

DISSERTATION

Die Rolle des Signalnetzwerks von CD226, TIGIT und CD96
für die humane T-Zell-Antwort und die Pathogenese von
chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

The role of the signalling network of CD226, TIGIT and CD96
for the human T cell response and the pathogenesis of
Inflammatory Bowel Disease

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Janina Strunk

Erstbetreuung: Prof. Dr. Birgit Sawitzki

Datum der Promotion: **30.06.2024**

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abstract.....	9
Deutsch.....	9
English.....	10
Einführung.....	11
T-Zellen als Komponenten des adaptiven Immunsystems.....	11
T-Zellaktivierung.....	12
Kosignalisierende Moleküle.....	12
Differenzierung in verschiedene T-Helferzell-Untergruppen.....	16
Differenzierung und Eigenschaften von T _H 9-Zellen.....	18
Die kosignalisierenden Rezeptoren CD96, TIGIT und CD226 bilden ein immunregulatorisches Netzwerk.....	20
Der kostimulierende Rezeptor CD226.....	20
Der koinhibitorische Rezeptor TIGIT.....	21
CD96 - auch ein koinhibitorischer Rezeptor?.....	23
Das klinische Bild chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED).....	24
Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	25
T _H 9-Zellen/ IL-9 produzierende T-Zellen in der Pathogenese von CED.....	28
Die Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	30
Einflüsse des Alters auf die Immunfunktion- die Rolle der Immunoseneszenz.....	31
Der Einfluss des Geschlechts auf die Immunfunktion.....	34
Fragestellung.....	36
Material und Methoden.....	37
Material.....	37
Antikörper.....	37
Chemikalien und Reagenzien.....	37
Puffer und Medien.....	39
Software.....	39
Verbrauchsmaterialien.....	39
Versuchskit.....	40
Methoden.....	40
Blutentnahme.....	40
Zellkultur.....	43

PBMC-Isolation	43
Bestimmung der Zellzahl	43
PBMZ-Stimulation	44
Durchflusszytometrie	44
Prinzip der Durchflusszytometrie	44
Live/Dead-Färbung und Fc-Rezeptorblock	45
Oberflächenfärbung	45
Intrazelluläre Färbung	45
Messung und Auswertung.....	46
Statistik.....	47
Ergebnisse	47
Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Korezeptoren CD226, TIGIT und CD96	48
Altersabhängige Änderungen der Rezeptorexpression bei gesunden Probanden	49
Einfluss von in-vitro-Stimuli auf die Expression von CD226, TIGIT und CD96	50
Unterschiede in der differenzierungsabhängigen CD96-Expression zwischen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	52
Koexpression von CD96 und dem koinhibitorischen Rezeptor PD-1	53
T-Zell-Subpopulation mit besonders hoher CD226-Expression	54
Funktionelle Auswirkung einer hohen CD226-Expression auf humanen T-Zellen	56
Einfluss von Alter und Geschlecht auf die CD226 ^{hoch} T-Zell-Population.....	58
Unterschiede in der CD226-, TIGIT- und CD96-Expression zwischen gesunden Probanden und CED-Patienten	59
Einfluss verschiedener Therapiestrategien auf IL-9-Produktion und CD226-, CD96- und TIGIT-Expression	62
Diskussion	66
Relevanz für die Immunoseneszenz und Immunocheckpointtherapie	66
Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression kosignalisierender Rezeptoren und deren Einfluss auf die Wirksamkeit von Immuncheckpointinhibitoren	67
Stimulations- und differenzierungsabhängige Effekte auf die Expression der kosignalisierenden Rezeptoren	68
Bedeutung der CD96-Expression und IL-9-Produktion für chronisch entzündliche Darmerkrankungen	70
Limitationen	74
Ausblick und Schlussfolgerung	75
Literaturverzeichnis.....	76
Eidesstattliche Versicherung	90
Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	91

Lebenslauf	92
Danksagung	94
Bescheinigung eines akkreditierten Statistikers	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die kosignalisierenden Rezeptoren CD28, CTLA4 und PD-1	16
Abbildung 2 Übersicht relevanter Zytokine und Transkriptionsfaktoren für die T _H 9-Differenzierung und IL-9-Produktion	19
Abbildung 3 Kostimulatorische Rezeptoren und ihre Liganden	20
Abbildung 4 Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	26
Abbildung 5 Die Hauptcharakteristika der Immunoseneszenz	34
Abbildung 6 Hierarchisches Vorgating	46
Abbildung 7 Beispielhafte Oberflächenfärbung für CD226, TIGIT und CD96 sowie FMO für CD96 auf unstimulierten CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	48
Abbildung 8 Vergleich der CD226-, CD96- und TIGIT- Expression auf unstimulierten CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	49
Abbildung 9 Vergleich der CD226, TIGIT und CD96 Expression auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen zwischen Männern und Frauen	50
Abbildung 10 Vergleich der CD226, TIGIT und CD96 Expression auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	51
Abbildung 11 Hierarchische Ordnung der T-Zell-Subpopulationen	52
Abbildung 12 CD96-Expression auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ naiven T-Zellen (T _{Naive}), zentralen Gedächtniszellen (T _{CM}), Effektor-Gedächtniszellen (T _{EM}) und Effektor- T-Zellen (T _{EMRA})	53
Abbildung 13 Darstellung der PD-1 Expression auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen, die CD96-positiv oder negativ sind	54
Abbildung 14 Contour Plots der Oberflächenfärbung für CD226, TIGIT und CD96 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	55
Abbildung 15 Frequenz der CD226 ^{hoch} T-Zellen unter CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.	55
Abbildung 16 Anteil der CD226 ^{hoch} T-Zellen mit und ohne CD96-Koexpression unter CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	56
Abbildung 17 IFN γ , IL-4 und IL-9-Produktion durch CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	57
Abbildung 18 Vergleich der IL-9-Produktion durch CD4 ⁺ T-Zellen mit unterschiedlicher CD226 und CD96-Expression	58
Abbildung 19 Vergleich der Frequenz CD226 ^{hoch} -exprimierender T-Zellen unter CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen von 54 gesunden Probanden unterschiedlichen Geschlechts und Alters	59
Abbildung 20 Vergleich der CD96-Expression und IL-9-Produktion durch CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen von CED-Patienten und gesunden Probanden	60
Abbildung 21 Vergleich der CD96-Expression auf CD8 ⁺ T-Zellen von CED-Patienten und gesunden Patienten	61
Abbildung 22 Vergleich der CD226, CD226 ^{hoch} und der TIGIT-Expression auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen von CED-Patienten und gesunden Probanden	62
Abbildung 23 Vergleich der IL-9-Produktion und Frequenz der CD226 ^{hoch} T-Zellen zwischen CED-Patienten mit unterschiedlichen Therapien	64
Abbildung 24 Vergleich der CD96 ⁺ T-Zellen zwischen CED-Patienten mit unterschiedlichen Therapien.	65
Abbildung 25 Vergleich der CD96 ⁺ T-Zellen zwischen CED-Patienten mit unterschiedlichen Therapien	65
Abbildung 27 Darstellung relevanter Zytokine und Transkriptionsfaktoren für die TH9-Differenzierung und IL-9-Produktion	72
Abbildung 28 Darstellung relevanter Zytokine und Transkriptionsfaktoren für die TH9-Differenzierung und IL-9-Produktion	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ausschnitthafte Übersicht über Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie nach (Chen and Flies, 2013)	13
Tabelle 2 Ausschnitthafte Übersicht über die Immunglobulin-Superfamilie nach (Chen and Flies, 2013)	14
Tabelle 3 Antikörper	37
Tabelle 4 Chemikalien und Reagenzien	37
Tabelle 5 Geräte	38
Tabelle 6 Puffer und Medien	39
Tabelle 7 Software	39
Tabelle 8 Verbrauchsmaterialien	39
Tabelle 9 Versuchskit	40
Tabelle 10 Gesunde Probanden	41
Tabelle 11 Überblick Altersverteilung und Verteilung des biologischen Geschlechts	41
Tabelle 12 CED-Patienten – Überblick Behandlungsgruppen	41
Tabelle 13 Colitis ulcerosa Patienten	42
Tabelle 14 Morbus Crohn Patienten.....	42
Tabelle 15 Laserkonfiguration des Cytoflex S	46

