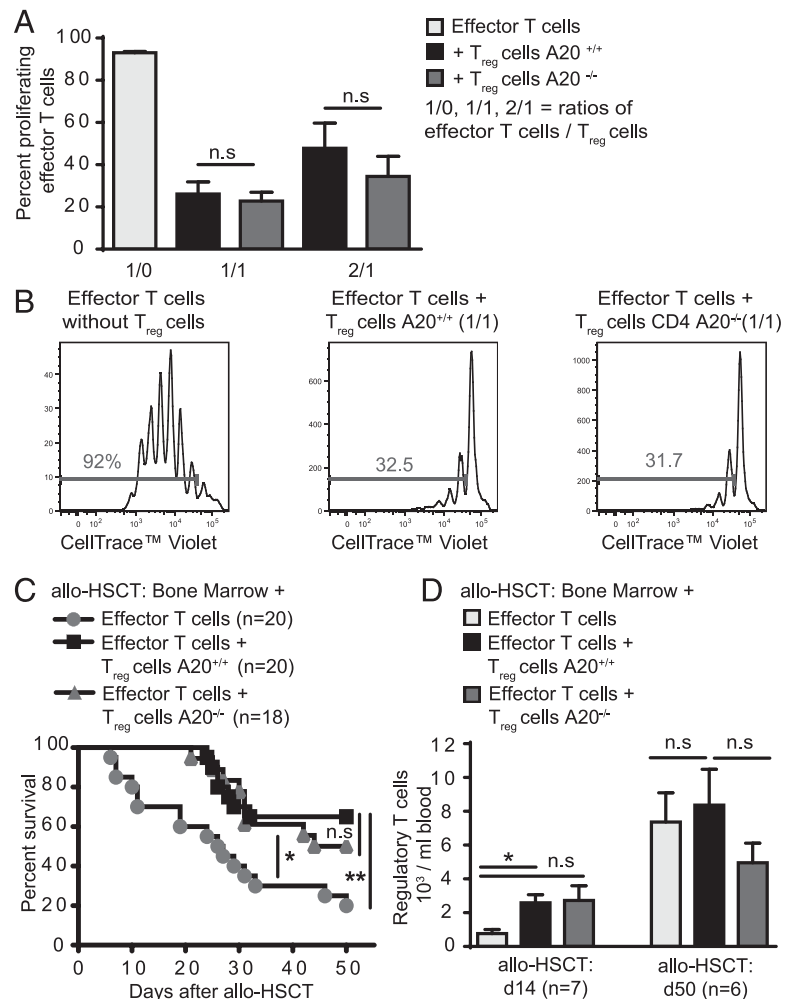
when CD4 A20^{+/+} or CD4 A20^{-/-} T_{reg} cells were used (Fig. 8D). Together, our data show that loss of A20 does not impair the suppressive functions of T_{reg} cells.

Discussion

NF-κB activation modulates T_{reg} cell development through various mechanisms, including induction of Foxp3 transcription in the thymus (16). We hypothesized that enhanced NF-κB activity in CD4⁺ T cells, as in the absence of its negative regulator A20, might have an impact on the development, maintenance, and functionality of T_{reg} cells. We observed that mice lacking A20 specifically in CD4⁺ T cells had increased numbers of CD4⁺ T_{reg} cells in spleen, lymph nodes, and thymus.

Because the increase in T_{reg} cells, which are known to arise in the thymus very early after birth (50), was already detectable in 12-d-old mice and could not be explained by enhanced iT_{reg} cell differentiation or expansion, we hypothesized that a cell-intrinsic effect during thymic T_{reg} cell generation may account for T_{reg} cell expansion in CD4 A20^{-/-} mice. In fact, competitive engraftment experiments in chimeras with BM from CD4 A20^{-/-} mice equally mixed with BM from WT mice established a significantly larger T_{reg} cell compartment compared with chimeras with BM from CD4 A20^{+/+} mice equally mixed with BM from additional WT mice. We observed that the majority of T_{reg} cells contributing to the enlarged T_{reg} cell compartment were derived from A20^{-/-} BM. This is in line with previous findings that increased NF-κB activity, in particular of c-Rel (17), leads to increased proportions and absolute numbers of thymic Foxp3⁺ natural T_{reg} cells (16).

FIGURE 8. A20-deficient T_{reg} cells are functional. **(A)** MACS-sorted A20^{+/+} or A20^{-/-} CD4⁺ CD25⁺ T effector cells were labeled with a cell tracer dye (CellTrace Violet) and cultured together with CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} cells in the presence of plate-bound anti-CD3 and irradiated APCs at different ratios. Numbers of proliferating effector T (T_{eff}) cells were determined on day 4. Pooled data of two independent experiments are shown. **(B)** Gating strategy and representative histograms of labeled T_{eff} cells of one representative experiment described in (A). **(C)** Survival curve of allo-HSCT recipient mice (BALB/c) after 9 Gy TBI + 5 × 10⁶ T cell-depleted BM cells + 2 × 10⁵ CD4⁺ CD25⁻ + 2 × 10⁵ CD8⁺ T cells (C57BL/6) and either 6 × 10⁵ A20^{+/+} or A20^{-/-} CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} cells (C57BL/6). Pooled data of three independent experiments are shown. Animal numbers per group (*n*) are depicted. **(D)** Number of donor-derived T_{reg} cells in the blood of allo-HSCT recipient mice that were transplanted as described in (C). Blood was taken at indicated time points. The experiment was performed once. Animal numbers per group (*n*) are depicted. Survival was analyzed using the log-rank test. Other experiments were analyzed using two-tailed unpaired *t* test. Data are presented as mean ± SEM. Significance was set at **p* < 0.05 and ***p* < 0.01.



Complementary to our data with CD4 A20^{-/-} BM chimeras, less T_{reg} cells were generated from c-Rel-deficient BM than from WT BM in a competitive setting (18). The differentiation of naive T cells toward iT_{reg} cells was regulated by c-Rel independently of IL-2 (18). Remarkably, in our setting, CD4 A20^{-/-} T_{reg} cells were less responsive to IL-2 in vitro. IL-2 is known to maintain T_{reg} cells by preventing Foxp3-induced apoptosis (46) and through regulation of MCL-1 that is essential for T_{reg} cell survival (45). In this context, we observed that A20^{-/-} T_{reg} cells were less affected by both the presence and absence of IL-2. Although the T_{reg} compartment originating from CD4 A20^{-/-} BM was expanded in vivo, A20^{-/-} cells displayed a reduced response to classical T_{reg} cell proliferative or differentiating factors such as IL-2 and TGF- β in vitro. In vivo, neither proliferation nor apoptosis was significantly affected in A20-deficient T_{reg} cells, contrary to A20^{-/-} effector T cells, which showed increased rates of apoptosis. This is in line with previous findings that show that A20 regulates cell death and survival of effector T cells (34, 35, 38). At the current stage, the molecular mechanisms to explain the relative insensitivity of A20^{-/-} T_{reg} cells toward IL-2 remain unclear. Intrinsic effects of differential NF- κ B regulation in CD4 A20^{-/-} mice rather than a higher cell turnover are the most likely explanation for T_{reg} expansion in these mice in vivo. In this context, we found that the activity of the NF- κ B subunit RelA (p65) was enhanced in Foxp3⁺ thymic T_{reg} cells in the absence of A20. In contrast, A20^{-/-} thymic T_{reg} cells showed reduced nuclear translocation of the NF- κ B subunit c-Rel. Because NF- κ B signaling was shown to modulate multiple steps of T_{reg} cell development in the thymus (48), we hypothesize that A20 influences the thymic development of natural T_{reg} cells through modulation of NF- κ B activation in T_{reg} cell progenitors. In line with this hypothesis, we discovered that the population increase in CD4 A20^{-/-} compared with CD4 A20^{+/+} mice was not restricted to the Foxp3⁺ thymic T_{reg} cell compartment, but was also comparably elevated in CD4SP CD25⁺ GITR⁺ Foxp3⁻ thymic T_{reg} cell progenitors. Furthermore, we observed elevated GITR expression levels of CD4SP CD25⁺ Foxp3⁻ thymic T_{reg} cell precursors. In this regard, it was shown recently that costimulation of tumor necrosis factor receptor superfamily molecules, such as GITR, connects TCR signal strength to thymic differentiation of T_{reg} cells (51). Further studies are needed to examine a possible role of A20 and NF- κ B activation in this context and to define how A20 restrains thymic T_{reg} cell progenitor generation molecularly. In addition, whether deleting A20 at other time points of T_{reg} cell generation that coincide with CD4 expression would entail different outcomes remains to be determined.

