

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung und Phänotypisierung humaner IL-21  
produzierender CD4+ T-Lymphozyten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ilko Kastir

aus

Bad-Saarow-Pieskow

Datum der Promotion: 22.06.2014

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Das Immunsystem.....	4
1.2 Das angeborene Immunsystem .....	4
1.3 Das erworbene Immunsystem .....	5
1.4 Primäre und sekundäre Lymphorgane.....	6
1.5 Entstehung von T-Lymphozyten.....	6
1.6 Der T-Zell Rezeptor .....	7
1.6 Antigene und der erste Kontakt.....	9
1.7 CD4+ T-Zellen .....	10
1.8 Differenzierung von CD4 + T-Zellen.....	11
1.9 Interleukin 21 .....	15
<b>2. Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
3.1 Material .....	19
3.2 Methoden .....	23
3.2.1 Isolation von mononukleären Zellen mit Dichtegradientenzentrifugation .....	24
3.2.2 Anreicherung der CD4+ T-Zellen mit immunmagnetischer Separation.....	25
3.2.3 Analyse und Isolation der CD4+ T-Zellen mit FACS.....	26
3.2.4 Zellzählung .....	31
3.2.5 Zellkultur .....	31
3.2.5.1 Stimulation bzw. Restimulation mittels Phorbol-12,13-Dibutyrat (PdBu) und Ionomycin.....	31
3.2.5.2 <i>In vitro</i> Stimulation und Polarisierung von naiven CD4+ T-Lymphozyten .....	32
3.2.6 Statistik .....	33
<b>3.3 Software</b> .....	<b>33</b>

---

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1 Untersuchung von humanen CD4+ T-Zellen des peripheren Blutes auf Produktion von IL-21</b> ..	<b>34</b>
4.1.1 Naive CD4+ T-Zellen produzieren kein IL-21 .....	35
4.1.2 CD4+ T-Gedächtniszellen produzieren IL-21 .....	36
4.1.3 Alle CD4+ T-Helfer-Zell-Subsets produzieren IL-21 .....	37
<b>4.2 Untersuchung humaner CD4+ T-Gedächtniszellen sekundärer Lymphorgane (Tonsille)</b> . .....	<b>41</b>
4.2.1 Tonsilläre CD4+ T-Gedächtniszellen produzieren in stärkerem Maße IL-21 .....	41
4.2.2 Tfh- und Nicht-Tfh-Zellen produzieren IL-21 .....	43
<b>4.3 Induktion der IL-21 Expression in humanen CD4+ naiven T-Zellen des peripheren Blutes</b> . .....	<b>45</b>
4.3.1 IL-12 induziert IL-21 Produktion in naiven CD4+ T-Zellen .....	46
4.3.2 IL-6 und IL-21 induzieren IL-21 Produktion, aber nicht in allen Spendern .....	48
4.3.3 IL-6 ist nicht für die spontane IL-21 Produktion verantwortlich.....	54
4.3.4 IL-6 und IL-21 hemmen die Produktion von IFN- $\gamma$ in naiven CD4+ T-Zellen.....	54
4.3.5 IL-10 induziert die Expression von IL-21 in naiven CD4+ T-Zellen .....	56
4.3.6 TGF- $\beta$ hemmt die Entstehung von IL-21 produzierenden Zellen .....	58
4.3.7 Spontanproduktion ist nicht auf Kontamination mit antigenerfahrenen Zellen zurückzuführen.....	59
4.3.8 Naive CD4+ T-Zellen Neugeborener produzieren unter neutralen Bedingungen kein IL-21.....	60
4.3.9 IL-21 Spontanproduktion korreliert mit erhöhter STAT3 Phosphorylierung.....	62
4.3.10 Neutralisierung von IL-21 reduziert die spontane STAT3 Phosphorylierung und IL-21 Produktion	65
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>67</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>82</b>
<b>7. Erklärung</b> .....	<b>92</b>
<b>8. Lebenslauf</b> .....	<b>93</b>
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>94</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Um ein Individuum effektiv vor Krankheiten zu schützen, muss das Immunsystem folgende Eigenschaften besitzen. i) Es muss in der Lage sein, potentielle Pathogene zu erkennen. ii) Das Immunsystem muss mit zahlreichen Effektorfunktionen ausgestattet sein, um verschiedene infektiöse Pathogene zu eliminieren. iii) Eine Regulation des Ausmaßes der Immunreaktion, sowie die Differenzierung zwischen körpereigenen und fremd ist von Nöten. iiiii) Eine einzigartige Eigenschaft des Immunsystems ist die Fähigkeit, ein immunologisches Gedächtnis zu generieren, welches zu einer schnelleren und effizienteren Immunantwort führt. (Murphy, K. 2008)

Die erste Verteidigungslinie gegen potentielle Pathogene stellen als physikalische und chemische Barrieren die Epithelien der Körperoberfläche einschließlich der Atemwege, des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts dar. Sekretionsprodukte von Haut- und Schleimhautdrüsen wie bakterizid wirksame Fettsäuren, Magensäure, Mucos und Enzyme halten Mikroben davon ab, in den Körper einzudringen bzw. töten sie schon auf dessen Oberfläche ab. Diese werden generell noch nicht als Teil des Immunsystems bezeichnet, welches erst zum Einsatz kommt, wenn diese Barrieren überwunden werden (Murphy, K. 2008).

Alle Zellen des Immunsystems entstehen im Knochenmark aus so genannten pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen. Diese teilen sich und differenzieren in Vorläuferzellen unterschiedlicher Leukozytentypen.

## 1.2 Das angeborene Immunsystem

Den ersten Abwehrmechanismus gegen eingedrungene Pathogene stellt das angeborene Immunsystem dar. Es ist nicht antigenspezifisch und reagiert innerhalb Minuten und Stunden. Geweberesidente Makrophagen sind die ersten Zellen, die auf Eindringlinge reagieren, während neutrophile Granulozyten später zum Ort der Infektion rekrutiert werden. Diese Zellen sind in der Lage Pathogene zu erkennen, zu phagozytieren und sie durch die Produktion von toxischen Substanzen und degradierenden Enzymen zu töten (Ezekowitz RAB 1998). Außer den neutrophilen gehören noch die basophilen und eosinophilen zur Klasse der Granulozyten. Ihre

Granula enthalten präformierte Effektormoleküle, die nach Aktivierung der Zelle ausgeschüttet werden. Eosinophile und Basophile sind wichtig bei der Abwehr gegen Parasiten, die zu groß sind, um von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten phagozytiert zu werden (Murphy K 2008). Neben Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sind dendritische Zellen eine dritte Klasse von phagozytierenden Zellen. Unausgereift verlassen sie das Knochenmark, um über das Blut zu den Geweben zu gelangen. Sie nehmen sowohl Partikel (Phagozytose), als auch große Mengen extrazellulärer Flüssigkeit (Pinozytose) auf und degradieren aufgenommene Proteine zu Peptiden, um diese auf ihrer Oberfläche T-Zellen zu präsentieren. Sie tun dies, indem sie die Peptide auf ihrer Zelloberfläche an bestimmte Moleküle, den MHC Molekülen, binden. An MHC Moleküle gebundene Peptide werden dann von T-Lymphozyten erkannt, wodurch diese aktiviert werden können. Auf der Oberfläche der dendritischen Zellen befinden sich Liganden für Rezeptoren auf T-Zellen, deren Bindung ein kostimulatorisches Signal darstellt, das Voraussetzung für eine adäquate Aktivierung ist. Da nur dendritische Zellen diese Liganden tragen, sind sie die einzigen Zellen, die naive T-Zellen aktivieren können. Deshalb werden sie auch als professionell Antigen präsentierende Zellen (APZ) bezeichnet. (Banchereau J 1998) (Murphy K 2008)

Dendritische Zellen sind, wie auch andere Zellen des angeborenen Immunsystems, mit einer Vielzahl von sogenannten pattern recognition receptors (PRRs), wie z.B. Toll-like Rezeptoren (TLR), Nod-like Rezeptoren (NLR) und C-type lectin Rezeptoren (CLR) ausgestattet, um pathogenassoziierte molekulare Strukturen (PAMPs), wie Lipopolysaccharide (LPS) der bakteriellen Zellwand oder virale doppelsträngige RNA als „fremd“ zu erkennen (Janeway CA 2002). Sie sezernieren daraufhin Effektormoleküle und erlangen einen Reifegrad, der die effektive Aktivierung von T-Zellen ermöglicht. Damit sind sie die wichtigste Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunreaktion (Banchereau J 1998). Zu den Zellen die ebenfalls zur Antigenpräsentation fähig sind, gehören Makrophagen und B-Lymphozyten. Diese sind aber nicht befähigt, die Differenzierung der naiven T-Zellen einzuleiten.

### **1.3 Das erworbene Immunsystem**

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem reagiert das erworbene Immunsystem erst nach einer Zeit der Aktivierung. Dafür ist das erworbene Immunsystem in der Lage, Infektionen effizient zu eliminieren und ein Gedächtnis zu generieren. Das erworbene

Immunsystem gliedert sich in zelluläre und humorale Bestandteile. Die Zellen des erworbenen Immunsystems sind die T- und B-Lymphozyten, während die von B-Lymphozyten produzierten Antikörper den humoralen Teil darstellen. Antikörper und aktivierte Lymphozyten, die im Laufe einer erworbenen Immunantwort produziert werden, überdauern die ursprüngliche Infektion und schützen vor einer Reinfektion mit dem gleichen Pathogen sogar nach vielen Jahren, dann ist die Immunantwort sowohl schneller als auch effizienter. (Bonilla FA 2010)

#### **1.4 Primäre und sekundäre Lymphorgane**

Thymus und Knochenmark sind die Orte der Bildung und Reifung von Lymphozyten, und werden als primäre Lymphorgane bezeichnet. Die Gewebe des Körpers, in denen spezifische Immunantworten initiiert werden, sind sekundäre Lymphorgane. Zu ihnen gehören die Milz, Lymphknoten, Tonsillen und Mukosa assoziierte lymphatische Gewebe (MALT) wie die Peyer's Patches im Darm und diffus verteilte Lymphfollikel in der Schleimhaut der Atem-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakte. Um eine antigenspezifische Immunantwort zu initiieren, müssen Pathogene aufgenommen und vom Ort der Infektion zu den sekundären lymphatischen Organen gebracht werden. Dies passiert mit Hilfe der dendritischen Zellen, die vom Eintrittsort über die Lymphe zu den sekundären lymphatischen Organen migrieren. Pathogene, die ins Blut eintreten, werden von APZ in der Milz aufgenommen. Pathogene die über Schleimhäute eintreten, werden direkt durch die Schleimhaut in die MALT, Tonsillen oder Peyer's Patches transportiert. (Murphy K 2008)

#### **1.5 Entstehung von T-Lymphozyten**

Die Reifung der Lymphozyten findet an unterschiedlichen Orten statt. Während die B-Lymphozyten oder auch B-Zellen im Knochenmark (bonemarrow) bleiben, wandern die Vorläufer der T-Lymphozyten (T-Zellen) in den Thymus, wo sie ausreifen. In jedem reifenden Lymphozyt wird eine einzigartige Variante des Antigenrezeptors generiert. Damit exprimiert die Population von Lymphozyten ein riesiges Repertoire an Rezeptoren mit extrem speziellen Antigenbindungsstellen (Murphy K 2008). Während des Reifungsprozesses durchläuft jeder Lymphozyt mehrere Schritte, die als positive und negative Selektion bezeichnet werden, in denen sichergestellt wird, dass die Spezifität ihrer Antigenrezeptoren nicht gegen körpereigene Strukturen gerichtet ist und dass die Rezeptoren funktionsfähig sind. (Wagner DH 2007) (Casellas R 2001)

(Murphy K 2008) Erst nach Ausreifung und Bestehen dieses Siebungsmechanismus werden die Lymphozyten in den Körperkreislauf entlassen. Lymphozyten, die noch nie Kontakt mit ihrem Antigen hatten, werden als naive Lymphozyten bezeichnet. Diejenigen, die durch ihr Antigen aktiviert wurden, differenziert sind und ihre volle Funktionsfähigkeit erreicht haben, werden als Effektor Lymphozyten bezeichnet. Während einer Immunantwort differenzieren auch einige der aktivierten Lymphozyten in Gedächtniszellen. Diese Lymphozyten sind für das immunologische Gedächtnis oder auch Immunität verantwortlich, das nach Infektion oder Impfung entsteht. Gedächtniszellen werden zu voll funktionsfähigen Effektor Lymphozyten differenzieren, wenn sie ein zweites Mal mit ihrem Antigen in Kontakt kommen, das kann auch viele Jahre oder Jahrzehnte später sein. (Hammarlund E 2003) (Murphy K 2008)

Während des Reifungsprozesses im Thymus können sich T-Zellen zu einem von drei T-Zelltypen entwickeln: T-Helfer-Zellen, zytotoxische und regulatorische T-Zellen. Zytotoxische T-Zellen töten Zellen, die mit Viren oder intrazellulären Pathogenen infiziert sind. T-Helfer-Zellen liefern Signale, die antigenstimulierte B-Zellen aktivieren. Sie können auch andere T-Zellen oder Makrophagen auf eine Weise stimulieren, die diesen Zellen hilft, effektiver gegen Pathogene vorzugehen. (Murphy K 2008) Regulatorische T-Zellen unterdrücken die Aktivität anderer Lymphozyten und tragen zur Kontrolle der Immunantwort bei indem sie eine unerwünschte inflammatorische Reaktion verhindern. Vor allem verhindern sie Reaktionen gegen körpereigene Strukturen im Sinne einer Autoimmunität. (Sakaguchi S 2006) (Fontenot JD 2005)

## **1.6 Der T-Zell Rezeptor**

Im Gegensatz zu Immunglobulinen, die mit Pathogenen oder deren toxischen Produkten in den extrazellulären Räumen des Körpers interagieren, erkennen T-Zellen ausschließlich Antigene, die auf den Zelloberflächen körpereigener Zellen präsentiert werden. Diese Antigene stammen von Viren oder intrazellulären Bakterien, die in der Zelle replizieren oder von Bestandteilen von Pathogenen bzw. Substanzen, die endozytiert wurden. Jede T-Zelle trägt etwa 30.000 identische TZR auf ihrer Oberfläche. Diese setzen sich aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten, der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zusammen und sind für die Antigenerkennung durch die T-Zelle zuständig. Im Unterschied zu Immunglobulinen werden TZR niemals sekretiert und auch die Antigenerkennung unterscheidet sich von ihnen. Während Igs normalerweise an die

Oberfläche von Proteinantigenen binden, reagieren TZR auf relativ kurze kontinuierliche Aminosäuresequenzen. Diese liegen oft innerhalb der nativen Struktur der Proteine verborgen und können nur erkannt werden, wenn die Proteine denaturiert, in Fragmente prozessiert wurden und auf der Oberfläche der Antigen präsentierenden Zelle an MHC-Moleküle gebunden sind. (Murphy K 2008) (Davis MM 1998)

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette des TZR allein sind nicht in der Lage einen funktionsfähigen Rezeptor zu etablieren, dazu sind weitere Moleküle notwendig. Dies ist erstens der CD3 Komplex, der allen T-Zellen eigen ist und für die Rekrutierung der intrazellulären Signalproteine zuständig ist (Call ME 2002). Zweitens ist ein Korezeptor notwendig, um das MHC-Molekül zu binden, welches das Antigen präsentiert. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen MHC I und MHC II, welche sich beide in Struktur und Expressionsmuster auf den Zelltypen des Körpers unterscheiden. MHC Moleküle der Klasse I präsentieren Peptide intrazellulärer Pathogene, meist Viren. Da Viren jede kernhaltige Zelle infizieren können, tragen so gut wie alle kernhaltigen Zellen MHC I Moleküle. Der Korezeptor CD8 bindet MHC I und befindet sich auf zytotoxischen T-Zellen. Diese sind darauf spezialisiert, infizierte oder entartete Zellen zu töten. MHC II Moleküle sind normalerweise auf B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen zu finden, Zellen, die aktiv an der Immunantwort beteiligt sind. Sie werden nicht oder nur selten von Zellen anderer Gewebe exprimiert. Der Korezeptor CD4 wird von T-Helfer-Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert und erkennt MHC II Komplexe. Während der Antigenerkennung assoziieren CD4 bzw. CD8 einerseits mit dem TZR und binden andererseits die MHC Moleküle der Antigen präsentierenden Zelle. (Zamoyska R 1998)

Die Aktivierung des bisher beschriebenen TZR-Komplexes ist nicht effizient genug, um naive T-Zellen zu aktivieren. Dazu ist die Stimulation sogenannter kostimulatorischer Rezeptoren, deren Liganden, sich auf DZs befinden, notwendig. Der wichtigste kostimulatorische Rezeptor ist CD28. Er erkennt CD80 und CD86 auf der Oberfläche der DZs. Um aktiviert zu werden muss die naive T-Zelle also beides, Antigen und einen kostimulatorischen Liganden auf derselben dendritischen Zelle binden. (Bour-Jordan H 2002) Damit ist klar, dass naive T-Zellen nur durch professionelle APZ, die DZs, aktiviert werden können und nicht von anderen Zellen, die das Antigen auf ihrer Oberfläche tragen. Erst nach Aufnahme und Aktivierung durch Pathogene exprimieren dendritische Zellen diese kostimulatorischen Liganden. Somit ist sichergestellt, dass naive T-Zellen nur als Antwort auf eine Infektion aktiviert werden.

Die vollständige Aktivierung des TZR Komplexes, des Korezeptors und der kostimulatorischen Rezeptoren stößt eine Signalkaskade an, die über mehrere Wege zur Aktivierung der drei wichtigsten T-Zell typischen Transkriptionsfaktoren NFκB, AP-1 und NFAT führt und dafür sorgt, dass die Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus eintritt. (Murphy K 2008)

## 1.6 Antigene und der erste Kontakt

Um aus dem Blut in sekundäre lymphatische Organe eintreten zu können, müssen Lymphozyten an die Epithelzellen sogenannter hochendothelialer Venülen (HEVs) binden. Diese Zell-Zell Kontakte werden von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Lymphozyten und HEV-Zellen und durch von letzteren ausgeschüttete Zytokine und Chemokine vermittelt. Zu den wichtigsten gehören Adhäsionsmoleküle der Klassen der Selektine und Integrine, die es den Lymphozyten ermöglichen, durch den Vorgang der Diapedese die Gefäßwände zu durchqueren und die T-Zell-Zonen der lymphatischen Gewebe zu betreten. Naive T-Zellen tragen den Chemokinrezeptor CCR7, der das von HEV-Zellen und Stromazellen der T-Zell-Zonen exprimierte Zytokin CCL21 bindet. Effektorzellen haben beispielsweise nur noch eine geringe Expression des CCR7 und können so nicht mehr in lymphatisches Gewebe eintreten. Sie exprimieren nun Rezeptoren, die am Ort der Infektionen ihre Liganden finden und den Eintritt in diese ermöglichen. (Rosen SD 2004) Ein Marker anhand dessen naive von antigenenerfahrenen T-Zellen unterschieden werden können, ist die membranständige Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45. Sie tritt in mehreren Isoformen auf, deren Expressionen in Zusammenhang mit dem Reifegrad von T-Zellen gebracht wird. Die Isoform CD45RA wird auf antigenunerfahrenen Zellen exprimiert und es wird angenommen, dass T-Zellen, die den Thymus verlassen, CD45RA aufweisen. Nach Aktivierung wird die RA Isoform sehr schnell herabreguliert und durch die CD45RO Isoform ersetzt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich auch innerhalb der Population von CD45RA+ T-Zellen einige Zellen befinden, die funktionelle Eigenschaften haben, die eigentlich Gedächtniszellen eigen sind. (Reen DJ 1998)

Naive T-Zellen, die gereift den Thymus verlassen haben, zirkulieren nun ständig vom Blut in die sekundären lymphatischen Organe, kontaktieren dabei täglich tausende von dendritischen Zellen und untersuchen die MHC:Peptid Komplexe auf der Suche nach ihrem Antigen. Trifft eine naive T-Zelle auf ihr Antigen, präsentiert von einer reifen

dendritischen Zelle, proliferiert sie für mehrere Tage. Bei diesem auch klonale Expansion genannten Vorgang entstehen viele Zellen eines Klonen, d.h. T-Zellen, die alle denselben TZR tragen und für dasselbe AG spezifisch sind. Gleichzeitig setzt auch ein Differenzierungsprozess ein, an dessen Ende funktionsfähige Effektor T-Zellen entstehen, die nun in der Lage sind, die sekundären lymphatischen Organe zu verlassen, ins Blut einzutreten und an den Ort der Infektion zu wandern. (Murphy K 2008)

## 1.7 CD4+ T-Zellen

CD4+ T-Zellen regulieren die Aktivität der Zellen des Immunsystems.

Eine ihrer wichtigsten Aufgaben ist die B-Zell-Hilfe. Die Aktivierung einer B-Zelle durch ein Antigen erfordert meistens die Bindung des Antigens an den BZR und die Interaktion der B-Zelle mit einer antigenspezifischen T-Helfer-Zelle. CD4+ T-Helfer-Zellen erkennen die Peptid:MHC II Komplexe auf der B-Zelle und stimulieren diese durch Bindung von CD40 Ligand an den kostimulatorischen B-Zell-ständigen Rezeptor CD40 und durch Ausschüttung von Zytokinen. T-Helfer-Zellen induzieren auf diese Weise die Proliferation der B-Zelle und leiten die Differenzierung in antikörperproduzierende Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen ein und beeinflussen Immunglobulinklassenwechsel oder aber somatische Hypermutation. Diese T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung führt zur Entstehung von B-Gedächtniszellen und Plasmazellen, die hoch affine Antikörper produzieren. (Parker DC 1993) (McHeyzer-Williams M 2003) Einige Antigene sind in der Lage, B-Zellen ohne T-Zell-Hilfe zu aktivieren. Dieser T-Zell unabhängige Prozess ist wichtig bei der Abwehr gegen Pathogen, die keine T-Zell Antwort auslösen können, hierbei entstehen jedoch niedrig affine Antikörper, keine B-Gedächtniszellen und die Induktion zum Klassenwechsel ist nur begrenzt möglich. (Murphy K 2008)

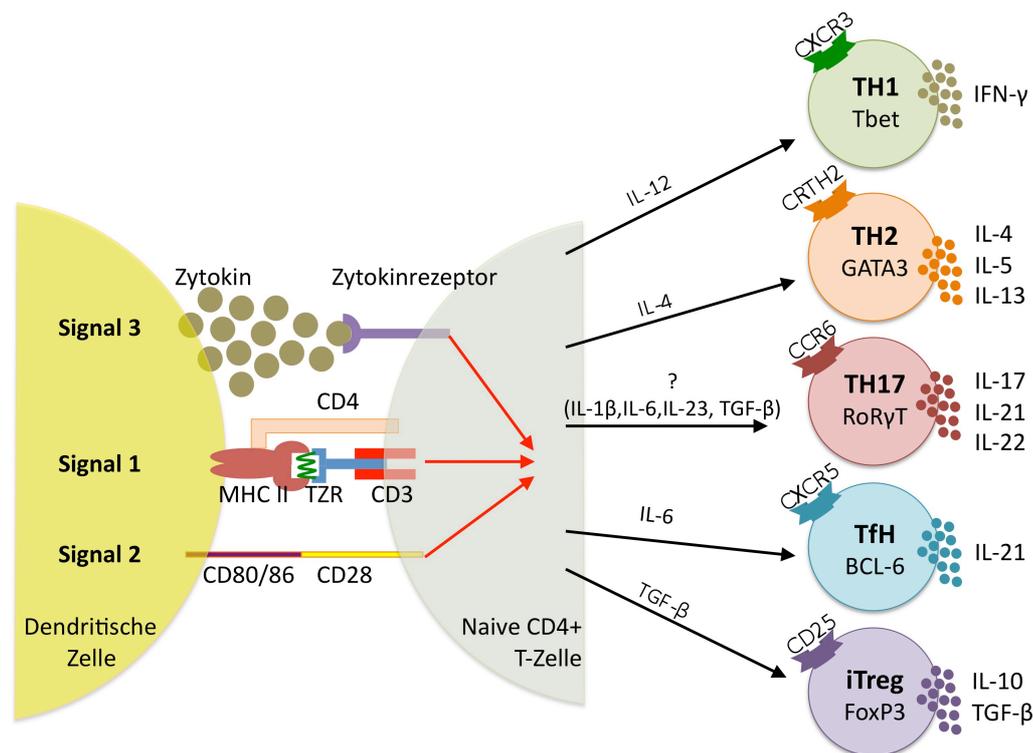
Außerdem induzieren CD4+ T-Helfer-Zellen die Reifung von Makrophagen, rekrutieren neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten zu den Orten der Infektion und Entzündung und beeinflussen die Proliferation und Aktivität der CD8+ zytotoxischen T-Zellen (Zhu J 2008).

## 1.8 Differenzierung von CD4 + T-Zellen

Weitere Eigenschaften, die Effektorzellen während der Differenzierung erlangt haben, sind die Aktivierbarkeit durch ihr Antigen ohne kostimulatorische Moleküle und die Veränderung der Expressionsmuster ihrer Oberflächenmoleküle, wie Adhäsionsmoleküle, Chemokin- und Zytokinrezeptoren, und ihrer Zytokine. CD4+ naive T-Zellen differenzieren in verschiedene Subsets mit unterschiedlichen Funktionen, sie dirigieren durch ihre Zytokinproduktion die volle Pracht des Immunsystems. (Zhu J 2008)

Mosman und Coffman zeigten 1986, dass CD4+ T-Zellen in 2 Gruppen unterteilt werden können. Zum einen in als T-Helfer-Zellen der Klasse 1 (Th1 Zellen) bezeichnete IFN- $\gamma$  produzierende Zellen, und zum anderen in IL-4 produzierende Th2 Zellen. Damit wurde klar, dass CD4+ T-Zellen nicht eine einheitliche Zellpopulation darstellen, sondern sich aus unterschiedlichen Zelllinien mit unterschiedlichen Funktionen und Eigenschaften zusammensetzen. (Mosmann TR 1986)

Seit dem sind weitere CD4+ T-Zell-Subsets mit spezifischen Eigenschaften entdeckt worden, womit das Th1/Th2 Paradigma erweitert wurde. Naive CD4+ T-Zellen haben das Potential, sich in eine von fünf und möglicherweise mehr Richtungen zu entwickeln, die durch die Signale, die sie während ihrer initialen Aktivierung erhalten, bestimmt werden. Diese Signale erhalten naive CD4+ T-Zellen von Zellen des angeborenen Immunsystems. Für eine adäquate Stimulation, die zur Differenzierung von Effektorzellen führt, sind 3 Signale notwendig. Als Signal 1 wird die Bindung der T-Zellen mit ihrem TZR an das spezifische von der DZ auf MHCII präsentierte Antigen bezeichnet. Die Aktivierung des kostimulatorischen Rezeptors CD28 ist als Signal 2 bekannt. Fehlt dieses Signal, wird die aktivierte T-Zelle anerg. In Abhängigkeit von dem phagozytierten Pathogen schütten aktivierte Immunzellen unterschiedliche Zytokine aus, die als Signal 3 die Differenzierung in eine der unterschiedlichen Subsets bestimmen. (Kapsenberg ML 2003)



**Bild 1) Differenzierung von CD4+ T-Helfer-Zellen**

Bis zu diesem Punkt sind fünf Subsets von CD4+ T-Zellen bekannt (Bild 1). Dazu gehören die CD4+ T-Helfer-Zellen Subsets Th1, Th2 und Th17, die folliculären T-Helfer-Zellen (Tfh) und die CD4+ regulatorischen T-Zellen (Treg).