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigen präsentierende Zelle
BATF	Basic Leucin Zipper ATF-like transcription factor
BTLA	B and T Lymphocyte Associated
CD	Cluster of differentiation
CEACAM 1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CMV	Zytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte associated Protein 4
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated 9
CRTAM	Cytotoxic and Regulatory T Cell Molecule
CU	Colitis ulcerosa
DMARDs	Disease modifying antirheumatic drugs
DNBS	Dinitrobezolsulfonsäure
DR3	Death receptor 3
DSS	Dextran Sodium Sulfat
DZ	Dendritische Zelle
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAS/FASL	FS-7-associated surface antigen (ligand)
FMO	Fluorescence minus one
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	Forward scatter
GATA3	GATA binding protein 3, GATA = spezifische DNA-Sequenz
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related Protein

GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein 1
HSV1gD	Herpes simplex virus 1 glycoprotein D
HVEM	Herpesvirus entry mediator
ICOS	inducible costimulator
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand
IRF4	Interferon regulatory factor 4
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
ITSM	Immunoreceptor tyrosine-based switch motif
KO	Knockout
LCL	Lymphoblastoid cell line
LIGHT	homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding HVEM, a receptor expressed on T lymphocytes
LT	Lymphotoxin
LT β R	Lymphotoxin beta receptor
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue
MC	Morbus Crohn
MHC	Major histocompatibility complex
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PBMZ	Periphere Blutmonozyten
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD-1/PD-L1/-2	Programmed cell death protein 1
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	Pattern recognition receptor
PtdSer	Phosphatidylserin
PU.1	PU box binding protein 1, PU box = purinreiche DNA-Sequenz
RAG	Rekombination-aktivierendes Gen
RANK/RANKL	Receptor activator of NF κ B (Ligand),
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
miRNA	microRNA
mRNA	messengerRNA
SASP	Sencecence-associated secretory phenotype
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SEM	Standard error of mean, Standardabweichung
SEMA4A	Semaphorin 4A
SSC	Side scatter
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TACTILE	T cell-activated increased late expression
Tbet	T-box expressed in T cells, T-box = DNA-Bindungsdomäne
T _{CM}	Central memory T cell, zentrale Gedächtniszelle
T _{EM}	Effector memory T cell, Effektor-Gedächtniszelle
T _{EMRA}	Effector memory T cell re-expressing CD45RA, terminal differenzierte T-Zellen
TF	Transkriptionsfaktor

TGFβ	Transforming growth factor beta, Transformierender Wachstumsfaktor
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIL	Tumor-infiltrierende T-Zellen
TIM-3	T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TL1A	TNF-like ligand 1A
T _N	Naive T-Zellen
TNBS	Trinitrobezolsulfonsäure
TNF/TNFR	Tumornekrosefaktor/ Tumornekrosefaktor-Rezeptor
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
WT	Wildtyp

Abstract

Deutsch

Kosignalisierende Rezeptoren beeinflussen entscheidend die T-Zell-Funktion. Der kostimulatorische Rezeptor CD226, der koinhibitorische Rezeptor TIGIT sowie der noch nicht eindeutig definierte Rezeptor CD96 binden den Liganden CD155 und formen somit ein Signalnetzwerk, das eine wichtige Rolle im Rahmen T-Zell-vermittelter Tumorkontrolle sowie immunvermittelter Erkrankungen spielt. Damit stellen diese drei Rezeptoren potenzielle therapeutische Zielstrukturen dar, deren Expression und Funktion in verschiedenen Kontexten wie dem Alterungsprozess, geschlechtsbedingten Einflüssen sowie Erkrankungen untersucht werden müssen, um deren Eignung als therapeutische Angriffspunkte für verschiedene Patientengruppen einschätzen zu können. Im Mausmodell wurde ein inhibitorischer Einfluss des Rezeptors CD96 auf die Interleukin-9-Produktion (IL-9), ein zentrales Zytokin in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED), durch T-Zellen festgestellt.

Daher habe ich im Rahmen dieser Arbeit 54 gesunde Probanden verschiedenen Alters und Geschlechts sowie 26 CED-Patienten bezüglich ihrer CD226-, TIGIT- und CD96-Expression und IL-9-Produktion durch T-Zellen aus dem peripheren Blut durchflusszytometrisch untersucht.

Ich konnte nachweisen, dass die Expression von TIGIT auf CD8⁺ T-Zellen altersabhängig steigt. Bei Frauen ist der Rezeptor CD226 hingegen verstärkt exprimiert, während die Expression von CD96 auf CD8⁺ T-Zellen verringert ist. Meine Daten zeigen zudem einen entscheidenden Einfluss des Stimulationsprotokolls auf die Expression von CD226, TIGIT und CD96 auf T-Zellen. Auch während des Differenzierungsprozesses einer naiven T-Zelle zu Gedächtniszellen und Effektor-T-Zellen verändert sich die Expression von CD96. Ich belege die Herausbildung einer T-Zell-Population mit besonders hoher CD226-Expression nach ConA-Stimulation, die die Hauptquelle der IL-9-Produktion durch T-Zellen zu sein scheint. Jedoch konnte ich keinen Unterschied in der IL-9-Produktion durch periphere T-Zellen oder in der Frequenz von CD226^{hoch} T-Zellen zwischen gesunden Probanden und CED-Patienten feststellen. Meine Daten zeigen jedoch, dass die Behandlung von CED-Patienten mit klassischen Immunsuppressiva, Prednisolon und Anti-TNF α -Therapien die IL-9-Produktion durch periphere T-Zellen senkt. Ebenso konnte ich nachweisen, dass die CD96-Expression auf CD8⁺ T-Zellen von CED-Patienten verringert ist.

Der altersabhängige Anstieg der TIGIT-Expression weist auf die T-Zell-Erschöpfung als Charakteristikum der Immunoseneszenz hin. Die hier aufgeführten Unterschiede können in der Expression von CD226 und CD96 zwischen den Geschlechtern zur gesteigerten adaptiven Immunantwort von Frauen beitragen. Die verringerte CD96-Expression auf CD8⁺ T-Zellen von CED-Patienten weist auf eine gesteigerte Zytotoxizität dieser Zellen hin. Ebenso scheint eine hohe CD226-Expression essenziell für

die IL-9-Produktion zu sein. Somit können sowohl CD226 als auch CD96 die Pathogenese von CED begünstigen.

English

Cosignalling receptors have a great influence on T cell function. The costimulatory receptor CD226, the coinhibitory receptor TIGIT and the receptor CD96, whose function is not yet determined, bind the same ligand CD155 and form a signalling network, that plays a crucial role in T cell mediated anti tumor responses as well as immune mediated diseases. Hence, those three receptors are potential therapeutic targets and as such their expression patterns and function in the context of aging, sex differences and diseases must be investigated to assess their suitability as therapeutic starting points for different patient groups. In mice an inhibitory influence of CD96 on IL-9 production by T cells, a crucial cytokine for the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD), has been described.

Therefore, I studied the expression of CD226, TIGIT and CD96 on T cells and the IL-9 production by T cells derived from peripheral blood of 54 healthy patients of different age and gender and 26 IBD patients using flow cytometry.

I proved that TIGIT expression increases on CD8⁺ T cells with age. CD226 on the other hand is expressed higher and CD96 is expressed lower on T cells of women compared to men. My data also shows that the selection of a stimulation protocol highly influences the expression of CD226, TIGIT and CD96. During differentiation of naïve T cells to memory T cells and effector T cells the expression of CD96 also changes. I demonstrate that a CD226 high expressing subpopulation of T cells emerges following ConA stimulation. This subpopulation seems to be the main source for IL-9 production by T cells. I could not detect a difference in the frequency of peripheral IL-9 producing T cells or CD226^{high} T cells between healthy donors and IBD patients, though. But treatment with classic immunosuppressive drugs, prednisolone and anti TNF α antibodies decreased IL-9 production by peripheral T cells. I also proved a decreased CD96 expression on CD8⁺ T cells from IBD patients.

The increase of TIGIT expression with age points to T cell exhaustion as a characteristic of immunosenescence. The gender dependent difference in CD226 and CD96 expression can contribute to an enhanced adaptive immune response in women. The decreased CD96 expression on CD8⁺ T cells of IBD patients could lead to increased cytotoxicity. Also, a high CD226 expression could be essential for IL-9 production. Hence, CD226 as well as CD96 might promote the pathogenesis of IBD.