Our finding that A20 restricts thymic T_{reg} cell generation is consistent with previous data for CYLD, another negative regulator of NF- κ B, which, as A20, was shown to remove nonproteolytic K63-linked polyubiquitin chains from signaling molecules in the TCR pathway. CYLD deficiency promotes constitutive NF- κ B activity in thymocytes and peripheral T cells, and is associated with enhanced T_{reg} cell frequencies (52, 53). Interestingly, CD25 expression is decreased in CYLD-deficient T_{reg} cells (52), which is in line with our findings revealing lower expression levels of CD25 in A20^{-/-} CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ T_{reg} cells. However, CYLD-deficient T_{reg} cells were shown to be less functional, failing to inhibit colitis in an adoptive transfer colitis model (52). This is in contrast with our data demonstrating that increased natural A20^{-/-} T_{reg} cells are functional to suppress allogeneic effector T cell toxicity in a preclinical model of acute GVHD. Perhaps differential NF- κ B regulation may explain those discrepancies, because A20 terminates NF- κ B signaling (19), whereas CYLD prevents spontaneous NF- κ B activation (54).

In summary, we propose that A20 holds the thymic development of natural T_{reg} cells in check and thereby contributes to fine-tuning

the CD4⁺ T cell response. Given that A20 inhibits T effector cell death in CD4⁺ T cells, unleashing T effector cell-mediated inflammatory activity, our data complement the picture of A20 as a potent regulator of T cell-mediated inflammation, inducing T effector cell survival while reducing T_{reg} cell generation. In light of the largely anti-inflammatory effects that have been attributed to A20 in many cell types, this proinflammatory aspect of A20 physiology in effector and regulatory CD4⁺ T cells is particularly important because it may contribute to a change of perception of the functions of A20 as a negative regulator of NF- κ B in the context of inflammation. Whether targeted modulation of A20 activity may allow to promote T_{reg} cell-mediated immune tolerance or, alternatively, favorable T cell immunity is a question of translational relevance that needs to be addressed in the future.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4: 330–336.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057–1061.
- Hsieh, C. S., H. M. Lee, and C. W. Lio. 2012. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 157–167.
- Huehn, J., J. K. Polansky, and A. Hamann. 2009. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat. Rev. Immunol.* 9: 83–89.
- Thome, M., J. E. Charton, C. Pelzer, and S. Hailfinger. 2010. Antigen receptor signaling to NF- κ B via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a003004.
- Song, J., T. So, and M. Croft. 2008. Activation of NF- κ B1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. *J. Immunol.* 180: 7240–7248.
- Medoff, B. D., B. P. Sandall, A. Landry, K. Nagahama, A. Mizoguchi, A. D. Luster, and R. J. Xavier. 2009. Differential requirement for CARMA1 in agonist-selected T-cell development. *Eur. J. Immunol.* 39: 78–84.
- Gupta, S., S. Manicassamy, C. Vasu, A. Kumar, W. Shang, and Z. Sun. 2008. Differential requirement of PKC- θ in the development and function of natural regulatory T cells. *Mol. Immunol.* 46: 213–224.
- Schmidt-Supprian, M., J. Tian, E. P. Grant, M. Pasparakis, R. Maehr, H. Ovaa, H. L. Ploegh, A. J. Coyle, and K. Rajewsky. 2004. Differential dependence of CD4⁺CD25⁺ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF- κ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4566–4571.
- Schmidt-Supprian, M., G. Courtois, J. Tian, A. J. Coyle, A. Israël, K. Rajewsky, and M. Pasparakis. 2003. Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity* 19: 377–389.
- Wan, Y. Y., H. Chi, M. Xie, M. D. Schneider, and R. A. Flavell. 2006. The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat. Immunol.* 7: 851–858.
- Barnes, M. J., P. Krebs, N. Harris, C. Eidenschen, R. Gonzalez-Quintal, C. N. Arnold, K. Crozat, S. Sovath, E. M. Moresco, A. N. Theofilopoulos, et al. 2009. Commitment to the regulatory T cell lineage requires CARMA1 in the thymus but not in the periphery. *PLoS Biol.* 7: e51.
- Vallabhapurapu, S., I. Powolny-Budnicka, M. Riemann, R. M. Schmid, S. Paxian, K. Pfeffer, H. Körner, and F. Weih. 2008. Rel/NF- κ B family member RelA regulates NK1.1-to NK1.1+ transition as well as IL-15-induced expansion of NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 38: 3508–3519.
- Bellavia, D., A. F. Campese, E. Alesse, A. Vacca, M. P. Felli, A. Balestri, A. Stoppacciaro, C. Tiveron, L. Tatangelo, M. Giovarelli, et al. 2000. Constitutive activation of NF- κ B and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *EMBO J.* 19: 3337–3348.
- Burchill, M. A., J. Yang, C. Vogtenhuber, B. R. Blazar, and M. A. Farrar. 2007. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 178: 280–290.
- Long, M., S. G. Park, I. Strickland, M. S. Hayden, and S. Ghosh. 2009. Nuclear factor- κ B modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 31: 921–931.
- Isomura, I., S. Palmer, R. J. Grumot, K. Bunting, G. Hoyne, N. Wilkinson, A. Banerjee, A. Proietto, R. Gugasyan, L. Wu, et al. 2009. c-Rel is required for the development of thymic Foxp3⁺ CD4 regulatory T cells. [Published erratum appears in 2010 J. Exp. Med. 207: 899.] *J. Exp. Med.* 206: 3001–3014.
- Ruan, Q., V. Kameswaran, Y. Tone, L. Li, H. C. Liou, M. I. Greene, M. Tone, and Y. H. Chen. 2009. Development of Foxp3(+) regulatory T cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity* 31: 932–940.
- Catrysse, L., L. Vereecke, R. Beyaert, and G. van Loo. 2014. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 35: 22–31.
- Lee, E. G., D. L. Boone, S. Chai, S. L. Libby, M. Chien, J. P. Lodolce, and A. Ma. 2000. Failure to regulate TNF-induced NF- κ B and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 289: 2350–2354.