Th1 Zellen wird die Fähigkeit zugeschrieben, besonders für die Abwehr von intrazellulären Mikroorganismen verantwortlich zu sein. Im Menschen spielt diese eine besondere Rolle für die Resistenz gegen Infektionen mit Mykobakterien. Das wichtigste subsetspezifische Zytokin ist IFN- $\gamma$ . Die Differenzierung zu Th1 Zellen wird durch den Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 1 vermittelt, dessen Aktivierung durch IFN- $\gamma$  ausgelöst wird. Da in ruhenden naiven T-Zellen das IFN- $\gamma$  Gen ausgeschaltet ist, muss das initial wirkende IFN- $\gamma$  exogen bereitgestellt werden. Dendritische Zellen schütten große Mengen IL-12 aus und stimulieren damit bestehende NK-Zellen, CD8+ T-Zellen und Th1 Zellen IFN- $\gamma$  zu produzieren. Über die Aktivierung von STAT1 induziert das exogene IFN- $\gamma$  die Expression des Th1 typischen Transkriptionsfaktor T-bet, welcher das IFN- $\gamma$  Gen anschaltet und eine Hochregulierung des IL-12R veranlasst. Nun ist die Zelle sensibler für IL-12 der dendritischen Zellen und kann über eine Aktivierung von STAT4 Programme der Expansion und weiteren Differenzierung starten. Das nun endogen produzierte IFN- $\gamma$  wirkt nun zum einen als

positiver Feedback Faktor und zum anderen wirkt es auf Makrophagen und hilft ihnen, ihre mikrobizide Aktivität zu erhöhen. (Zhu J 2008) Obwohl Chemokinrezeptorexpression nicht strikt mit Subsetzugehörigkeit korreliert, gibt es bestimmte Chemokinrezeptoren, die bevorzugt von Th1 Zellen exprimiert werden, dazu gehören CXCR3 und CCR5. (Rivino L 2008) (Baggiolini M 1998)

Th2 Zellen sind für die Vernichtung von extrazellulären Pathogenen und Würmern zuständig. Ihre Aktivierung durch nicht pathogene Antigene wurde für die Entstehung von allergischen inflammatorischen Krankheiten wie Asthma verantwortlich gemacht. (Moosman TR 1989) Diese Zellen produzieren unter anderem die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. IL-4 ist ein wichtiger Vermittler des IgE Klassenwechsels in B-Zellen. IL-5 ist beteiligt an der Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten. Wie für Th1 Zellen IFN- $\gamma$ , stellt IL-4 für Th2 Zellen den positiven Feedback Faktor dar. Das IL-4 Signal aktiviert STAT6, welcher die Expression von GATA-3 induziert, ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription der Th2 typischen Zytokine auslöst und stimulierend auf die Expression des IL-4R wirkt. (Zhu J 2008) Th2 typische Chemokinrezeptoren sind CCR3, CCR4, CCR8 und CRTh2. (D'Ambrosio D 1998) (Cosmi L 2000) (Sallusto F 1998)

Th17 Zellen wurden vor viel kürzerer Zeit entdeckt und sind nun Gegenstand wachsenden Interesses. Die Arbeiten weisen darauf hin, dass Th17 Zellen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von extrazellulären Bakterien und Pilzen spielen. (Zhu J 2008) Außerdem wird immer klarer, dass Autoimmunreaktionen, die anfänglich Th1 Zellen zugeschrieben wurden, zumindest teilweise von Th17 Zellen ausgehen. (Stockinger B 2007) Für das Maussystem ist mehrfach gezeigt worden, dass TGF- $\beta$  und IL-6 gemeinsam zu einer Induktion des Th17 Zelltyps führen und dass IL-21 in Abwesenheit von IL-6 dessen Rolle übernehmen kann. (Zhou L 2007) (Korn T 2007) Wie die Entstehung von humanen Th17 Zellen reguliert wird, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Während einige Arbeitsgruppen vermuteten, dass nicht TGF- $\beta$ , sondern IL-1 $\beta$  in Kombination mit IL-6 Th17 Polarisierung induzieren (Acosta-Rodriguez EV 2007), (Wilson NJ 2007), zeigten andere, dass TGF- $\beta$  essentiell ist, und zwar in Kombination mit IL-23 oder IL-21 und oder proinflammatorischen Zytokinen (Yang L 2008), (Manel N 2008), (Volpe E 2008). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass TGF- $\beta$  die Expression des RAR-related orphan receptor gamma T (ROR $\gamma$ T) induziert, dem wichtigsten Transkriptionsfaktor der Th17 Zellen. Und IL-23 für die Entwicklung von Th17 Zellen notwendig ist, zwar nicht initial, jedoch für die

Stabilisierung des Th17 Phänotyps. (Awasthi A 2009) Die Zytokine, die von Th 17 Zellen produziert werden, sind IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22. IL-17 induziert wichtige inflammatorische Reaktionen wie die Produktion inflammatorischer Zytokine sowie die Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten. IL-21 wirkt über einen Feedback Mechanismus positiv auf die Generation der Th17 Zellen. IL-22 vermittelt unter Anderem inflammatorische Reaktionen in der Haut, schützt Hepatozyten während akuter Leberentzündung. Besonders wichtig ist IL-22 bei der Immunabwehr gegen Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae* und *Citrobacter rodentium*. (Stockinger B 2007) Ein Chemokinrezeptor der von allen Th17 Zellen exprimiert wird ist CCR6. (Korn T 2008) (Bettelli E 2008)

Das vierte Subset von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind induzierte Tregs, die iTregs, die funktionell den natürlichen Tregs (nTregs), die bereits im Thymus entstehen, ähnlich sind. Sie spielen eine tragende Rolle bei der Vermittlung von Selbst-Toleranz und in der Regulation von Immunantworten. (Fontenot JD 2005) Ihre Effekte verwirklichen Tregs sowohl durch Zell-Zell-Kontakte als auch durch die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$ . Der Großteil der nTregs trägt CD25, die  $\alpha$ -Kette des IL-2R Komplexes auf seiner Oberfläche. (Sakaguchi S 2006) Dies trifft allerdings auf alle aktivierten T-Zellen zu. Diese regulieren jedoch die  $\alpha$ -Kette einige Tage nach der Aktivierung wieder herunter, während Tregs konstant eine hohe Expression von CD25 aufweisen. (Murphy K 2008) Der von TGF- $\beta$  induzierte Transkriptionsfaktor forkhead box P3 (FoxP3) und dessen kontinuierliche Expression ist für die Differenzierung von Tregs aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sowie für die Aufrechterhaltung ihrer suppressiven Aktivität unabdingbar. (Zhu J 2008)

Ein ebenfalls vor nicht all zu langer Zeit entdecktes Subset von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen zeichnet sich durch die Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 und des induzierbaren kostimulatorischen Rezeptor (ICOS) aus (Fazilleau N 2009). CXCR5 bindet CXCL13, das von folliculären Stromazellen, folliculäre Dendritische Zellen eingeschlossen, produziert wird. Dadurch ist es T-Zellen, die diesen Rezeptor tragen möglich, in die folliculären Regionen der sekundär lymphatischen Organe zu migrieren. (King C 2008) Sie können somit in die B-Zell Zonen der Lymphfollikel einwandern bzw. durch die eigene Produktion von CXCL13 B-Zellen anlocken. B-Zellen mit Peptid beladenen MHCII Komplexen können so kontaktiert werden und Immunglobulin Klassenwechsel, somatische Hypermutation und Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen vermittelt

werden. Deshalb wurde dieses Subset folliculäre T-Helfer-Zellen (T<sub>fh</sub>) genannt (Fazilleau N 2009). Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor BCL-6, der in Th1, Th2, Th17 Zellen nicht zu finden ist. Außerdem können T-bet, GATA-3 und RoR $\gamma$ T in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Deshalb werden T<sub>fh</sub>-Zellen als eigenständiges Subset von T-Helfer-Zellen angesehen (Nurieva RI 2008). Sie produzieren große Mengen von IL-21 und tragen den IL-21R auf ihrer Oberfläche, was für einen positiven Feedback Mechanismus dieses Zytokins in der Entwicklung der T<sub>fh</sub>-Zellen spricht. (Vogelzang A 2008) Uneinigkeit herrscht bisher im Verständnis der Entwicklung von T<sub>fh</sub>-Zellen. Es ist nicht eindeutig geklärt, ob diese direkt aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach initialem Antigenkontakt differenzieren oder ob jedes der anderen T-Helfer-Zell-Subsets in der Lage ist, Ausgangspunkt für die Entwicklung von T<sub>fh</sub>-Zellen zu sein. (King C 2008) (Fazilleau N 2009) Es ist bekannt, dass alle anderen T-Helfer-Zell-Subsets in der Lage sind, die folliculären Regionen zu betreten, zudem ist gezeigt worden, dass die Effektorzytokine der Th1, Th2, Th17 und Treg Zellen IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, IL-10 und TGF- $\beta$  am Ig Klassenwechsel beteiligt sein können (Fazilleau N 2009).

## 1.9 Interleukin 21

Das Interleukin 21 ist ein Zytokin mit pleiotropen Effekten auf verschiedene Zelltypen, unter anderen sind das B-, T- und NK-Zellen. Gerade 12 Jahre ist es her, da die Entdeckung des Interleukins 21(IL-21) und seines Rezeptors (IL-21R) publiziert wurde (Dumoutier L 2000) (Parrish-Novak J 2000). Seit dem hat sich das Wissen über die Struktur der Gene und Proteine, ihrer Gewebeverteilungen und Effekte ständig vergrößert. Die Beteiligung an autoimmunen und malignen Prozessen, allergischen Reaktionen und Regulationen des Immunsystems machen es zum Gegenstand aktuellster Forschung und zu einem potentiellen Zielmolekül der pharmakologischen Therapie im Kampf gegen Autoimmunkrankheiten und Krebs (Leonard WJ 2008).

Das IL-21 Molekül ist ein 15 kD schweres, aus 131 Aminosäuren bestehendes Protein, gebildet aus 4  $\alpha$  Helices, welches Strukturähnlichkeit mit IL-2, IL-4 und IL-15 aufweist. Es gehört zur Familie der Zytokine, deren Rezeptoren die gemeinsame Zytokinrezeptor  $\gamma$  Kette ( $\gamma$ c) beinhalten. Das IL-21 Gen liegt angrenzend an den IL-2 Genlokus auf dem humanen Chromosom 4 (Parrish-Novak J 2000). Bindung von IL-21 an den zugehörigen Rezeptor führt zu einer starken Aktivierung/Phosphorylierung von STAT3 und einer leichten Aktivierung von STAT5 und STAT1 (Parrish-Novak J 2002).

Während seine Expression bisher nur in aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und NKT-Zellen nachgewiesen worden ist, ist die Expression seines Rezeptors und damit die Wirkung von IL-21 auch auf nicht lymphoide Zelltypen verbreitet. So tragen B- und T- Lymphozyten und NK-Zellen diesen Rezeptor, aber auch DZ, Makrophagen, Epithelzellen und Keratinozyten (Leonard WJ 2008).

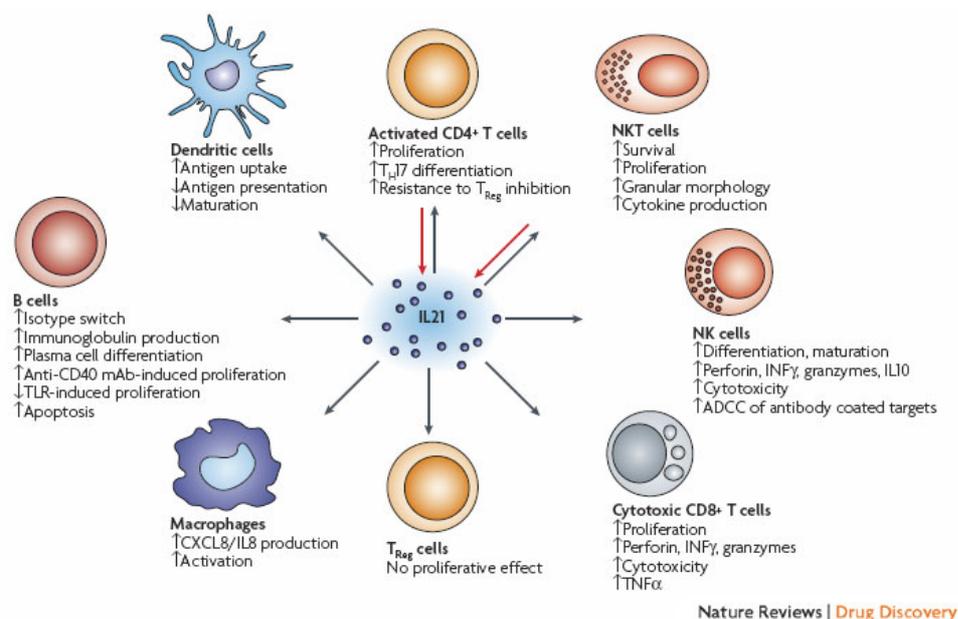
In der Biologie der B-Zellen spielt IL-21 in verschiedener Weise eine bedeutende Rolle. Zum einen beeinflusst es die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen, die Produktion von Immunglobulinen zum anderen. In Kooperation mit IL-4 stimuliert es die Produktion von Immunglobulinen der Gruppe G und hemmt die durch IL-4 induzierte Produktion von IgE. Gleichzeitig kooperierte es mit IL-4 bei der Formation der Keimzentren in den B-Zell-Zonen lymphatischer Organe. (Ozaki K 2002)(Ozaki K 2004)

Für T-Zellen kann IL-21 in Kombination mit den Zytokinen IL-15 und IL-7 ein Stimulus für die Proliferation sein. Dies ist *in vitro* gezeigt worden sowohl für CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Maus (Zeng R 2005) als auch für humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Onoda T 2007) und zwar für naive als auch Gedächtniszellen beider T-Zell Gruppen. Sowohl für T<sub>H</sub>1-Zellen (Vogelzang A 2008), als auch für Th17 Zellen (Bettelli E 2008) ist IL-21 als positiver Feedback Faktor essentiell an der Entstehung und Aufrechterhaltung beider Zelltypen beteiligt. Darüber hinaus vermag IL-21 die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Kombination mit IL-15 zu steigern, besonders in antigen-spezifischen Zellen (Kasaian MT 2002). Von besonderer Bedeutung ist IL-21 für von CD4<sup>+</sup> T-Zellen geleistete Hilfe für CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Kampf gegen virale Infektionen. Es ist essentiell für die Generation von antiviralen zytotoxischen T-Zellen in Mäusen und hilft die Effektoraktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu erhalten, die nötig sind um persistierende virale Infektionen unter Kontrolle zu bekommen (Elsaesser H 2009) (Yi JS 2009).

Die Wirkung auf dendritische Zellen ist eher eine inhibitorische. So exprimieren DZ, die in Gegenwart von IL-21 expandiert wurden weder die  $\alpha$ - noch die  $\beta$ -Kette des hoch affinen IL-2R. Sie exprimieren weiterhin niedrige Level von MHCII und CCR7. Außerdem können sie nicht von LPS aktiviert werden CD80, CD86 oder MHCII Moleküle verstärkt zu exprimieren. Zu guter Letzt sind sie nicht in der Lage T-Zell Antworten zu stimulieren, im Gegenteil, sie beeinflussen T-Zell Aktivitäten negativ. (Leonard WJ 2005) (Skak K 2008)

Die Beteiligung an der Regulation von Antikörperproduktion, Generation inflammatorischer T-Helfer-Zellen und der Aktivierung und Verstärkung zytolytischer Zellen rückte das Interleukin 21 in das Interesse der Forschung um Autoimmunkrankheiten. Polymorphismen in den IL-21 und IL-21R Genen bzw. im IL-2/IL-21 Genlokus sind assoziiert mit Systemischem Lupus Erythematodes (SLE), Diabetes Typ I, Rheumatoider Arthritis und inflammatorischen Darmerkrankungen (Sondergaard H 2009). In Mausmodellen des Diabetes Typ I (NOD, non obesity diabetis) und des SLE sind erhöhte IL-21 Blutspiegel gemessen worden und die Hälfte aller Patienten, die an SLE leiden, weisen ebenfalls erhöhte IL-21 Spiegel auf (Leonard WJ 2008). Es wird vermutet, dass der proliferative Effekt von IL-21 auf CD8+ T-Zellen, die für die Zerstörung der B-Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas verantwortlich sind, das Entstehen von NOD begünstigt. IL-21 hat auch einen verstärkenden Effekt in der Entwicklung von experimenteller allergischer Enzephalitis (EAE) dem Mausmodell der humanen Multiplen Sklerose. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von IL-21 an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten.

In Maus Experimenten konnte ein starker Antitumoreffekt für IL-21 nachgewiesen werden. In klinischen Studien der Phase II in denen IL-21 als Tumorthherapie für Patienten mit Nierenzellkarzinomen und oder Malignem Melanom ertestet wird und wurde, konnte gute Wirksamkeit und ein akzeptables Sicherheitsprofil beobachtet werden (Zeng R 2005) (Skak K 2008) (Parrish-Novak J 2000) (Hashmi MH 2010).



**Bild 2) Modulation des Immunsystems durch IL-21** (Skak K 2008)

## 2. Fragestellung der Arbeit

Das Zytokin IL-21 ist maßgeblich in die Regulation immunologischer Prozesse involviert. Es fördert die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen und induziert Immunglobulin Klassenwechsel. Außerdem erhöht es die Zytotoxizität von CD8+ T-Zellen und ist an der Vermittlung der von CD4+ T-Zellen geleisteten Hilfe für zytotoxische Zellen im Kampf gegen virale Infektionen und eventuell Tumorzellen beteiligt. Für CD4+ T-Zellen stellt es einen Stimulus zur Proliferation dar und wirkt über einen positiven Feedback Mechanismus stimulierend auf die Generation von Th17 und Tfh-Zellen. Auf diesem Wege kann IL-21 jedoch auch die Entstehung von Autoimmunkrankheiten fördern. Um seine positiven Effekte nutzen zu können und oder die negativen Eigenschaften zu unterdrücken, ist es wichtig IL-21 produzierenden Zellen zu identifizieren und charakterisieren und gleichzeitig deren Entstehungsmechanismen zu verstehen. Es ist bekannt, dass IL-21 von aktivierten CD4+ T-Zellen produziert wird. Ob diese Fähigkeit auf bestimmte Subsets beschränkt ist, konnte jedoch noch nicht eindeutig bewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb humane IL-21 produzierende CD4+ T-Lymphozyten hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu einem oder mehreren CD4+ Subsets analysiert werden. Des Weiteren sollte festgestellt werden, unter welchen stimulatorischen Bedingungen IL-21 Produktion in naiven CD4+ T-Zellen induziert wird und welche Stimuli eine Inhibition bewirken können.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

Im Folgenden sind die Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien aufgeführt, die für die Durchführung der Experimente verwendet wurden.

Geräte	Hersteller
Accu-Jet Pro Pipettierhilfe	Th. Geier, Berlin, (D)
AutoMACS™ Pro Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, (D)
Zellzählkammer	Precicolor HBG, Giessen-Lützellingen, (D)
Zentrifugen (5415R, 5810R)	Eppendorf, Hamburg, (D)
Tiefgefrierschrank (-80 °C)	Thermo, Langenselbold, (D)
Drummond Pipettierhilfe	Th. Geier, Berlin, (D)
Finnipette (0,2 – 2,0 µl; 2 – 20 µl; 20 – 200 µl; 200 – 1000 µl)	VWR International, Dresden, (D)
Finnipette digital 12-channel	VWR International, Dresden, (D)
Durchflusszytometer (FACSCanto™ II)	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, (D)
Inkubator	Binder, Tuttlingen, (D)
Lamina HERAsafe (steriler Abzug)	Thermo, Langenselbold, (D)
Lichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, (D)
Multipette Plus 4981 (2 – 1000 µl)	VWR International, Dresden, (D)
Kühlschrank (2 – 8 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, (D)
Austauschfilter Pipettierhilfe	Süd Laborbedarf, Gauting, (D)
Vortexer	VWR International, Dresden, (D)

Wasserbad (1008)	Th. Geier, Berlin, (D)
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Zellkulturplatten (96-Napf, Flachboden)	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
Zellkulturplatten (96-Napf, Rundboden)	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
Zellkulturplatten (96-Napf, Flachboden)	Nunc, Roskilde, (DK)
Deckel für Zellkulturplatten	Nunc, Roskilde, (DK)
Zellsieb (70 µm, Nylon)	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
Cell Trics® (30 µm)	Partec GmbH, Münster, (D)
Eppendorf Röhrchen (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, (D)
FACS Röhrchen (5 ml, unsteril)	Sarstedt, Nümbrecht, (D)
FACS Röhrchen (5 ml, steril)	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
Falcon Röhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
MACS™ Separationssäulen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, (D)
Parafilm	Roth, Essen, (D)
Vacutainer, Blutentnahmeset Butterfly-kanüle	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
Vacutainer, Blutentnahmeröhrchen heparinisiert	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
Pipettenspitzen (0,2 µl; 2 µl; 200 µl; 1000 µl)	VWR International, Dresden, (D)
Einwegpipetten (2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
Sterile Filter	VWR International, Dresden, (D)

Spritzen (25 ml)	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, (D)
Pinzette	VWR International, Dresden, (D)
<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	Sigma, München, (D)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe, (D)
Serum Austausch Faktor (SRF)	Invitrogen, Karlsruhe, (D)
Ficoll™	PAA Laboratories, Cölbe, (D)
Formaldehyd (FA) (3,7%)	Merck, Darmstadt, (D)
Disodium-ethylen-diamin-azetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, (D)
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen, Karlsruhe, (D)
Penicillin	PAA Laboratories, Cölbe, (D)
Saponin	Merck, Darmstadt, (D)
Sodiumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe, (D)
Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe, (D)
Rekombinante Untereinheit des humanen IL-21Rezeptor (sIL-21R)	R&D Systems,(D)
Phorbol-12,13-dibutyrate (PdBU)	eBioscience, Frankfurt a.M., (D)
Ionomycin	eBioscience, Frankfurt a.M., (D)
Brefeldin A	Sigma, München, (D)
CD4+ T cell isolation Kit II human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, (D)
<b>Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
PBS (phosphate buffered saline) Puffer	PAA Laboratories, Cölbe, (D)

8,0 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,42 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	
PBS/BSA Puffer PBS + 0,5% BSA	
Beschichtungspuffer für Zellstimulation GIBCO DPBS 14040	Invitrogen, Karlsruhe, (D)
MACS™ Waschpuffer PBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, (D)
MACS™ Laufpuffer PBS + 0,5 % BSA + 2 mM EDTA + 0,09 % Azid	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, (D)
Permeabilisierungspuffer PBS + 0,5 % Saponin + 10,0 % BSA	
Phosflow Perm Buffer III	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)

Cytofix Fixation Buffer	Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
RPMI – Medium (Rosewell Park Memorial Institute) RPMI 1640 + GlutaMAX-ITM + 10 % (v/v) SRF + 1 mM Pyruvat + 100 µM Nichtessentielle Aminosäuren + 200 U/ml Penicillin + 200 U/ml Streptomycin + 50 µM β-mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe, (D)

Die folgenden aufgereinigten neutralisierenden Antikörper wurden verwendet, um Zytokine im Medium der Induktionsexperimente zu eliminieren.

Anti IL-2, anti IL-4, anti IL-6, anti IL-10, anti IL-10R, anti IL-12, anti IFN $\gamma$  wurden von BD-Pharmingen, Heidelberg, (D) gekauft, enthalten wenig Azide und wenig Endotoxin und wurden in einer Konzentration von 2µg/ml eingesetzt. Der lösliche IL-21R (sIL-21R) wurde von R&D Systems gekauft und mit 10µg/ml eingesetzt.

Für Induktionsexperimente wurden die folgenden rekombinanten Zytokine eingesetzt. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-21, IL-23, TGF- $\beta$  wurden von R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt,(D) gekauft.

### 3.2 Methoden

Alle Experimente wurden entsprechend der Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis durchgeführt.

Aufreinigung, Isolation und Experimentansätze wurden unter sterilen Bedingungen innerhalb des Abzugs durchgeführt. Verwendete Instrumente und Reagenzien wurden

entweder 20 Minuten (min) bei 2 bar und 121 °C autoklaviert, oder vom Hersteller steril und endotoxinfrei geliefert.

### **3.2.1 Isolation von mononukleären Zellen mit Ficoll® Dichtegradientenzentrifugation**

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden aus Buffy coats gesunder Spender (DRK, Dresden, Deutschland) oder aus Frischblutproben gesunder freiwilliger Spender gewonnen, mononukleäre Zellen sekundärer Lymphorgane wurden aus Tonsillen von Patienten der Charité Berlin, nach Tonsillektomie isoliert. Mononukleäre Zellen Neugeborener wurden aus Nabelschnurblut isoliert, das in Zusammenarbeit mit der Klinik für Geburtshilfe der Charité Campus Virchow Klinikum aus Nabelschnüren direkt nach der Geburt entnommen wurde. Das Blut stammt von reifen, gesunden Neugeborenen (37;0 SSW – 41;6 SSW) ohne Hinweise auf perinatale Asphyxie (5-Minuten APGAR-Wert < 7, NSpH < 7,1) mit Normalgewicht (>2500g und <4000g) die selbst und deren Mütter keine Infektionszeichen (Fieber >38,5°C, Leukozyten >15.000/μl, CRP >20mg/l) aufwiesen.

Die Vorgaben der „local ethics committees on human studies“ (Charité Berlin, Deutschland) wurden jederzeit befolgt.

Tonsillen wurden nach der Entfernung in PBS/BSA bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Kapsel wurde mit einem Skalpell geöffnet und das Gewebe durch ein steriles Sieb gerieben. Die aufgefangene Zellsuspension wurde steril gefiltert und zweimal in PBS/BSA gewaschen.

Buffy coats wurden 4:1 mit PBS verdünnt, die Zellsuspension aus Tonsillen wurde auf 70 ml mit PBS verdünnt, während Frischblut unverdünnt blieb. 35 ml der verdünnten bzw. unverdünnten Zellsuspension wurden vorsichtig über 15 ml Ficoll® in einem 50 ml Falcon Röhrchen geschichtet und mit 2000 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 20 Minuten (min) bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sind die Erythrozyten auf den Boden gesunken, darüber befindet sich der Ficoll®. Die darauf liegende Schicht Plasma wurde abgesaugt, ohne den Teppich aus mononukleären Zellen in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll® zu versehren. Die Zellen der Interphase wurden mit einer Einwegpipette (10 ml) geerntet und in ein neues 50 ml Falcon Röhrchen mit 5 ml PBS überführt, auf 50 ml mit PBS verdünnt und abermals mit

2000 U/min jedoch für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 50 ml PBS/BSA resuspendiert und mit 1000 U/min für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Bei dieser Zentrifugationsgeschwindigkeit verbleibt der größte Teil der Thrombozyten im Überstand und kann mit dem Überstand entfernt werden.

Nabelschnurblut wurde in mit Heparin beschichteten Blutentnahmeröhrchen aufgenommen und gekühlt gelagert. Die Proben wurden spätestens 3 Stunden nach Entnahme weiterverarbeitet. Das gekühlte Blut wurde mit der dreifachen Menge PBS verdünnt und je 35 ml vorsichtig über 15 ml Ficoll® in einem 50 ml Falcon Röhrchen geschichtet und mit 2000 U/min für 35 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Die weiteren Schritte entsprechen denen der Isolation von Mononukleären Zellen des peripheren Blutes.

### **3.2.2 Anreicherung der CD4+ T-Zellen mit immunmagnetischer Separation**

Unter immunmagnetischer Separation versteht man die antikörpervermittelte Zellseparation mittels magnetischer Markierung der relevanten Zellen (Positiv-Selektion) bzw. Markierung sämtlicher irrelevanter Zellen (Negativ-Selektion). Dabei arbeitet man mit Antikörpern, die an Magnetbeads, winzige, kolloidal suspendierte, von einer Polystyrol-, Polysaccharid- oder Silanhülle umgebene superparamagnetische Partikel, gekoppelt sind. Paramagnetisch bedeutet, dass sie ihre magnetischen Eigenschaften lediglich besitzen, solange sie sich in einem magnetischen Feld befinden. Dadurch wird verhindert, dass die Partikel verklumpen. Das Prinzip nutzt die zelltypspezifische Ausstattung mit Oberflächenmolekülen, welche mit magnetbeadgekoppelten Antikörpern markiert werden. Eine derart behandelte Zellsuspension wird durch eine mit Eisenkügelchen gepackte Säule (ferromagnetische Matrix) geschickt, die sich innerhalb eines starken Magnetfeldes befindet. Die markierten Zellen werden im Magnetfeld zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen ungehindert durchfließen und aufgefangen werden können. Nach Inaktivierung des Magnetfeldes können die markierten Zellen dann ebenfalls eluiert und gesondert gesammelt werden. Bei der Positiv-Selektion werden die relevanten Zellen markiert, in der Säule angereichert und nachträglich eluiert, während bei der Negativ-Selektion die irrelevanten Zellen markiert und in der Säule festgehalten werden. Das erste Eluat enthält bereits die gewünschten Zellen. Während die Positiv-Selektion oft höhere Reinheit erzielt, besteht jedoch hier die Gefahr der unkontrollierten Zellaktivierung. Außerdem tragen die markierten Zellen die entsprechenden Antikörper

auf ihrer Oberfläche, was sich in nachfolgenden Experimenten evtl. als störend herausstellen könnte. Die Markierung kann direkt oder indirekt erfolgen. Bei der direkten Markierung sind die Magnetbeads an die Antikörper gekoppelt, die das Oberflächenmolekül erkennen. Bei der indirekten Markierung sind die primären Antikörper an Fluorochrome oder Biotin gekoppelt. Sekundäre Antikörper sind gegen das Fluorochrom gerichtet bzw. sind an Streptavidin, das Biotin bindet, gekoppelt. Die Magnetbeads befinden sich dann an den sekundären Antikörpern. (Luttmann W 2008)

Zur Isolierung von CD4 positiven T-Helfer-Zellen wurde ein AutoMACS™ Pro Separator und ein CD4 isolation kit II, benutzt. Hierbei handelt es sich um eine Negativ-Selektion, bei der die CD4 positiven Zellen unberührt bleiben.

Mononukleäre Zellen aus Buffy coats, Tonsillen, Nabelschnurblutproben oder Frischblutproben wurden mit 200 µl CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail (Miltenyi) 20 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde mit 400 µl Anti-Biotin MicorBeads (Miltenyi) ebenfalls für 20 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden dann zweimal in PBS/BSA gewaschen und in 5 ml PBS/BSA aufgenommen und zur Separation in den AutoMACS™ Pro Separator mit dem Programm depleatS gegeben. Nach der Separation wurde die Negativfraktion zwei mal mit PBS/BSA gewaschen und in 500 µl PBS/BSA aufgenommen, über Nacht bei 4°C aufbewahrt oder sofort weiterverwendet.