Einführung

Man unterscheidet zwei Arme des Immunsystems: die angeborene Immunantwort und die adaptive, erworbene Immunantwort. Das angeborene Immunsystem umfasst Komponenten und Mechanismen, die bereits im Genom codiert sind und daher vererbt werden. Die angeborene Immunantwort erkennt über bestimmte Rezeptoren wie die Pattern-recognition-Rezeptoren (PRR) Pathogene anhand von phylogenetisch alten molekularen Strukturen, die von vielen Pathogenen exprimiert werden (Turvey and Broide, 2010). Das adaptive Immunsystem hingegen basiert auf Genelementen, die durch Gensegmentrekombination und im Falle der B-Zellen auch durch somatische Hypermutation neu rekombiniert werden, wodurch eine große Vielfalt an antigenspezifischen Rezeptoren geschaffen wird. Dies ermöglicht der adaptiven Immunantwort die hochspezifische Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen. Immunzellen des angeborenen Immunsystems reagieren schnell, wenn auch unspezifisch auf Pathogene. Bei Aktivierung adaptiver Immunzellen kommt es bei erstmaligem Antigenkontakt zunächst zur klonalen Expansion, wodurch die adaptive Immunantwort verzögert eintritt. Nach einer solchen Immunantwort bilden sich jedoch Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit demselben Pathogen schneller reagieren können (Marshall et al., 2018, Chaplin, 2010).

T-Zellen als Komponenten des adaptiven Immunsystems

T- und B-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort. Vorläufer der T-Lymphozyten reifen im Thymus heran (Marshall et al., 2018). Während ihrer Reifung im Thymus differenzieren sich die T-Zellen entweder zu CD4⁺ oder zu CD8⁺ T-Lymphozyten. Durch den Chemokinrezeptor CCR7 wandern T-Zellen in sekundär lymphatisches Gewebe wie Milz, Lymphknoten oder Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT), wo es zur Antigenpräsentation durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen oder Makrophagen kommt (Förster et al., 2008). Die Aktivierung durch Antigenkontakt führt zur klonalen Expansion und Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektor-T-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen. CD8⁺ T-Zellen induzieren über die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor auf der Zielzelle sowie über spezifische Proteasen (Granzyme) und zytolytische Proteine (Perforin) den Zelltod von beispielsweise virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen (Marshall et al., 2018). CD4⁺ T-Helferzellen beeinflussen durch Zytokinproduktion die Aktivität anderer Immunzellen und können aufgrund ihres Zytokinprofils in verschiedene Untergruppen mit verschiedenen Funktionen eingeteilt werden (Marshall et al., 2018). Nach Wegfall des Antigen-Stimulus kommt es zur klonalen Kontraktion der T-Zellen. Einige der T-Zellen bleiben jedoch erhalten und entwickeln sich zu langlebigen Gedächtniszellen. Man unterscheidet mehrere Gruppen an T-Gedächtniszellen. Die zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}) exprimieren wie naive

T-Zellen den Chemokinrezeptor CCR7 und sind primär in peripher lymphatischen Geweben vorzufinden. Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) wandern mit den von ihnen exprimierten Adhäsionsmolekülen schnell in entzündetes Gewebe ein und können sich schneller zu Effektor-T-Zellen differenzieren als zentrale Gedächtniszellen. Darüber hinaus wurden geweberesidente T-Gedächtniszellen beschrieben, die sich dauerhaft im peripheren Gewebe befinden (Farber et al., 2014). Neben den konventionellen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen gibt es T-Zellen, die sich im Thymus aus potenziell autoreaktiven T-Zellen entwickeln: die regulatorischen T-Zellen (T_{regs}), deren Funktion es ist, T-Zell-vermittelte Immunantworten zu dämpfen. Sie sind u.a. durch die Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors CD25 gekennzeichnet, der von anderen T-Zellen erst nach vollständiger Aktivierung und Differenzierung exprimiert wird (Chaplin, 2010, Mueller et al., 2013, Pennock et al., 2013).

T-Zellaktivierung

T-Zellen können über ihren T-Zell-Rezeptor spezifische Peptidfragmente, die ihnen von anderen Zellen über sogenannte MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) präsentiert werden, binden. Dieses Phänomen wird als MHC-Restriktion bezeichnet (Chaplin, 2010, Zinkernagel and Doherty, 1997). Es wird zwischen MHC-I- und MHC-II-Molekülen unterschieden. MHC-I-Moleküle werden sowohl von Immun- als auch Nicht-Immunzellen exprimiert. Über die MHC-I-Moleküle werden Peptidfragmente von intrazellulären Proteinen aus dem Zytoplasma präsentiert. $CD8^+$ T-Zellen können mit ihrem T-Zell-Rezeptor und dem Korezeptor CD8 an das MHC-I-Molekül binden (Chaplin, 2010, Marshall et al., 2018). MHC-II-Moleküle hingegen werden vor allem von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) wie dendritischen Zellen (DZ) oder Makrophagen exprimiert. Ihre Expression kann jedoch auch auf Nicht-Immunzellen induziert werden. APZs internalisieren extrazelluläre Proteine, u.a. auch Antigene von extrazellulären Pathogenen, und prozessieren diese zu Peptidfragmenten, die über die MHC-II-Moleküle präsentiert werden können. $CD4^+$ T-Zellen erkennen mit ihrem T-Zell-Rezeptor und ihrem Korezeptor CD4 die Antigen-MHC-II-Komplexe (Chaplin, 2010, Marshall et al., 2018). Zur Aktivierung von T-Zellen wird ein von kosignalisierenden Molekülen vermitteltes zusätzliches Signal benötigt (Lafferty et al., 1980).

Kosignalisierende Moleküle

Nach Bindung des T-Zell-Rezeptors an einen Antigen-MHC-Komplex organisieren sich kosignalisierende Moleküle und deren Liganden räumlich um den T-Zell-Rezeptor und den Antigen-MHC-Komplex und bilden eine Kommunikationsplattform mit der Antigen-präsentierenden Zelle, die immunologische Synapse (Chen and Flies, 2013). Durch die Interaktion mit ihren Liganden regulieren die kosignalisierenden Rezeptoren die T-Zell-Aktivierung. Die kostimulierenden und koinhibitorischen

Signale der kosignalisierenden Rezeptoren werden in der T-Zelle integriert und entscheiden über die Aktivierung der T-Zelle. Die Expression kosignalisierender Moleküle verändert sich laufend umweltabhängig während Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der T-Zelle (Chen and Flies, 2013). So werden zur vollständigen Aktivierung einer T-Zelle viele kostimulierende Rezeptoren exprimiert, die nach T-Zell-Rezeptorbindung an einen Peptid-MHC-Komplex die Ausbildung von T-Zell-Effektorfunktionen unterstützen. Nach Aktivierung der T-Zelle nimmt die Expression koinhibitorischer Rezeptoren allmählich zu. Dies verhindert eine überschießende T-Zell-Antwort und führt letztendlich zur Terminierung der T-Zell-Aktivierung (Chen and Flies, 2013). Bleibt ein kostimulierendes Signal nach T-Zell-Rezeptor-Aktivierung aus, verfällt eine naive T-Zelle in einen hyporesponsiven Zustand, der verhindert, dass die T-Zelle bei erneutem Kontakt mit diesem Antigen aktiviert wird (Mueller et al., 1989, Schwartz et al., 1989, Zhu et al., 2011). Effektor-T-Zellen hingegen benötigen kein kostimulierendes Signal für ihre Aktivierung (Chen and Flies, 2013).

Kosignalisierende Moleküle sind eine heterogene Gruppe an kostimulierenden und koinhibitorischen Rezeptoren aus der Immunglobulin-Superfamilie und der TNF/TNFR- Familie (tumor necrosis factor/ tumor necrosis factor receptor) (Chen and Flies, 2013).

Typisch für die TNF-Rezeptor-Superfamilie sind eine oder mehrere Cystein-reiche Domänen im extrazellulären Anteil des Rezeptors. Bei Kontakt mit einem Liganden trimerisieren die Rezeptoren und binden intrazellulär den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor (TRAF). Über diesen werden verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert wie der PI3-Kinase-Weg, der MAPK-Signalweg oder der Signalweg des Transkriptionsfaktors NFκB (So and Ishii, 2019).

Tabelle 1 Ausschnitthafte Übersicht über Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie nach (Chen and Flies, 2013, So and Ishii, 2019, Dostert et al., 2019)

GITR= Glucocorticoid-induced TNFR-related Protein, HVEM= Herpesvirus entry mediator, LIGHT= homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding HVEM, a receptor expressed on T lymphocytes, BTLA= B and T Lymphocyte Associated, LT α3= Lymphotoxin, HSV1gD= Herpes simplex virus 1 glycoprotein D, DR3= Death receptor 3, TL1A= TNF-like ligand 1A, RANK/RANKL= Receptor activator of NFκB (Ligand), LTβR= Lymphotoxin beta receptor, FAS/FASL= FS-7-associated surface antigen (ligand), TNF/TNFR= Tumornekrosefaktor/ Tumornekrosefaktor-Rezeptor

Molekülname	Ko-Signal	Ligand
OX40	Kostimulierend	OX40L
CD27	Kostimulierend	CD70
GITR	Kostimulierend	GITRL
CD30	Kostimulierend	CD30L
4-1BB	Kostimulierend	4-1BBL

HVEM	Kostimulierend	LIGHT, BTLA, CD160, LT α 3, HSV1gD
DR3	Kostimulierend	TL1A
CD40	Kostimulierend	CD40L
RANK	Osteoklastenaktivierung	RANKL
LT β R	Kostimulierend	LT α 1 β 2, LIGHT
FAS	Apoptose	FASL
TNFR1	Apoptose/Zellüberleben	TNF α , LT α
TNFR2	Apoptose/Zellüberleben	TNF α , LT α

Die Immunglobulin-Superfamilie hingegen ist charakterisiert durch einen Immunglobulin-ähnlichen Aufbau und lässt sich in mehrere Subfamilien einteilen (Tabelle 2) (Chen and Flies, 2013).