21. Catrysse, L., M. Farhang Ghahremani, L. Vereecke, S. A. Youssef, C. Mc Guire, M. Sze, A. Weber, M. Heikenswalder, A. de Bruin, R. Beyaert, and G. van Loo. 2016. A20 prevents chronic liver inflammation and cancer by protecting hepatocytes from death. *Cell Death Dis.* 7: e2250.
22. Chu, Y., J. C. Vahl, D. Kumar, K. Heger, A. Bertossi, E. Wójtowicz, V. Soberon, D. Schenten, B. Mack, M. Reutelschöfer, et al. 2011. B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood* 117: 2227–2236.
23. Tavares, R. M., E. E. Turer, C. L. Liu, R. Advincula, P. Scapini, L. Rhee, J. Barrera, C. A. Lowell, P. J. Utz, B. A. Malynn, and A. Ma. 2010. The ubiquitin modifying enzyme A20 restricts B cell survival and prevents autoimmunity. *Immunity* 33: 181–191.
24. Kool, M., G. van Loo, W. Waelput, S. De Prijck, F. Muskens, M. Sze, J. van Praet, F. Branco-Madeira, S. Janssens, B. Reizis, et al. 2011. The ubiquitin-editing protein A20 prevents dendritic cell activation, recognition of apoptotic cells, and systemic autoimmunity. *Immunity* 35: 82–96.
25. Vereecke, L., M. Sze, C. Mc Guire, B. Rogiers, Y. Chu, M. Schmidt-Supprian, M. Pasparakis, R. Beyaert, and G. van Loo. 2010. Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *J. Exp. Med.* 207: 1513–1523.
26. Wellcome Trust Case Control Consortium. 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661–678.
27. Musone, S. L., K. E. Taylor, T. T. Lu, J. Nititham, R. C. Ferreira, W. Ortmann, N. Shifrin, M. A. Petri, M. I. Kamboh, S. Manzi, et al. 2008. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 40: 1062–1064.
28. Graham, R. R., C. Cotsapas, L. Davies, R. Hackett, C. J. Lessard, J. M. Leon, N. P. Burt, C. Guiducci, M. Parkin, C. Gates, et al. 2008. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 40: 1059–1061.
29. Matmati, M., P. Jacques, J. Maelfait, E. Verheugen, M. Kool, M. Sze, L. Geboes, E. Louagie, C. Mc Guire, L. Vereecke, et al. 2011. A20 (TNFAIP3) deficiency in myeloid cells triggers erosive polyarthritis resembling rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 43: 908–912.
30. Schmitz, R., M. L. Hansmann, V. Bohle, J. I. Martin-Subero, S. Hartmann, G. Mechttersheimer, W. Klapper, I. Vater, M. Giefing, S. Gesk, et al. 2009. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 206: 981–989.
31. Düwel, M., V. Welteke, A. Oeckinghaus, M. Baens, B. Kloof, U. Ferch, B. G. Darnay, J. Ruland, P. Marynen, and D. Krappmann. 2009. A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains. *J. Immunol.* 182: 7718–7728.
32. Coornaert, B., M. Baens, K. Heynincq, T. Bekaert, M. Haegman, J. Staal, L. Sun, Z. J. Chen, P. Marynen, and R. Beyaert. 2008. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nat. Immunol.* 9: 263–271.
33. Giordano, M., R. Roncagalli, P. Bourdely, L. Chasson, M. Buferne, S. Yamasaki, R. Beyaert, G. van Loo, N. Auphan-Anezin, A. M. Schmitt-Verhulst, and G. Verdeil. 2014. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 11115–11120.
34. Onizawa, M., S. Oshima, U. Schulze-Topphoff, J. A. Osés-Prieto, T. Lu, R. Tavares, T. Prodhomme, B. Duong, M. I. Whang, R. Advincula, et al. 2015. The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. [Published erratum appears in 2015 *Nat. Immunol.* 16: 785.] *Nat. Immunol.* 16: 618–627.
35. Matsuzawa, Y., S. Oshima, M. Takahara, C. Maeyashiki, Y. Nemoto, M. Kobayashi, Y. Nibe, K. Nozaki, T. Nagaishi, R. Okamoto, et al. 2015. TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting MTOR and promoting autophagy. *Autophagy* 11: 1052–1062.
36. Drennan, M. B., S. Govindarajan, E. Verheugen, J. M. Coquet, J. Staal, C. McGuire, T. Taghon, G. Leclercq, R. Beyaert, G. van Loo, et al. 2016. NKT sublineage specification and survival requires the ubiquitin-modifying enzyme TNFAIP3/A20. *J. Exp. Med.* 213: 1973–1981.
37. Lee, P. P., D. R. Fitzpatrick, C. Beard, H. K. Jessup, S. Lehar, K. W. Makar, M. Pérez-Melgosa, M. T. Sweetser, M. S. Schlissel, S. Nguyen, et al. 2001. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15: 763–774.
38. Fischer, J. C., V. Otten, K. Steiger, M. Schmickl, J. Slotta-Huspenina, R. Beyaert, G. van Loo, C. Peschel, H. Poeck, T. Haas, and S. Spörl. 2017. A20 deletion in T cells abrogates acute graft-versus-host disease. *Eur. J. Immunol.* In press.
39. Fischer, J. C., A. Wintges, T. Haas, and H. Poeck. 2017. Assessment of mucosal integrity by quantifying neutrophil granulocyte influx in murine models of acute intestinal injury. *Cell. Immunol.* 316: 70–76.
40. Fischer, J. C., M. Bscheider, G. Eisenkolb, C. C. Lin, A. Wintges, V. Otten, C. A. Lindemans, S. Heidegger, M. Rudelius, S. Monette, et al. 2017. RIG-I/MAVS and STING signaling promote gut integrity during irradiation- and immune-mediated tissue injury. *Sci. Transl. Med.* 9: eaag2513.
41. Schurgers, E., H. Kelchtermans, T. Mitera, L. Geboes, and P. Matthys. 2010. Discrepancy between the in vitro and in vivo effects of murine mesenchymal stem cells on T-cell proliferation and collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12: R31.
42. George, T. C., S. L. Fanning, P. Fitzgerald-Bocarsly, R. B. Medeiros, S. Highfill, Y. Shimizu, B. E. Hall, K. Frost, D. Basiji, W. E. Ortyl, et al. 2006. Quantitative measurement of nuclear translocation events using similarity analysis of multi-spectral cellular images obtained in flow. [Published erratum appears in 2009 *J. Immunol. Methods* 344: 85.] *J. Immunol. Methods* 311: 117–129.
43. Thomas, D. C., R. J. Mellanby, J. M. Phillips, and A. Cooke. 2007. An early age-related increase in the frequency of CD4+ Foxp3+ cells in BDC2.5NOD mice. *Immunology* 121: 565–576.
44. Yang, C. H., L. Tian, G. S. Ling, N. J. Trendell-Smith, L. Ma, C. K. Lo, D. I. Stott, F. Y. Liew, and F. P. Huang. 2008. Immunological mechanisms and clinical implications of regulatory T cell deficiency in a systemic autoimmune disorder: roles of IL-2 versus IL-15. *Eur. J. Immunol.* 38: 1664–1676.
45. Pierson, W., B. Cauwe, A. Policheni, S. M. Schlenner, D. Franckaert, J. Berges, S. Humblet-Baron, S. Schönefeldt, M. J. Herold, D. Hildeman, et al. 2013. Antiapoptotic Mcl-1 is critical for the survival and niche-filling capacity of Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 14: 959–965.
46. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* 201: 723–735.
47. Gerdes, J., H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab, and H. Stein. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133: 1710–1715.
48. Fulford, T. S., D. Ellis, and S. Gerondakis. 2015. Understanding the roles of the NF- κ B pathway in regulatory T cell development, differentiation and function. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 136: 57–67.
49. Edinger, M., P. Hoffmann, J. Ermann, K. Drago, C. G. Fathman, S. Strober, and R. S. Negrin. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat. Med.* 9: 1144–1150.
50. Fontenot, J. D., J. L. Dooley, A. G. Farr, and A. Y. Rudensky. 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J. Exp. Med.* 202: 901–906.
51. Mahmud, S. A., L. S. Manlove, H. M. Schmitz, Y. Xing, Y. Wang, D. L. Owen, J. M. Schenkel, J. S. Boomer, J. M. Green, H. Yagita, et al. 2014. Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 15: 473–481.
52. Reissig, S., N. Hövelmeyer, B. Weigmann, A. Nikolaev, B. Kalt, T. F. Wunderlich, M. Hahn, M. F. Neurath, and A. Waisman. 2012. The tumor suppressor CYLD controls the function of murine regulatory T cells. *J. Immunol.* 189: 4770–4776.
53. Reiley, W. W., W. Jin, A. J. Lee, A. Wright, X. Wu, E. F. Tewalt, T. O. Leonard, C. C. Norbury, L. Fitzpatrick, M. Zhang, and S. C. Sun. 2007. Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses. *J. Exp. Med.* 204: 1475–1485.
54. Reiley, W., M. Zhang, X. Wu, E. Granger, and S. C. Sun. 2005. Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by IkappaB kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 25: 3886–3895.