### **3.2.3 Analyse und Isolation der CD4+ T-Zellen und deren Subgruppen mit Durchflusszytometrischer Messung und Sortierung (FACS = fluorescence-activated-cell-sorter)**

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass verschiedene Zelltypen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und auch intrazellulären Zusammensetzung unterschieden werden können. Das Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten umfasst unter anderem Lymphozytentypisierung, funktionelle Untersuchungen, Zellzahlbestimmungen bis hin zu DNA- und Zellzyklusanalysen. Die meisten Anwendungen setzen eine Markierung von zellulären Strukturen mit Antikörpern voraus. Diese Antikörper sind an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (direkte Markierung) bzw. werden mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (indirekte Markierung) nachgewiesen. Die Messung der Zellen beruht darauf, dass die so markierten Zellen von einem Laserstrahl erfasst werden, wodurch es zur Lichtstreuung und Anregung der gekoppelten Fluores-

zenzfarbstoffe kommt. Diese emittieren daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses Licht wird in einem komplexen System aus Spiegeln und Filtern im Durchflusszytometer gebündelt und zerlegt, wodurch für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff ein spezifisches Signal entsteht. Unabhängig von den Fluoreszenzfarbstoffen kann anhand der Streuung des Laserstrahls eine Aussage über die Größe der Zelle und deren Granularität gemacht werden. Die nach vorne abgelenkten Strahlen, auch Vorwärtsstreulicht (FSC = Forwardscatter) genannt, sind ein Maß für die relative Größe. Das im 90° Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidescatter) dient als Maß für die Granularität einer Zelle. Entscheidendes Merkmal dieser Methode ist, dass sehr viele Zellen in kurzer Zeit in einem laminaren Probenstrom einzeln an den Lasern vorbeigeführt werden und einzeln charakterisiert werden können. (Luttmann W 2008)

Die Auswertung der so gesammelten Daten erfolgt entweder in Form von eindimensionalen Histogramm-Plots, bei denen die Stärke des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen wird. Je nach Intensität der Signale kann eine lineare oder logarithmische Darstellung gewählt werden. Der Vorteil der logarithmischen Darstellung liegt in der besseren Auflösung schwacher Fluoreszenzsignale. Eine zweite Art der Darstellung ist jene in Form von zweidimensionalen Dot-Plots, mit der sich die Beziehung von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzen auf einer Zelle zeigen lässt. So können zwei Fluoreszenzkanäle gegeneinander aufgetragen werden und einfach positive Zellen (Kanal 1 positiv, Kanal 2 negativ oder umgekehrt) von doppelt positiven oder doppelt negativen Zellen unterschieden werden. Hierbei ist zu beachten, dass Zellen, die exakt die gleichen Fluoreszenzeigenschaften haben, als ein Punkt dargestellt werden, somit die Zahl der Punkte nicht die wahre Zellzahl wiedergibt. (Luttmann W 2008)

In der Zellsortierungseinrichtung (Zellsorter) werden Zellen nicht nur optisch sondern auch räumlich aufgetrennt und stehen danach für weitere Experimente zur Verfügung. Zur Sortierung einzelner, nach ihren Fluoreszenzeigenschaften mittels Durchflusszytometrie ausgewählter Zellpopulationen wird der elektrisch leitfähige Flüssigkeitsstrom aufgebrochen, wodurch einzelne Tröpfchen entstehen. Tröpfchen, in denen sich eine Zelle mit ausgewählten Streuungs- und Fluoreszenzeigenschaften befindet, werden je nach Eigenschaft der Zelle elektrisch positiv oder negativ geladen. In einem elektrischen Feld kommt es dann zu einer ladungsabhängigen Ablenkung der einzelnen

Tröpfchen, die dann in separaten Reagenzröhrchen aufgefangen werden können. (Luttmann W 2008)

Für die Analyse und Sortierung mit Durchflusszytometrie und FACS wurden die extrazellulären Marker der Zellen in PBS/BSA mit Antikörpern gegen CD25, CCR6, CD161, CD62L, CCR4, CXCR3 und oder CRTH2 für 30 min bei 37°C, und im Anschluss mit anti CD4, anti CD45RA, ICOS und oder CXCR5 für 10 min bei 4°C inkubiert. Wenn notwendig, wurde, nach zweimaligem Waschen der Zellen in PBS/BSA, mit sekundären Antikörpern 10 min bei 4°C gefärbt. Danach wurden die Zellen zwei mal in PBS/BSA gewaschen und direkt gemessen, oder einer intrazellulären Färbung unterzogen bzw. durch einen sterilen Filter, der Zellklumpen zurückhält, in ein steriles FACS Röhrchen (5 ml) überführt, anschließend auf 1-2 ml PBS/BSA verdünnt und in einem FACSAria (BD) sortiert. Die isolierten Zellpopulationen wurden danach in Kulturmedium gewaschen, über Nacht bei 37°C im Inkubator aufbewahrt oder sofort weiter verwendet.

Für die Färbung intrazellulärer Moleküle muss die Zellmembran permeabilisiert werden, um ein Eindringen der Antikörper zu ermöglichen. Voraussetzung dafür ist die Fixierung der Zellen, diese soll das Antigen länger stabil und in der Zelle halten. Zur Fixierung wurden die Zellen 1-2 mal in PBS gewaschen und dann in der Fixierlösung (Formaldehyd 2%ig) resuspendiert und 20 min bei 4°C inkubiert. Formaldehyd führt zur Kreuzvernetzung von Proteinen.

Um überschüssiges Formaldehyd zu entfernen wurden die Zellen im Anschluss zweimal in Permeabilisierungspuffer gewaschen. Das verwendete Saponin ist ein pflanzliches Detergens und führt zur Perforation der Zellmembran. Danach wurden die Zellen mit den Antikörpern gegen intrazelluläre Moleküle in Permeabilisierungspuffer für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 2 mal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und zur Messung in 200 µl PBS/BSA aufgenommen.

Die Färbung intranukleärer Moleküle setzt zusätzlich die Permeabilisierung der Kernmembran voraus. Für diese Färbung wurden die Zellen nach Zentrifugation und Entfernen der Überstände in 100µl Fixierungspuffer (Fix buffer I) resuspendiert und bei 4°C 10 min inkubiert. Nach Entfernung des Fixierungspuffers wurden die Zellen für 1 min auf Eis gestellt und danach in 100µl Permeabilisierungspuffer (Perm buffer III) resuspendiert und auf Eis 30 min permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS/BSA bei Raumtemperatur gewaschen und weitere 10 min bei Raum-

temperatur in PBS/BSA inkubiert. Nach Zentrifugation und Entfernung der Überstände wurden 30µl der Mischung aus Antikörpern gegen intranukleäre Moleküle und PBS/BSA zugegeben und die Zellen 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in PBS/BSA gewaschen, in 150 µl PBS/BSA aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Für die Analyse mit Durchflusszytometrie und FACS wurden die folgenden Fluorochrome eingesetzt

Fluorochrom	Excitation max. Wellenlänge	Emission max. Wellenlänge
Alexa Flour 405	360 nm, 405 nm	421 nm
Alexa Flour 488, FITC,	488 nm	519 nm
Pe	488 nm, 532 nm	480 nm, 565 nm
Alexa Flour 647, APC	595 nm, 633 nm, 647 nm	660 nm
Alexa Flour 700	702 nm	723 nm
Pe-Cy-5	496 nm, 546 nm	627 nm
APC-Cy-7	650 nm	785 nm
Cy-5	650 nm	695 nm

Die folgende Liste führt alle Antikörper auf, die für die Färbung von Zelloberflächenmarkern, intrazellulären und intranukleären Markern benutzt wurden. Die optimalen Konzentrationen wurden durch Titration vor Beginn der Experimente ermittelt.

Spezifität	Isotyp	Klone	Flourochrom	Konzen- tration	Hersteller
CCR6	mIgG1, k	11A9	Pe, Biotin	1:50	BD Biosciences,(D)
CCR4	mIgG2B	205410	Pe, Biotin	1:50	R&D Systems,(D)
CD62L	mIgG1, k	Dreg56	Pe	1:50	BD Biosciences,(D)

CD161	mIgG1, k	DX12	Pe	1:50	BD Biosciences,(D)
CXCR5	mIgG2b	51505	Unkonjugiert	1:100	R&D Systems,(D)
CD4	mIgG1, k	TT1	Alexa 405	1:100	DRFZ*, (D)
CD25	mIgG1, k	BC96	APC, FITC	1:100	eBioscience, (D)
CD45RA	mIgG1, k	4G11	FITC, APC	1:50	DRFZ*, (D)
CXCR3	mIgG1, k	1C6	Pe-Cy5	1:25	BD Biosciences,(D)
CRT2	rlgG2a	BM16	Pe, Biotin	1:25	Miltenyi, (D)
ICOS	mIgG1, k	ISA-3	PE, FITC	1:50	eBioscience, (D)
IL-2	rlgG2a, k	MQ1- 17H12	FITC, APC	1:100	BD Biosciences,(D)
IL-4	mIgG1, k	MP4- 25D2	Pe, APC	1:200	BD Biosciences,(D)
IL-10	rlgG1	JES3- 9D7	Pe, APC	1:200	BD Biosciences,(D)
IL-17	mIgG1, k	64DEC1 7	Pe, APC	1:100	eBioscience, (UK)
IL-21	mIgG1, k	3A3-N2	Pe, APC	1:100	eBioscience, (UK)
IFN $\gamma$	mIgG1, k	4SB3	APC, Cy 5.5	1:900	DRFZ*, (D)
pSTAT3 (pY705)	mIgG1, k	4/P- STAT3	APC	1:10	BD Biosciences,(D)
pSTAT4 (pY693)	mIgG1, k	38/p- Stat4	Pe	1:10	BD Biosciences,(D)
Streptavidin			Pe, FITC	1:200	DRFZ*, (D)
Anti-IgG2b	mIgG1, k		FITC	1:200	Southern Biotech,(USA)

\* Antikörper wurden durch Kollegen aus dem DRFZ hergestellt.

### 3.2.4 Zellzählung

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Zellzählkammer benutzt, die mit 10 µl einer verdünnten Zellsuspension beladen wurde. Unter dem Lichtmikroskop wurde ein Quadrat, welches in 16 Quadrate unterteilt ist komplett ausgezählt. Nach folgender Formel wurde anhand der ermittelten Zellzahl, des Verdünnungsfaktors (df) und des Gesamtvolumens (v) die Gesamtzellzahl errechnet.

$$\text{Formel 1) Gesamtzellzahl} = \text{ausgezählte Zellen} * 10.000 * \text{df} * v$$

### 3.2.5 Zellkultur

#### 3.2.5.1 Stimulation bzw. Restimulation mittels Phorbol-12,13-Dibutyrat (PdBu) und Ionomycin

Aus menschlichen Geweben isolierte T-Zellen zeigen eine niedrige bis keine spontane Zytokinexpression. Deren Nachweis erfordert normalerweise eine in vitro Aktivierung mit antigen-, mitogen- oder pharmakologisch wirksamen Stimuli wie Proteinantigenen, anti-CD3/CD28, Superantigen oder verschiedene Phorbol-ester und Ionophore. Letztere aktivieren die Signalkaskade unterhalb des T-Zell-Rezeptorkomplexes. Somit wird eine Aktivierung des T-Zell-Rezeptorkomplexes imitiert, ohne diesen wirklich berühren zu müssen. (Luttmann W 2008)

Phorbol-ester wie PMA, TPA und PdBu aktivieren die Proteinkinase C, während Ionophoren wie Ionomycin die Calciumausschüttung und Aktivierung der Ras und Mapkinase Kaskade stimulieren.

Als Resultat wird die Genexpression im Kern und die Proteinbiosynthese im Zytosol erhöht und damit die Zytokinproduktion angeregt. Auf diese Weise kann man T-Zellen anregen ihre subtypspezifischen Zytokine zu produzieren.

Zellsuspensionen werden dazu bei 1500 U/min und 4°C zentrifugiert, Überstände werden abgenommen und Zellen in Kulturmedium mit 0,1 µM PdBu und 0,1 µg/ml Ionomycin resuspendiert und im Inkubator bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> Gehalt 5 h aufbewahrt.

Um die Sekretion der produzierten Zytokine zu verhindern, nutzt man Brefeldin A, ein antiviral und antibiotisch wirksames Stoffwechselprodukt eines Pilzes, das den Export

von sekretorischen Proteinen aus dem Golgi-Apparat hemmt. Das heißt die produzierten Zytokine verbleiben in der Zelle und können so markiert und gemessen werden. Brefeldin A wird den Ansätzen mit 10 µg/ml zugegeben.

*Ex vivo* Stimulation von 200.000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen pro Napf erfolgte mit PdBU, Ionomycin für 6 h in der Anwesenheit von Brefeldin A während der letzten 4 h. Anschließend wurden die Zellen intra- und extrazellulär für Oberflächenmoleküle und Zytokine gefärbt.

### **3.2.5.2 *In vitro* Stimulation und Polarisierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten**

Die Stimulation erfolgt auf Kulturplatten (100.000 Zellen pro Napf), beschichtet mit 2 µg/ml anti CD3 und 6 µg/ml anti CD28 im Kulturmedium im Inkubator unter verschiedenen Konditionen:

- In der neutralen Kondition unter Zugabe von 2 µg/ml neutralisierenden Antikörpern gegen IL-4, IL-12 und IFN $\gamma$ ,
- in der TH1 Kondition unter Zugabe von 2 µg/ml anti IL-4 und 10 ng/ml IL-12,
- in der TH2 Kondition unter Zugabe von 2 µg/ml anti IL-12 und anti IFN- $\gamma$  und 10 ng/ml IL-4,
- in der TH17 Kondition unter Zugabe von 2 µg/ml anti IL-4, anti IL-12 und anti IFN- $\gamma$ , 10 ng/ml IL-6, 1 ng/ml TGF- $\beta$ , 10 ng/ml IL-1b und 10 ng/ml IL-23.

Alle weiteren Konditionen ergänzen die neutrale um 2µg/ml anti IL-6, anti IL-10, anti IL-10R oder 10µg/ml sIL-21R, 10 ng/ml IL-6, IL-10, IL-21, oder 1 ng/ml TGF- $\beta$ . Nach vier Tagen, wurden die Zellen auf unbeschichtete Platten transferiert, zentrifugiert, die Überstände wurden entfernt und die Zellen wurden in neuem Kulturmedium unter Zugabe von 20 U/ml IL-2 resuspendiert und für weitere 2 Tage im Inkubator aufbewahrt. Am Tag 6 wurden die Zellen mit PdBU und Ionomycin 6 h lang restimuliert, die letzten 4 davon in der Gegenwart von Brefeldin A und intrazellulär für Zytokine gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Für die Analyse der intranukleären Moleküle STAT3 und STAT4 wurden die Zellen nach 48h Zellkultur, wie oben beschrieben, ohne Restimulation fixiert und gefärbt.

### 3.2.6 Statistik

Auf Grund der niedrigen Anzahl von Stichproben in allen Experimenten wurde nicht von einer Gaus'schen Normalverteilung ausgegangen.

In den Experimenten, in denen die Zytokinproduktion unterschiedlicher Zelltypen bzw. von Zellen aus unterschiedlichen Geweben verglichen wurde, wurde der Mann-Whitney-Test für ungepaarte Stichproben angewendet. Das trifft zu für die statistische Analyse in den Abb. 1-6 B, hier wurden CCR6+ bzw. CCR6- Zellen verglichen, 2-1 B, hier wurden Zellen des peripheren Blutes mit tonsillären Zellen verglichen und 2-3 B, hier wurden CXCR5+ICOS+ mit CXCR5-ICOS- tonsilläre Zellen verglichen.

In Experimenten, in denen die Zytokinproduktion des gleichen Zelltyps, also naive CD4+ T-Zellen des peripheren Blutes bzw. aus Nabelschnurblut, unter gleichen Konditionsbedingungen, die sich nur in der Zugabe von Zytokinen und neutralisierenden Antikörpern unterschieden, verglichen wurde, ist der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben angewendet worden. Dies trifft auf alle Induktionsexperimente zu, Abb. 3-1 bis 4-13. Für die STAT Experimente standen nicht genügend Spontanproduzenten zur Verfügung, deshalb konnte keine statistische Analyse durchgeführt werden. Es wurden lediglich die Mittelwerte mit Standardabweichung gebildet.

Die statistische Grenze zwischen Nicht- und Spontanproduzenten, anhand der IL-21 Produktion in der neutralen Kondition, wurde mittels Clusteranalyse bestimmt und bestätigt die willkürlich gesetzte Grenze. Dabei wurden die Spender 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 14,15 und 18-23 in die Gruppe der Nicht-Spontanproduzenten eingeteilt und die Spender 2, 4, 7, 11, 12, 13, 16, 17 in die Gruppe der Spontanproduzenten.

### 3.3 Software

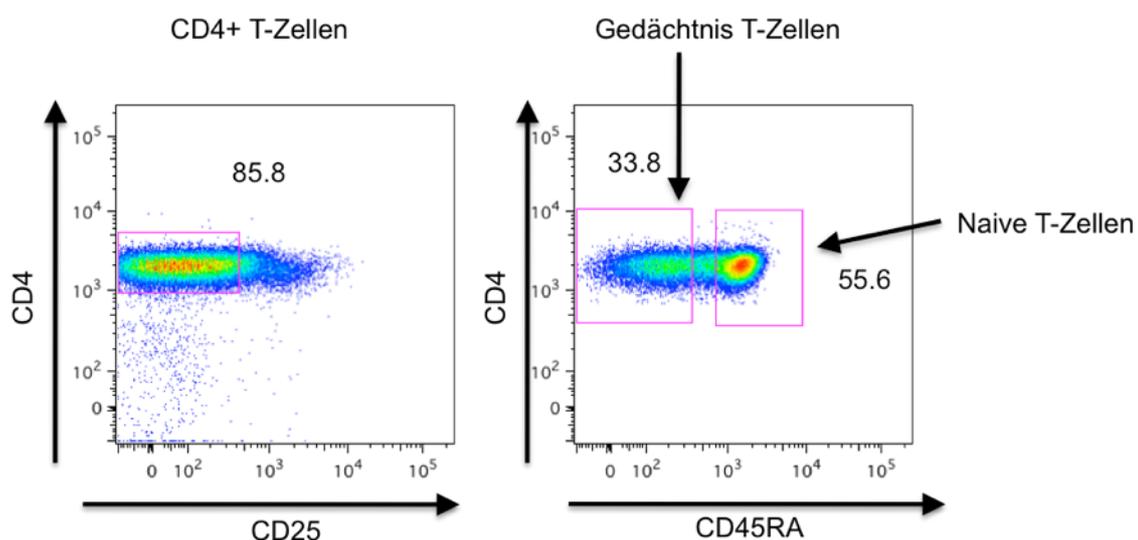
Daten am FACS CANTO II wurden mit dem Programm FACSDiva (Version 6.1.1), BD Biosciences, (D) erfasst und weiter verarbeitet mit FlowJo (Version 8.6), Treestar, (UK). Die Darstellung der Daten in Diagrammen und die statistischen Analysen wurden mit dem Programm Graph Pad Prism (Version 5), GraphPad Software, Inc., (USA) erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung von humanen CD4+ T-Zellen des peripheren Blutes auf Produktion von IL-21

IL-21 ist das Schlüsselzytokin über das CD4+ T-Helfer-Zellen ihre Effekte auf B-Zellen und CD8+ T-Zellen vermitteln. Sowohl die Fähigkeit der einzelnen Subsets zur Produktion dieses Zytokins, als auch die Mechanismen, die zur Expression und Ausschüttung von IL-21 führen waren zu Beginn dieser Studie im humanen System noch wenig erforscht.

Um herauszufinden, welche Populationen von CD4+ T-Zellen in der Lage sind, IL-21 zu produzieren, wurden zuerst CD4+ T-Gedächtniszellen und naive CD4+ T-Zellen isoliert und *ex vivo* stimuliert. Gedächtniszellen wurden als CD4+CD45RA- Zellen und naive Zellen als CD4+CD45RA+ Zellen aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) isoliert. Um regulatorische T-Zellen auszuschliessen wurden in beiden Fällen auch CD25+ Zellen depletiert. Die Abbildung 1-1 zeigt die Gatingstrategie für die FACS gestützte Zellaufreinigung.

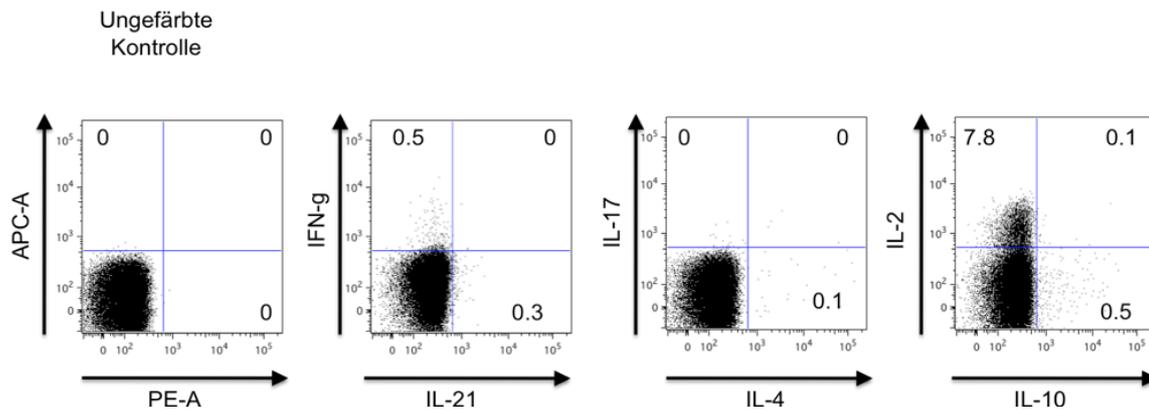


**Abb. 1-1) Aufreinigungsstrategie für CD4+ T-Gedächtniszellen und naive T-Zellen.** Durchflusszytometrische Analyse von humanen PBMCs. Exemplarische Gatesetzung für die Zellsortierung.

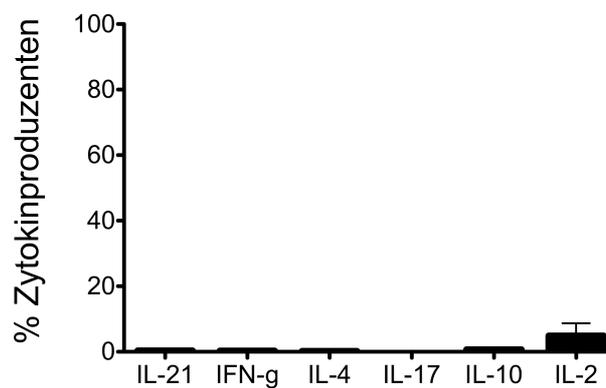
#### 4.1.1 Naive CD4+ T-Zellen produzieren kein IL-21

Per Definition produzieren naive T-Zellen keine Effektorzytokine (Murphy K 2008). Die Ergebnisse zeigen, dass dies auch auf die Produktion von IL-21 zutrifft (Abb.1-2).

A



B



**Abb. 1-2) Naive CD4+ T-Zellen produzieren ex vivo kein IL-21.** A) Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinexpression naiver (CD4+CD45RA+CD25-) T-Zellen des humanen peripheren Blutes nach ex vivo Stimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Balken zeigen die Mittelwerte für den prozentualen Anteil von Zytokinproduzenten an allen naiven CD4+ T-Zellen  $\pm$  Standardabweichungen. Die Daten stammen aus 4 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 7 Spendern.

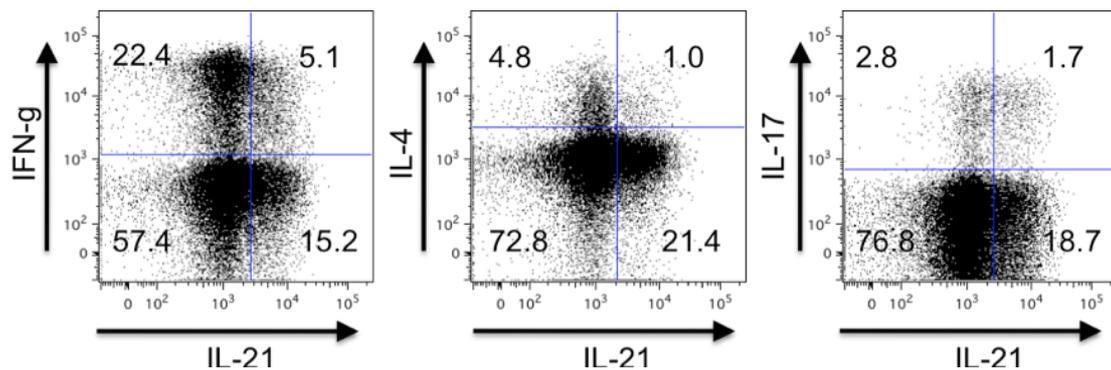
Wie das Balkendiagramm der Abb. 1-3 zeigt, wurden die Zytokine IL-21, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-17 und IL-10 von weniger als 1% der naiven T-Zellen produziert. Lediglich IL-2 Produktion konnte in  $4,8 \pm 3,8\%$  der Zellen nachgewiesen werden.

#### 4.1.2 CD4+ T-Gedächtniszellen produzieren IL-21

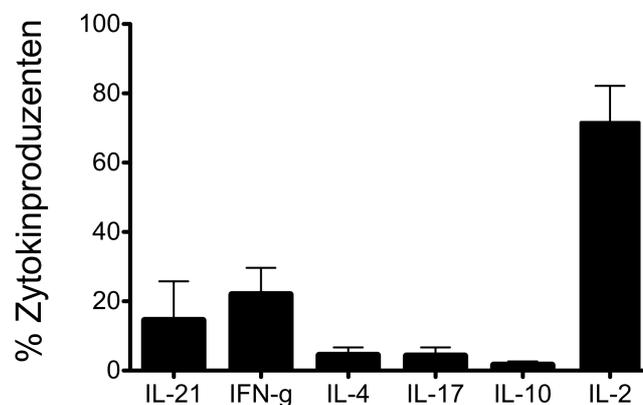
Wie in Abb. 1-3 zu sehen ist, sind CD4+ T-Gedächtniszellen in der Lage, nach polyklonaler Stimulation durch Phorbol-12,13-dibutyrat (PdBu) und Ionomycin, die das T-Zell Rezeptorsignal imitieren, IL-21 zu produzieren. Es exprimieren  $14,5 \pm 11,3\%$  der Zellen IL-21. Des Weiteren produzierten  $21,9 \pm 7,7\%$  IFN- $\gamma$  und  $4,3 \pm 2,3\%$  IL-4. Für IL-17 waren  $4,2 \pm 2,5\%$  aller Zellen positiv. Die Expression von IL-10 lag bei  $1,6 \pm 1,1\%$  und die von IL-2 bei  $71,6 \pm 21,1\%$ .

Demnach ist IL-21 neben IFN- $\gamma$  das häufigste Effektorzytokin, das von CD4+ T-Gedächtniszellen produziert wird, was seine Bedeutung in der Regulation von Immunantworten durch CD4+ T-Helfer-Zellen unterstreicht. Die Abbildung 1-3 zeigt außerdem, dass IL-21 zum Teil von IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-17 produzierenden Zellen koexprimiert wird. So produzieren  $15,2 \pm 9,9\%$  der IFN- $\gamma$  positiven Zellen auch IL-21. Von allen IL-4 produzierenden Zellen exprimieren  $15,8 \pm 6,4\%$  IL-21 und von allen IL-17 positiven Zellen  $30,5 \pm 20,0\%$ .

A



B



**Abb. 1-3) CD4+ T-Gedächtniszellen produzieren *ex vivo* IL-21.** A) Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinexpression FACS aufgereinigter humaner CD4+CD45RA-CD25- T-Gedächtniszellen des peripheren Blutes nach *ex vivo* Stimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Balken zeigen die Mittelwerte für den prozentualen Anteil von Zytokinproduzenten an allen CD4+ T-Gedächtniszellen  $\pm$  Standardabweichungen. Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 6 Spendern.

#### 4.1.3 Alle CD4+ T-Helfer-Zell-Subsets produzieren IL-21

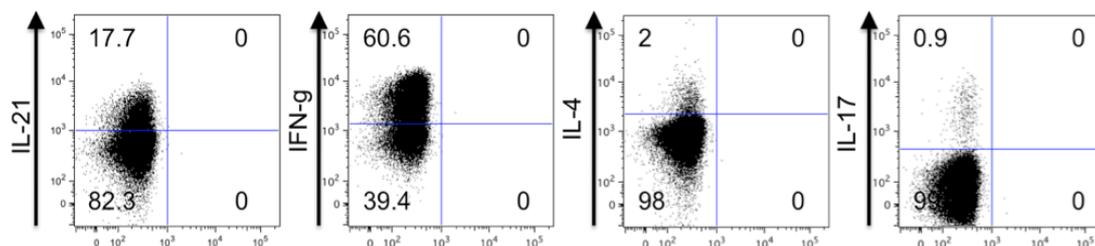
Die Tatsache, dass Zellen, die IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-17 produzieren, auch IL-21 produzieren können (Abb. 1-3), führte zu der Vermutung, dass alle bekannten CD4+ T-Helfer-Zell-Subsets zur Expression von IL-21 fähig sind. Um dies weiter zu bestätigen, wurden CD4+ T-Gedächtniszellen mit Hilfe von subsetspezifischen Oberflächenmarkern isoliert, *ex vivo* stimuliert und analysiert.

Um die IL-21 Produktion von Th1, Th2 bzw. Th17 Zellen zu analysieren, wurden die Oberflächenmoleküle CXCR3, CRTH2 bzw. CCR6 gefärbt. CXCR3+ bzw. CRTH2+

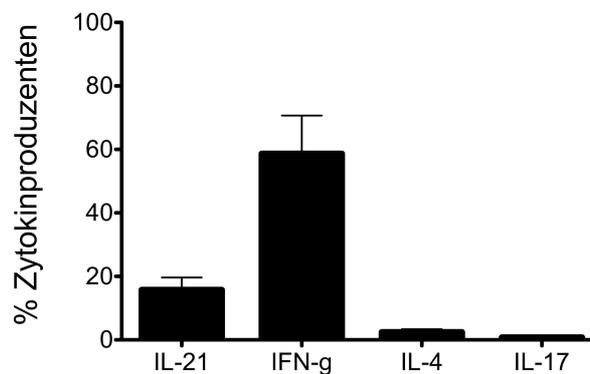
CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen aus den selben Spendern wurden sortiert und *ex vivo* stimuliert.

Abb. 1-4 zeigt die Zytokinexpression der Th1 Zellen, unter denen erwartungsgemäß viele IFN- $\gamma$  Produzenten und relativ wenig IL-4 und IL-17 Produzenten zu finden waren. Bemerkenswert ist, dass ein erheblicher Anteil der Th1 Zellen in der Lage sind, IL-21 zu produzieren.