Tabelle 2 Ausschnitthafte Übersicht über die Immunglobulin-Superfamilie nach (Chen and Flies, 2013, Zhao et al., 2021, Su et al., 2008)

ICOS= inducible costimulator, PD-1= Programmed cell death protein 1, CTLA-4= Cytotoxic T-lymphocyte associated Protein 4, BTLA= B and T Lymphocyte Associated, TIGIT= T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains, CRTAM= Cytotoxic and Regulatory T Cell Molecule, HVEM= Herpesvirus entry mediator, TIM= T cell immunoglobulin and mucin domain, PtdSer= Phosphatidylserin, SEMA4A= Semaphorin 4A, CEACAM 1= Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, HMGB1= High-Mobility-Group-Protein 1

Subfamilie	Molekülname	Ko-Signal	Ligand
B7-CD28	CD28	kostimulierend	B7.1, B7.2, B7-H2
	ICOS (CD278)	kostimulierend	B7-H2
	PD-1	koinhibitorisch	B7-H1, B7-DC
	CTLA-4	koinhibitorisch	B7.1, B7.2, B7-H2
	BTLA	koinhibitorisch	HVEM, UL44
	B7.1 (CD80)	koinhibitorisch	B7-H1, CD28, CTLA-4
	B7-H1 (CD274, PD-L1)	koinhibitorisch	PD-1, B7.1
CD226	CD226	kostimulierend	CD112, CD155
	TIGIT	koinhibitorisch	CD112, CD155
	CD96	unklar	CD111 (murin), CD155

	CRTAM	kostimulierend	NECL2
TIM	TIM1	kostimulierend	TIM1, TIM4, PtdSer
	TIM2	koinhibitorisch	SEMA4A, H-Ferritin
	TIM3	koinhibitorisch	Galectin-9, PtdSer, CEACAM1, HMGB1
	TIM4	unklar	TIM1, PtdSer

CD28 und CTLA-4 (CD152), Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und der B7-CD28-Subfamilie, sind zwei sehr gut untersuchte kosignalisierende Moleküle. Sie binden an zwei verschiedene Liganden, CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), auf APZs (Azuma et al., 1993, Linsley et al., 1990). Der Ligand CD86 wird auch auf ruhenden Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert und die Expression wird bei Aktivierung der APZ hochreguliert. Die CD80-Expression hingegen wird erst mit Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zelle induziert (Sansom et al., 2003). CD28 vermittelt wichtige aktivierende Signale, die das Überleben und die Proliferation der T-Zelle unterstützen (Appleman et al., 2000, Boise et al., 1995, Sperling et al., 1996). Darüber hinaus fördert die Aktivierung des CD28-Signalweges die Zytokinproduktion durch T-Zellen (zusammengefasst in (Chen and Flies, 2013, Keir and Sharpe, 2005)).

Der inhibitorische Rezeptor CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) bindet wie CD28 an die Liganden CD80 und CD86, jedoch mit einer höheren Affinität (Azuma et al., 1993, Hathcock et al., 1993, Linsley et al., 1991). Dadurch wird die Bindung von CD28 an seine Liganden und die Vermittlung dessen koaktivierender Signale verhindert. Primär ist CTLA-4 intrazellulär lokalisiert. Mit Aktivierung der T-Zelle wird die Oberflächen-Expression von CTLA-4 induziert. Tatsächlich wird die Funktion von CTLA-4 überwiegend über das Ausmaß der Oberflächenexpression reguliert (Rudd et al., 2009, Schneider and Rudd, 2014). Welche bedeutende Rolle der koinhibitorische Rezeptor CTLA-4 in der Regulation der T-Zell-Antwort hat wird deutlich an CTLA-4 defizienten Mäusen. Diese zeigten eine starke Lymphoproliferation und Gewebsschädigung durch T-Zellen, was zum frühzeitigen Versterben dieser Tiere führte (Tivol et al., 1995, Waterhouse et al., 1995, Chen and Flies, 2013, Keir and Sharpe, 2005).

PD-1 (programmed cell death, CD279) ist ein weiteres gut untersuchtes Beispiel für einen koinhibitorischen Rezeptor. Der Rezeptor gehört wie CD28 und CTLA-4 zur B7-CD28-Proteinfamilie und damit zur Immunglobulin-Superfamilie. PD-1 wurde zuerst als ein Rezeptor beschrieben, der auf apoptotischen Zellen exprimiert wird, daher der Name programmed cell death (Ishida et al., 1992). Die Expression von PD-1 wird infolge von T-Zell-Rezeptor-Stimulation induziert. Für PD-1 sind zwei Liganden identifiziert worden: PD-L1 (B7-H1, CD274) und PD-L2 (B7-DC, CD273) (Freeman et al., 2000, Latchman et al., 2001). PD-L1 wird konstitutiv auf einer Vielzahl an Zelltypen, wie Epithelzellen aber

auch Leukozyten, exprimiert. Unter Einfluss des Zytokins IFN γ wird die Expression sogar noch hochreguliert. PD-L2 hingegen wird vor allem von nicht aktivierten tolerogenen Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert (Yamazaki et al., 2002). PD-1 verfügt über zwei zytoplasmatische Sequenzmotive, die charakteristisch für inhibitorische Rezeptoren sind: ITIM (immunoreceptor tyrosine based inhibition motif) und ITSM (immunoreceptor tyrosine based inhibition motif) (Nishimura and Honjo, 2001, Shlapatska et al., 2001). Die Bindung von PD-1 an seine Liganden resultiert in einer Hemmung der T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion (Freeman et al., 2000, Latchman et al., 2001). Die Neigung von PD1-defizienten Mäusen zu Autoimmunreaktionen weisen auf eine wichtige Rolle des koinhibitorischen Moleküls in der Abschwächung der T-Zell-vermittelten Immunantwort hin (zusammengefasst in (Chikuma, 2016, Keir and Sharpe, 2005)).

Koinhibitorische Moleküle wie CTLA-4 und PD-1 stellen wichtige Immuncheckpoints für die Regulation von T-Zell-Antworten dar. In ihrer Abwesenheit kommt es zur massiven T-Zell-Proliferation und gewebeschädigenden T-Zell-Antworten (Waterhouse et al., 1995, Gough et al., 2005, Nishimura et al., 1999). Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass chronisch stimulierte T-Zellen, z.B. im Falle chronischer Virusinfektionen oder bei Tumorerkrankungen, vermehrt inhibitorische Rezeptoren wie

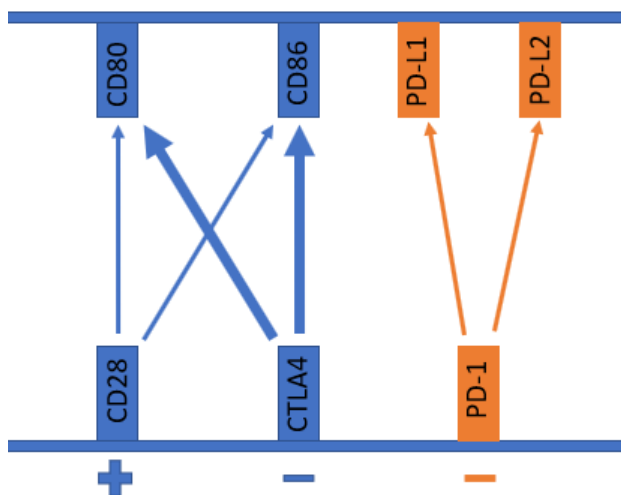


Abbildung 1 Die kosignalisierenden Rezeptoren CD28, CTLA4 und PD-1. CD28 und CTLA4 binden die Liganden CD80 und CD86, wobei CTLA4 eine höhere Bindungsaffinität (dargestellt durch die Stärke der Pfeile) zu den Liganden als CD28 aufweist. PD-1 bindet die Liganden PD-L1 und PD-L2. Die Plusymbole weisen auf einen kostimulierenden, die Minusymbole auf einen koinhibitorischen Charakter hin.