Short Communication

A20 deletion in T cells modulates acute graft-versus-host disease in mice

Julius C. Fischer**¹, Vera Otten**¹, Katja Steiger^{2,3}, Martina Schmickl¹,
Julia Slotta-Huspenina³, Rudi Beyaert^{4,5}, Geert van Loo^{4,5},
Christian Peschel¹, Hendrik Poeck*¹, Tobias Haas*¹ and Silvia Spoerl*¹

¹ Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany

² Comparative Experimental Pathology, Technische Universität München, Munich, Germany

³ Institute of Pathology, Technische Universität München, Munich, Germany

⁴ Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, Ghent, Belgium

⁵ Inflammation Research Center, VIB, Ghent, Belgium

The NF- κ B regulator A20 limits inflammation by providing negative feedback in myeloid cells and B cells. Functional lack of A20 has been linked to several inflammatory and autoimmune diseases. To define how A20 affects the functionality of T effector cells in a highly inflammatory environment, we performed conventional allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) with A20-deficient CD4⁺ and CD8⁺ donor T cells in mice. Severity and mortality of graft-versus-host disease (GVHD) after allo-HSCT was drastically reduced in recipients transplanted with conventional doses of A20-deficient T cells. Consistently, we found that the A20-deficient donor T-cell compartment was strongly diminished at various timepoints after allo-HSCT. However, proportionally more A20-deficient donor T cells produced IFN- γ and systemic inflammation was elevated early after allo-HSCT. Consequently, increasing the dose of transplanted A20-deficient T cells reversed the original phenotype and resulted in enhanced GVHD mortality compared to recipients that received A20^{+/+} T cells. Still, A20-deficient T cells, activated either through T cell receptor-dependent or -independent mechanisms, were less viable than control A20^{+/+} T cells, highlighting that A20 balances both, T-cell activation and survival. Thus, our findings suggest that targeting A20 in T cells may allow to modulate T-cell-mediated inflammatory diseases like GVHD.

Keywords: A20 · Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation · Graft-versus-host disease · Inflammatory response · T cells



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

Acute graft-versus-host-disease (GVHD) is a major complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT).

It is caused by alloreactive donor T cells which mainly attack the gastrointestinal tract, skin and liver [1]. Conditioning therapy prior to allo-HSCT leads to activation of antigen presenting cells (APCs) which primes donor-derived T cells and causes

Correspondence: Dr. Silvia Spoerl, Dr. Tobias Haas and Dr. Hendrick Poeck
e-mail: silvia.spoerl@tum.de; tobias.haas@tum.de; hendrik.poeck@tum.de

*These authors have contributed equally.
**These authors have contributed equally.

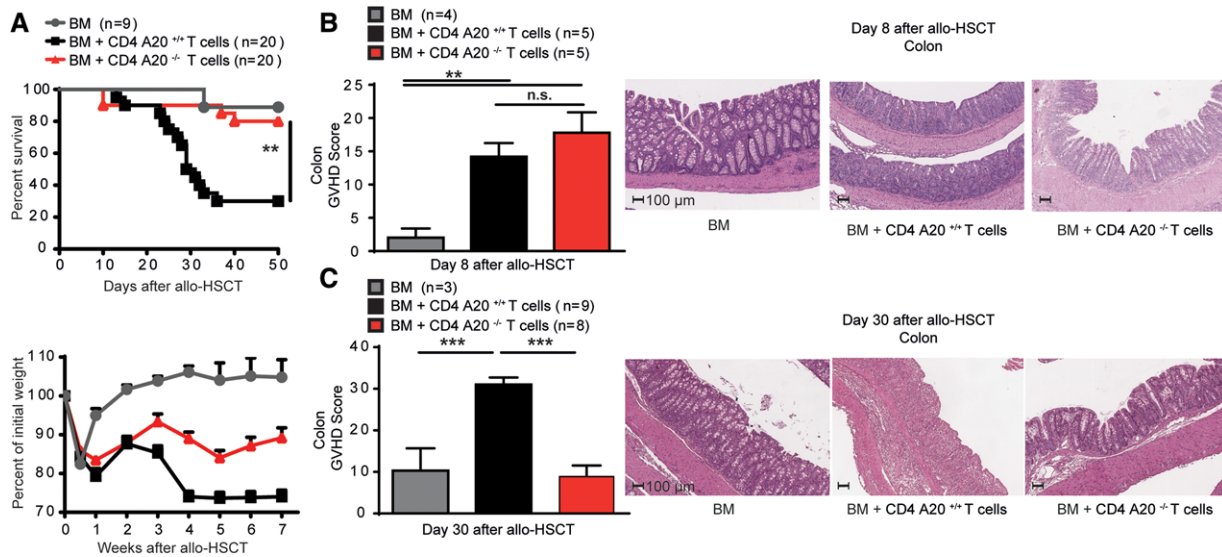


Figure 1. A20-deficient T cells cause less graft-versus-host disease after conventional allo-HSCT. Allo-HSCT experiments: Balb/c recipients received TBI and T cell depleted C57BL/6 WT bone marrow cells (TCD-BM) or TCD-BM + T cells isolated from A20^{F/F}CD4^{Cre-} (CD4 A20^{+/+}) or A20^{F/F}CD4^{Cre+} (CD4 A20^{-/-}) C57BL/6 animals. (A) Animal survival (upper panel) and weight curve (lower panel). Pooled data from three independent experiments with 14–21 samples per experiment. (B) Histopathological analysis of large intestines of recipients on day 8 after allo-HSCT: Pooled GVHD Score (left panel), representative images (right panel). Data are representative of two experiments with 6–14 samples per experiment. Scale bar: 100 μ m. (C) Histopathological analysis of large intestines of recipients on day 30 after allo-HSCT. Pooled GVHD Score (left panel), representative images (right panel). Data are from 1 experiment with 20 samples. Animal numbers per group (n) are depicted. Experiments were analyzed using two-tailed unpaired t-test or the Log-rank test (survival). Data are presented as mean \pm SEM. Significance was set at *p* values < 0.05, *p* < 0.01, and *p* < 0.001, represented by asterisks (*, ** and ***).

GVHD [2]. T-cell activation and priming through T-cell receptor (TCR)- and cytokine receptor-mediated pathways leads to induction of NF- κ B which regulates T-cell function and survival. NF- κ B generally requires negative feedback regulation to restrain inflammation, and uncontrolled NF- κ B activation is associated with various autoimmune diseases and cancer [3]. One of the key regulators of NF- κ B is the ubiquitin editing enzyme A20 [4]. In T cells, A20 removes polyubiquitin chains from MALT1, limiting TCR induced NF- κ B activation [4]. While A20-deficient mice die within a few weeks due to exaggerated inflammation [5], lineage-specific A20 deficiency in various cell types such as B cells or dendritic cells (DCs) results in higher susceptibility to inflammatory diseases [6–9]. Furthermore, genetic polymorphism of A20 in humans has been linked to various autoimmune diseases [10–14]. However, the role of A20 in T cells and T-cell-mediated diseases is only beginning to emerge. In CD8⁺ T cells, deletion of A20 led to increased production of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF and IL-2 but resulted in enhanced cell death and impaired memory T-cell responses [15, 16]. In CD4⁺ T cells, A20 was shown to be essential for survival and expansion by promoting autophagy and protecting from necroptotic cell death [17, 18]. Unrestricted necroptosis in A20^{-/-} CD4⁺ cells led to reduced inflammation in a Th17-cell-dependent model of autoimmune encephalomyelitis [18]. In NKT1 and NKT2 natural killer T (NKT) cell sublineages, A20 was also shown to restrict TCR-dependent activation and survival, thereby controlling NKT cell differentiation [19]. Prompted by the apparent contrast between anti-inflammatory effects in various tissues and cell types on one hand and promotion of T helper

cell survival on the other, we tested the functionality of A20 deficient CD4⁺ T cells in a mouse model of T cell-dependent acute GVHD. We demonstrate that the A20-deficient donor T-cell compartment displays enhanced effector function but reduced viability after allo-HSCT, potentially modulating morbidity and mortality of GVHD.