A



B

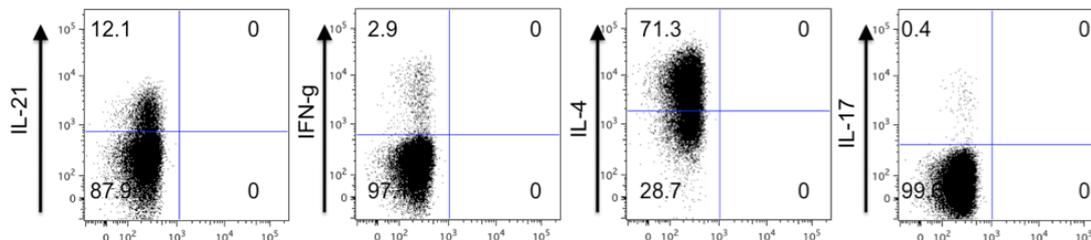


**Abb. 1-4) Th1 Zellen produzieren *ex vivo* IL-21.** A) Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinexpression FACS aufgereinigter humaner Th1 Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>) des peripheren Blutes nach *ex vivo* Stimulation mit PdBU/Ionomyzin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Balken zeigen die Mittelwerte für den prozentualen Anteil von Zytokinproduzenten an allen Th1 Zellen  $\pm$  Standardabweichungen. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 5 Spendern.

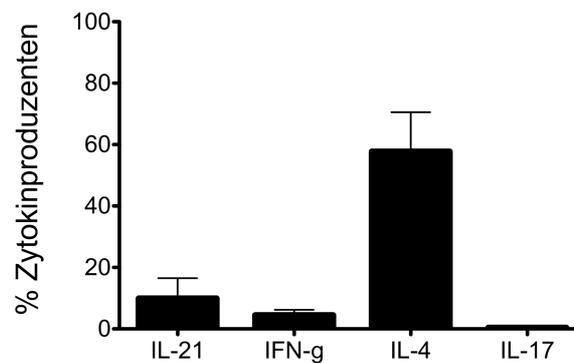
Die Expression des Zytokins IFN- $\gamma$  konnte für  $58,6 \pm 12,1\%$  der Th1 Zellen nachgewiesen werden. Von diesen Zellen produzierten  $15,7 \pm 3,9\%$  IL-21, während nur  $2,4 \pm 1,0\%$  IL-4 und  $0,8 \pm 0,6\%$  IL-17 produzierten.

Auch Th2 Zellen sind fähig, IL-21 herzustellen (Abb. 1-5). Neben dem hohen Anteil IL-4 positiver Zellen, war der Anteil der IFN- $\gamma$  und IL-17 Produzenten wie zu erwarten war, gering.

A



B

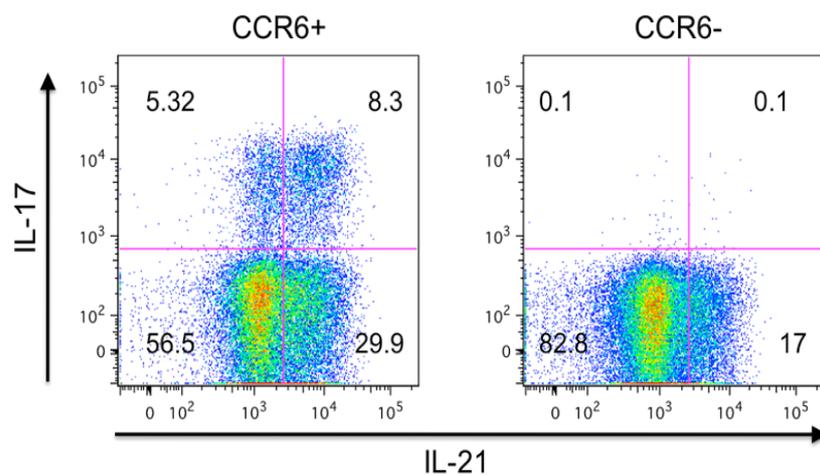


**Abb. 1-5) Th2 Zellen produzieren ex vivo IL-21.** A) Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinexpression FACS aufgereinigter humaner Th2 Zellen (CD4+CD25-CD45RA-CRTH2+) des peripheren Blutes nach ex vivo Stimulation mit PdBU/Ionomyzin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Balken zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von Zytokinproduzenten an allen Th2 Zellen  $\pm$  Standardabweichungen. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 5 Spendern.

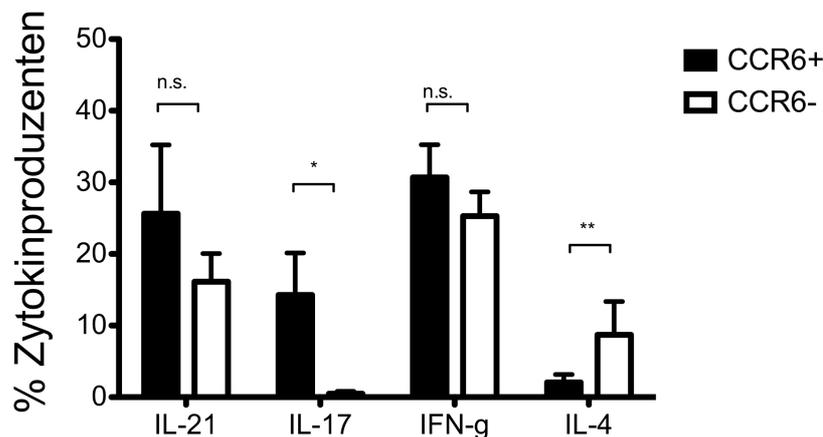
Es waren  $57,7 \pm 12,8\%$  der Zellen positiv für IL-4 und nur  $4,4 \pm 1,8\%$  positiv für IFN- $\gamma$  und  $0,4 \pm 0,2\%$  für IL-17. Eine IL-21 Produktion konnte für  $9,9 \pm 6,6\%$  der Th2 Zellen gezeigt werden.

Das dritte untersuchte Subset der CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen sind die Th17 Zellen. Gedächtniszellen wurden für den Chemokinrezeptor CCR6 gefärbt, da alle Th17 Zellen diesen Oberflächenmarker tragen. CCR6<sup>+</sup> und CCR6<sup>-</sup> Zellen aus denselben Spendern wurden sortiert und *ex vivo* stimuliert. Abb. 1-6 zeigt, dass nur CCR6<sup>+</sup> Zellen IL-17 produzieren, dass eine Koproduktion von IL-17 und IL-21 vorliegt, und dass auch CCR6<sup>-</sup> Zellen IL-21 bilden.

A



B



**Abb. 1-6) Th17 Zellen produzieren *ex vivo* IL-21.** A) Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinexpression FACS aufgereinigter humaner CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+/-</sup> T-Gedächtniszellen des peripheren Blutes nach *ex vivo* Stimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. Th17 Gedächtniszellen sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> B) Statistische Analyse. Die Balken zeigen die Mittelwerte des Anteils der Zytokinproduzenten an allen CCR6<sup>+/-</sup> Zellen  $\pm$  Standardabweichungen. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 5 Spendern.

Unter den CCR6+ Zellen produzierten  $14,3 \pm 5,9\%$  IL-17,  $30,7 \pm 4,5\%$  IFN- $\gamma$  und  $2,1 \pm 1,1\%$  IL-4, während unter den CCR6-  $0,5 \pm 0,3\%$  IL-17,  $25,3 \pm 3,4\%$  IFN- $\gamma$  und  $8,7 \pm 4,6\%$  IL-4 produzierten. Eine IL-21 Produktion konnte in der Population der CCR6+ Zellen ( $25,6 \pm 9,6\%$ ), als auch unter den CCR6- Zellen ( $16,12 \pm 3,9\%$ ) nachgewiesen werden.  $38,1 \pm 15,8\%$  der IL-17 produzierenden CCR6+ Zellen koexprimierten IL-21.

Es konnte also gezeigt werden, dass alle Subsets von CD4+ T-Helfer-Zellen zur IL-21 Produktion fähig sind. Th17 Zellen beinhalten den größten Anteil an IL-21 produzierenden Zellen, gefolgt von Th1 und diese von Th2 Zellen.

#### **4.2 Untersuchung humaner CD4+ T-Gedächtniszellen sekundärer Lymphorgane (Tonsille) auf Produktion von IL-21.**

Sekundäre Lymphorgane sind der Ort der Antigenpräsentation und der Interaktion von T- und B-Zellen. Die T-Zell-abhängige Immunglobulinproduktion wird durch die von CD4+ T-Helfer-Zellen ausgeschütteten Zytokine reguliert. (Murphy K 2008) IL-21 spielt besonders bei der Produktion von IgG aber auch bei der Organisation der Keimzentren eine Schlüsselrolle. (Leonard WJ 2008)

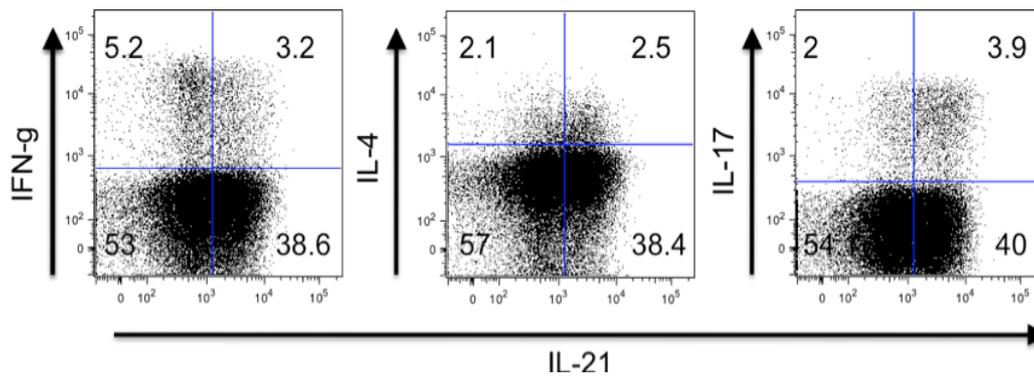
Tonsillen sind die am besten und mit wenigen Ausnahmen einzigen zugänglichen sekundären Lymphorgane des Menschen, und obwohl ektomierte Tonsillen von chronischen Entzündungen geprägt sind, stellen sie für die immunologische Forschung den besten Weg für die Annäherung an die Verhältnisse in sekundär lymphatischen Organen dar.

Es wurden daher CD4+ T-Gedächtniszellen aus Tonsillen von Patienten nach Tonsillektomie isoliert und *ex vivo* stimuliert.

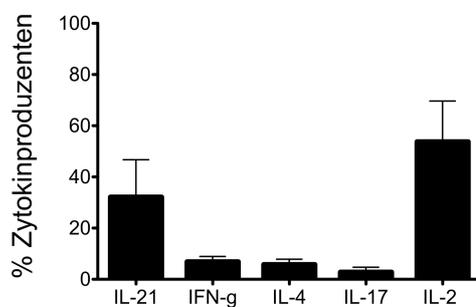
##### **4.2.1 Tonsilläre CD4+ T-Gedächtniszellen produzieren in stärkerem Maße IL-21**

Wie Abb. 2-1 zeigt, produzieren CD4+ T-Gedächtniszellen aus der Tonsille IL-21. Die Frequenz der IL-21 Produzenten ist allerdings mit über 30% höher als im Blut. Unterschiede sind auch sowohl in der Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 und IL-2, als auch in der Anzahl der Koproduzenten festzustellen. Von allen IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen exprimieren  $29,6 \pm 12,0\%$  IL-21, während es unter den IL-4 Produzenten  $47,8 \pm 7,4\%$  und unter den IL-17 produzierenden Zellen,  $45,6 \pm 17,9\%$  sind.

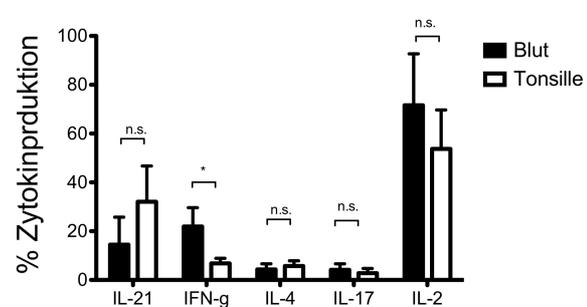
A



B



C



**Abb. 2-1) Humane tonsilläre CD4+ Gedächtniszellen produzieren *ex vivo* IL-21.** A) Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinexpression FACS aufgereinigter humaner tonsillärer CD4+ T-Gedächtniszellen nach *ex vivo* Stimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Balken zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von Zytokinproduzenten an allen tonsilläre CD4+ T-Zellen  $\pm$  Standardabweichungen. Die Daten stammen aus 4 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 5 Spendern. C) Statistische Analyse. Vergleich der Zytokinproduktion CD4+ T-Gedächtniszellen aus dem peripheren Blut mit denen aus der Tonsille (unterschiedliche Spender für Tonsillen und peripherem Blut). Die Balken zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von Zytokinproduzenten  $\pm$  Standardabweichungen.

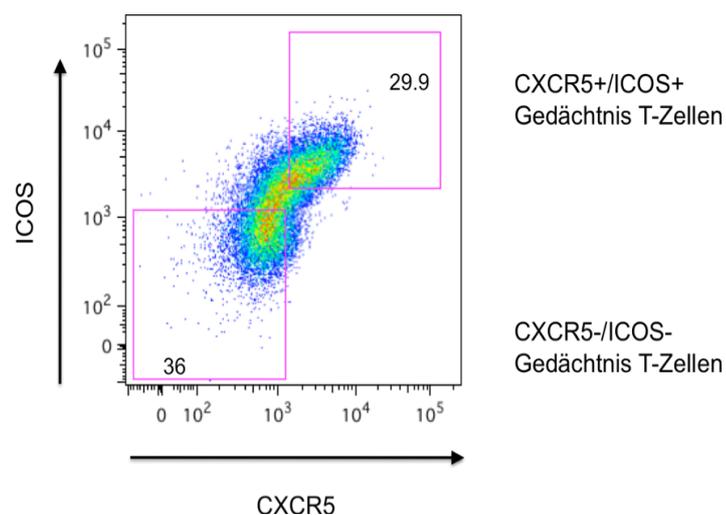
IL-21 ist das am häufigsten von CD4+ T-Zellen produzierte Effektorzytokin in der Tonsille, es konnte in  $32,1 \pm 14,7\%$  der Zellen detektiert werden. Außerdem waren unter den tonsillären T-Helfer-Zellen  $6,8 \pm 2,1\%$  IFN- $\gamma$  Produzenten,  $5,4 \pm 2,1\%$  IL-4 Produzenten,  $2,8 \pm 1,9\%$  IL-17 Produzenten und für IL-2 waren  $53,7 \pm 15,9\%$  der Zellen positiv. Im Vergleich mit CD4+ T-Gedächtniszellen aus dem peripheren Blut befinden sich unter den tonsillären Zellen mehr IL-21 und IL-4 Produzenten und weniger IFN- $\gamma$ , IL-17 und IL-2 Produzenten. Auf Grund der niedrigen Stichprobenzahl ( $n=5$ ) konnte trotz offensichtlichem Unterschied in der IFN- $\gamma$ , IL-21, IL-4, IL-17 und IL-2 Produktion nur für

die IFN- $\gamma$  Produktion ein statistisch signifikanter Unterschied errechnet werden. In der Tonsille finden sich viel mehr Zellen, die IL-4 und IL-21 koexprimieren als im Blut.

#### 4.2.2 Tfh- und Nicht-Tfh-Zellen produzieren IL-21

Es ist gezeigt worden, dass folliculäre T-Helfer-Zellen (Tfh) den Chemokinrezeptor CXCR5, welcher den Eintritt in die B-Zell-Zonen der Lymphfollikel ermöglicht, auf ihrer Oberfläche tragen. Des Weiteren exprimieren sie ICOS, den Rezeptor für ICOS-Ligand. (Fazilleau N 2009)

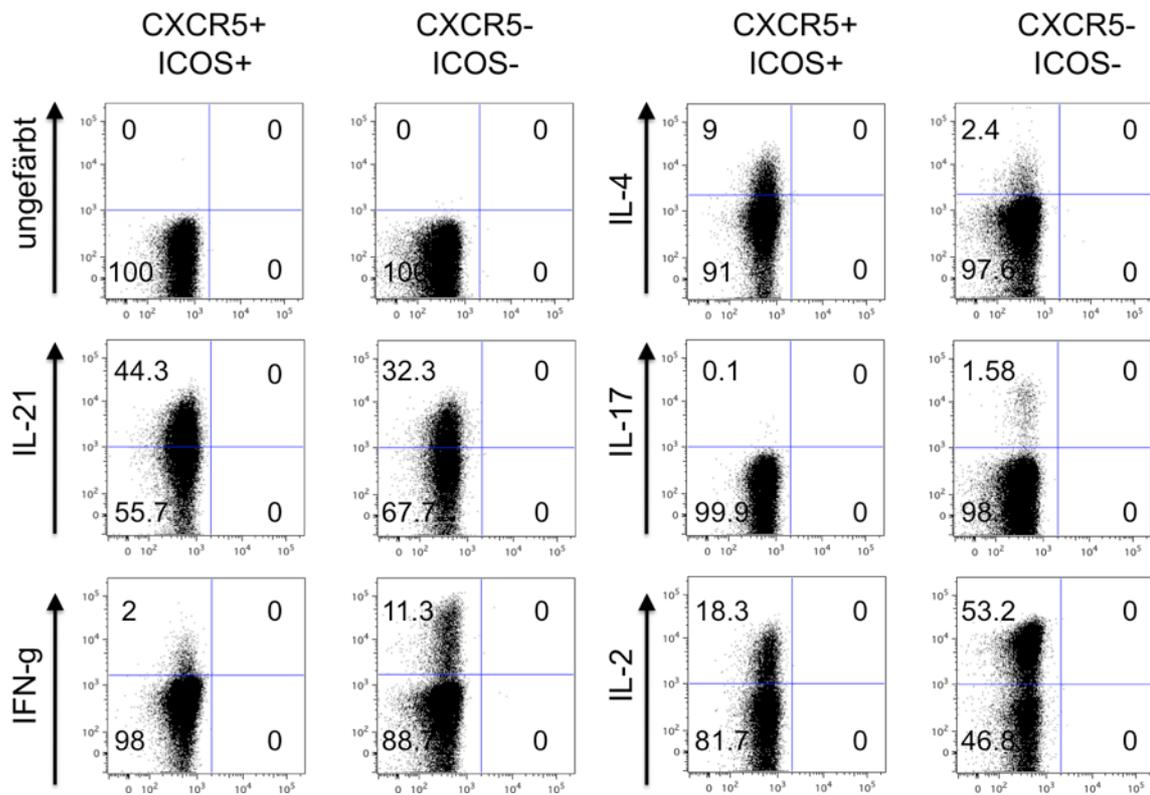
Zur Identifizierung von Tfh-Zellen, die in den Lymphfollikeln sekundärer Lymphorgane zu finden sind, wurden in einem weiteren Versuchsansatz die CD4+ T-Gedächtniszellen aus der Tonsille auf ihre Expression von CXCR5 und ICOS analysiert (Abb.2-2).



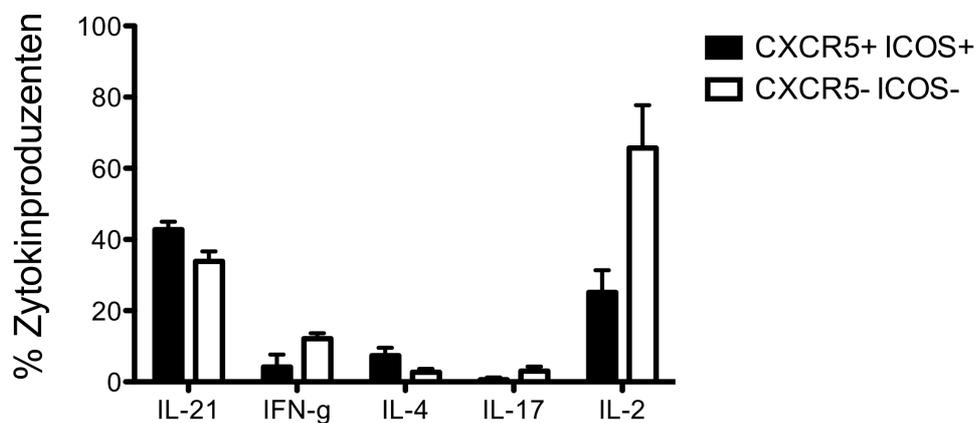
**Abb. 2-2) Tonsilläre CD4+ T-Gedächtniszellen werden anhand der Expression von CXCR5 und ICOS in Tfh- und Nicht-Tfh-Zellen eingeteilt.** Durchflusszytometrische Analyse mittels MACS angereicherter tonsillärer CD4+ T-Gedächtniszellen. Die Gates wurden, wie in Abb. 1-1 zu sehen ist, gesetzt. Zusätzlich wurden die Oberflächenmoleküle CXCR5 und ICOS gefärbt.

Es konnten zwei distinkte Populationen identifiziert werden. CXCR5+/ICOS+ folliculäre T-Helfer-Zellen (Tfh) und CXCR5-/ICOS- Nicht-Tfh-Zellen. Diese beiden Populationen wurden mittels FACS isoliert und *ex vivo* stimuliert (Abb.2-3).

A



B



**Abb. 2-3) Zytokinexpressionsmuster von Tfh- und Nicht-Tfh-Zellen.** A) Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion FACS aufgereinigter humaner CD4+ T-Helfer-Zellen aus der Tonsille nach *ex vivo* Stimulation. CD4+CD25-CD45RA-CXCR5+ICOS+ Tfh-Zellen im Vergleich mit CD4+CD25-CD45RA-CXCR5-ICOS- Nicht-Tfh-Zellen. B) Statistische Analyse. Die Balken zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von Zytokinproduzenten  $\pm$  Standardabweichungen. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 3 Spendern.

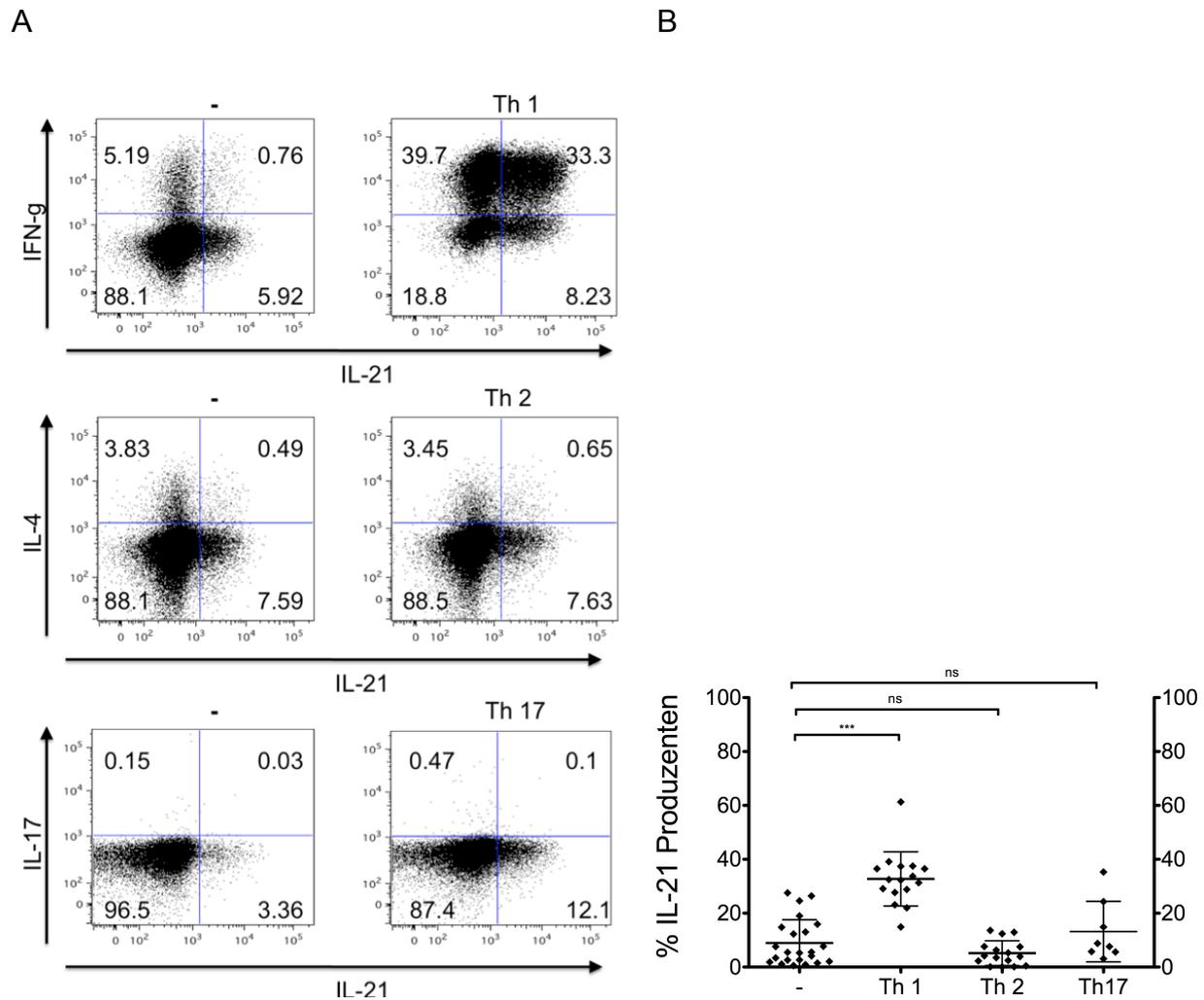
Es wurden sichtbare Unterschiede in der Zytokinproduktion der beiden Populationen gefunden. Abb. 2-3 zeigt, dass in der Population der CXCR5+ICOS+ Zellen für  $42,8 \pm 2,2\%$  IL-21 Produktion nachgewiesen wurde, während sich unter den CXCR5- ICOS- Zellen noch  $33,8 \pm 2,8\%$  IL-21 Produzenten befanden. Auch für andere Zytokine wurden unterschiedliche Expressionsraten beobachtet. So wird von nur  $4,2 \pm 3,5\%$  der doppelt positiven Zellen IFN- $\gamma$ ,  $0,6 \pm 0,6\%$  IL-17 und  $25,1 \pm 6,3\%$  IL-2 synthetisiert, während sich unter den doppelt negativen Zellen  $12,1 \pm 1,5\%$  IFN- $\gamma$  Produzenten,  $3,0 \pm 1,2\%$  IL-17 Produzenten und  $65,7 \pm 12,1\%$  IL-2 Produzenten befanden. Ähnlich wie IL-21 wird auch IL-4 stärker ( $7,4 \pm 2,3\%$ ) von CXCR5+ ICOS+ als von CXCR5- ICOS- Zellen ( $2,7 \pm 0,9\%$ ) produziert. Auf Grund der niedrigen Stichprobenzahl ( $n=3$ ) war keine statistische Analyse möglich. Die Ergebnisse können nur als richtungsweisend interpretiert werden. Es kann also zusammenfassend festgestellt werden, dass das am häufigsten produzierte Effektorzytokin sowohl in der Population der folliculären T-Helfer-Zellen als auch unter den CXCR5-ICOS-Nicht-Tfh-Zellen IL-21 ist, Tfh-Zellen weisen nur eine 1,3-fach höhere Expressionsrate auf. Stärkere Unterschiede ließen sich für IL-4 Produzenten, die 3 mal öfter unter Tfh-Zellen zu finden sind, feststellen, während eine höhere Anreicherung für Zellen, die IFN- $\gamma$  (3-fach), IL-17 (5-fach) und IL-2 (3-fach) produzieren unter den Nicht-Tfh-Zellen beobachtet wurde.

#### **4.3 Induktion der IL-21 Expression in humanen CD4+ naiven T-Zellen des peripheren Blutes.**

Wie gezeigt werden konnte, sind naive Zellen *ex vivo* nicht in der Lage, IL-21 zu produzieren. Deshalb sollte untersucht werden, welche Faktoren nötig sind, diese Zellen dazu anzuregen, IL-21 zu produzieren.

### 4.3.1 IL-12 induziert IL-21 Produktion in naiven CD4+ T-Zellen

Zu Beginn wurde untersucht, wie sich Th1, Th2 und Th17 induzierende Bedingungen auf die IL-21 Produktion auswirken. (Abb. 3-1)

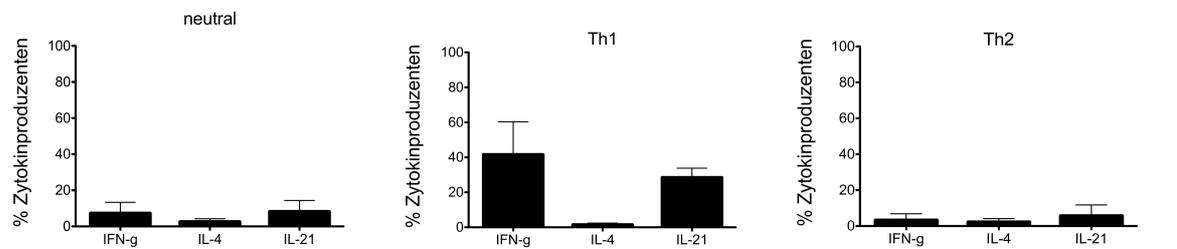


**Abb. 3-1) IL-21 Produktion *in vitro* polarisierter CD4+ T-Zellen.** A) Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion FACS aufgereinigter naiver CD4+CD25-CD45RA+CCR6- *in vitro* stimulierter T-Zellen nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. Die Stimulation erfolgte mit anti CD3 und anti CD28 Antikörpern unter neutralen nicht polarisierenden und Th1, Th2 und Th17 polarisierenden Bedingungen. Die Dotplots der neutralen Kondition sind repräsentativ für 9 unabhängige Experimente mit insgesamt 23 Spendern, die Th1 und Th2 Bedingungen wurden in 6 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 16 Spendern, die Th17 Kondition in 4 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 8 Spendern durchgeführt. B) Statistische Analyse. Die Striche zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von IL-21 Produzenten  $\pm$  Standardabweichungen.