CTLA-4 und PD-1 exprimieren und gestörte T-Zell-Effektorfunktionen aufweisen. Dieser Zustand wird als T-Zell-Erschöpfung bezeichnet und ist reversibel (Wherry, 2011). Diese Tatsache spielt vor allem in Tumorpatienten eine wichtige klinische Rolle, da hier medikamentös der Einfluss inhibitorischer Signalwege auf die T-Zellen moduliert werden kann (zusammengefasst in (Seidel et al., 2018, Wherry and Kurachi, 2015). Koinhibitorische Moleküle werden ebenfalls bevorzugt auf regulatorischen T-Zellen exprimiert.

Differenzierung in verschiedene T-Helferzell-Untergruppen

Nach Aktivierung durch T-Zell-Rezeptor-Stimulation und kostimulierende Signale differenzieren sich naive CD4⁺ T-Zellen abhängig von dem Zytokinmilieu, in dem sie sich befinden, in Effektor-T-Zellen und

Gedächtnis-T-Zellen mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften. 1989 beschrieben Mosmann und Coffman als erste an murinen CD4⁺ T-Zellen zwei distinkte Subpopulationen, genannt T_H1 und T_H2, die sich durch die von ihnen produzierten Zytokine unterscheiden (Mosmann and Coffman, 1989). Diese Beobachtung konnte auch beim Menschen bestätigt werden. Durch Zytokine in der T-Zell-Umgebung werden bestimmte Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie aktiviert, die wiederum Subgruppen-spezifische Transkriptionsfaktoren induzieren. So können die verschiedenen T-Zell-Subgruppen durch Produktion ihrer Zytokine die Polarisierung weiterer T-Helferzellen beeinflussen (Zhu and Paul, 2010).

T_H1-Zellen sind vornehmlich durch die Produktion des Zytokins Interferon gamma (IFN γ), aber auch Interleukin-2 (IL-2) und TNF charakterisiert. Unter dem Einfluss von IFN γ und IL-12 werden die Transkriptionsfaktoren (TF) STAT1 und STAT4 aktiviert, die die verstärkte Expression des T_H1-charakteristischen Transkriptionsfaktors Tbet initiieren. T_H1-Zellen dienen der Eliminierung intrazellulärer Pathogene wie Viren oder intrazellulärer Bakterien, die in Makrophagen überleben können. Die T_H1-Antwort verstärkt die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen und induziert die Produktion der Komplement-bindenden IgG-Subklassen IgG1 und IgG3. T_H2-Zellen hingegen produzieren vor allem IL-4, IL-5 und IL-13, jedoch kein IFN γ . IL-4 aktiviert in CD4⁺ T-Zellen den Transkriptionsfaktor STAT6, der wiederum den für T_H2-Zellen typischen Transkriptionsfaktor GATA3 induziert. Die T_H2-Immunantwort bekämpft durch die Aktivierung und Unterstützung Eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in erster Linie extrazelluläre Parasiten. T_H2-Zytokine unterstützen ebenfalls die IgE-Produktion durch B-Zellen. 1989 postulierten Mosmann und Coffman das T_H1/T_H2-Paradigma. Mit der Zeit sind jedoch weitere T-Helferzell-Subgruppen identifiziert worden. T_H17-Zellen wurden 2003 erstbeschrieben und sekretieren überwiegend IL-17A und IL-17F, aber auch IL-22 und IL-21. Ihre Differenzierung wird durch TGF β , IL-6 und IL-23 bestimmt. Durch diese Zytokine wird STAT3 aktiviert und dadurch die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ T induziert. T_H17-Zellen bekämpfen extrazelluläre Bakterien und Pilze, u.a. durch die Aktivierung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und die Induktion der IgG-Produktion durch B-Zellen. Außerdem aktivieren T_H17-Zellen die Sekretion antimikrobieller Peptide durch Epithelzellen. (zusammengefasst in (Pennock et al., 2013, Zhu et al., 2010)).

Neben den bereits genannten T-Helferzell-Untergruppen existieren weitere distinkte Gruppen an CD4⁺ T-Zellen, unter anderem eine Subpopulation, die vornehmlich durch die Produktion von IL-9 charakterisiert ist.

Differenzierung und Eigenschaften von T_H9-Zellen

Das Zytokin IL-9 wurde erstmals 1988 von Uyttenhove et al. als T-Zell-Wachstumsfaktor (TCGF) P40, das von murinen T-Zellen produziert wird, beschrieben (Uyttenhove et al., 1988). Kurz darauf wurden von zwei anderen Arbeitsgruppen zwei weitere Faktoren in murinen T-Zellen, bezeichnet als TCGF III und MEA (mast cell growth enhancing factor), entdeckt, die, wie sich herausstellte, identisch mit dem Faktor P40 waren (Schmitt et al., 1989). Schließlich wurde das humane Homolog von P40 identifiziert und Interleukin-9 genannt (Yang et al., 1989). Interleukin-9 wurde lange für ein T_H2-Zytokin gehalten. Jedoch wurde mit der Zeit ersichtlich, dass es distinkte primär IL-9 sekretierende T-Zellen gibt. Diese wurden zuerst in Mäusen identifiziert (Schmitt et al., 1994). 2008 schließlich wurden diese IL-9-produzierenden Zellen als eigene T-Zell-Untergruppe charakterisiert, welche T_H9 genannt wurde (Dardalhon et al., 2008, Veldhoen et al., 2008) (zusammengefasst in (Weigmann and Neurath, 2017)). Wie auch bei anderen T-Zell-Subpopulationen wird die Polarisation von T_H9-Zellen vor allem durch das Zytokinmilieu der Zelle reguliert. Die Differenzierung zu T_H9-Zellen ist hauptsächlich abhängig von IL-2, TGFβ und IL-4 (Schmitt et al., 1994).

IL-4 induziert den Transkriptionsfaktor STAT6, der die Expression der TFs Tbet und FOXP3 unterdrückt und damit eine Differenzierung zur T_H1- oder regulatorischen T-Zelle verhindert. Stattdessen werden die TFs IRF4, GATA3 und BATF aktiviert (Dardalhon et al., 2008, Jabeen et al., 2013, Veldhoen et al., 2008). IRF4 und BATF binden den IL-9-Promotor direkt. Darüber hinaus regulieren beide TFs weitere T_H9 assoziierte Gene und inhibieren die Expression T_H1-assoziierter Transkriptionsfaktoren (Jabeen et al., 2013, Staudt et al., 2010). Die Expression von GATA3 in T_H9-Zellen ist niedriger als in T_H2-Zellen (Veldhoen et al., 2008). Der Transkriptionsfaktor unterdrückt die Aktivierung von FOXP3 und unterstützt damit die T_H9-Polarisation, jedoch in größeren Mengen würde GATA3 die Expression von T_H2 assoziierten Genen aktivieren und PU.1, einen für die T_H9-Differenzierung wichtigen TF blocken (Chang et al., 2009, Chang et al., 2010, Chang et al., 2005, Dardalhon et al., 2008). PU.1 ist der einzige Transkriptionsfaktor, der die IL-9-Produktion auch in anderen T-Zell-Populationen induzieren kann. Er bindet den IL-9-Promotor direkt und ist in der Lage, die Chromatinstruktur durch Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen zu verändern und somit die Transkription zu ermöglichen (Chang et al., 2010).

IL-2 hingegen aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT5, der ebenfalls den IL-9-Promotor direkt binden kann (Kaplan et al., 2015). Außerdem fördert STAT5 die Expression von IRF4 und PU.1 (Chang et al., 2010, Jabeen et al., 2013).

TGFβ ist ein Induktor des Transkriptionsfaktors FOXP3, der durch den von IL-4 aktivierten Transkriptionsfaktor STAT6 wieder herunterreguliert wird. Jedoch unterstützt TGFβ die T_H9-

Differenzierung über SMAD-abhängige Signalwege. SMAD-Proteine sind intrazelluläre Signalproteine, die für die TGFβ-assozierten Signalkaskaden essenziell sind. SMAD 2,3 und 4 verändern die Chromatinstruktur in der IL-9-Promotorregion. Zusätzlich bilden SMAD2 und 3 ein Komplex mit IRF4, welcher den IL-9-Promotor bindet (Tamiya et al., 2013). Doch besonders wichtig ist die Fähigkeit von TGFβ, PU.1 unabhängig von SMAD-Proteinen zu induzieren (Chang et al., 2010) (zusammengefasst in (Kaplan et al., 2015, Kaplan, 2017)).