Results

A20-deficient T cells cause less graft-versus-host disease after conventional allo-HSCT

To analyze the role of A20 in T cell activation, functionality and survival, we generated A20^{F/F}CD4^{Cre+} (CD4 A20^{-/-}) mice which specifically lack A20 in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Supporting Information Fig. 1A). To test the relevance of A20 in donor T-cell-mediated acute GVHD, we chose a major mismatch mouse model of allo-HSCT, where activated allogeneic effector T cells induce GVHD symptoms like enteritis and severe weight loss. Balb/c recipient mice received conditioning therapy with total body irradiation (TBI) to eradicate the recipient hematopoietic system. Subsequently, recipients received C57BL/6 allogeneic WT bone marrow cells alone or together with donor T cells isolated from either CD4 A20^{+/+} or CD4 A20^{-/-} C57BL/6 mice. Recipients who received conventional doses [20] of CD4 A20^{-/-} T cells (5×10^5) developed significantly less GVHD than recipients of CD4 A20^{+/+} T cells (Fig. 1A). Differences seemed to occur during the course of GVHD,

and in fact, histopathological analysis of recipients revealed comparable intestinal GVHD scores on day 8 (Fig. 1B, Supporting Information Fig. 1B) but significantly reduced GVHD scores on day 30 after allo-HSCT between recipients of conventional doses of CD4 A20^{-/-} as compared to CD4 A20^{+/+} T cells (Fig. 1C, Supporting Information Fig. 1C).

Increased activation of A20-deficient T cells after transplantation

We next analyzed spleens of naïve CD4 A20^{-/-} mice and found that both CD4⁺ and CD8⁺ fractions were significantly decreased as compared to A20^{F/F} CD4^{Cre-} (CD4 A20^{+/+}) and A20^{F/+} CD4^{Cre+} (CD4 A20^{+/-}) mice. Activation markers indicated a shift from a naïve towards a memory T-cell phenotype (Supporting Information Fig. 2A, B). Allo-HSCT performed with equal numbers of T cells isolated from CD4 A20^{+/+} or CD4 A20^{-/-} mice resulted in lower absolute numbers of CD3⁺ T cells infiltrating the intestinal mucosa on day 8 and day 30 after transplantation (Fig. 2A, B, Supporting Information Fig. 3A, B). Further analysis confirmed reduced fractions of donor T cells in the intestines and revealed decreased absolute numbers of donor T cells in the spleens of allo-HSCT recipients transplanted with A20^{-/-} T cells (Fig. 2C, Supporting Information Fig. 3C). However, of the remaining CD4⁺ or CD8⁺ A20-deficient T cells, a larger proportion of T cells stained positive for IFN- γ compared to controls (Fig. 2D, E, Supporting Information Fig. 3D, E). Consistently, in mice transplanted with CD4 A20^{-/-} T cells, TNF- α levels were first elevated (on day 8) but then reduced (on day 30) compared to mice transplanted with CD4 A20^{+/+} T cells (Fig. 2F). This transitory enhancement of the systemic inflammatory response and T-cell activation in mice transplanted with A20^{-/-} T cells was not counterbalanced by increased expansion of regulatory T cells (Supporting Information Fig. 3F). Therefore, we speculated whether increasing the dose of transplanted A20-deficient donor T cells would amplify the transitory enhancement of early T-cell-mediated inflammation to a point where reduced GVHD morbidity and mortality in mice transplanted with A20^{-/-} T cells would reverse into the opposite. Indeed, we found reduced survival and enhanced weight loss of recipients transplanted with 2×10^6 A20-deficient donor T cells (Fig. 2G, Supporting Information Fig. 3G). Next, we studied whether CD4⁺ or CD8⁺ T cells contributed to this effect in recipients transplanted with high amounts of A20-deficient T cells and found that both, CD4⁺ or CD8⁺ A20^{-/-} T cells independently increased early mortality and weight loss after allo-HSCT (Fig. 2H, I, Supporting Information Fig. 3H, I).

Enhanced cell death after activation of A20-deficient T cells

We then analyzed the impact of activation on proliferation and survival of naïve CD4⁺ A20^{+/+} and A20^{-/-} T cells in vitro.

During a 5-day culture of 50×10^3 naïve CD4⁺ T cells activated with α -CD3 and α -CD28, absolute numbers of live A20^{+/+} CD4⁺ T cells remained largely unchanged, whereas A20^{-/-} CD4⁺ T-cell numbers were already decreased after 3 days of culture and gradually and significantly decreased further between day 3 and 5 (Fig. 3A). T cell receptor activation induced significantly more cell death in A20^{-/-} CD4⁺ T cells, evident at both 4 and 24 h of culture. Even directly after purification, splenic A20^{-/-} CD4⁺ T cells displayed a significantly higher proportion of dying cells than A20^{+/+} CD4⁺ T cells (Fig. 3B). To mimic T-cell receptor-independent activation *in vivo*, we next injected LPS into the peritoneal cavity of CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} mice, provoking a systemic inflammatory response with unspecific activation of antigen presenting cells, and analyzed absolute numbers of T cells one day later. LPS injection induced a significant reduction of CD4⁺ T cells in CD4 A20^{-/-} mice, whereas CD4⁺ T-cell counts in CD4 A20^{+/+} control mice remained stable (Fig. 3C). Thus, both TCR-dependent and -independent activation rapidly led to a drastic reduction of T cell viability in A20 deficient T cells. Finally, we performed *in vitro* allogeneic mixed lymphocyte reactions to elucidate whether reduced T cell survival could explain reduced GVHD after allo-HSCT. Absolute numbers of CD4⁺ A20^{-/-} T cells were decreased compared to CD4⁺ A20^{+/+} T cells after 5 days of culture with allogeneic dendritic cells (Fig. 3D).

Discussion

Analyzing the outcome of GVHD after allo-HSCT with A20-deficient T cells in mice, we noticed that GVHD severity was drastically reduced. Quantities of A20-deficient CD4⁺ and CD8⁺ donor T cells, although transplanted with equal doses compared to wild-type controls, formed a significantly reduced donor T-cell compartment after transplantation. However, despite reduced overall numbers, a larger proportion of A20-deficient donor CD4⁺ and CD8⁺ T cells produced IFN- γ . These findings indicate more intense effector function accompanied by more pronounced cellular demise of A20-deficient T cells after activation during allo-HSCT.

The milder GVHD phenotype of allo-HSCT recipients transplanted with conventionally dosed A20-deficient T cells was attributable to the reduced absolute numbers of effector T cells as a consequence of their higher susceptibility to cell death. Both direct activation *in vitro* via TCR- and co-stimulation as well as indirect activation of helper T cells *in vivo* after LPS injection (presumably via innate stimulation of APCs) precipitated cellular demise of A20-deficient naïve T cells. We thus propose that during conditioning therapy for allo-HSCT, A20-deficient T cells are primed by activated donor APCs, triggering their activation but also their cell death. This is in line with recent reports indicating that A20 restricts necroptosis and apoptosis after activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells [16, 18]. Reduced survival after TCR- and co-stimulation may thus contribute to reduced T-cell fractions in naïve CD4 A20^{-/-} mice.