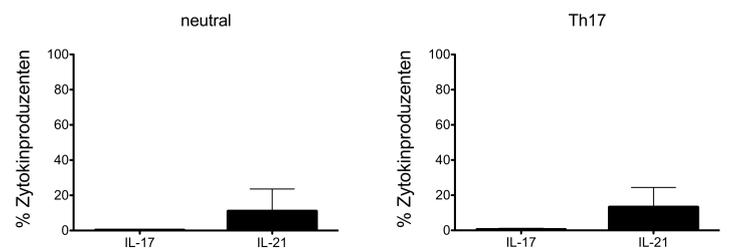
Zellen, die unter Th1 polarisierenden Bedingungen kultiviert wurden produzierten zu  $32,7 \pm 10\%$  IL-21. Unter Th2 Bedingungen konnte für  $5,2 \pm 4,6\%$  und unter Th17 Konditionen für  $13,2 \pm 11,2\%$  der Zellen eine IL-21 Produktion nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied der IL-21 Produzenten im Vergleich zur neutralen Kondition ( $9,0 \pm 8,6\%$ ) konnte für Zellen der Th1 Kondition nachgewiesen werden. Wohingegen weder die Th17 noch die Th2 Kondition eine signifikante Erhöhung gegenüber der Neutralkondition ergab (Abb. 3-2).

Um zu untersuchen, ob eine Polarisation der naiven CD4+ Zellen zu Th1, Th2 oder Th17 Zellen erfolgreich war, wurde die Produktion der subsetspezifischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-17 ermittelt (Abb. 3-2).

A



B



**Abb. 3-2) Zytokinproduktion unter Th1, Th2 und Th17 Konditionen.** Statistische Analyse der durchflusszytometrischen Bestimmung der Zytokinproduktion FACS aufgereinigter naiver CD4+ *in vitro* stimulierter T-Zellen nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. Die Balken zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von Zytokinproduzenten  $\pm$  Standardabweichungen. A) Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit 6 Spendern. B) Die Daten stammen aus 4 unabhängigen Experimenten mit 8 Spendern.

In der neutralen Kondition konnte eine IFN- $\gamma$  Produktion von  $7,3 \pm 6,0\%$ , IL-4 von  $2,6 \pm 1,6\%$  und IL-21 von  $8,2 \pm 6,2\%$  der Zellen nachgewiesen werden. In der Th1 Kondition produzierten  $41,6 \pm 18,7\%$  der Zellen IFN- $\gamma$ , was eine signifikante Erhöhung um das sechsfache darstellt.

In der Th2 Kondition wurde eine durchschnittliche IL-4 Produktion von  $2,2 \pm 1,9\%$  erreicht. Die IFN- $\gamma$  Produktion unter Th2 Bedingung sank von durchschnittlich  $7,3\%$  im neutralen auf  $3,3\%$  in dem Ansatz mit IL-4. Dieser Unterschied ist signifikant,  $p < 0,05$  (Daten nicht gezeigt).

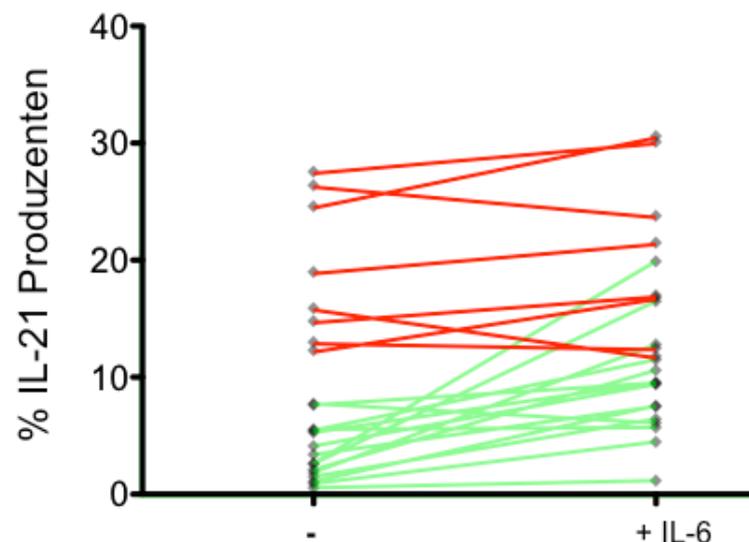
In weiteren Experimenten wurde in der Kontrollkondition eine IL-17 Produktion von  $0,2 \pm 0,3\%$  und eine IL-21 Produktion von  $11,0 \pm 12,6\%$  erzielt, während die IL-17 Produktion in der Th17 Kondition mit  $0,4 \pm 0,7\%$  fast unverändert blieb, stieg die IL-21 Produktion auf  $13,2 \pm 11,2\%$ .

#### **4.3.2 IL-6 und IL-21 induzieren IL-21 Produktion, aber nicht in allen Spendern**

Des Weiteren sollte untersucht werden, welche anderen Zytokine einen Einfluss auf die IL-21 Produktion *in vitro* stimulierter CD4<sup>+</sup> naiver T-Zellen haben.

Im Maussystem ist gezeigt worden, dass IL-6 und IL-21 induzierend auf die Expression von IL-21 wirken (Nurieva RI 2007). Um zu überprüfen, ob das auch auf den Menschen zutrifft, wurden Induktionsexperimente durchgeführt, bei denen rekombinantes humanes IL-6 und IL-21 dem Kulturmedium zugegeben wurden.

In 9 Experimenten mit insgesamt 23 gesunden Spendern (Tab. 1) wurde eine hohe Variabilität der IL-21 Produktion in Abwesenheit exogener Zytokine und mit Neutralisierung von IL-4, IL-12 und IFN- $\gamma$  festgestellt (Mittelwert  $9,0 \pm 8,6\%$ , Minimum  $0,6\%$ , Maximum  $27,6\%$ ). Wie in Abb. 4-1 gezeigt wird, hat die Zugabe von IL-6 einen stärkeren Effekt auf die Zellen, die in der neutralen Kondition verhältnismäßig wenig IL-21 ( $< 10\%$ ) produzieren und keinen bis einen sehr schwachen Effekt auf die Zellen, die in der neutralen Kondition viel IL-21 ( $> 10\%$ ) produzieren.

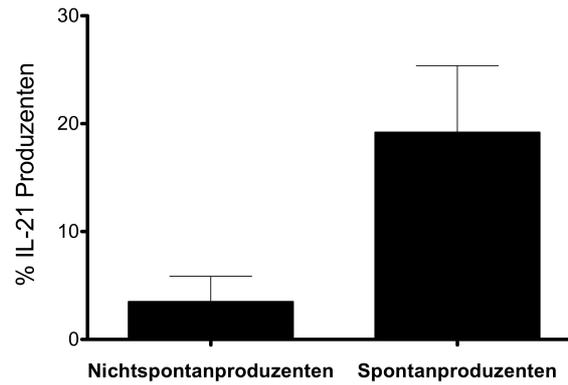


**Abb. 3-3) IL-21 Produktion nach *in vitro* Induktion mit und ohne Zugabe von IL-6.** Statistische Analyse der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils von IL-21 Produzenten an naiven T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit anti CD3/CD28 in An- oder Abwesenheit von rekombinantem IL-6 nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. Die Daten stammen aus 9 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 23 Spendern.

Anhand dieser Kriterien wurden die Spender in 2 Gruppen eingeteilt: Die erste Gruppe von Spendern, bei denen in der Neutralkondition weniger als 10% der Zellen IL-21 produzieren, wurden als Nichtspontanproduzenten bezeichnet, während die zweite Gruppe von Spendern, bei denen in der Neutralkondition mehr als 10% der Zellen IL-21 produzierten als Spontanproduzenten bezeichnet wurden. (siehe Tab. 1) Der relative Anteil von Nicht- und Spontanproduzenten liegt bei 65 zu 35. Abb. 4-2 zeigt den durchschnittlichen Anteil von IL-21 Produzenten in der Neutralkondition, die bei den Nichtspontanproduzenten bei  $3,5 \pm 2,4\%$  und bei den Spontanproduzenten bei  $19,9 \pm 6,2\%$  liegt. Mittels statistischer Clusteranalyse können alle Spender in ebenfalls 2 Gruppen unterteilt werden. Eine Gruppe enthält die Spender 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 14,15 und 18-23, die andere Gruppe enthält die Spender 2, 4, 7, 11, 12, 13, 16, 17. Damit kann die willkürlich gesetzte Grenze durch statistische Analyse bestätigt werden.

**Tabelle 1 )** Liste der IL-21 Produktion von naiven CD4+ T-Zellen nach Stimulation unter verschiedenen Konditionen in %.

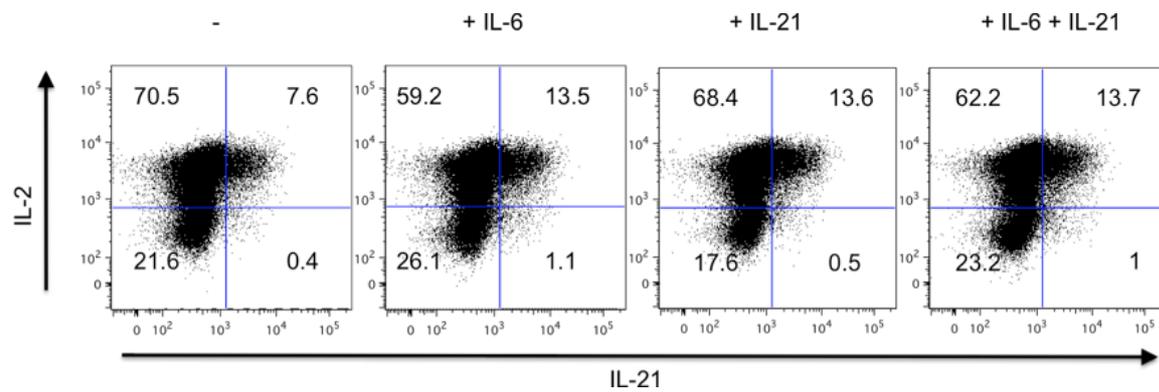
Experiment	Spender	neutral	+ anti IL-6	+ IL-6	+IL-21	+IL-6 + IL-21
1	1	1,9	n.a.	12,8	n.a.	n.a.
2	2	24,6	n.a.	30,6	n.a.	n.a.
2	3	0,9	n.a.	4,5	n.a.	n.a.
2	4	26,4	n.a.	23,8	n.a.	n.a.
2	5	2,7	n.a.	19,9	n.a.	n.a.
3	6	1,1	0,9	7,6	n.a.	n.a.
3	7	27,6	n.a.	30,1		
4	8	2,6	n.a.	16,5	16,6	n.a.
4	9	2,1	n.a.	10,6	12,1	n.a.
5	10	3,4	n.a.	7,5	6,7	n.a.
5	11	12,3	n.a.	16,8	14,1	n.a.
6	12	13,0	n.a.	12,5	10,3	n.a.
6	13	15,9	n.a.	11,8	14,0	n.a.
7	14	4,1	3,6	9,4	10,6	14,8
7	15	5,3	4,8	9,6	9,4	9,8
7	16	14,8	13,7	17,0	13,9	14,1
7	17	19,0	19,8	21,5	15,9	20,9
8	18	5,5	6,1	11,5	11,9	14,3
8	19	7,6	8,5	9,5	8,1	9,1
8	20	0,6	0,6	1,2	0,9	1,0
9	21	1,5	0,8	6,4	8,5	9,0
9	22	7,7	4,4	6,1	6,0	5,8
9	23	5,6	4,5	5,7	4,8	5,5



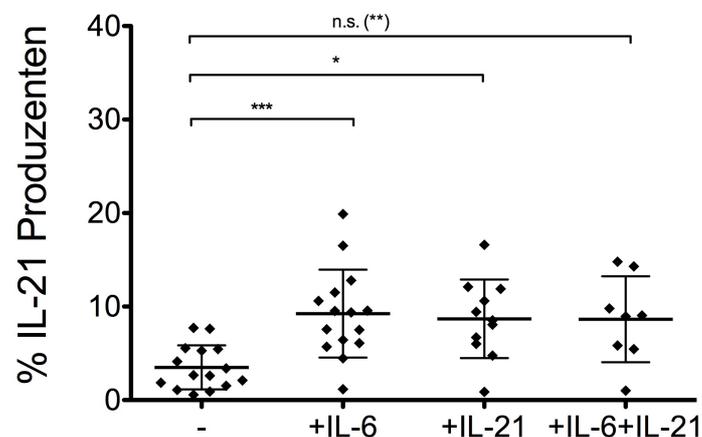
**Abb. 3-4) Durchschnittliche IL-21 Produktion in der neutralen Kondition.** Statistische Analyse der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils an IL-21 Produzenten unter FACS aufgereinigten naiven CD4+ *in vitro* stimulierten T-Zellen nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. Die Balken zeigen die Mittelwerte des Anteils von IL-21 Produzenten in der jeweiligen Gruppe an unter neutralen Konditionen stimulierten naiven CD4+ T-Zellen  $\pm$  Standardabweichung.

In Abb. 4-3 ist die IL-21 Produktion *in vitro* unter Zugabe von IL-6, IL-21 oder IL-6 und IL-21 stimulierter naiver CD4+ T-Zellen von Nichtspontanproduzenten zu sehen. Die Abb. zeigt deutlich, dass in der Gruppe der Nichtspontanproduzenten die Zugaben der genannten Zytokine eine signifikante Steigerung der IL-21 Produktion nach Restimulation herbeiführte.

A



B



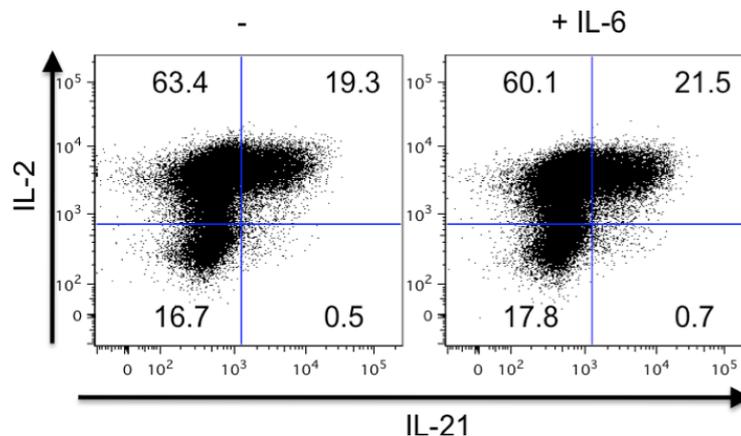
**Abb. 3-5) IL-21 Produktion von *in vitro* stimulierten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter Zugaben von IL-6, IL-21 oder IL-6 + IL-21 in der Gruppe der Nichtspontanproduzenten.** A) Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion FACS aufgereinigter naiver CD4<sup>+</sup> *in vitro* stimulierter T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>) nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Auswertung wurde mit dem Wilcoxon-Test (Mann-Whitney-Test) durchgeführt. Daten stammen von 15 Spendern in der Negativkontrolle und +IL-6 Kondition, in der +IL-21 Konditionen waren es 11 Spender. In der +IL-6 + IL-21 Kondition waren es nur 8 Spender, deshalb wurde hier zusätzlich der Mann-Whitney-Test angewendet. Die Striche zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von IL-21 Produzenten  $\pm$  Standardabweichung.

Unter Zugabe von IL-6 erhöhte sich die Anzahl der IL-21 positiven Zellen auf  $9,3 \pm 4,7\%$ , IL-21 im Kulturmedium führte zu einer Steigerung auf  $8,7 \pm 4,2\%$  und IL-6 + IL-21 auf  $8,7 \pm 4,6\%$ . Die Kombination von IL-6 und IL-21 führte zu keiner weiteren Steigerung in der Anzahl der IL-21 positiven Zellen im Vergleich zum Einsatz

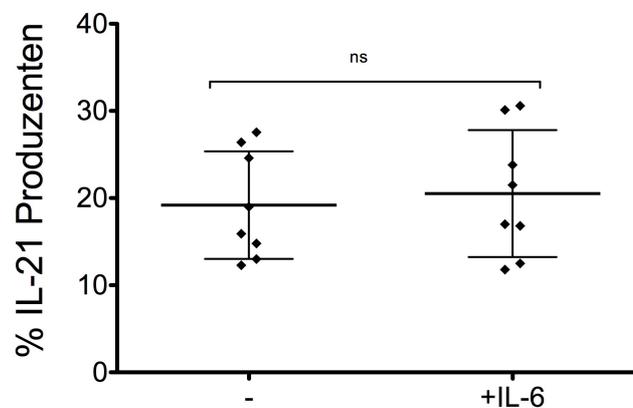
der beiden Zytokine alleine. Abb. 4-3B zeigt, dass die Steigerung in der Produktion von IL-21 unter den Nichtspontanproduzenten signifikant ist.

In der Gruppe der Spontanproduzenten konnte keine signifikante Veränderung in der IL-21 Produktion durch Zugabe von IL-6 beobachtet werden (Abb. 4-4).

A



B

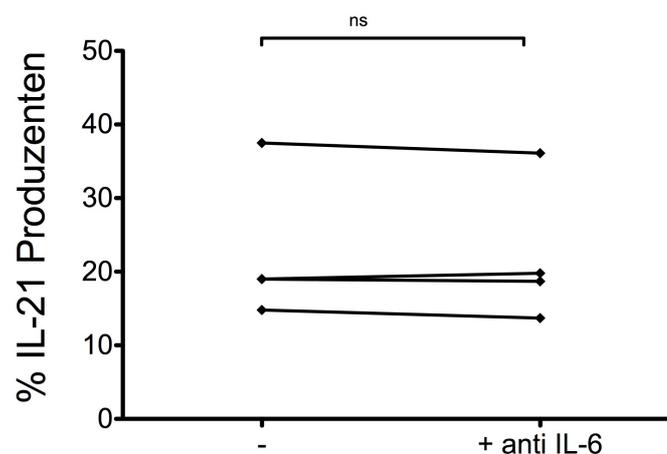


**Abb. 3-6) IL-21 Produktion von *in vitro* stimulierten naiven CD4+ T-Zellen unter Zugaben von IL-6 in der Gruppe der Spontanproduzenten.** A) Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion FACS aufgereinigter naiver CD4+ *in vitro* stimulierter T-Zellen (CD4+CD45RA+CD25-CCR6-) nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Daten stammen von 8 Spendern in 5 unabhängigen Experimenten. Die Striche zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von IL-21 Produzenten  $\pm$  Standardabweichung.

In der Negativkontrolle synthetisierten  $19,2 \pm 6,2\%$  und mit IL-6  $20,5 \pm 7,3\%$  der Zellen IL-21.

### 4.3.3 IL-6 ist nicht für die spontane IL-21 Produktion verantwortlich

Um zu untersuchen, ob diese hohe IL-21 Produktion in der Kontrollkondition unter den Spontanproduzenten durch endogenes IL-6 ausgelöst wird, wurden in einer zusätzlichen Kondition neutralisierende Antikörper gegen humanes IL-6 zugegeben. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die IL-21 Produktion von vier Spontanproduzenten lag in der Kontrollkondition bei  $37,5 \pm 10,2\%$  und mit Zugabe von anti IL-6 bei  $36,1 \pm 9,7\%$ .

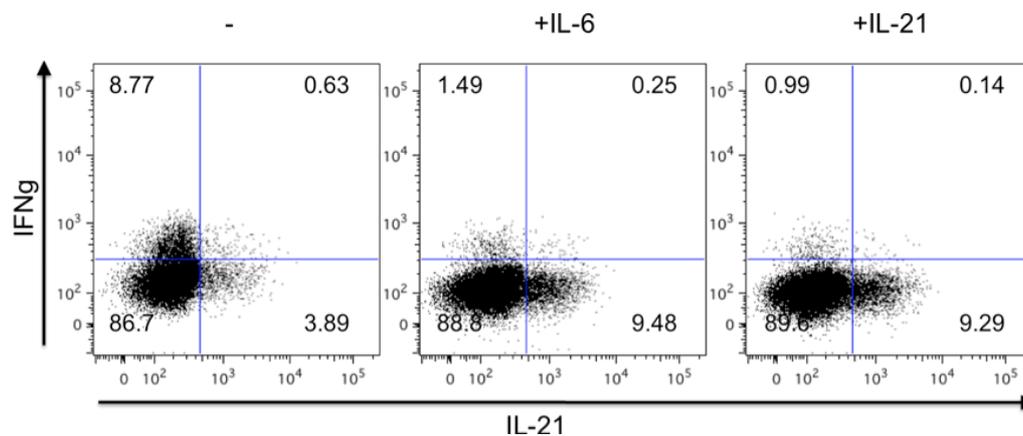


**Abb. 3-7) IL-21 Produktion *in vitro* stimulierter naiver CD4+ T-Zellen ohne und mit Neutralisierung von IL-6 im Kulturmedium.** Statistische Analyse der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils von IL-21 Produzenten an FACS aufgereinigten naiven CD4+ *in vitro* stimulierten T-Zellen nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. Die Striche zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von IL-21 Produzenten  $\pm$  Standardabweichung. Die Daten stammen von 4 Spendern aus 3 unabhängigen Experimenten.

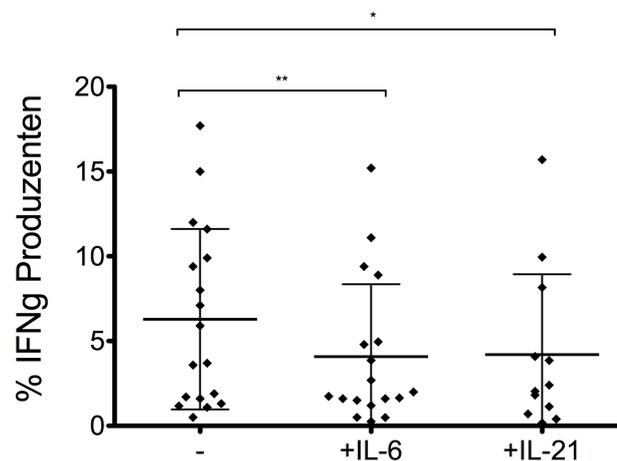
### 4.3.4 IL-6 und IL-21 hemmen die Produktion von IFN- $\gamma$ in *in vitro* stimulierten naiven CD4+ T-Zellen

Wie in Abb. 3-1 gezeigt werden konnte, ist die Zugabe von IL-12, die zu einer Th1 Polarisierung der Zellen führt, ein starker Stimulus für die IL-21 Produktion. Um zu untersuchen, ob IL-6 und IL-21 indirekt über eine Th1 Polarisierung die Induktion der IL-21 Synthese auslösen, wurde die IFN- $\gamma$  Produktion in Zellen, die in Gegenwart von IL-6 bzw. IL-21 stimuliert wurden, analysiert.

A



B



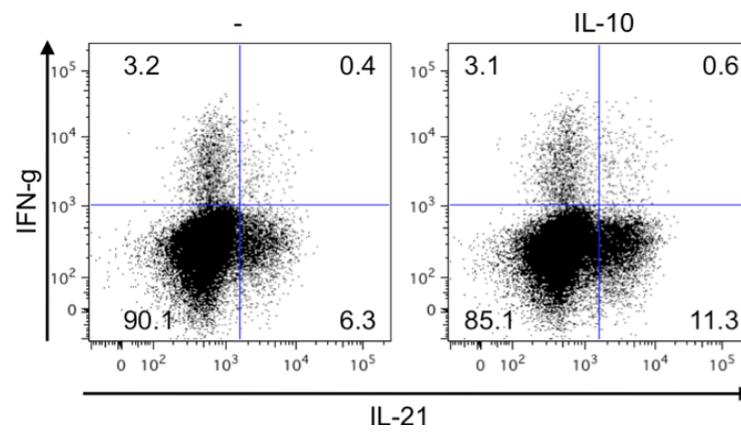
**Abb. 3-8) IFN- $\gamma$  Produktion *in vitro* stimulierter naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter Zugabe von IL-6 und IL-21.** A) Durchflusszytometrische Analyse naiver *in vitro* stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>) nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Daten stammen von 18 Spendern in – und + IL-6 und von 12 Spendern in + IL-21. Die Striche zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von IFN- $\gamma$  Produzenten  $\pm$  Standardabweichung.

Wie in Abb. 3-1 zu sehen ist, ging die Erhöhung der IL-21 Produktion, induziert durch IL-12 mit einer starken Zunahme der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen einher. Die Zugabe von IL-6 bzw. IL-21 führte wiederum zu einer Verminderung der IFN- $\gamma$  positiven Zellen. Während in der neutralen Kondition die durchschnittliche IFN- $\gamma$  Produktion bei  $6,3 \pm 5,3\%$  lag, sank sie unter IL-6 Zugabe auf  $4,1 \pm 4,3\%$  und unter IL-21 Zugabe auf  $4,2 \pm 4,7\%$ . Diese Unterschiede erwiesen sich als signifikant.

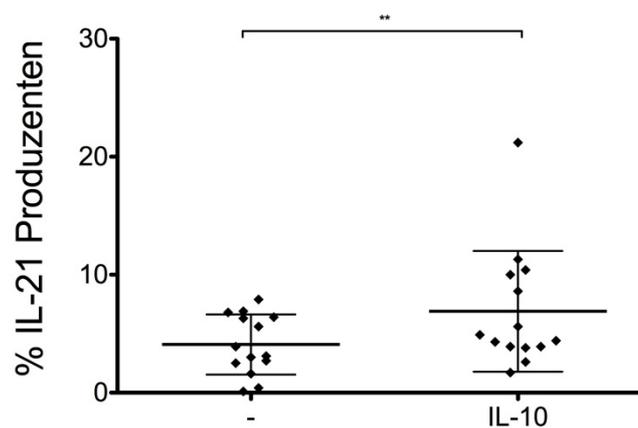
#### 4.3.5 IL-10 induziert die Expression von IL-21 in naiven CD4+ T-Zellen, ist aber nicht für spontane IL-21 Produktion verantwortlich

Neben den Effekten von inflammatorischen Zytokinen wurde der Einfluss von zwei antiinflammatorischen Zytokinen, IL-10 und TGF- $\beta$  auf die IL-21 Produktion von naiven *in vitro* stimulierten T-Zellen hin untersucht. Während für TGF- $\beta$  ein hemmender Effekt nachgewiesen werden konnte (Abb. 4-11), zeigte IL-10 einen leichten aber signifikant positiven Effekt auf die IL-21 Produktion (Abb. 4-9).

A



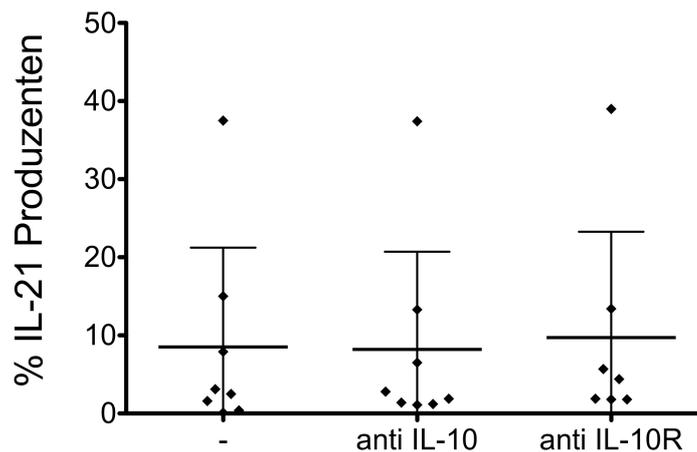
B



**Abb. 3-9) IL-21 Produktion *in vitro* stimulierter CD4+ naiver T-Zellen unter Zugabe von IL-10.**

A) Durchflusszytometrische Analyse *in vitro* stimulierter naiver CD4+ T-Zellen nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Daten stammen von 14 Spendern in 5 unabhängigen Experimenten. Die Striche zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteil von IL-21 Produzenten  $\pm$  Standardabweichung.

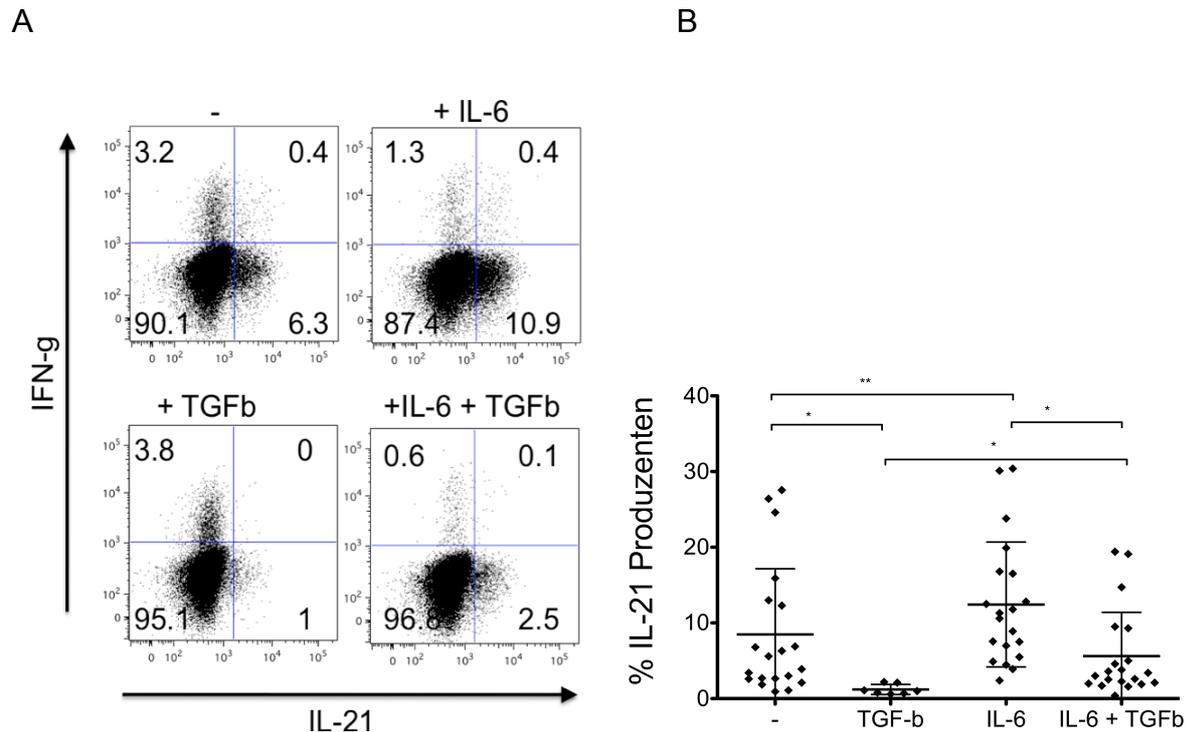
Damit kommt auch IL-10 als potentieller Stimulus für die Spontanproduktion von IL-21 unter neutralen Konditionen in Frage. Deshalb wurden weitere Induktionsexperimente durchgeführt, bei denen neutralisierende Antikörper gegen IL-10 bzw. Antikörper, die den IL-10 Rezeptor blocken zugegeben wurden (Abb. 4-10).