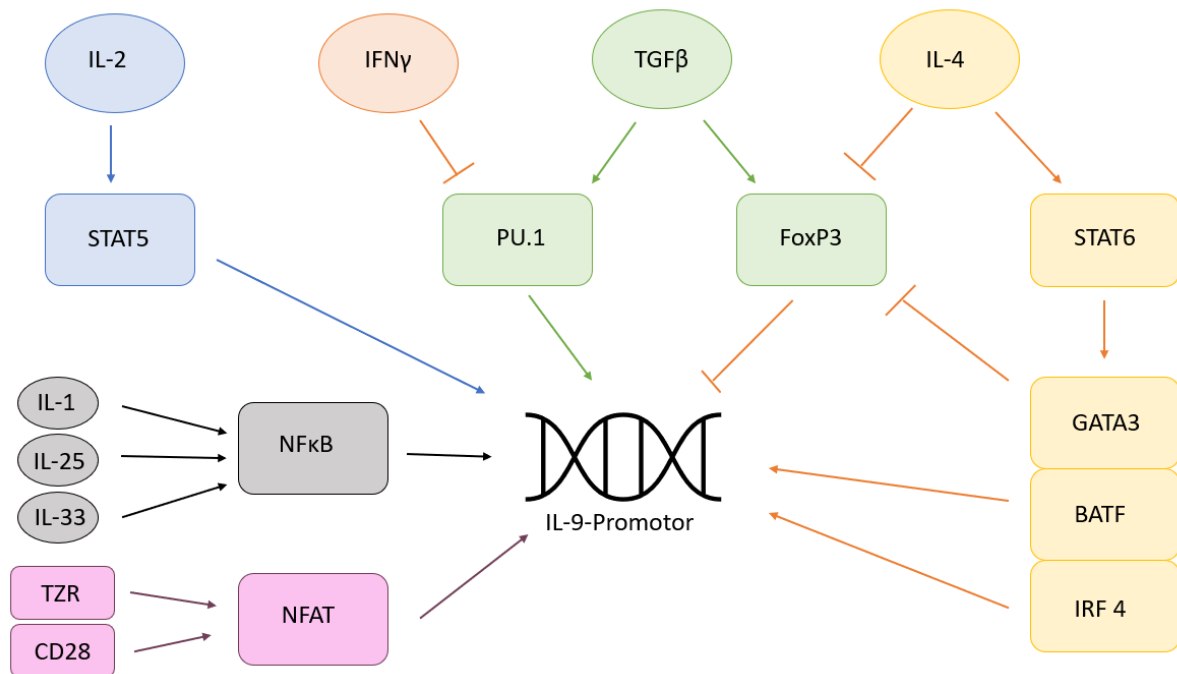


Abbildung 2 Übersicht relevanter Zytokine und Transkriptionsfaktoren für die T_H9 -Differenzierung und IL-9-Produktion nach (Kaplan et al., 2015) IL=Interleukin, IFN γ = Interferon gamma, TGF β = Transforming growth factor beta, STAT= Signal Transducers and Activators of Transcription, PU.1= PU box binding protein 1, FoxP3= Forkhead-Box-Protein 3, GATA3= GATA binding protein 3, BATF= Basic Leucin Zipper ATF-like transcription factor, IRF 4= Interferon regulatory factor 4, NFκB= nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, NFAT= Nuclear factor of activated T cells, TZR= T-Zell-Rezeptor, CD= Cluster of differentiation

T_H9 -Zellen produzieren überwiegend IL-9, aber in geringeren Mengen auch IL-10, IL-3 und IL-21 (Dardalhon et al., 2008, Jabeen et al., 2013, Kaplan et al., 2011, Park et al., 2014). T_H9 -Zellen haben protektive Funktionen in einigen Erkrankungen. Bei bestimmten Wurminfektionen vermitteln T_H9 -Zellen die Immunantwort und die Produktion von IL-9, IL-3 und IL-21 durch T_H9 -Zellen inhibiert Tumorwachstum, z.B. beim Melanom. Auf der anderen Seite haben T_H9 -Zellen auch pathogenetische Eigenschaften. Sie tragen zur Entwicklung von atopischen Erkrankungen, besonders Asthma, bei und fördern die Entzündung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) (zusammengefasst in (Kaplan et al., 2015)).

Die kosignalisierenden Rezeptoren CD96, TIGIT und CD226 bilden ein immunregulatorisches Netzwerk

Diese drei kosignalisierenden Moleküle sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und binden CD155 als Liganden. CD155 (necl-5) gehört zur Gruppe der Nektine und Nektin-ähnlichen Proteine und dient auch als Rezeptor für den Poliovirus. CD155 wird schwach auf verschiedenen Geweben exprimiert. Durch Zellstresssignale verursacht durch DNA-Mutationen oder Aktivierung von Pattern-recognition-Rezeptoren (PRR) wird die CD155-Expression hochreguliert. Daher wird CD155 besonders stark auf gestressten Zellen wie Tumorzellen und virusinfizierten Zellen exprimiert (Gao et al., 2017).

CD226 ist ein kostimulierender Rezeptor, während TIGIT und vermutlich auch CD96 inhibitorische Eigenschaften haben. TIGIT bindet an CD155 mit einer höheren Affinität als CD96 und CD226. CD226 als das aktivierende kosignalisierende Molekül bindet CD155 mit der niedrigsten Affinität (Chan et al., 2014, Yu et al., 2009). Somit bilden CD226, TIGIT und CD96 ein immunregulatorisches Netzwerk vergleichbar mit dem Signalweg der kosignalisierenden Rezeptoren CD28 und CTLA-4.

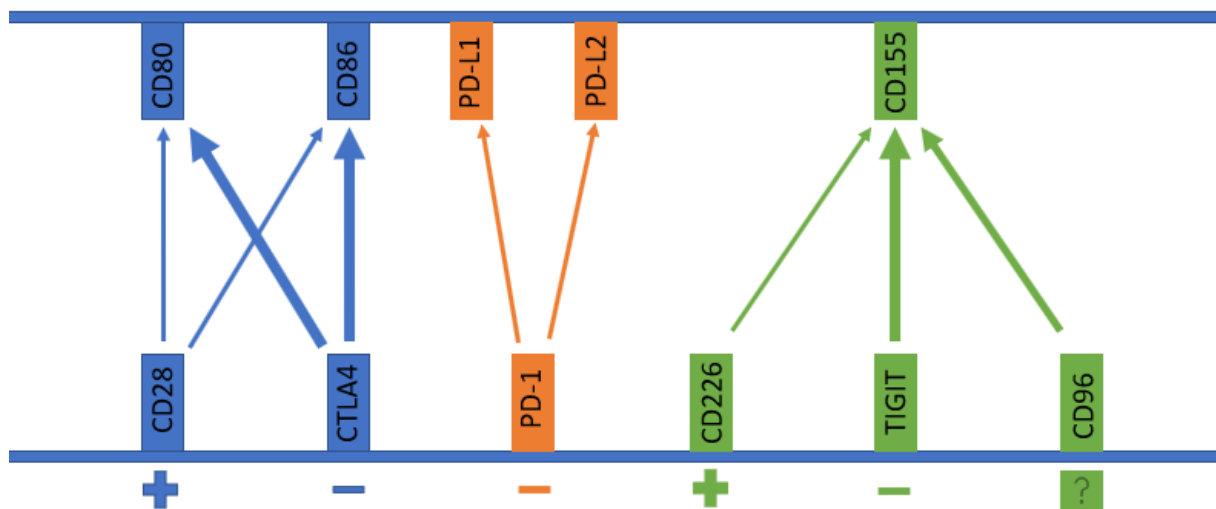


Abbildung 3 Kosignalisierende Rezeptoren und ihre Liganden. CD28 und CTLA4 binden die Liganden CD80 und CD86, wobei CTLA4 eine höhere Bindungsaffinität zu den Liganden als CD28 aufweist. PD-1 bindet die Liganden PD-L1 und PD-L2. CD226, TIGIT und CD96 binden den gemeinsamen Liganden CD155 mit unterschiedlicher Affinität. Die Stärke der Pfeile symbolisiert die Stärke der Bindungsaffinität. Die Plus- und Minus-Symbole weisen auf einen kostimulierenden, die Minus-Symbole auf einen koinhibitorischen Charakter hin. Die Funktion von CD96 ist noch nicht eindeutig definiert.