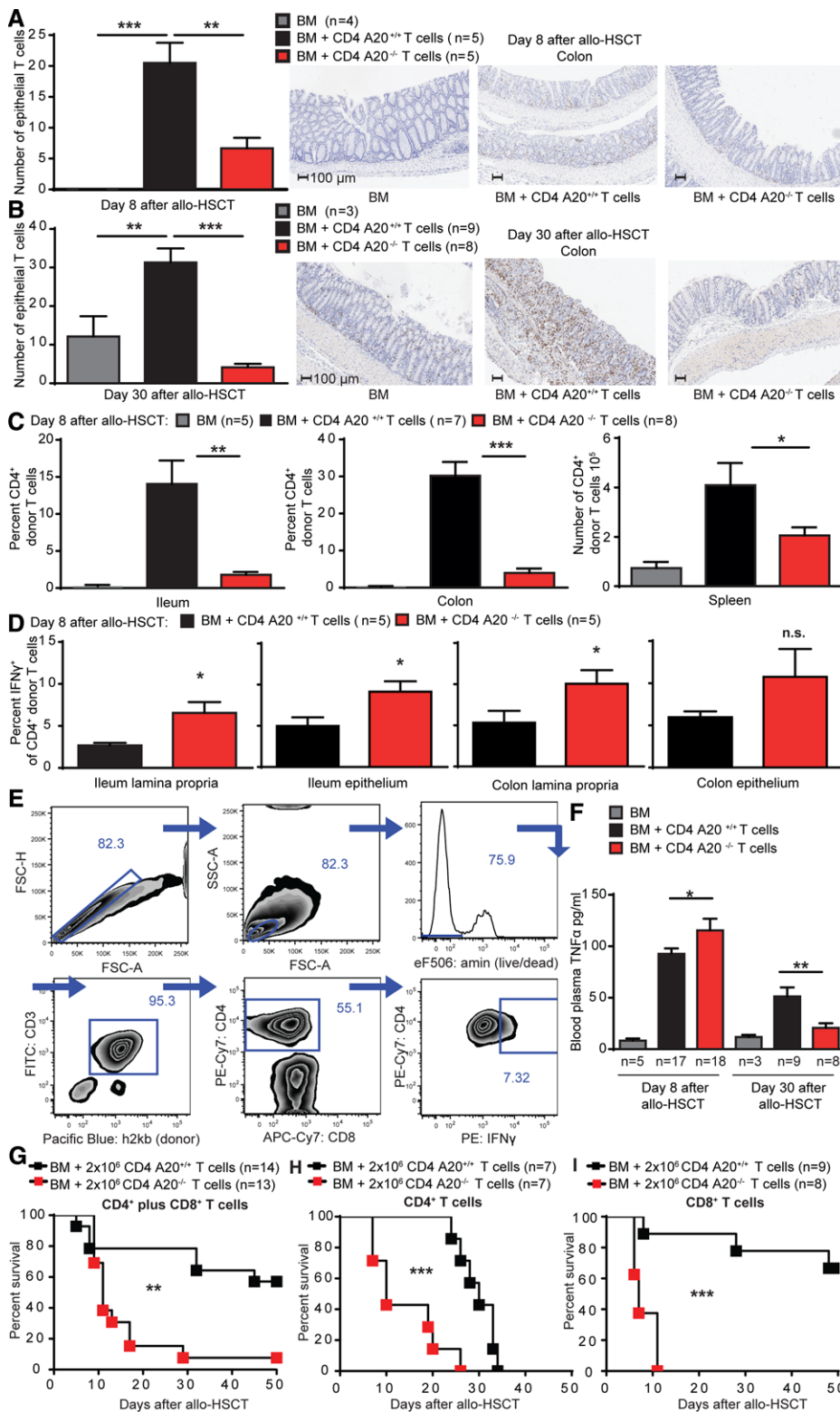


Figure 2. Lack of A20 in T cells augments activation but reduces numbers of infiltrated T cells after transplantation. (A) Immunohistochemical analysis of epithelial CD3⁺ cell infiltration of large intestines on day 8 after allo-HSCT: number of CD3⁺ cells per low power field (left panel), representative images (right panel). Data from 1 experiment with 14 samples. Scale bar: 100 μm (B) Immunohistochemical analysis of epithelial CD3⁺ cell infiltration of large intestines on day 30 after allo-HSCT. Number of CD3⁺ cells per low power field (left panel), representative images (right panel). Data are from one experiment with 20 samples. Scale bar: 100 μm. (C) Percentages of CD4⁺ h2kb⁺ (donor) T cells of all live intestinal intraepithelial cells and absolute numbers of splenic CD4⁺ h2kb⁺ T cells on day 8 after allo-HSCT. Pooled data from two independent experiments with 6–14 samples per experiment. (D) Percentages of IFN-γ⁺ cells of CD4⁺ h2kb⁺ T cells isolated from indicated organs on day 8 after allo-HSCT. Data are representative of 2 experiments with 5–10 samples per experiment. (E) Representative FACS gating strategy to identify donor derived (h2kb⁺) T cells and IFNγ⁺ donor T cells on day 8 after allo-HSCT. Data are representative of two experiments with 6–14 samples per experiment. Depicted FACS plots show small intestinal lamina propria cells of a recipient transplanted with A20^{+/+} T cells. (F) Blood plasma TNF-α levels of recipients on day 8 and 30 after allo-HSCT. Pooled data of 4 independent experiments with 11–34 samples per experiment. (G) Survival after allo-HSCT: Recipients received TBI and TCD-BM with a mixture of either 2 × 10⁶ A20^{+/+} or A20^{-/-} CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Pooled data of two independent experiments with 13–14 samples per experiment. (H) Survival after allo-HSCT: Recipients received TBI and TCD-BM with either A20^{+/+} or A20^{-/-} CD4⁺ T cells. Data are from 1 experiment with 14 samples. (I) Survival after allo-HSCT: Recipients received TBI and TCD-BM with either A20^{+/+} or A20^{-/-} CD8⁺ T cells. Pooled data from two independent experiments with 7–14 samples per experiment. Animal numbers per group (n) are depicted. Data were analyzed using ordinary one-way ANOVA for multiple comparisons and two-tailed unpaired t-test or the Log-rank test (survival). Data are presented as mean ± SEM. Significance was set at p values < 0.05, p < 0.01, and p < 0.001, represented by asterisks (*, ** and ***).