**Abb. 3-10) IL-21 Produktion von *in vitro* stimulierten CD4+ naiven T-Zellen unter Neutralisierung von IL-10 bzw. Blockung des IL-10R.** Statistische Analyse der durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils von IL-21 Produzenten an FACS aufgereinigten naiven CD4+ *in vitro* stimulierten T-Zellen nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. Die Daten stammen von 8 Spendern bzw. 7 Spendern in der Kondition mit anti IL-10R aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Striche zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von IL-21 Produzenten  $\pm$  Standardabweichung.

Die Expression von IL-21 in der neutralen Kondition lag bei  $8,5 \pm 12,7\%$ , mit anti IL-10 lag sie bei  $8,2 \pm 12,5\%$  und mit anti IL-10R bei  $9,7 \pm 13,6\%$ . Ein Experiment wurde mit einem bekannten Spontanproduzenten und einem bekannten Nichtspontanproduzenten durchgeführt. Auch hier konnte keine Verringerung der spontanen IL-21 Produktion durch Zugabe von anti IL-10 und anti IL-10R beobachtet werden.

### 4.3.6 TGF- $\beta$ hemmt die Entstehung von IL-21 produzierenden Zellen unter *in vitro* Stimulation

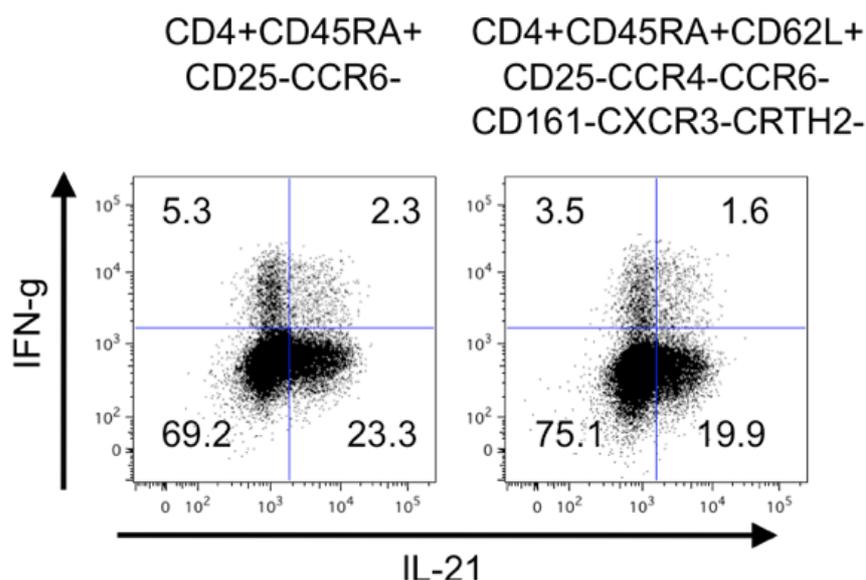


**Abb. 3-11) IL-21 Produktion *in vitro* stimulierter CD4<sup>+</sup> naiver T-Zellen unter Zugaben von TGF- $\beta$  und oder IL-6.** A) Durchflusszytometrische Analyse des Anteils von IL-21 Produzenten an FACS aufgereinigten naiven CD4<sup>+</sup> *in vitro* stimulierten T-Zellen nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Daten stammen von 20 Spendern in der Negativkontrolle (-), der IL-6 und IL-6 + TGF- $\beta$  Kondition und 7 Spendern in der TGF- $\beta$  Kondition. Die Striche zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von IL-21 Produzenten  $\pm$  Standardabweichung.

Die Zugabe von TGF- $\beta$  in die Zellkulturen führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-21 Expression von  $8,5 \pm 8,7\%$  in der neutralen Kondtion auf  $1,2 \pm 0,7\%$ . IL-6 allein erhöhte, wie erwartet, die IL-21 Produktion ( $12,4 \pm 8,3\%$ ) und konnte die TGF- $\beta$  abhängige Reduktion signifikant jedoch nicht vollständig rückgängig machen ( $5,6 \pm 5,8\%$ ). TGF- $\beta$  und IL-6, so wurde in Experimenten mit naiven Mauszellen gezeigt, induzieren die Produktion von IL-17. (Stockinger B 2007) (Zhou L 2007) (Korn T 2007) Diese Beobachtung wurde hier nicht gemacht. In Zellen, die unter Zugaben von TGF- $\beta$  und IL-6 stimuliert wurden, war kein IL-17 detektierbar. (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.7 Die Spontanproduktion von IL-21 unter neutralen Bedingungen ist nicht auf eine Kontamination mit antigenerfahrenen Zellen zurückzuführen.

Um auszuschließen, dass bereits polarisierte Zellen, die noch oder wieder den Marker für Naivität CD45RA tragen, für die starke Produktion von IL-21 in der neutralen Kondition bei den Spontanproduzenten verantwortlich sind, wurden Zellen eines Spontanproduzenten auf zwei unterschiedliche Weisen gesortet. Eine Hälfte der Zellen wurde mit der normalen Sortingstrategie als CD4+CD45RA+CD25-CCR6- gesortet, während die andere Hälfte mit einer neuen Strategie sortiert wurden. Diese sollte seltene polarisierte Zellen bzw. Vorläuferzellen der bekannten Helfer-T-Zell-Subsets Th1, Th2 und Th17, die CD45RA+ sind noch zusätzlich ausschließen. Außerdem wurde ein zweiter Marker für naive T-Zellen, CD62L, hinzugefügt. Die Zellen wurden als CD4+CD45RA+CD25-CCR6-CD62L+CXCR3-CRTH2-CCR4-CD161- sortiert und parallel mit der ersten Hälfte in demselben Experiment unter neutralen Bedingungen kultiviert (Abb. 4-12).



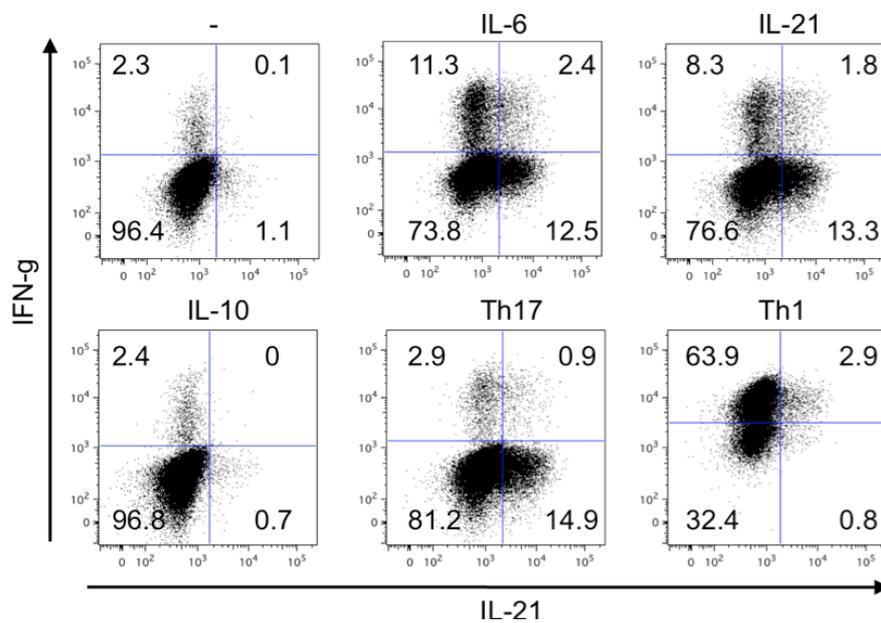
**Abb. 3-12) Spontanproduktion von IL-21 mit verschiedenen Sortingstrategien.** Durchflusszytometrische Analyse des Anteils von IL-21 Produzenten an FACS aufgereinigten naive CD4+ *in vitro* sitmulierte T-Zellen nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A.

Die neue Sortingstrategie führte nur zu einer sehr schwachen Reduktion der IL-21 Produktion in der Negativkontrolle von weniger als 5%.

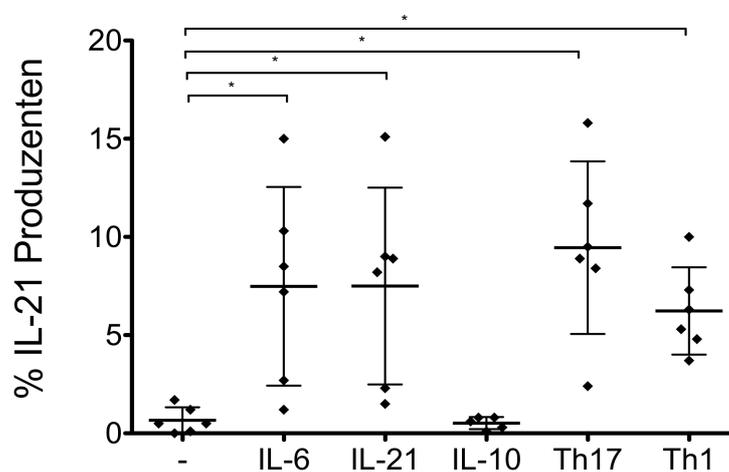
#### 4.3.8 Naive CD4+ T-Zellen Neugeborener produzieren unter neutralen Bedingungen kein IL-21.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass bereits aktivierte bzw. polarisierte Zellen, die zur IL-21 Expression fähig sind, in der Population der naiven Zellen enthalten sind und nicht identifiziert wurden oder deren Marker noch nicht bekannt sind, wurden Induktionsexperimente mit naiven CD4+ T-Zellen aus Nabelschnurblut gesunder und normgerecht geborener Babys durchgeführt (Abb. 4-13). Es wird angenommen, dass unter naiven T-Zellen aus Nabelschnurblut keine Kontamination mit Gedächtnis bzw. Effektorzellen besteht.

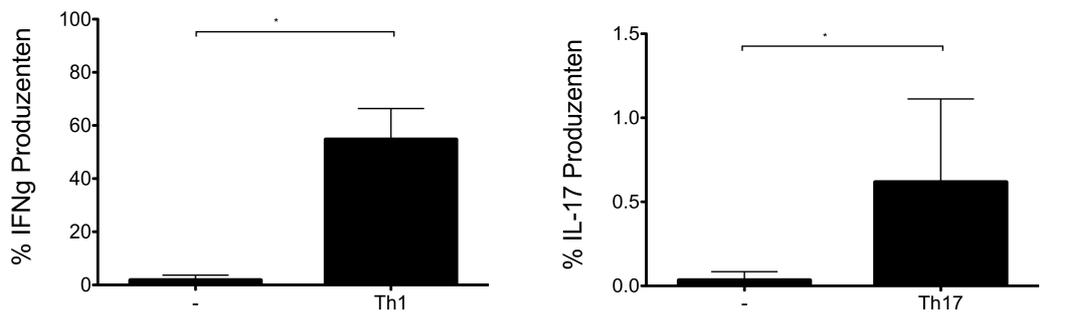
A



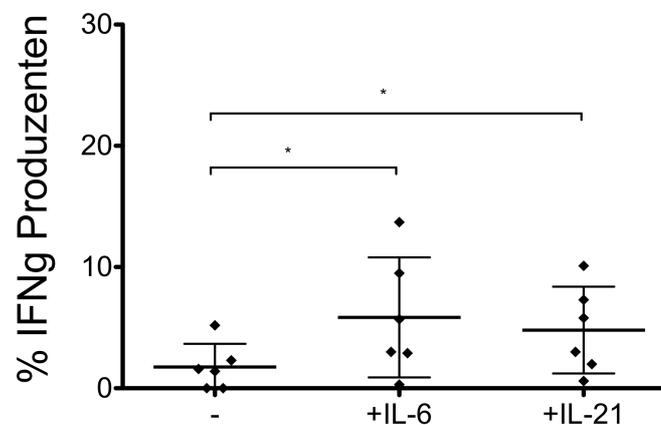
B



C



D



**Abb. 3-13) IL-21 Produktion humaner CD4<sup>+</sup> naiver T-Zellen aus dem Nabelschnurblut nach *in vitro* Stimulation.** A) Durchflusszytometrische Analyse des Anteils von IL-21 Produzenten an naiven (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>) *in vitro* stimulierten T-Zellen aus Nabelschnurblut nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A. B) Statistische Analyse. Die Striche zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von IL-21 Produzenten  $\pm$  Standardabweichung. C) Statistische Analyse der Zytokinproduktion unter Th1 bzw. Th17 Konditionen im Vergleich zur neutralen Kondition. Die Striche zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils von Zytokinproduzenten  $\pm$  Standardabweichung. D) Statistische Analyse der IFN- $\gamma$  Produktion unter Zugabe von IL-6 bzw. IL-21. Die Daten stammen von 6 Spendern aus 2 unabhängigen Experimenten.

Es konnten keine Spontanproduzenten unter den Spendern gefunden werden und im Vergleich zu Zellen des peripheren Blutes, die unter den Nichtspontanproduzenten immerhin eine IL-21 Produktion von  $3,5 \pm 2,4\%$  aufweisen, liegt die IL-21 Produktion der Nabelschnurblutzellen in der neutralen Kondition bei  $0,7 \pm 0,7\%$ . Die Zugabe von IL-6 bzw. IL-21 führte zu einer Erhöhung der IL-21 Expression auf  $7,5 \pm 5,1\%$  bzw.

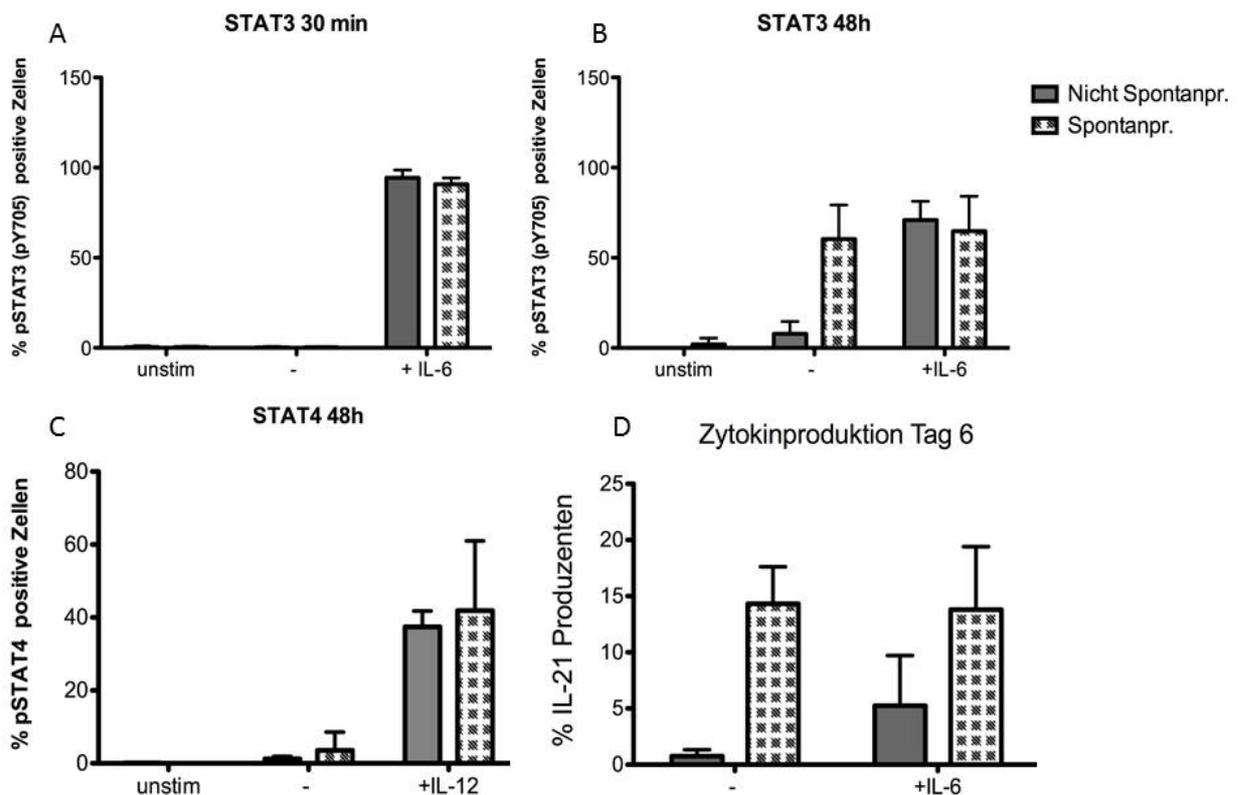
7,5 ± 5,0% und erstaunlicher Weise zu einer Erhöhung der IFN- $\gamma$  Expression von 1,8 ± 1,9% (-) auf 5,9 ± 5,0% (+IL-6) und 4,8 ± 3,6% (+IL-21). Auch die Kultivierung unter Th1 polarisierenden Konditionen erhöhte die IL-21 Produktion (6,2 ± 2,2%), jedoch nicht so markant, wie in den Zellen des peripheren Blutes (32,7 ± 10%). Die Th17 Kondition führte in den Experimenten mit Nabelschnurblut zu der stärksten Erhöhung der IL-21 Produktion. Unter Th17 Konditionen stimulierte Zellen exprimierten 4,4% IL-21. Für IL-10 konnte kein induzierender Effekt beobachtet werden. Zellen, die mit IL-10 stimuliert wurden produzierten 0,5 ± 0,3% IL-21. Die Induktion des Th1 bzw. Th17 Zelltyps wurde durch die Analyse der Expression der subsetspezifischen Zytokine IFN- $\gamma$  bzw. IL-17 überprüft (Abb.4-13 C). Für beide Konditionen wurde eine signifikante Erhöhung dieser Zytokine beobachtet. Die IFN- $\gamma$  Produktion lag in der neutralen Kondition bei 1,8 ± 1,9% und unter Th1 Bedingungen bei 54,7 ± 11,7%. Obwohl die IL-17 Produktion unter Th17 Bedingungen im Vergleich zu neutralen Kondition ebenfalls signifikant erhöht werden konnte (von 0,0 ± 0,1% auf 0,6 ± 0,5%), war sie so gering, dass von einer erfolgreichen Induktion von Th17 Zellen nicht ausgegangen werden kann.

Stellt man die Ergebnisse der Induktionsexperimente mit naiven Zellen aus peripherem Blut Erwachsener (PBZ) denen aus Nabelschnurblut (NBZ) gegenüber, zeigt sich, dass in beiden Gruppen IL-6, IL-21 und IL-12 einen induzierenden Effekt auf die IL-21 Expression haben, IL-12 jedoch weniger stark in NBZ als in PBZ. Kultivierung unter Th17 Kondition führt in NBZ zur stärksten signifikanten Erhöhung der Anzahl IL-21 positiver Zellen, während in PBZ keine signifikante Erhöhung gemessen wurde. IL-10 hat auf NBZ im Gegensatz zu PBZ keinen induzierenden Effekt auf die IL-21 Produktion und es konnte keine Spontanproduktion in NBZ unter nicht polarisierenden Bedingungen festgestellt werden. Überraschend ist weiterhin, dass der hemmende Effekt von IL-6 und IL-21 auf die IFN- $\gamma$  Produktion in PBZ nicht beobachtet werden konnte, im Gegenteil, diese Zytokine haben in NBZ einen induzierenden Effekt auf die IFN- $\gamma$  Produktion.

#### **4.3.9 IL-21 Spontanproduktion korreliert mit erhöhter STAT3 Phosphorylierung**

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Erforschung des Phänomens der Spontanproduktion ist die Analyse der Proteine der IL-21 Signalkaskade. Es wurde untersucht, ob die spontane IL-21 Produktion mit einer erhöhten STAT3 Phosphorylierung einhergeht, und

ob naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Spontanproduzenten *ex vivo* bereits phosphorylierte STAT3 Moleküle besitzen. Dazu wurden naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen von bekannten Nicht-spontanproduzenten und Spontanproduzenten 30 min bzw. 48 h stimuliert und eine Analyse der STAT3 Phosphorylierung durchgeführt. Um auszuschließen, dass eine allgemeine Phosphorylierung von STAT Proteinen vorliegt, wurden die Zellen zur Kontrolle auf ihre STAT4 Phosphorylierung untersucht. Außerdem wurden unstimulierte Zellen analysiert. Es wurde jeweils ein Ansatz mit IL-6 bzw. IL-12 als Positivkontrolle versehen.

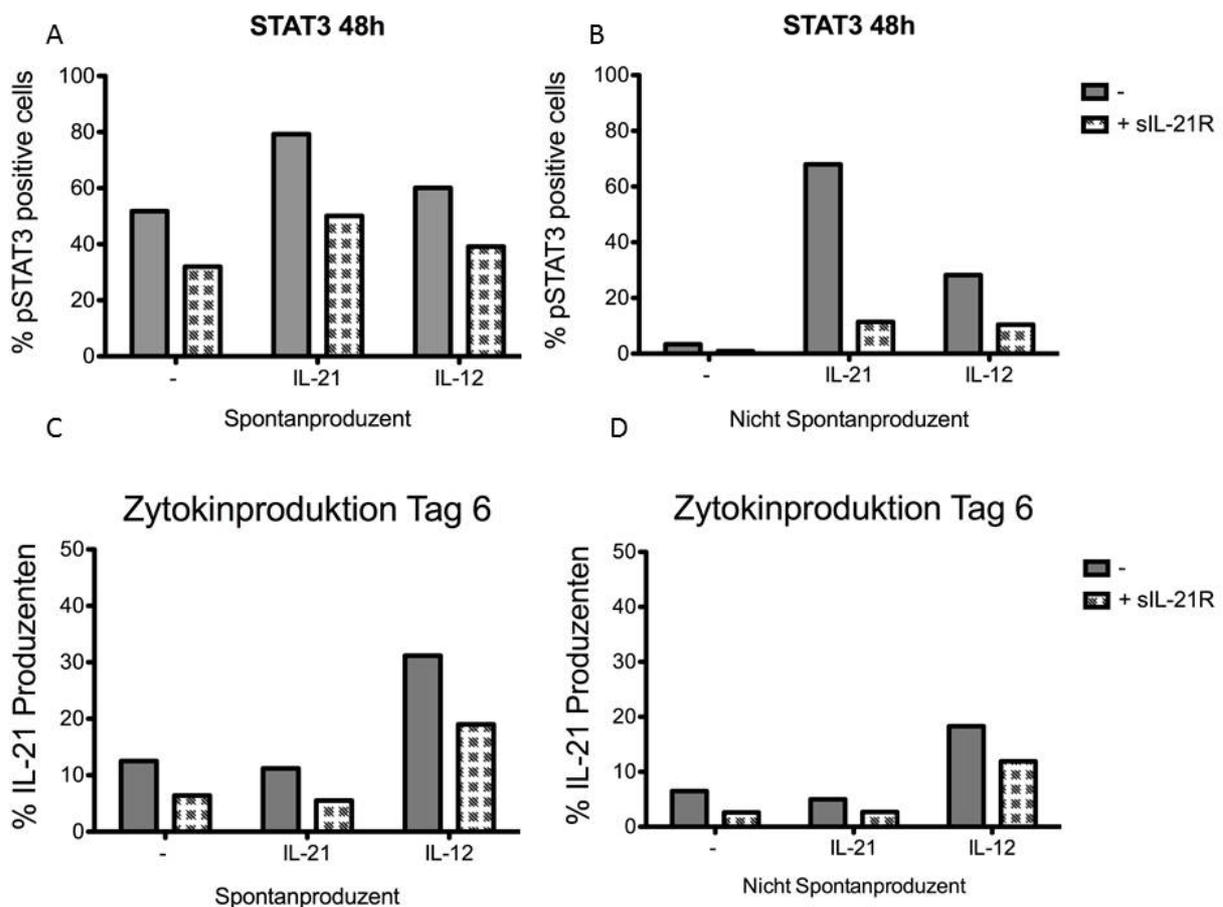


**Abb. 3-14) STAT3 und STAT4 Phosphorylierung und IL-21 Produktion in humanen CD4<sup>+</sup> naiven T-Zellen von Spontan- und Nicht Spontanproduzenten nach *in vitro* Stimulation.** Statistische Analyse. Naive (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>) T-Zellen wurden entweder ohne Stimulation (unstim) in Kulturmedium inkubiert oder mit anti CD3/28 unter neutralen Bedingungen mit und ohne Zugabe von IL-6 bzw. unter Th1 Bedingungen stimuliert. Je ein Ansatz wurde A) nach 30 min bzw. B+C) nach 48 h unterbrochen und nach Färbung intranukleärer Moleküle mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ein weiterer Ansatz nicht unterbrochen und nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A wurde durchflusszytometrisch der Anteil von IL-21 Produzenten analysiert. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit 4 Nicht Spontanproduzenten und 3 Spontanproduzenten. Die Balken zeigen die Mittelwerte des prozentualen Anteils pSTAT3 bzw. pSTAT4 bzw. IL-21 positiver Zellen ± Standardabweichung.

Während Zellen von Spontanproduzenten nach 48 h TZR Stimulation ohne Zugabe exogener Zytokine zu einem hohen Anteil STAT3 Phosphorylierung aufwiesen ( $60,3 \pm 18,9\%$ ), konnte nur eine schwache STAT3 Phosphorylierung in Zellen von Nicht Spontanproduzenten unter gleichen Bedingungen beobachtet werden ( $7,9 \pm 6,8\%$ ). Es wurde hingegen kein Unterschied im Anteil pSTAT3 positiver Zellen gefunden ohne TZR Stimulation ( $0,4 \pm 0,5\%$  Spontan- bzw.  $0,4 \pm 0,7\%$  Nicht Spontanproduzenten) oder nach 30 Minuten Stimulation unter neutralen Bedingungen ( $0,3 \pm 0,3\%$  bzw.  $0,3 \pm 0,5\%$ ). Der Anteil pSTAT3 positiver Zellen unterschied sich zwischen beiden Spendergruppen auch nicht mit Zugabe von IL-6 sowohl nach 30 Minuten ( $91 \pm 3,4\%$  bzw.  $94,4 \pm 4,3\%$ ) als auch nach 48 Stunden ( $64,8 \pm 19,3\%$  bzw.  $71 \pm 10,3\%$ ). Eine generelle STAT-Phosphorylierung ist auszuschließen, da nach 48 Stunden keine erhöhte STAT4 Phosphorylierung in der neutralen Kondition nachgewiesen wurde.

#### 4.3.10 Neutralisierung von IL-21 in der Zellkultur reduziert die spontane STAT3 Phosphorylierung und IL-21 Produktion an Tag 6

Es stellte sich die Frage, ob die spontane Phosphorylierung von STAT3 in Zellen von Spontanproduzenten durch die Produktion von IL-21 im Sinne eines feed forward loops ausgelöst wird. Durch Zugabe des rekombinanten löslichen IL-21R (soluble, sIL-21R) sollte untersucht werden, ob eine Neutralisierung von IL-21 in der Kultur die Spontanphosphorylierung hemmen kann.



**Abb. 3-15) STAT3 Phosphorylierung und IL-21 Produktion in humanen CD4+ naiven T-Zellen eines Spontan- und eines Nicht Spontanproduzenten nach *in vitro* Stimulation mit und ohne IL-21 Neutralisierung.** Statistische Analyse. FACS aufgereinigte naive (CD4+CD45RA+CD25-CCR6-) T-Zellen wurden *in vitro* mit und ohne Neutralisierung von IL-21 unter neutralen Bedingungen, mit Zugabe von IL-21 bzw. unter Th1 polarisierenden Bedingungen stimuliert. Ein Ansatz wurde A+B) nach 48h unterbrochen und nach Färbung intranukleärer Moleküle mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ein weiterer Ansatz wurde C+D) nicht unterbrochen und nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A wurde durchflusszytometrisch der Anteil von IL-21 Produzenten analysiert. Die Daten stammen aus einem Experiment mit einem Spontanproduzenten und einem Nicht Spontanproduzent. Die Balken zeigen den prozentualen Anteil der pSTAT3 bzw. IL-21 positiven Zellen.

Durch die Neutralisierung von IL-21 in der Zellkultur konnte die spontane Phosphorylierung von STAT3 in Zellen eines Spontanproduzenten von 51,8% auf 32,0% und eines Nicht Spontanproduzenten von 3,4% auf 0,9% gesenkt werden. Auch die STAT3 Phosphorylierung induziert durch IL-21 und IL-12 wurde durch Zugabe von sIL-21R gesenkt. Dieses Ergebniss spiegelt sich in der IL-21 Produktion der Zellen an Tag 6 wider. Auch hier konnte ein hemmender Einfluss der IL-21 Neutralisierung beobachtet werden. Die Expression von IL-21 unter neutralen Bedingungen wurde durch Zugabe von sIL-21R von 12,5% in einem Spontanproduzent bzw. 6,5% in einem Nicht Spontanproduzent auf 6,4% bzw. 2,6% gesenkt. Die IL-12 induzierte IL-21 Produktion (31,6% bzw. 18,3%) wurde ebenfalls in beiden Spendern gesenkt (19,0% bzw. 11,9%). Für IL-21 konnte in diesem Experiment kein Effekt auf die IL-21 Produktion nachgewiesen werden, die Wirksamkeit des rekombinanten Zytokins wurde aber durch die stärkere STAT3 Phosphorylierung nach 48 h bewiesen.

## 5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Populationen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu identifizieren, die IL-21 produzieren und intra- und extrazelluläre Faktoren zu finden, die die Expression des IL-21 Proteins induzieren bzw. hemmen können.