Der kostimulierende Rezeptor CD226

CD226, auch bekannt als DNAM-1 für DNAX accessory molecule-1, wurde erstmals im Jahr 1996 von Shibuya et al. als ein Adhäsionsmolekül beschrieben, das die von NK- und T-Zellen vermittelte Zytotoxizität reguliert. CD226 wird neben NK- und T-Zellen auch auf Monozyten und B-Zellen

exprimiert (Shibuya et al., 1996). Als Rezeptor bindet CD226 nicht nur CD155, sondern auch CD112 (nectin-2), ebenfalls Mitglied der Nectin-Proteinfamilie, jedoch mit geringerer Affinität (Bottino et al., 2003, Tahara-Hanaoka et al., 2004).

Auf humanen und murinen NK-Zellen spielt CD226 eine wichtige Rolle in der Regulation der NK-Zell-Adhäsion und NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität (Bottino et al., 2003, Iguchi-Manaka et al., 2008, Shibuya et al., 1996). Außerdem unterstützt CD226 die IFN γ -Produktion von murinen NK-Zellen während einer Entzündungsreaktion (Chan et al., 2014). CD226 scheint auch Einfluss auf die Formation der immunologischen Synapse von NK- und T-Zellen zu haben (Ramsbottom et al., 2014, Shibuya et al., 1999). Eine Funktion von NK-Zellen ist das Eliminieren von unreifen dendritischen Zellen, um eine effektive Immunantwort zu ermöglichen. Neben anderen aktivierenden Rezeptoren ist auch CD226 von Bedeutung für diesen Selektionsprozess bei Menschen und Mäusen *in vitro* (Pende et al., 2006, Seth et al., 2009).

Neben NK-Zellen ist CD226 auch ein wichtiger Regulator der T-Zell-Effektorfunktionen. Der Rezeptor beeinflusst die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität in Menschen und Mäusen (Iguchi-Manaka et al., 2008, Shibuya et al., 1996). Tatsächlich scheint CD226 unabdingbar für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch nicht professionelle Antigen-präsentierende Zellen, wie z.B. Tumorzellen, zu sein (Gilfillan et al., 2008). Unter CD4⁺ T-Zellen wird CD226 vor allem auf T_H1-Zellen exprimiert. Unter T_H2 polarisierenden Bedingungen wird die CD226-Expression sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen herunterreguliert (Dardalhon et al., 2005, Lozano et al., 2013). In der Tat führt ein knockdown von CD226 in humanen T-Zellen zu einer verringerten IFN γ -Produktion als auch Tbet-Expression, einem Transkriptionsfaktor charakteristisch für T_H1-differenzierte Zellen. Darüber hinaus wird durch den CD226 knockdown die Expression von GATA3, einem typischen T_H2-Transkriptionsfaktor, und die Produktion von T_H2-Zytokinen gesteigert. Dies weist auf eine Modulation der T_H1/T_H2-Balance durch CD226 hin (Lozano et al., 2013). CD226-Expression auf regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) hingegen markiert einen eher instabilen T_{reg}-Phänotyp und geht mit einer verminderten immunsuppressiven Kapazität dieser Zellen einher (Fuhrman et al., 2015).

Insgesamt spielt CD226 eine essenzielle Rolle in der Kontrolle von Tumoren, Infektionen und immunvermittelten Erkrankungen durch NK- und T-Zellen (Chan et al., 2014, Gilfillan et al., 2008, Iguchi-Manaka et al., 2008, Nabekura et al., 2010, Xiong et al., 2015).

Der koinhibitorische Rezeptor TIGIT

Der koinhibitorische Rezeptor TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains), auch bezeichnet als WUCAM und VSTM3, wurde 2009 unabhängig voneinander von drei verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert (Boles et al., 2009, Stanietsky et al., 2009, Yu et al., 2009). Wie auch PD-1

verfügt TIGIT in seinem zytoplasmatischen Anteil über das ITIM-Signalmotiv, dessen Bedeutung für die Signaltransduktion von TIGIT jedoch noch nicht geklärt ist. TIGIT wird auf aktivierten T-, NK- und NK T-Zellen exprimiert, besonders auf regulatorischen und dysfunktionalen T-Zellen. Wie CD226 bindet auch TIGIT an CD112 als zweiten Liganden (zusammengefasst in (Dougall et al., 2017)).

Es wurden zwei Wege beschrieben, auf denen TIGIT mit der Funktion von CD226 interferieren kann. Aufgrund seiner höheren Affinität kann TIGIT mit CD226 um die Bindung an den Liganden CD155 konkurrieren, vergleichbar mit CTLA-4 und CD28 (Yu et al., 2009). Darüber hinaus kann TIGIT auch mit einem CD226-Molekül auf derselben Zelle interagieren. Diese in-cis-Interaktion verhindert die Homodimerisierung von CD226, die für die Initiierung der CD226-abhängigen Signalkaskade wichtig ist (Johnston et al., 2014).

Auf humanen und murinen NK-Zellen inhibiert TIGIT die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität und IFN γ -Produktion (Li et al., 2014, Liu et al., 2013, Stanietsky et al., 2009, Stanietsky et al., 2013, Wang et al., 2015).

TIGIT kann T-Zell-Effektorfunktionen auf zell-extrinsischem und zell-intrinsischem Wege beeinflussen (zusammengefasst in (Dougall et al., 2017)). Der koinhibitorische Rezeptor fördert die Produktion von IL-10 durch dendritische Zellen, wodurch die T-Zell-Antwort abgeschwächt wird (Yu et al., 2009). Unter regulatorischen T-Zellen haben die TIGIT exprimierenden Zellen ausgeprägtere suppressive Eigenschaften als TIGIT-negative T_{regs} (Fuhrman et al., 2015, Joller et al., 2014). TIGIT positive T_{regs} inhibieren die T_{H1}/T_{H17} Differenzierung, jedoch nicht die T_{H2} Differenzierung (Joller et al., 2014, Kourepini et al., 2016). Folglich kann TIGIT über die Regulation der Funktion dendritischer Zellen und regulatorischer T-Zellen die T-Zell-Antwort modulieren. Darüber hinaus hat TIGIT auch direkten Einfluss auf die T-Zell-Funktion. So kann TIGIT die Proliferation muriner und humaner T-Zellen nach Stimulation inhibieren. Ebenso hat TIGIT einen hemmenden Einfluss auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine, besonders IFN γ , aber auch IL-13, IL-9 und IL-17 und die Expression von Transkriptionsfaktoren wie GATA3, Tbet und IRF4 (Joller et al., 2011, Levin et al., 2011, Lozano et al., 2012). Im Tumorkontext hemmt TIGIT die Funktion von CD8⁺ T-Zellen. TIGIT wird auf hohem Niveau auf Tumor infiltrierenden T-Zellen (TILs) von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Kolonkarzinom und Melanomen exprimiert und dämpft so die Immunantwort gegen Tumorzellen (Chauvin et al., 2015, Johnston et al., 2014). Tatsächlich markiert TIGIT gemeinsam mit PD-1 unter den TILs ein Subset erschöpfter T-Zellen mit dysfunktionalen Effektorfunktionen (zusammengefasst in (Dougall et al., 2017)). Eine Blockade von TIGIT gemeinsam mit dem PD-1-Liganden PD-L1 resultiert in einer gesteigerten T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen (Johnston et al., 2014).

CD96 - auch ein koinhibitorischer Rezeptor?

Die Eigenschaften des kosignalisierenden Moleküls CD96 sind noch nicht so gut untersucht wie die von TIGIT und CD226, obwohl er als erster beschrieben wurde. Der Rezeptor wurde 1992 von Wang et al. identifiziert (Wang et al., 1992). Die Arbeitsgruppe nannte das Molekül TACTILE für *t cell activation increased late expression*, da sie auf humanen T-Zellen beobachtet hat, dass die CD96-Expression nach Aktivierung hochreguliert wurde mit einem Peak sechs bis neun Tage nach dem Stimulus. CD96 wird wie TIGIT und CD226 auf T-, NK- und NK-T-Zellen exprimiert (Wang et al., 1992). Um die 12 Jahre später wurde CD155 als Ligand für CD96 identifiziert (Fuchs et al., 2004). Im Gegensatz zu CD226 und TIGIT bindet CD96 nicht CD112, allerdings interagiert das murine CD96 mit dem murinen Molekül CD111 (Nectin-1). Diese Interaktion konnte jedoch im Menschen bisher nicht beobachtet werden (Seth et al., 2007).

Fuchs et al. untersuchten auch die funktionellen Eigenschaften von CD96 auf humanen NK-Zellen und beschrieben einen steigernden Effekt von CD96 auf die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (Fuchs et al., 2004). Jedoch konnten andere Arbeitsgruppen diese Observation weder in humanen noch murinen Zellen bestätigen (Carlsten et al., 2007, Seth et al., 2007, Stanietsky et al., 2009). Stattdessen wurde gezeigt, dass CD96 einen hemmenden Einfluss auf die IFN γ -Produktion von murinen NK-Zellen hat (Chan et al., 2014).