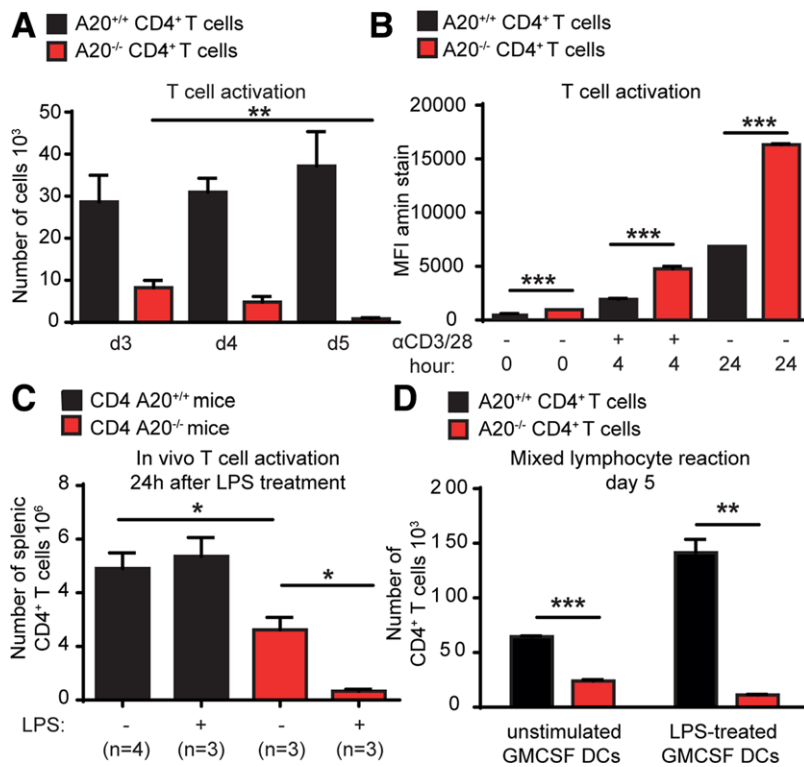


Figure 3. Enhanced cell death after activation of T cells deficient for A20. (A) CD4⁺ CD62L^{high} CD44^{low} A20^{+/+} or A20^{-/-} T cells were cultured *in vitro* in the presence of plate bound α -CD3 and soluble α -CD28 for 5 days. Live absolute cell numbers were determined thereafter using Flow Cytometry Cell Counting Beads. Pooled data of two independent experiments with 14–18 samples per experiment. (B) CD4⁺ A20^{+/+} and A20^{-/-} T cells were cultured *in vitro* as described in Panel A. Cell viability (amine stain) was analyzed 0, 4, and 24 h after start of the culture. Mean fluorescence intensity (MFI) of amine stain was determined by flow cytometry. Data are from one experiment with 12 samples. (C) CD4 A20^{+/+} and CD4 A20^{-/-} recipient mice were either treated with LPS *i.p.* or left untreated and absolute numbers of splenic CD4⁺ T cells were determined 24 h after intervention. Data are representative of two experiments with 13–19 samples per experiment. Animal numbers per group (n) are depicted. (D) Absolute CD4⁺ T-cell numbers on day 5 of mixed lymphocyte cultures containing A20^{+/+} CD4⁺ or A20^{-/-} CD4⁺ T cells (C57BL/6) and dendritic cells (Balb/c) with or without previous activation by LPS. Data are from one experiment with 12 samples. Data were analyzed using ordinary one-way ANOVA for multiple comparisons and two-tailed unpaired t-test. Data are presented as mean \pm SEM. Significance was set at *p* values < 0.05, *p* < 0.01, and *p* < 0.001, represented by asterisks (*, ** and ***).

The increased percentage of IFN- γ -producing T cells after allo-HSCT suggested that A20-deficient T cells were especially prone to activation due to failing negative feedback regulation of NF- κ B, consistent with enhanced CD8⁺ T cell effector function of A20-deficient T cells [15, 16]. However, increased early T cell activation with transiently enhanced local and systemic inflammation is not enduring due to higher susceptibility to cell death, otherwise intrinsically detained by A20. Strikingly, escalating the number of transplanted T cells resulted in paradoxically enhanced mortality of recipients transplanted with A20-deficient CD4⁺ or CD8⁺ T cells early after transplantation. Thus, we demonstrate that A20-deficiency in T cells can provoke paradoxical GVHD phenotypes *in vivo*, depending on the number of A20-deficient T cells involved. Increased inflammation early after activation of a sufficiently large number of A20-deficient T cells may induce irreversible damage before cellular demise can counterbalance those effects. We therefore speculate that A20 in T cells may also modulate the phenotype of other inflammatory disease models, depending on the quantity of T cells involved and their predominance for pathophysiology and clinical outcome mirrored in each model. The observation that A20 deficient T cells, upon stimulation, become hyperactivated and then die, suggests that targeting A20 may allow to tip the balance between T cell-mediated inflammation and T cell demise, with interesting implications not only for GVHD but also graft-versus-tumor (GVT) effects. When it comes to therapeutic modulation of A20, correct target dosage as well as time-point and duration of the intervention will be critical to promote anti-tumor responses and alleviate allo- and autoimmune side effects.

Concluding remarks

Lack of A20 in T cells abrogates GVHD after conventional allo-HSCT due to reduced numbers of donor T cells in GVHD effector organs. Lower T cell numbers are a result of decreased survival of naive A20^{-/-} T cells after activation. However, before they eventually die, A20-deficient T cells display increased inflammatory activity. Targeting A20 in T cells may thus allow complex modulation of T cell mediated inflammatory processes like GVHD and GVT.

Materials and methods

Animals

Mice with lineage specific deficiency of A20 in T cells were generated by breeding A20^{F/F} mice [9] with CD4Cre transgenic mice [21]. Balb/c (h-2kd) mice were purchased from Janvier Laboratories (France). Sex matched mice were used between 6 and 12 weeks of age. Animal protocols were approved by the regulatory agency Regierung von Oberbayern, München, Germany.

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

GVHD experiments were performed as previously described [22] and are summarized in supporting materials. The number of transplanted T cells was chosen as previously described [20].

Histopathology

Evaluation of GVHD pathology was performed essentially as previously described [23] and is summarized in Supporting Materials.

Isolation of intestinal T cells

Experiments were performed essentially as previously described [24] and are summarized in Supporting Materials.

Allogeneic mixed lymphocyte reactions

Mixed lymphocyte reactions were performed as previously described [25] and are summarized in Supporting Materials.

Statistics

GraphPad Prism version 6 was used for statistical analysis. Applied statistical tests are indicated in the figure legends. Significance was set at p values < 0.05 , $p < 0.01$, and $p < 0.001$, represented by asterisks (*, ** and ***). Further information is summarized in Supporting Materials.