Die Herangehensweise an die Identifizierung und Charakterisierung von humanen IL-21 produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in dieser Arbeit ist zweiarbig. Erstens wurden verschiedene Populationen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen *ex vivo* auf ihre Fähigkeit zur IL-21 Produktion nach Stimulation untersucht und zweitens wurde untersucht, ob spezielle Faktoren, und wenn ja welche, nötig sind, naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach *in vitro* Stimulation und Kultur zur IL-21 Produktion anzuregen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen, nicht aber CD4<sup>+</sup> naive T-Zellen des peripheren Blutes *ex vivo* nach Stimulation mit PdBU und Ionomycin IL-21 produzieren, und dass eine Koproduktion mit den für CD4 Helfer-Zell-Subsets spezifischen Zytokinen der Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4) und Th17 (IL-17) Zellen vorliegt. Diese Ergebnisse bekräftigen die durch Onoda et al. 2007 gezeigte IL-21 Produktion in humanen CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen und die Abwesenheit von IL-21 Protein in naiven *ex vivo* stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. (Onoda T 2007) Im Gegensatz dazu stehen allerdings die hier gezeigten IL-21/IL-4 Koproduzenten, die von Onoda et al. 2007 nicht beobachtet wurden. Da der Anteil von IL-4 exprimierenden Zellen an der Population der CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen mit durchschnittlich 4% sehr niedrig ist, und die doppelt positiven Zellen weniger als 1% ausmachen, können Fehler bei der Analyse durch falsch positive Zellen nicht ausgeschlossen werden. Um zu untersuchen, ob wirklich jedes der genannten Subsets Th1, Th2 und Th17 zur IL-21 Produktion fähig ist, wurden diese nach Anreicherung mittels Subset-spezifischer Marker und FACS Technologie getrennt stimuliert und analysiert. Die Wahl der zur Isolation verwendeten Marker resultierte aus Studien, welche die Spezifität dieser Marker unterstreichen. So wurde in mindestens drei unterschiedlichen Publikationen (Rivino L 2008) (Sallusto F 1998) (Bonecchi 1998) gezeigt, dass hauptsächlich von CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen des Typ Th1 bzw. deren Vorläuferzellen der Chemokinrezeptor CXCR3 exprimiert wird. Rivino et al. 2004 unterteilten CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in zentrale und Effektor Gedächtniszellen, in beiden Populationen lag der Anteil von IL-4 produzierenden Zellen an allen CXCR3<sup>+</sup> Zellen *ex vivo* nach Stimulation unter 4% und ist damit zu

vernachlässigen. Die zusätzliche Analyse der Zellen auf die Expression von CCR5 hätte hier die Reinheit der Th1 Zellen erhöhen können, dieser Marker wurde ebenfalls als Th1-spezifisch charakterisiert. Er markiert allerdings Zellen, die durch ihre Aktivierung die Fähigkeit erlangt haben, in periphere Gewebe zu migrieren (Sallusto F 1998). Da alle Th1 Zellen, auch nicht aktivierte, analysiert werden sollten wurde dieser Marker zur Anreicherung nicht verwendet. Durch die Analyse der CXCR3+ Zellpopulation auf die Produktion von IL-4 ( $2,4 \pm 1,0\%$ ) und von IL-17 ( $0,8 \pm 0,6\%$ ), die nicht signifikant ist, kann eine Kontamination mit Th2 bzw. Th17 Zellen ausgeschlossen werden. Cosmi et al. 2000 haben den Prostaglandin Rezeptor CRTH2 als sicheren Marker für humane Th2 Zellen des peripheren Blutes identifiziert. (Cosmi L 2000) Die CRTH2+ Population der CD4+ T-Zellen in genannter Studie enthielt weniger als 2% IFN- $\gamma$  produzierende Zellen. Die in vorliegender Studie beobachtete Produktion von INF- $\gamma$  bzw. IL-17 lag bei CRTH2+ CD4+ T-Gedächtniszellen unter 5% bzw. unter 1%. Th17 Zellen tragen den Chemokinrezeptor CCR6 auf ihrer Oberfläche und produzieren IL-17 (Liu H 2008) (Korn T 2008) (Acosta-Rodriguez EV 2007), deshalb wurde CCR6 als Marker zur Anreicherung von Th17 Zellen herangezogen. Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die gemachten Beobachtungen insofern, als dass sowohl Th1 und Th17 als auch Th2 Zellen zur IL-21 Produktion *ex vivo* nach Stimulation befähigt sind. Dabei zeigte sich, dass Th17 Zellen die meisten IL-21+ Koproduzenten beinhalten ( $30,5 \pm 20,0\%$ ), gefolgt von Th1 Zellen ( $15,2 \pm 9,9\%$ ) und Th2 Zellen ( $15,8 \pm 6,4\%$ ).

In verschiedenen Studien ist nahegelegt worden, dass das Interleukin 21 spezifisch sei für eines der T-Helfer-Zell Subsets. So haben Wurster et al. 2002 gezeigt, dass murine *in vitro* induzierte Th1 Zellen im Gegensatz zu Th2 Zellen keine Expression von IL-21 mRNA aufweisen. (Wurster AL 2002) In Experimenten mit Mäusen, die mit *Schistosoma mansoni* immunisiert wurden, wurden IL-21 produzierende Zellen gefunden, die ebenfalls IL-4 und GATA3 exprimierten. (Zaretsky AG 2009) Eine andere Studie konnte ebenfalls nachweisen, dass IL-4 produzierende Th2 Zellen in Lymphknoten von mit Wurmantigen immunisierten Mäusen IL-21 exprimierten. (King IL 2009) Eine weitere Arbeitsgruppe (Pesce J 2006) untersuchte in einer Studie Mausmodelle, die auf eine Infektion mit *S. mansoni* Eiern mit einer verstärkten Th1 oder Th2 Antwort reagierten. Während im Th1 Model IFN- $\gamma$  mRNA und im Th2 Model IL-13 mRNA gegenüber Wildtypmäusen stark erhöht waren, konnten in beiden Modellen über 50-fach erhöhte IL-21 mRNA Spiegel gemessen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass

IL-21 kein Th1 oder Th2 typisches Zytokin ist. In Studien im humanen System wurde nachgewiesen, dass IFN- $\gamma$  produzierende Zellen, die aus der Lamina Propria des Darms isoliert wurden, in der Lage sind, IL-21 zu synthetisieren (Sarra M 2010), und dass IL-21 stimulierend auf die Expression Th1 spezifischer Gene wirkt. (Strengell M 2002) In mehreren Studien ist die Bedeutung von IL-21 für Th17 Zellen zum einen als positiver feedback Mechanismus in der Generation dieser Zellen und zum anderen als von diesen Zellen produziertes Effektormolekül unterstrichen worden. (Betelli E 2008) Nach dem derzeitigen Wissensstand ist in dieser Arbeit zum ersten Mal innerhalb einer Studie gezeigt worden, dass humane Th1, Th2 und Th17 Zellen aus dem peripheren Blut in der Lage sind, IL-21 *ex vivo* nach Stimulation zu produzieren. Zudem konnten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Tonsille nachgewiesen werden, die IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-17 zusammen mit IL-21 koexprimieren. Diese Beobachtungen bestätigen die von Spolsiki et al. gemachte Vermutung, dass IL-21 kein subsetspezifisches Zytokin ist, sondern von verschiedenen CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen exprimiert wird. (Spolski R 2008)

Im Vergleich mit antigenerfahrenen CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine durchschnittlich höhere IL-21 Produktion von Zellen, die aus Tonsillen isoliert wurden hin. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Lymphfollikel sekundärer Organe der Ort sind, an dem T-Zell-B-Zell Interaktionen stattfinden und IL-21 dabei von großer Bedeutung ist (King C 2008). Follikuläre T-Helfer-Zellen (Tfh) sind an den Interaktionen mit B-Zellen bzw. deren Aktivierung, Differenzierung, Proliferation und Ig-Produktion maßgebend beteiligt. Sie tragen den Chemokinrezeptor CXCR5 und ICOS, einen Marker für aktivierte Zellen, auf ihrer Oberfläche. Es wurde bisher angenommen, dass diese Zellen die Hauptproduzenten von IL-21 sind. (Chtanova T 2004) Ausgehend von dieser Annahme sollte man erwarten, dass unter den Tfh-Zellen im Gegensatz zu anderen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in sekundären Lymphorganen eine höhere IL-21 Produktion zu finden ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass unter CXCR5<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> Zellen eine höhere Expression von IL-4 und IL-21 vorliegt, während die Expression von IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-17 niedriger ist als unter den tonsillären nicht-Tfh-Zellen. Dennoch liegt die Expressionsrate für IL-21 in der Population der CD4<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup>ICOS<sup>-</sup> T-Zellen immer noch höher, als die der Zellen aus dem Blut. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse (Ma CS 2009) unterstützen die hier gemachten Beobachtungen. Diese unterteilten jedoch alle CXCR5<sup>+</sup> tonsillären CD4<sup>+</sup> T-Zellen in CD45RA<sup>-</sup>CXCR5 stark, intermediär und schwach exprimierende Zellen und

identifizierten nur die CXCR5 stark exprimierenden Zellen als Tfh-Zellen. Eine Analyse der CD45RA-CXCR5- Zellen erfolgte nicht, dennoch ist der gleiche Trend zu beobachten. Die von Ma et al. 2009 als nicht-Tfh-Zellen (schwach und intermediär CXCR5 exprimierend) bezeichneten Zellen produzierten ebenfalls im Vergleich mit Tfh-Zellen (stark CXCR5 exprimierend) weniger IL-21 und IL-4 und mehr IFN- $\gamma$ , IL-17 und IL-2. In vorliegender Arbeit wurde eine andere Unterteilung vorgenommen. Die hier als folliculäre T-Helfer-Zellen bezeichneten Zellen sind alle CXCR5+ICOS+ Zellen, während nicht-Tfh-Zellen CXCR5-ICOS- sind. Sicher ist jedoch, dass auch diese Zellen zu einer erheblichen IL-21 Produktion im Stande sind und IFN- $\gamma$  und IL-17 produzieren, welche auch Immunglobulinklassenwechsel induzieren können (Fazilleau N 2009) (Blaho VA 2009). Ob nicht-Tfh-Zellen auch die Fähigkeit haben, B-Zell Hilfe zu leisten und eventuell nach ihrer Aktivierung CXCR5 hochregulieren können und so an die Grenze der T-B-Zell Zone migrieren, ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden. Ma et al. 2009 zeigten in ihrer Studie, dass sowohl CXCR5 stark, schwach und intermediär exprimierende tonsilläre CD4+ T-Zellen in der Lage waren *in vitro* kokultivierte B-Zellen zur Produktion und Sekretion von Immunglobulinen zu aktivieren. Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen ergänzen bzw. widersprechen den von Ma et al. 2009 gemachten Beobachtungen. So konnte von zwei Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass CD4+ CXCR5- T-Zellen im Gegensatz zu CXCR5+ nicht in der Lage waren, *in vitro* B-Zellen zur Immunglobulin Sekretion zu aktivieren, weder lösliches IgM noch IgG oder IgA (Bryant VL 2007) (Breitfeld D 2000). In einer anderen Studie wurde allerdings gezeigt, dass CXCR5+ und CXCR5- CD4+ T-Zellen aus der Tonsille gleichermaßen befähigt waren, *in vitro* B-Zellen zur Produktion von löslichem IgM anzuregen, während die Produktion von IgG und IgA stärker durch CXCR5+ Zellen induziert wurde. (Schaerli P 2000) Es wurde angenommen, dass nicht-TfH-Zellen wohl in der Lage sind, B-Zellen zu aktivieren, woraufhin diese IgM produzieren; sie zum Klassenwechsel zu IgG bzw. IgA anzuregen, bedürfe es allerdings der Hilfe durch Tfh-Zellen (Schaerli P 2000). Diese unterschiedlichen Ergebnisse der genannten Arbeitsgruppen weisen daraufhin, dass auch nicht TfH-Zellen in begrenzter Weise B-Zell Hilfe leisten können weshalb deren Fähigkeit zur IL-21 Produktion verständlich scheint. Es muss jedoch bedacht werden, dass tonsilläre Zellen einem Milieu entnommen wurden, das durch chronische Entzündung geprägt war oder noch ist, das heißt, dass die Zellen chronisch aktiviert sein könnten und ihre Expressionsmuster möglicherweise nicht die Verhältnisse in sekundär lymphatischen Organen per se widerspiegeln. Die

beiden häufigsten Indikationen für eine Tonsillektomie sind rezidivierende (chronische) Tonsillitis und tonsilläre Hypertrophie. Patienten die 3-4 Episoden von akuter Tonsillitis pro Jahr erleiden oder bei denen eine länger als 3 Monate anhaltende Entzündung der Tonsillen vorliegt und oder bei denen die antibiotische Behandlung mit Penizillin keine Besserung bringt, wird die Operation empfohlen, da häufig oder chronisch entzündete Tonsillen als Herd dienen. (Boenninghaus HG 2007) Zum einen können sich von dort Erreger über die Blutbahn, die Lymphe oder eine Phlegmone durch das Spatium parapharyngeum ausbreiten und entfernte Organe befallen. Zu den gefürchteten Komplikationen gehören entzündliche Herz- und Gefäßkrankheiten und rheumatisches Fieber. Zum andern können Antikörper gebildet werden, die mit antigenwirksamen Substanzen Immunkomplexe bilden und fehlerhaft ablaufende Immunreaktionen auslösen können. Dabei kann es zu akut fieberhaftem Gelenkrheumatismus kommen oder gar Glomerulonephritis. Auch tonsilläre Hyperplasien können durch immunologische Abwehrvorgänge ausgelöst werden. (Boenninghaus HG 2007) Die häufigsten Pathogene, die in Tonsillen, die aufgrund von rezidivierenden Entzündungen oder Hypertrophie entnommen wurden, gefunden werden, sind Bakterien, vorrangig *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilis influenzae* und *Staphylococcus aureus* (Jeong JH 2007) (Loganathan A 2006) (Zautner AE 2010). Mehrere Arbeitsgruppen (Agren K 1998) (Costalonga M 2009) (Veckman V 2004)(Pahlman LI 2008) zeigten, dass *S.pyogenes* und *H.influenzae* die Entstehung von Th1 Zellen und die Sekretion von Th1 typischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$  begünstigen. Das von *S. aureus* produzierte Enterotoxin B (SEB) wiederum löst eine Polarisierung zum Th2 Zelltyp aus (Mandron M 2006) (Liu T 2007). Da sekundäre Lymphorgane auch der Ort sind, an dem Interaktionen von CD4+ T-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems stattfinden, wie CD8+ T-Zellen und NK-Zellen und an diesen Interaktionen IL-21 beteiligt sein kann (Leonard WJ 2008), ist die Entdeckung, dass auch nicht-TfH-Zellen dieses Zytokin produzieren, verständlich. Die Beobachtungen zur IL-21 Produktion in der Tonsille unterstützen ebenfalls die Annahme, dass IL-21 kein Zytokin ist, das einer bestimmten Gruppe von CD4+ T-Zellen eigen ist. Weder im peripheren Blut noch in der Tonsille.

Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen deuten darauf hin, dass mehrere inflammatorische und ein antiinflammatorisches Zytokin naive *in vitro* stimulierte CD4+ T-Zellen zur IL-21 Produktion anregen können. Den stärksten Effekt zeigte dabei IL-12 unter Th1 induzierenden Konditionen auf naive Zellen des peripheren Blutes, in Zellen

aus Nabelschnurblut war die Wirkung von IL-12 vergleichsweise schwächer. Allerdings ist die Wirkung von IL-12 auf die IL-21 Produktion robust und führt unabhängig von der Spontanproduktion von IL-21 unter nichtpolarisierenden Bedingungen immer zu einer Erhöhung des Anteils an IL-21 Produzenten. Das von dendritischen Zellen produzierte Zytokin, ist für die Differenzierung von Th1 Zellen essentiell. (Zhu J 2008) Hier konnte gezeigt werden, dass IL-12 die Entstehung von Zellen induziert, die entweder IL-21 und IFN- $\gamma$  oder IL-21 allein produzieren. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe (Schmitt N 2009) zeigten die gleiche Tendenz, was die Wirkung von IL-12 betrifft. Außerdem wurde durch Schmitt et al. 2009 nachgewiesen, dass die IL-12 induzierte IL-21 Produktion über die Aktivierung von STAT4 verwirklicht wird. Weitere Zytokine konnten in dieser Arbeit als Induktoren der IL-21 Synthese identifiziert werden. Dazu gehören IL-6, IL-10 und IL-21 selbst. Diese Ergebnisse sind im Gegensatz zu den Effekten von IL-12 weniger erstaunlich, da jedes dieser Zytokine eine Aktivierung von STAT3 bewirkt. Dass STAT3 für die Aktivierung der IL-21 Expression wichtig ist, ist schon länger bekannt (Takeda K 1999) (Williams L 2004) (Dienz O 2009) (Wei L 2007). Damit könnte auch die Beobachtung erklärt werden, dass die Kombination von IL-6 und IL-21 die IL-21 Expression, die schon durch IL-6 oder IL-21 allein induziert wird, nicht mehr verstärkt. Die vollständige Phosphorylierung aller STAT3 Moleküle ist wahrscheinlich schon durch Zugabe eines Zytokins erreicht und kann nicht mehr erhöht werden. Im Gegensatz zu IL-12 ist die Wirkung von IL-6 und IL-21 weniger stabil und sehr wohl abhängig von der IL-21 Produktion unter nichtpolarisierenden Bedingungen. Bereits 2007 wurde durch Nurieva et al. für naive CD4<sup>+</sup> Maus T-Zellen gezeigt, dass IL-6 und IL-21 deren IL-21 Expression induzieren. (Nurieva RI 2007) Damit gibt es mindestens 2 Wege über die eine Induktion der IL-21 Expression erreicht werden kann, einmal über STAT3 aber auch über STAT4. Schmitt et al. 2009 zeigten im Gegensatz zu dieser Arbeit, dass IL-6 und IL-10 keinen Einfluss auf die IL-21 Produktion haben. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnten die unterschiedlichen Sortingstrategien sein. Schmitt et al. 2009 sortierten naive Zellen als CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> in dieser Population könnten Tregs enthalten sein, welche neben CD4 auch CD25 exprimieren und TGF- $\beta$  produzieren (Zhu J 2008). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, hat TGF- $\beta$  einen hemmenden Einfluss auf die IL-21 Expression und könnte somit die durch IL-6 und IL-10 induzierte IL-21 Produktion wiederum unterdrückt haben. Ein zweiter Unterschied zum Experimentaufbau, der nicht trivial ist, ist die Verwendung von RPMI complete medium durch

Schmitt et al. 2009, welches Serumkomponenten und damit unbestimmte Mengen an TGF- $\beta$  enthält, im Gegensatz zu der Verwendung von Serum freiem Medium in den Experimenten dieser Arbeit. Drittens wurden in beiden Arbeiten unterschiedliche Stimulationsbedingungen, die Konzentration von anti CD3 und anti CD28 betreffend, angewendet. Schmitt et al. 2009 benutzten Konzentrationen von 5 $\mu$ g anti CD3 und 1 $\mu$ g anti CD28 für die Beschichtung der Kulturplatten, während in dieser Arbeit die Konzentrationen bei 2 $\mu$ g anti CD3 und 6  $\mu$ g anti CD28 lagen. Der Einfluss der unterschiedlichen Stimulationsbedingungen auf die IL-21 Produktion ist jedoch bisher nicht untersucht worden. Die Ergebnisse einer weiteren Arbeitsgruppe (Ma CS 2009), die für IL-6, IL-12 und IL-21 einen induzierenden Effekt auf humane naive CD4+ T-Zellen nachgewiesen haben gehen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konform. Die Sortingstrategie genannter Arbeitsgruppe beinhaltet ebenfalls nicht die Eliminierung von CD25+ Tregs aus der Population der naiven Zellen. Angaben zum verwendeten Kulturmedium bzw. Stimulationsbedingungen fehlen in genannter Veröffentlichung. Der induzierende Effekt von IL-10 auf die IL-21 Expression humaner naiver CD4+ T-Zellen wurde zum ersten Mal in der vorliegenden Arbeit gezeigt.

IL-6 und IL-21 haben trotz ihrer induzierenden Wirkung auf die IL-21 Produktion einen hemmenden Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Produktion von *in vitro* stimulierten CD4+ T-Zellen aus dem peripheren Blut Erwachsener. Das ist insofern interessant, als das IFN- $\gamma$  produzierende Th1 Zellen eine potente Quelle für IL-21 darstellen (siehe oben). Dass IL-6 die Entwicklung von Th1 Zellen hemmt, indem es zum einen in die Signalkaskade downstream des IFN- $\gamma$ R eingreift und die IFN- $\gamma$  Genexpression unterdrückt und zum anderen die Entstehung von Th2 Zellen durch Induktion der endogenen IL-4 Synthese favorisiert, ist bisher nur für das Maussystem gezeigt worden. (Diehl S 2000) (Diehl S 2002) IL-12 stellt also einen alternativen Weg dar, der die Expression von IL-21 auch unter Th1 polarisierenden Bedingungen ermöglicht und andere Wege der Signalweiterleitung nutzt, nämlich STAT4. Erstaunlich ist jedoch, dass die Effekte von IL-6 und IL-21 auf die Expression von IFN- $\gamma$  in Zellen aus Nabelschnurblut gegensätzlich sind.

Die hier gemachten Beobachtungen, dass TGF- $\beta$  die IL-21 Produktion von naiven *in vitro* stimulierten T-Zellen hemmt, bestätigt im Maussystem gemachte Entdeckungen (Suto A 2008). Suto et al. 2008 zeigten in genannter Veröffentlichung, dass naive murine CD4+ T-Zellen durch IL-6 zur IL-21 Produktion angeregt werden und die Zugabe von TGF- $\beta$  die IL-6 induzierte IL-21 Produktion hemmt. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  die IL-6 unabhängige bzw. spontane IL-21 Produktion ebenso hemmt wie die IL-6 induzierte.

Unter Th2 induzierenden Bedingungen konnte in dieser Arbeit keine IL-21 Produktion festgestellt werden. Diese Ergebnisse gehen konform mit denen zweier Arbeitsgruppen (Ma CS 2009) (Onoda T 2007), die keine IL-21 Produktion von humanen naiven CD4+ T-Zellen unter Th2 Bedingungen gemessen haben. Diese Beobachtungen stehen allerdings im Gegensatz zu der Beobachtung, dass Th2 Zellen aus dem peripheren Blut und aus der Tonsille *ex vivo* zur IL-21 Produktion fähig sind. Eine mögliche Begründung könnte hierfür sein, dass die *in vitro* Induktion zu Th2 Zellen unvollständig war, diese Vermutung wird bestärkt durch die Beobachtung, dass unter Th2 induzierenden Konditionen keine erhöhte IL-4 Produktion im Gegensatz zur unpolarisierenden Kondition zu verzeichnen war. (Abb. 3-1). Es ist allerdings eine Verringerung der IFN- $\gamma$  Produktion unter Th2 Bedingungen aufgetreten, was für eine zumindest teilweise Differenzierung der Zellen spricht und zeigt, dass das verwendete rekombinante IL-4 biologisch wirksam war. Ma et al. 2009 zeigen in ihren Abbildungen für die Th2 Differenzierung nicht ob eine IL-4 Produktion induziert wurde. Deshalb kann nicht davon ausgegangen werden, dass in genannter Arbeit eine vollständige Differenzierung zu Th2 Zellen stattgefunden hat. In der von Onoda et al. 2007 gezeigten Th2 Induktion konnte eine IL-4 Produktion von 7,5% der Zellen gezeigt werden, nicht gezeigt ist eine Negativkontrolle. Damit ist nicht nachvollziehbar, ob eine erhöhte IL-4 Produktion und damit Differenzierung stattgefunden hat. Zudem haben Onoda et al. 2007 für IL-12 eine sehr schwache Wirkung auf die IL-21 Produktion (1,7% IL-21 Produzenten) beobachtet, was den hier und von Schmitt et al. gemachten neueren Beobachtungen widerspricht. Zudem ist eine *in vitro* Induktion nur der Versuch die Vorgänge *in vivo* nachzuahmen, was aber niemals vollständig erreicht werden kann. Zusammengefasst ist zu diesem Zeitpunkt und Wissensstand nicht sicher gezeigt worden, dass es unter Th2 induzierenden Bedingungen nicht zur Entstehung von IL-21 produzierenden Zellen kommt. Weitere Experimenten mit optimierten Bedingungen müssen folgen. Ein

Versuchsansatz könnte sein, die Stärke der TZR Aktivierung und oder die Zeit bis zur Restimulierung zu verändern. Wie von Pfeiffer et al. 1995 und Kumar et al. 1995 gezeigt wurde, führt eine schwache TZR Aktivierung zur Entwicklung des Th2 Zelltyps während starke TZR Aktivierung die Entwicklung von Th1 Zellen unterstützt. (Pfeiffer C 1995)(Kumar V 1995) Auch die Zeitspanne spielt eine entscheidene Rolle, so beginnt die Hochregulierung von c-maf, einem wichtigen Transkriptionsfaktor für die Th2 Differenzierung erst 5-7 Tage nach dem Priming. (Brogdon JL 2002) Weiterhin ist gezeigt worden, dass die Beteiligung des Korezeptors CD4 für Th2 Entwicklung essentiell ist (Fowell DJ 1997) (Brown DR 1997), der in den hier durchgeführten Experimenten unberührt blieb.

Th17 induzierende Bedingungen führten in den Experimenten dieser Arbeit zu einer erhöhten IL-21 Produktion gegenüber der Negativkontrolle in naiven CD4+ T-Zellen des peripheren Blutes und des Blutes aus Nabelschnüren. Unter den Nichtspontanproduzenten und Nabelschnurzellen war diese Erhöhung signifikant. In den Zellen des peripheren Blutes konnte jedoch keine signifikant erhöhte IL-17 Produktion festgestellt werden, womit nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass eine vollständige Th17 Induktion stattgefunden hat. Experimente im Maussystem zeigten für Th17 induzierende Konditionen ebenfalls eine Erhöhung in der IL-21 Expression. (Korn T 2007) (Nurieva R 2007) (Zhou L 2007) (Volpe E 2008) (Wei L 2007) Die in den genannten Arbeiten verwendeten Konditionen für die Th17 Induktion beinhalteten IL-6 oder IL-21 und TGF- $\beta$  in Kombination mit oder ohne IL-23. Im humanen System sind die Bedingungen für eine vollständige Th17 Polarisierung bis dato nicht gänzlich bekannt, bzw. es besteht bisher keine Einigkeit darüber. In humanen naiven CD4+ T-Zellen, die unter Konditionen, die in murinen Zellen zu einer Th17 Polarisierung führten (IL-6 + TGF- $\beta$  bzw. IL-21 + TGF- $\beta$ ), kultiviert wurden, konnte in den Experimenten dieser Studie kein IL-17 detektiert werden. Wilson et al. haben gezeigt, dass die Kombination aus IL-1 $\beta$  und IL-23 zur Generierung von humanen IL-17 produzierenden Zellen führt (Wilson NJ 2007), während (Acosta-Rodrigues EV 2007) diese Wirkung für die Kombination aus IL-1, IL-6 und IL-23 zeigten. Beide Arbeitsgruppen arbeiteten mit Kulturmedium, das Serumkomponenten enthielt, so auch latentes TGF- $\beta$ , womit die Wirkung dieses Zytokins nicht beachtet wurde (O'Garra A 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde mit serumfreiem Medium gearbeitet und zusätzlich sind Zellen, die den Chemokinrezeptor CCR6 exprimieren aus der Population

der naiven Zellen aussortiert worden. Die Expression von CCR6 spricht für eine bereits stattgefundenene Polarisierung. Werden diese Zellen nicht aussortiert, besteht die Möglichkeit, dass bereits polarisierte CCR6+ Zellen durch Zugabe von speziell Th17 expandierenden Zytokinen wie IL-23 oder IL-1b vermehrt werden und eine Einschätzung über die wahre Polarisierung naiver Zellen nicht mehr möglich ist. In Induktionsexperimenten mit naiven CD4+CD45RA+CD25- T-Zellen, die in CCR6+ und CCR6- Zellen sortiert wurden, zeigte sich, dass in der Population der CCR6+ naiven T-Zellen nach *in vitro* Stimulation unter Th17 polarisierenden Bedingungen eine IL-17 Produktion von durchschnittlich 7% stattfand, während in der Population der CCR6-naiven Zellen weniger als 1% IL-17 exprimierten (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sprechen für die hier vertretene These, dass nur ein Aussortieren der CCR6+ Zellen aus der Population der naiven Zellen eine reale Einschätzung der Polarisierung zum Th17 Zelltyp ermöglicht. Singh et al. 2008 haben für ihre Induktionsexperimente naive T-Zellen aus Nabelschnurblut benutzt, von denen ausgegangen wird, dass sie bisher nicht von Antigenen aktiviert wurden und damit noch keine Polarisierung erfahren haben. Die Ergebnisse von Singh et al. 2008 zeigten dementsprechend eine relativ geringe Induktion von IL-17 produzierenden Zellen (1,8%) unter Konditionen die IL-1, IL-6, IL-23, TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$  enthielten. (Singh SP 2008) Es ist jedoch bisher in Einzelzellanalysen nicht gezeigt worden, dass humane *in vitro* generierte Th17 Zellen IL-21 produzieren. Auch hier gilt es weitere Versuche zur optimaleren Induktion von Th17 Zellen durchzuführen. Suto et al. 2008 haben in Induktionsexperimenten mit naiven Mauszellen gezeigt, dass unter Th17 polarisierenden Bedingungen der Großteil der IL-21 Produzenten IL-17 negativ ist (etwa 2/3 der IL-21+ Zellen). (Suto A 2008)

Die Beobachtung, dass naive CD4+ T-Zellen in einigen Spendern nach *in vitro* Stimulation ohne differenzierende Stimuli in der Lage sind, IL-21 zu produzieren ist unerwartet. Die weitere Feststellung, dass diese Fähigkeit spendervariabel ist, ist außerdem sehr interessant, wenn man bedenkt, welchen Einfluss IL-21 auf die Entstehung bzw. Exazerbation von Autoimmunkrankheiten hat. Dies führt nämlich zu der Überlegung ob eine Veranlagung zur Erkrankung eventuell im Zusammenhang mit genannter Spontanproduktion steht bzw. mit den Mechanismen, die zur Spontanproduktion führen und eventuell noch andere bisher unerkannte Auswirkungen haben. Die Einteilung in Spontanproduzenten und Nichtspontanproduzenten erfolgte aufgrund der

virtuellen Grenze zwischen Spendern, deren Zellen auf Stimulation und Kultivierung unter IL-6 mit erhöhter IL-21 Produktion reagieren und denen, die durch IL-6 nicht zu erhöhter Expression angeregt werden können, bzw. zu keiner signifikanten Erhöhung (siehe Abb.4-1). Obwohl diese Einteilung durch statistische Clusteranalyse bestätigt wurde, gibt es eine Grauzone, die zwischen 5 und 10% liegt. Wie die Tab.1 zeigt, gibt es innerhalb dieser Zone einige Spender (19, 22 und 23), deren Zellen auch unter Zugabe von IL-6 keine erhöhte bzw. sogar eine verminderte (Spender 22) Anzahl von IL-21 Produzenten aufweisen. Dafür kann es mehrere Gründe geben, die Zellen könnten durch unentdeckte Einflüsse nicht optimal kultiviert worden sein, so dass ihre wahre Fähigkeit zu einer viel höheren Spontanproduktion nicht zum Vorschein kam und sie eigentlich in die Gruppe der Spontanproduzenten gehören. Oder aber nur der Ansatz mit IL-6 enthielt Störfaktoren, welche die Induktion einer erhöhten IL-21 Synthese durch IL-6 verhinderten. Um auszuschließen, dass eine erhöhte IL-21 Produktion in nichtpolarisierten Zellen der neutralen Kondition nur einer Vermehrung von bereits polarisierten Zellen, die noch den naiven Phänotyp aufweisen (CD45RA+) zu Grunde liegt, wurde in einem bekannten Spontanproduzenten eine andere Sortierstrategie zur Aufreinigung naiver Zellen angewendet. Hierbei wurden Marker, die Th1, Th2 bzw. Th17 Zellen und deren Vorläuferzellen eigen sind, aussortiert. Diese Marker waren CXCR3 für Th1 Zellen, CRTH2 und CCR4 für Th2 Zellen und CCR6 und CD161 für Th17 Zellen (Cosmi L 2008). Zusätzlich wurde neben CD45RA noch CD62L, ein weiterer Naivitätsmarker angefärbt und nur Zellen sortiert, die beide Marker trugen. Die Verringerung in der Spontanproduktion durch die neue Sortierstrategie im Vergleich mit der alten im selben Experiment belief sich auf weniger als 5% und damit war die alternative Sortiermethode nicht effektiv. Es kann dennoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sich bereits aktivierte oder polarisierte Zellen unter den naiven Zellen befanden, Zellen z.B. deren Phänotyp bisher nicht bekannt ist und die durch die Sortierstrategien nicht identifiziert werden können.