Acknowledgements: We thank Marc Schmidt-Supprian for critical input and support. We thank Bernhard Haller for statistical advice. This study was supported by Else-Kröner-Fresenius-Stiftung (2015.A06 to S.S. and 2012.A61 to H.P.), Deutsche Forschungsgemeinschaft (PO 1575/3-1 to H.P. and SFB824 – Z2 to K.S.), German Cancer AID (111620 to H.P.) and the European Hematology Association (to H.P.). V.O. received support from the TUM Medical Graduate Center. S.S. was supported by the Kommission für Klinische Forschung (KKF) of TUM Medical Center. J.C.F. designed, performed and analyzed experiments, introduced V.O. into lab techniques and wrote the manuscript. V.O. performed, analyzed and helped to design experiments. K.S. and J.S.-H. analyzed histopathological experiments. M.S. helped to perform experiments. C.P., R.B. and G.v.L. provided critical input and further help. S.S. initiated the study, performed and analyzed experiments. H.P., T.H. and S.S. wrote the manuscript and guided the study.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Blazar, B. R., Murphy, W. J. and Abedi, M., Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012. 12: 443–458.
- Heidegger, S., van den Brink, M. R., Haas, T. and Poeck, H., The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Front Immunol* 2014. 5: 337.
- Ben-Neriah, Y. and Karin, M., Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol* 2011. 12: 715–723.
- Catrysse, L., Vereecke, L., Beyaert, R. and van Loo, G., A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol* 2014. 35: 22–31.
- Lee, E. G., Boone, D. L., Chai, S., Libby, S. L., Chien, M., Lodolce, J. P. and Ma, A., Failure to regulate TNF-induced NF-kappa B and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 2000. 289: 2350–2354.
- Chu, Y., Vahl, J. C., Kumar, D., Heger, K., Bertossi, A., Wojtowicz, E., Soberon, V. et al., B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood* 2011. 117: 2227–2236.
- Tavares, R. M., Turer, E. E., Liu, C. L., Advincula, R., Scapini, P., Rhee, L., Barrera, J. et al., The ubiquitin modifying enzyme A20 restricts B cell survival and prevents autoimmunity. *Immunity* 2010. 33: 181–191.
- Kool, M., van Loo, G., Waelput, W., De Prijck, S., Muskens, F., Sze, M., van Praet, J. et al., The ubiquitin-editing protein A20 prevents dendritic cell activation, recognition of apoptotic cells, and systemic autoimmunity. *Immunity* 2011. 35: 82–96.
- Vereecke, L., Sze, M., Mc Guire, C., Rogiers, B., Chu, Y., Schmidt-Supprian, M., Pasparakis, M. et al., Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *J Exp Med* 2010. 207: 1513–1523.
- Wellcome Trust Case Control, C., Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007. 447: 661–678.
- Musone, S. L., Taylor, K. E., Lu, T. T., Nititham, J., Ferreira, R. C., Ortmann, W., Shifrin, N. et al., Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2008. 40: 1062–1064.
- Graham, R. R., Cotsapas, C., Davies, L., Hackett, R., Lessard, C. J., Leon, J. M., Burt, N. P. et al., Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2008. 40: 1059–1061.
- Matmati, M., Jacques, P., Maelfait, J., Verheugen, E., Kool, M., Sze, M., Geboes, L. et al., A20 (TNFAIP3) deficiency in myeloid cells triggers erosive polyarthritis resembling rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2011. 43: 908–912.
- Schmitz, R., Hansmann, M. L., Bohle, V., Martin-Subero, J. I., Hartmann, S., Mechtersheimer, G., Klapper, W. et al., TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med* 2009. 206: 981–989.
- Giordano, M., Roncagalli, R., Bourdely, P., Chasson, L., Buferne, M., Yamasaki, S., Beyaert, R. et al., The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. *PNAS* 2014. 111: 11115–11120.
- Just, S., Nishanth, G., Buchbinder, J. H., Wang, X., Naumann, M., Lavrik, I. and Schluter, D., A20 Curtails Primary but Augments Secondary CD8+ T Cell Responses in Intracellular Bacterial Infection. *Sci Rep* 2016. 6: 39796.
- Matsuzawa, Y., Oshima, S., Takahara, M., Maeyashiki, C., Nemoto, Y., Kobayashi, M., Nibe, Y. et al., TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting mTOR and promoting autophagy. *Autophagy* 2015. 11: 1052–1062.
- Onizawa, M., Oshima, S., Schulze-Topphoff, U., Osés-Prieto, J. A., Lu, T., Tavares, R., Prodhomme, T. et al., The ubiquitin-modifying enzyme A20 restricts ubiquitination of the kinase RIPK3 and protects cells from necroptosis. *Nat Immunol* 2015. 16: 618–627.

- 19 Drennan, M. B., Govindarajan, S., Verheugen, E., Coquet, J. M., Staal, J., McGuire, C., Taghon, T. et al., NKT sublineage specification and survival requires the ubiquitin-modifying enzyme TNFAIP3/A20. *J Exp Med* 2016. 213: 1973–1981.
- 20 Schroeder, M. A. and DiPersio, J. F., Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech* 2011. 4: 318–333.
- 21 Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Perez-Melgosa, M. et al., A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 2001. 15: 763–774.
- 22 Fischer, J. C., Wintges, A., Haas, T. and Poeck, H., Assessment of mucosal integrity by quantifying neutrophil granulocyte influx in murine models of acute intestinal injury. *Cell Immunol* 2017 316: 70–76.
- 23 Hill, G. R., Crawford, J. M., Cooke, K. R., Brinson, Y. S., Pan, L. and Ferrara, J. L., Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997. 90: 3204–3213.
- 24 Fischer, J. C., Bscheider, M., Eisenkolb, G., Lin, C. C., Wintges, A., Otten, V., Lindemans, C. A. et al., RIG-I/MAVS and STING signaling promote gut integrity during irradiation- and immune-mediated tissue injury. *Sci Transl Med* 2017. 9.
- 25 Spoerl, S., Mathew, N. R., Bscheider, M., Schmitt-Graeff, A., Chen, S., Mueller, T., Verbeek, M. et al., Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease. *Blood* 2014. 123: 3832–3842.

Abbreviations: **allo-HSCT:** Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation · **APC:** Antigen presenting cell · **BM:** Bone marrow · **DC:** Dendritic cells · **GVHD:** Graft-versus-host disease · **GVT:** Graft-versus-tumor · **NKT cell:** Natural killer T cell · **TBI:** Total body irradiation · **TCD-BM:** T cell depleted bone marrow · **TCR:** T cell receptor

Full correspondence: Dr. Silvia Spoerl, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Strasse 22, 81675 München, Germany
e-mail: silvia.spoerl@tum.de

Additional correspondence: Dr. Tobias Haas, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Strasse 22, 81675 München, Germany
e-mail: tobias.haas@tum.de

Additional correspondence: Dr. Hendrick Poeck, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Strasse 22, 81675 München, Germany
e-mail: hendrik.poeck@tum.de

Received: 24/12/2016

Revised: 29/6/2017

Accepted: 2/8/2017

Accepted article online: 22/8/2017

This is a License Agreement between Vera Otten ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the CCC Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the CCC Terms and Conditions below.

Order Date	28-Mar-2022	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1204259-1	Publisher	WILEY - V C H VERLAG
ISSN	1521-4141	Portion	GMBH & CO. KGAA Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	European journal of immunology	Publication Type	e-Journal
Article Title	A20 deletion in T cells modulates acute graft-versus-host disease in mice.	Start Page	1982
Author/Editor	European Federation of Immunological Societies.	End Page	1988
Date	01/01/1971	Issue	11
Language	English	Volume	47
Country	Germany	URL	http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jhome/25061
Rightsholder	John Wiley & Sons - Books		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product and any product related to main product
Page range(s)	1-7	Distribution	Worldwide
Total number of pages	7	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	The role of A20 in T cells in the differentiation of regulatory T cells in the thymus and the development of akute graft versus host disease	Institution name	Technical University Munich
		Expected presentation date	2023-03-01

Instructor name Vera Otten

ADDITIONAL DETAILS

The requesting person / organization to appear on the license Vera Otten

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	entire article	Title of the article/chapter the portion is from	A20 deletion in T cells modulates acute graft-versus-host disease in mice.
Editor of portion(s)	Fischer, Julius C.; Otten, Vera; Steiger, Katja; Schmickl, Martina; Slotta-Huspenina, Julia; Beyaert, Rudi; Loo, Geert; Peschel, Christian; Poeck, Hendrik; Haas, Tobias; Spoerl, Silvia	Author of portion(s)	Fischer, Julius C.; Otten, Vera; Steiger, Katja; Schmickl, Martina; Slotta-Huspenina, Julia; Beyaert, Rudi; Loo, Geert; Peschel, Christian; Poeck, Hendrik; Haas, Tobias; Spoerl, Silvia
Volume of serial or monograph	47	Publication date of portion	2017-11-01
Page or page range of portion	1982-1988		

RIGHTSHOLDER TERMS AND CONDITIONS

No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto. You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley material. This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process. In no instance may the total amount of Wiley Materials used in any Main Product, Compilation or Collective work comprise more than 5% (if figures/tables) or 15% (if full articles/chapters) of the (entirety of the) Main Product, Compilation or Collective Work. Some titles may be available under an Open Access license. It is the Licensors' responsibility to identify the type of Open Access license on which the requested material was published, and comply fully with the terms of that license for the type of use specified Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>.

CCC Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.

3. Scope of License; Limitations and Obligations.

- 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.
- 3.2. General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 29118 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.
- 3.3. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).
- 3.4. In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.
- 3.5. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. " Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.
- 3.6. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.
5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.
6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.
7. Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.
8. Miscellaneous.
 - 8.1. User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.
 - 8.2. Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here:<https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/privacy-policy>
 - 8.3. The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.
 - 8.4. No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating

procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

- 8.5. The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to support@copyright.com.

v 1.1