In naiven Zellen, die aus Nabelschnurblut isoliert wurden (NBZ), konnte keine Spontanproduktion nachgewiesen werden. Es ist jedoch weiterhin unklar, ob diese Beobachtung dadurch zu erklären ist, dass diese Zellen einen naiveren Zustand haben als Zellen aus dem peripheren Blut Erwachsener Spender (PBZ). Es sind auch Unterschiede in der Fähigkeit anderer Zytokine, die IL-21 Produktion zu beeinflussen, beobachtet worden. So ist der Effekt von IL-12 nicht so ausgeprägt wie in naiven Zellen Erwachsener und

für IL-10 konnte kein induzierender Effekt nachgewiesen werden. Zusammen mit der Tatsache, dass IL-6 und IL-21 in NBZ anders als in PBZ die IFN- $\gamma$  Produktion in naiven *in vitro* stimulierten T-Zellen induzieren und nicht hemmen, sprechen die Ergebnisse dafür, dass naive Zellen Neugeborener nicht mit denen Erwachsener zu vergleichen sind. Womöglich repräsentieren sie nicht (nur) einen „supernaiven“ Phänotyp, sondern unterscheiden sich als Teil eines anderen undifferenzierteren oder unerfahreneren Immunsystems in vielerlei Hinsicht. Das heißt, dass diese Zellen eventuell andere Rezeptorexpressionen aufweisen oder bestimmte Proteine der Signalkaskaden (noch) nicht exprimiert werden. Ein Beispiel für derartige Unterschiede zwischen adulten und neonatalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist das Phänomen, dass der Kontakt des Immunsystems Neugeborener mit Pathogenen zu einer verstärkten Th2 Antwort führt, selbst mit Pathogenen, die in Erwachsenen Th1 vermittelte Immunreaktionen auslösen (Reen DJ 1998) (Atkins B 1999). Dieses unausgeglichene Th1/Th2 Gleichgewicht wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass neonatale naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Antigenkontakt innerhalb von 24h große Mengen von IL-4 und IL-13 produzieren, welche die Entwicklung von Th1 Zellen verhindern bzw. unterdrücken. (Zaghouani H 2009) In adulten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist der Th2 Zytokinlokus, der die Gene von IL-4, IL-5 und IL-13 beherbergt ausgeschaltet und es benötigt Th2 induzierenden Bedingungen um die Genexpression zu ermöglichen, die erst nach Tagen nach AG-Stimulation eintritt. Die Ergebnisse der letzten Jahre deuten daraufhin, dass Teile des Th2 Zytokinlokus in naiven neonatalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Maus und Mensch hypomethylierte Regionen aufweisen und somit eine schnelle Expression dieser Gene möglich ist (Zaghouani H 2009).

Rassenspezifische genetische Unterschiede könnten ebenfalls für die Erklärung des Fehlens von Spontanproduktion in Nabelschnurblutzellen in Frage kommen. Während die Blutproben aus Buffycoats und von Frischblutspendern wahrscheinlich hauptsächlich von der deutschen Bevölkerung stammen, war unter den Spendern von Nabelschnurblut der Anteil an Spendern türkischer Abstammung verhältnismäßig groß (80%).

Eine weitere Möglichkeit, die als Erklärung für die Spontanproduktion in Betracht kommt, ist das Vorhandensein IL-21 induzierender Zytokine in der Zellkultur. Möglich ist eine Produktion durch die naiven Zellen selbst bzw. durch Kontaminationen mit anderen Zelltypen z.B. dendritischen Zellen, die IL-12 und IL-6 produzieren, obwohl letzteres

nahezu ausgeschlossen werden kann, da im Sortcheck eine Reinheit von naiven CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup> T-Zellen von über 95% vorlag. In der Kultur befinden sich neutralisierende Antikörper gegen IL-12, IL-4 und IFN- $\gamma$  und in weiteren Ansätzen wurden zusätzlich Antikörper gegen IL-6, IL-10 oder den IL-10 Rezeptor zugegeben. Auch dies führte zu keiner signifikanten Reduktion der Spontanproduktion. Aber auch eine Kontamination mit IL-21 produzierenden CD45RA<sup>+</sup> naiven oder nicht naiven Zellen kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Dieses scheint jedoch unwahrscheinlich, da kein IL-21 oder IFN- $\gamma$  *ex vivo* in naiven Zellen intrazellulär nach 6 Stunden Stimulation detektiert wurde.

Ob die Fähigkeit zur Spontanproduktion genetisch festgelegt ist, konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Doch auch Proteine der Signalkaskade, die der Expression des IL-21 Gens vorangehen, könnten dafür verantwortlich sein. Dazu gehören unter anderem der IL-21 Rezeptor, STAT3, STAT4 oder c-Maf, ein Transkriptionsfaktor für den in mindestens drei Studien mit Mauszellen gezeigt wurde, dass er die IL-21 Expression hochreguliert (Hiramatsu Y 2009) (Pot C 2009) (Bauquet AT 2009). Hiramatsu et al. 2009 haben in ihrer Studie ebenfalls gezeigt, dass TGF- $\beta$  die c-Maf induzierte IL-21 Produktion hemmt. Ob der hemmende Effekt von TGF- $\beta$  auf die IL-21 Produktion, der in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ebenfalls über die Hemmung der c-Maf induzierten IL-21 Produktion in humanen Zellen wirkt, bleibt unklar und muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Eine erhöhte c-Maf Aktivität könnte jedoch für die Erklärung der Spontanproduktion in Frage kommen. In der durch Hiramatsu et al. 2009 durchgeführten Studie wurden unter anderem Mauszellen benutzt, in denen eine forzierte c-Maf Expression vorlag. Diese Zellen zeigten im Gegensatz zu Wildtyp Zellen eine starke IL-21 Produktion in der neutralen Kondition, die durch die Zugabe von IL-6 nicht mehr erhöht werden konnte. Von Pot et al. 2009 ist gezeigt worden, dass IL-27 in der Lage ist, die Expression von c-Maf zu stimulieren und über diesen Weg die Produktion von IL-21 zu erhöhen. IL-27 und IL-6 nutzen für die Weiterleitung ihrer Signale beide das Signalketten Protein gp130 (Pot C 2009). Sollte IL-27 in der Kultur für die Expression von c-Maf und IL-21 verantwortlich sein, könnte das gp130 Protein dadurch blockiert oder gesättigt sein, so dass es nicht mehr für die Signaltransduktion von IL-6 zur Verfügung steht. IL-27 wird allerdings von APZs produziert (Pot C 2009), deren Vorhandensein in der Zellkultur durch FACS gestützte Zellanreicherung nahezu auszuschließen ist.

Für eine Beteiligung von STAT3 am Auftreten von Spontanproduktion unter einigen Spendern spricht die Beobachtung, dass unter Spontanproduzenten IL-6 die IL-21 Produktion nicht mehr erhöhen kann, ähnlich wie die Kombination von IL-6 und IL-21, welche die IL-6 induzierte Produktion von IL-21 nicht mehr erhöhen kann. Im Gegensatz dazu vermag die Zugabe von IL-12 die erhöhte IL-21 Produktion unter Spontanproduzenten noch weiter zu erhöhen, was dafür spricht, dass STAT4 in diesen Zellen in der neutralen Kondition noch nicht oder zumindest nicht vollständig phosphoryliert ist. Dieser Verdacht verhärtet sich durch erste Experimente in Rahmen dieser Arbeit, die die Beteiligung von STAT3 bzw. STAT4 an der Spontanproduktion untersucht haben. Obwohl für eine statistische Analyse nicht genug Spontanproduzenten zur Verfügung standen, konnte die Tendenz beobachtet werden, dass die erhöhte IL-21 Produktion in Zellen von Spontanproduzenten begleitet wird von einer stärkeren STAT3 Phosphorylierung in diesen Zellen nach 48 h Kultur. Zudem wurde gezeigt, dass naive CD4+ T-Zellen von Spontanproduzenten *ex vivo* keine erhöhte STAT3 Phosphorylierung aufweisen und dass naive Zellen erst nach Aktivierung des T-Zell Rezeptors STAT3 phosphorylieren. Dies trifft jedoch nicht auf STAT4 Proteine zu, was bedeutet, dass die spontane Phosphorylierung STAT3 spezifisch ist. In einem einzelnen Experiment mit nur einem verfügbaren Spontanproduzenten und einem Nicht Spontanproduzenten wurde die spontane und die zytokininduzierte STAT3 Phosphorylierung und IL-21 Produktion an Tag 6 nach Restimulation mit PdBU/Ionomycin durch die Neutralisation von IL-21 in der Zellkultur reduziert. Es wird für diese Ergebnisse natürlich kein Anspruch auf statistische Signifikanz erhoben, aber sie lassen eine frühe TZR-induzierte IL-21 Produktion in Zellen von Spontanproduzenten vermuten, die dann im feed forward loop weitere IL-21 Produktion induziert. Diese Amplifikation würde auch die hohe IL-21 Produktion in einigen Spontanproduzenten (20-30%) an Tag 6 erklären.

Das Phänomen kann bei der Frequenz der Spontanproduzenten (etwa 30%) auf einem Polymorphismus im IL-21 Gen beruhen. Aber auch Veränderungen im STAT3 Gen können nicht ausgeschlossen werden, da die Neutralisierung von IL-21 die spontane STAT3 Phosphorylierung nicht vollständig unterdrücken konnte.

STAT3 Mutationen sind assoziiert mit dem Hyper-IgE-Syndrom, bei dem es zu einer erhöhten Produktion von Immunglobulinen der Klasse E und einem Defekt in der Generation von Th17 Zellen kommt (Durant L 2010). Zudem wurde in Mausexperimenten nachgewiesen, dass STAT3 essentiell ist für die Entstehung von

inflammatorischen Darmerkrankungen, und zwar nicht nur durch die Veränderung des Th17/Treg Gleichgewichts, sondern auch durch den Einfluss auf die Proliferation und das Überleben von T-Zellen. (Durant L 2010) Eine überschießende Aktivierung von STAT3 ist assoziiert mit malignen Transformationen und der Entstehung verschiedener Krebsarten. (Haura EB 2005) IL-21 selbst wird in Zusammenhang mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten gebracht. Polymorphismen in den IL-21 und IL-21R Genen bzw. im IL-2/IL-21 Genlokus sind assoziiert mit Systemischem Lupus Erythematodes (SLE), Diabetes Typ I, Rheumatoider Arthritis und inflammatorischen Darmerkrankungen (Sondergaard H 2009) und die Hälfte aller humanen Patienten, die an SLE leiden, weisen ebenfalls erhöhte IL-21 Spiegel auf (Leonard WJ 2008). Sollten Veränderungen in den Genen, die mit der Expression und oder Phosphorylierung von IL-21 und oder STAT3 in Zusammenhang stehen für die Spontanproduktion von IL-21 in einigen Spendern verantwortlich sein, könnte gerade diese Spontanproduktion ein Indikator sein für die Prädisposition einiger Individuen, STAT3/IL-21 assoziierte Krankheiten zu entwickeln.

Zukünftige Experimente, die die Beteiligung von STAT3 und anderen Moleküle der IL-21 Singnalkaskade an der Spontanproduktion weiter untersuchen, bis hin zu Genanalysen sollten klarere Antworten auf die Frage nach dem bzw. den Auslösern der Spontanproduktion und deren Bedeutung bringen.

## 6. Literaturverzeichnis

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F Interleukins 1 and 6 but not transforming growth factor b are essential for the differentiation of interleukine 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 8 (2007): 1-8.

Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8 (2007): 639-646.

Adkins B T-cell function in newborn mice and humans. *Immunology Today* 20 (1999): 330-335.

Agren K, Brauner A, Andersson J Haemophilus influenzae and Streptococcus pyogenes group A challenge induce a Th1 type of cytokine response in cells obtained from tonsillar hypertrophy and recurrent tonsillitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 60 (1998): 35-41.

Awasthi A, Kuchroo VK Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 5 (2009): 489-498.

Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392 (1998): 565-568.

Banchereau J, Steinman RM Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 (1998): 245-252.

Bauquet AT, Jin H, Paterson AM et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 10 (2009): 167-175.

Betelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 453 (2008): 1051-1057.

Blaho VA, Buczynski MW, Dennis EA, Brown CR Cyclooxygenase-1 orchestrates germinal center formation and antibody class-switch via regulation of IL-17. *J Immunol* 183 (2009): 5644-5653.

Boenninghaus HG, Lenarz T *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde.* Vol. XIII. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007.

Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1) and Th2s. *J Exp Med*. 187 (1998): 129-134.

Bonilla FA, Oettgen HC Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010): 33-40.

Bour-Jordan H, Bluestone JA CD28 Function: A Balance of Costimulatory and Regulatory Signals. *Clin Immunol.* 22 (2002): 1-7.

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 192 (2000): 1545-1552.

Brogdon JL, Leitenberg D, Bottomly K The Potency of TCR Signaling Differentially Regulates NFATc/p Activity and Early IL-4 Transcription in Naive CD4+ T Cells. *J Immunol* 168 (2002): 3825-3832.

Brown DR, Moskowitz NH, Killeen N, Reiner SL A Role for CD4 in Peripheral T Cell Differentiation. *J Exp Med*. 186 (1997): 101-107.

Bryant VL, Ma CS, Avery DT et al. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol* 179 (2007): 8180-8190.

Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW The Organizing Principle in the Formation of the T Cell Receptor-CD3 Complex. *Cell* 111 (2002): 967-979.

Casellas R, Shih TA, Kleinewietfeld M et al. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 291 (2001): 1541-1544.

Chtanova T, Tangye SG, Newton R et al. T Follicular helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. *J Immunol* 173 (2004): 68-78.

Cosmi L, Annunziato F, Iwasaki M et al. CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur J Immunol.* 30 (2000): 2972-2979.

Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med*. 205 (2008): 1903-1916.

Costalonga M, Cleary PP, Fischer LA, Zhao Z Intranasal bacteria induce Th1 but not Treg or Th2. *Mucosal Immunol*. 2 (2009): 85-95.

D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R et al. Selective upregulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol*. 161 (1998): 5111-5115.

Davis MM, Boniface JJ, Reich Z et al. Ligand Recognition By alpha beta T Cell Receptors. *Annu Rev Immunol*. 16 (1998): 523-544.

Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A et al. Inhibition of Th1 Differentiation by IL-6 Is Mediated by SOCS1. *Immunity* 13 (2000): 805-815.

Diehl S, Rincón M The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*. 39 (2002): 531-536.

Dienz O, Eaton SM, Bond JP et al. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *J Exp Med*. 206 (2009): 69-78.

Dumoutier L, Louahed J, Renauld J-C Cloning and Characterization of IL-10-Related T Cell-Derived Inducible Factor (IL-TIF), a Novel Cytokine Structurally Related to IL-10 and Inducible by IL-9. *J Immunol* 164 (2000): 1814-1819.

Durant L, Watford WT, Ramos HL et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* 32 (2010): 605-615.

Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* 324 (2009): 1569-1572.

Ezekowitz RAB, Hoffman J. Innate Immunity. *Curr Opin Immunol*. 8 (1998): 9-53.

Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG Follicular Helper T Cells: Lineage and Location. *Immunity* 30 (2009): 324-335.

Fontenot JD, Rudensky AY A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 6 (2005): 331-337.

Fowell DJ, Magram J, Turck CW et al. Impaired Th2 Subset Development in the Absence of CD4. *Immunity* 6 (1997): 559-569.

Hashmi MH, Van Veldhuizen PJ Interleukin-21: updated review of Phase I and II clinical trials in metastatic renal cell carcinoma, metastatic melanoma and relapsed/refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Biol Ther.* 5 (2010): 807-17

Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* 9 (2003): 1131-1137.

Haura EB, Turkson J, Jove R Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signla transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2 (2005): 315-324.

Hiramatsu Y, Suto A, Kashiwakuma D et al. c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF- $\beta$  inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 87 (2009): 1-9.

Janeway CA, Medzhitov R Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20 (2002): 197-216.

Jeong JH, Lee DW, Ryu RA et al. Bacteriologic comparison of tonsil core in recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Laryngoscope* 117 (2007): 2146-2151.

Kapsenberg, ML Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3 (2003): 984-993.

Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL et al. IL-21 Limits NK Cell Responses and Promotes Antigen-Specific T Cell Activation: A Mediator of the Transition from Innate to Adaptive Immunity. *Immunity* 16 (2002): 559-569.

King C, Tangye SG, Mackay CR T Follicular Helper (TFH) Cells in Normal and Dysregulated Immune Responses. *Annu Rev Immunol.* 26 (2008): 741-766.

King IL, Mohrs M IL-4-producing CD4<sup>+</sup>T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells. *J Exp Med* 206 (2009): 1001-1007.

Korn T, Bettelli E, Gao W et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* 448 (2007): 484-488.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 27 (2008): 485-517.

Kumar V, Bhardwaj V, Soares L et al. Major histocompatibility complex binding affinity of an antigenic determinant is crucial for the differential secretion of interleukin 4/5 or interferon  $\gamma$  by T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995): 9510-9514.

Leonard WJ, Spolski R Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol.* 9 (2005):688-98.

Leonard WJ, Zeng R, Spolski R Interleukin 21: a cytokine/cytokine receptor system that has come of age. *J Leukoc Biol.* 84 (2008): 348-356.

Liu H, Rohowsky-Kochan C Regulation of IL-17 in Human CCR6<sup>+</sup> Effector memory T Cells. *J Immunol* 180 (2008): 7948-7957.

Liu T, He SH, Zheng PY et al. Staphylococcal enterotoxin B increases TIM4 expression in human dendritic cells that drives naive CD4 T cells to differentiate into Th2 cells. *Mol Immunol.* 44 (2007): 3580-3587.

Loganathan A, Arumainathan UD, Ramn R Comparative study of bacteriology in recurrent tonsillitis among children and adults. *Singapore Med J.* 47 (2006): 271-275.

Luttmann W *Der Experimentator Immunologie.* Vol. III. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Springer, 2008.

Ma CS, Suryani S, Avery DT et al. Early commitment of naive human CD4<sup>+</sup> T cells to the T follicular helper (T<sub>fh</sub>) cell lineage is induced by IL-12. *Immunology and Cell Biology* 87 (2009): 590-600.

Mandron M, Ariès MF, Brehm RD et al. Human dendritic cells conditioned with *Staphylococcus aureus* enterotoxin B promote Th2 cell polarization. *J Allergy Clin Immunol.* 117 (2006): 1141-1147.

McHeyzer-Williams M, McHeyzer-Williams L, Panus J et al. Helper T-cell-regulated B-cell immunity. *Microbes and Infection* 5 (2003): 205-212.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman R Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136 (1986): 2348-2357.

Mosmann TR, Coffman RL Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 46 (1989): 111-147.

Murphy K, Travers P, Walport M *Immunobiology*. Vol. VII. New York: Garland Sciences, 2008.

Nurieva RI, Chung Y, Hwang D et al. Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity* 29 (2008): 138-149.

Nurieva RI, Yang XO, Martinez G et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory t cells. *Nature* 448 (2007): 480-484.

O'Garra A, Stockinger B, Veldhoen M Differentiation of human TH-17 cells does require TGF- $\beta$ ! *Nat Immunol* 9 (2008): 588-590.

Onoda T, Tahman M, Nara H et al. Human CD4<sup>+</sup> central and effector memory T cells produce IL-21: effect on cytokine-driven proliferation of CD4<sup>+</sup> T cell subsets. *Int Immunol* 19 (2007): 1191-1199.

Ozaki K, Spolski R, Ettinger R Regulation of B Cell Differentiation and Plasma Cell Generation by IL-21, a Novel Inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* 173 (2004): 5361-5371.

Ozaki K, Spolski R, Feng CG et al. A Critical Role for IL-21 in Regulating Immunoglobulin Production. *Science* 298 (2002): 1630-1634.

Pahlman LI, Olin AI, Darenberg J et al. Soluble M1 protein of *Streptococcus pyogenes* triggers potent T cell activation. *Cel Microbiol.* 10 (2008): 404-414.

Parker DC T cell-dependent B-cell activation. *Annu Rev Immunol.* 11 (1993): 331-340.

Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408 (2000): 57-63.

Parrish-Novak J, Foster DC, Holly RD, Clegg CH Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol.* 72 (2002): 856-863.

Pesce J, Kaviratne M, Ramalingam TR et al. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J Clin Invest.* 116 (2006): 2044-2055.

Pfeiffer C, Stein J, Southwood S et al. Altered Peptide Ligands Can Control CD4 T Lymphocyte Differentiation In Vivo. *J Exp Med.* 181 (1995): 1569-1574.

Pot C, Jin H, Awasthi A et al. IL-27 Induces the Transcription Factor c-Maf, Cytokine IL-21, and the Costimulatory Receptor ICOS that Coordinately Act Together to Promote Differentiation of IL-10-Producing Tr1 Cells. *J Immunol* 183 (2009): 797-801.

Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol.* 6 (2006): 741-750.

Reen DJ Activation and functional capacity of human neonatal CD4 T-cells. *Vaccine* 16 (1998): 1401-1408.

Rivino L, Messi M, Jarrossay D et al. Chemokine Receptor Expression Identifies Pre-T Helper (Th)1, Pre-Th2, and Nonpolarized Cells among Human CD4+ Central Memory T Cells. *J Exp Med.* 200 (2004): 725-735.

Rosen, SD Ligands for L-Selectin: Homing, Inflammation, and Beyond. *Annu Rev Immunol.* 22 (2004): 129-156.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R et al. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunolo Rev* 21 (2006): 8-27.

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR et al. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 187 (1998): 875-883.

Sarra M, Monteleone I, Stofi C et al. Interferon-gamma-expressing Cells Are a Major Source of Interleukin-21 in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 16 (2010): 1-8.

Schaerli P, Willmann K, Lang AB et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*. 192 (2000): 1553-1562.

Schmitt N, Morita R, Bourdery L et al. Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity* 31 (2009): 158-169.

Singh SP, Zhang HH, Foley JF et al. Human T Cells That Are Able to Produce IL-17 Express the Chemokine Receptor CCR6. *J Immunol* 180 (2007): 214-221.

Skak K, Kragh M, Hausman D, Smyth MJ, Sivakumar PV Interleukin 21: combination strategies for cancer therapy. *Nat Rev* 7 (2008): 231-240.

Sondergaard H, Skak K IL-21: roles in immunopathology and cancer therapy. *Tissue Antigens* 74 (2009): 467-479.

Spolski R, Leonard WJ Interleukin-21: Basic Biology and Implications for Cancer and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 26 (2008): 57-79.

Stockinger B, Veldhoen M Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*. 19 (2007): 281-286.

Strengell M, Sareneva T, Foster D et al. IL-21 upregulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. *J Immunol* 169 (2002): 3600-3605.

Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S et al. Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. *J Exp Med*. 205 (2008): 1369-1379.

Takeda K, Clausen B, Kaisho BE et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10 (1999): 39-49.

Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J et al. Streptococcus pyogenes and Lactobacillus rhamnosus differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 75 (2004): 764-771.

Vogelzang A, McGuire HM, Yu D et al. A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T Follicular Helper Cells. *Immunity* 29 (2008): 127-137.

Volpe E, Servant N, Zollinger R et al. A critical function for transforming growth factor- $\beta$ , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human TH-17 responses. *Nat Immunol* 9 (2008): 650-657.

Wagner DH Re-shaping the T cell repertoire: TCR editing and TCR revision for good and for bad. *Clin Immunol* 123 (2007): 1-6.

Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ IL-21 Is Produced by Th17 Cells and Drives IL-17 Production in a STAT3-dependent Manner. *J Biol Chem* 282 (2007): 34605-34610.

Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* 172 (2004): 567-576.

Wilson NJ, Boniface K, Chan JR et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 8 (2007): 950-957.

Wurster AL, Rodgers VL, Satoskar AR et al. Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J Exp Med.* 196 (2002): 969-977.

Yi JS, Du M, Zajac AJ A vital role for Interleukin-21 in the control of chronic viral infection. *Science* 324 (2009): 1525-1526.

Zaghouani H, Hoeman CM, Adkins B Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol.* 30 (2009): 585-591.

Zamoyska R CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol.* 10 (1998): 82-87.

Zaretsky AG, Taylor JJ, King IL et al. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med.* 206 (2009): 991-999.

Zautner AE, Krause M, Stropahl G et al. Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. *PLoS One.* 5 (2010): e9452.

Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8<sup>+</sup> T cell expansion and function. *J Exp Med* 201 (2005): 139-148.

Zhou L, Ivanov II, Spolski R et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8 (2007): 967-974.

Zhu J, Paul WE CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112 (2008): 1557-1569.

## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ilko Kastirr, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung und Phänotypisierung humaner IL-21 produzierender CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

## **8. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 9. Danksagung

Ich danke Dr. habil. Jens Geginat, der meine Arbeit in seiner Forschungsgruppe ermöglicht hat und mir jeder Zeit mit Rat, produktiver Kritik und ermutigendem Lob zur Seite stand. Es hat mir viel Spaß gemacht, unter Deiner Obhut zu forschen, vor allem habe ich viel gelernt und freue mich auf die kommenden Monate unserer Zusammenarbeit.

Für die Übernahme der Doktormutterschaft danke ich Univ.-Prof. Dr. Birgit Sawitzki.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Svenja Steinfelder, die mich vom ersten bis zum letzten Tag mit Hingabe und Geduld betreut hat und mir wissenschaftliches Denken und Arbeiten beigebracht hat. Du hast mich immer motiviert und angespornt, mich nicht mit weniger zufrieden zu geben. Vielen Dank für die schöne Zeit, ich hoffe, dass unsere Freundschaft lange erhalten bleibt.

Gleichermaßen danke ich meinen Kollegen aus der AG Geginat, Bodo Steckel, Jana Krietsch, Barbara Häringer und Laura Lozza, sowie meinen Kollegen aus dem RCIS, die mir jederzeit mit professioneller und moralischer Unterstützung zur Seite standen, und die mir weit über das dienstliche Maß hinaus ans Herz gewachsen sind.

Des Weiteren danke ich meinen Kooperationspartnern Dr. Chiara Romagnani und ihrer Arbeitsgruppe für den wissenschaftlichen Austausch und die zuvorkommende Bereitstellung der Tonsillen; sowie der Klinik für Geburtsmedizin der Charité, CVK.

Für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft auch in den Mittagspausen, sowie für ihr Bemühen jede noch so kleine Zellpopulation zu isolieren, danke ich Dr. Toralf Kaiser und Jenny Kirsch von der Cell Sorting Facility.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinen Großeltern, meinen Freunden und vor allem meinem Bruder die mich bei meinen Vorhaben unterstützt und mich jederzeit zum Weitermachen angehalten haben und mit ihrem Interesse an meiner Arbeit mir stets das Gefühl gegeben haben, auf dem richtigen Weg zu sein.

Meine Hochachtung gilt allen Spendern, die durch ihre großzügigen und wertvollen Gaben das Voranschreiten der Wissenschaften ermöglichen und die Grundlage für

meine Arbeit darstellen. Ich wünsche allen Babys ein langes und glückliches Leben mit ihren Familien.