Über die Funktion von CD96 auf T-Zellen ist noch wenig bekannt. Eriksson et al. haben die CD96-Expression auf CD8⁺ T-Zellen von HIV-positiven Patienten untersucht. Interessanterweise wurde bei Patienten mit hoher Viruslast eine Herunterregulation der CD96-Expression auf einem Teil der CD8⁺ T-Zellen beobachtet. CD96 positive und CD96 negative CD8⁺ T-Zellen sekretieren große Mengen an IFN γ , aber nur der CD96 negative Teil an T-Zellen produziert auch das zytolytische Protein Perforin. Folglich könnte CD96 einen hemmenden Einfluss auf die zytotoxischen Eigenschaften der CD8⁺ T-Zellen haben (Eriksson et al., 2012). Dafür sprechen auch die Daten von Wang et al. In ihrer Studie zeigten sie, dass eine CRISPR/Cas9-basierte Deletion von CD96 in humanen T-Zellen deren zytotoxischen Eigenschaften steigerte (Wang et al., 2023). Die CD96-Expression beeinflusst ebenfalls die proinflammatorischen Eigenschaften von T_H9-Zellen. In einem T-Zell-Transfer-Modell entwickelten RAG-defiziente Mäuse, die aufgrund ihrer RAG-Knockouts selbst keine T-Zellen haben, injiziert mit T_H9-Zellen mit niedriger CD96-Expression eine schwere Kolitis im Gegensatz zu Mäusen, die T_H9-Zellen mit hoher CD96-Expression erhalten haben (Stanko et al., 2018). Auch Wu et al. zeigten, dass Patienten mit einer Spondylitis ankylosans eine niedrigere CD96-Expression auf peripheren T-Zellen aufweisen und dass eine niedrigere CD96-Expression mit einer gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine durch CD4⁺ positive T-Zellen einhergeht (Wu et al., 2022). Eine weitere Studie beschreibt eine geringere IL-

17-Produktion durch $\gamma\delta$ -T-Zellen in CD96-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Oh-Oka et al., 2022). Zusammenfassend spricht die Datenlage für eine inhibitorische Rolle von CD96 in Bezug auf die Zytokinproduktion durch T-Zellen. CD96 wird, wie TIGIT und PD-1, auf Tumorerinfiltrierenden T-Zellen exprimiert. Eine Blockade von CD96 allein sowie gemeinsam mit einer PD-1-Blockade steigert die Effektivität der von CD8⁺ T-Zellen vermittelte Antitumor-Immunantwort (Mittal et al., 2019). Diese Daten sprechen eher für CD96 als Inhibitor von T-Zell-Funktionen. Allerdings zeigte ein kürzlich veröffentlichter Artikel, dass eine Blockade von CD96 auf murinen CD8⁺ T-Zellen zu einer verringerten T-Zell-vermittelten Aktivität führt (Chiang et al., 2020).

Die vorliegenden Daten reichen folglich noch nicht aus, um ein Urteil über die inhibitorischen oder aktivierenden Eigenschaften von CD96 zu fällen. Wie TIGIT und PD-1 verfügt CD96 in seinem zytoplasmatischen Anteil über das Signalmotiv ITIM, was auf inhibitorische Eigenschaften von CD96 hinweisen kann. Jedoch wurde beim humanen CD96-Molekül auch das YXXM-Signalmotiv beschrieben, das u.a. auch der aktivierende Rezeptor CD28 aufweist (Meyer et al., 2009) (zusammengefasst in (Bernhardt, 2014)).

Das klinische Bild chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED)

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind die beiden HAUPTERSCHEINUNGSBILDER der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und beide sind durch einen schubweisen Verlauf charakterisiert. Sowohl MC als auch CU treten in der Regel in der 2. bis 4. Lebensdekade auf, doch interessanterweise sind auch vermehrt Menschen im Alter von 50 bis 80 Jahren betroffen. Allgemein steigt die Inzidenz und Prävalenz von CED weltweit mit der Zeit an. Die höchsten Prävalenzen finden sich in den Industrienationen (Torres et al., 2017, Ungaro et al., 2017).

Morbus Crohn kann jeden Teil des Gastrointestinaltrakts betreffen. Am häufigsten jedoch kommt es zur Entzündung des terminalen Ileums und proximalen Kolons. Die transmurale und segmentale Entzündung der Darmwand kann zu Strikturen und Fisteln führen. Lokalisation und Schwere der Erkrankung bestimmen das Symptombild. Die häufigste klinische Präsentation sind Schmerzen im rechten Unterbauch, chronische Diarrhoe, Gewichtsverlust und Fatigue. Die Diarrhoe ist in der Regel nicht blutig, obwohl bei Beteiligung des Kolons es zu Blut im Stuhl kommen kann. Bis zu einem Drittel der MC-Patienten leiden an analen oder perianalen Fisteln, Fissuren oder anorektalen Abszessen und rund 50 % der Patienten entwickeln extraintestinale Manifestationen der Erkrankung. Diese können die Gelenke in Form von peripherer Arthritis oder ankylosierender Spondylitis, die Augen durch eine Uveitis oder Episkleritis oder auch die Haut betreffen (Torres et al., 2017).

Colitis ulcerosa auf der anderen Seite ist durch eine auf das Kolon beschränkte Entzündung der Mukosa charakterisiert. Die Entzündung beginnt in der Regel am Rektum und kann sich kontinuierlich in

proximaler Richtung ausbreiten. Die Klinik hängt vom Ausmaß der Beteiligung des Kolons ab. Leitsymptom ist gewöhnlich eine blutige Diarrhoe, aber die Erkrankung kann sich auch durch drängenden Stuhldrang, Inkontinenz, Fieber und Bauchschmerzen präsentieren. Extraintestinale Manifestationen, wie periphere Arthritis, betreffen ein Drittel der Patienten. Assoziierte Erkrankungen wie primäre sklerosierende Cholangitis und Pyoderma gangrenosum sind häufiger bei CU als bei MC Patienten (Ungaro et al., 2017).

Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Die genaue Ätiologie der CED ist trotz intensiver Forschung nicht bekannt. Bekannterweise jedoch bedingen eine genetisch bedingte Suszeptibilität zusammen mit Umweltfaktoren die Erkrankung. Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) wurden mehr als 200 Allele identifiziert, die mit der Entstehung von CED assoziiert sind. Zudem weisen um die 10 % der CED-Patienten eine familiäre Prädisposition auf (Ungaro et al., 2017, Torres et al., 2017). Rauchen ist eines der am besten untersuchten Umweltfaktoren in Bezug auf CED. Das Risiko für Morbus Crohn wird durch Tabakkonsum deutlich erhöht, während aktive, aber nicht ehemalige Raucher vor Erkrankung an Colitis ulcerosa eher geschützt sind. Medikamente wie orale Kontrazeptiva und Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) steigern das Risiko für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Außerdem scheint eine Appendektomie ebenfalls ein protektiver Faktor gegen Colitis ulcerosa zu sein. Darüber hinaus hat die Ernährung Einfluss auf die Entwicklung von CED. So fördern ein verringerter Konsum von Ballaststoffen und ein vermehrter von gesättigten Fettsäuren die Entstehung eines Morbus Crohn. Auch eine veränderte Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms beeinflusst die Pathogenese. Im Darm von CED-Patienten wurden vermehrt Mikroorganismen mit proinflammatorischen Eigenschaften entdeckt. Jedoch scheiterten Versuche, die Darmflora mit Probiotika und Antibiotika zu manipulieren (Torres et al., 2017, Ungaro et al., 2017).

Diese genetischen und Umweltfaktoren können unter anderem die Barrierefunktion des Darms beeinflussen. Eine dysfunktionale Epithelbarriere des Darms ermöglicht die Translokation von antigenem Material wie Bakterien aus dem Darmlumen in die Lamina propria der Mukosa. Dies triggert eine dysregulierte und wahrscheinlich genetisch prädisponierte Entzündungsreaktion, die die Aktivierung verschiedener Immunzellen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine bedingt. Bei CED-Patienten finden sich deutlich gesteigerte Mengen an T-Zellen, welche essenzielle Produzenten proinflammatorischer Zytokine sind, in der intestinalen Mukosa. Die so ausgelöste Entzündung führt zur Schädigung der Mukosa und der Darmwand. Aufgrund einer gestörten Wundheilung kommt es jedoch zu einer verzögerten Reparatur der entstandenen mukosalen Schäden

(Fuss et al., 1996, Pastorelli et al., 2013) (zusammengefasst in (Neurath, 2014, Zundler and Neurath, 2017)). Die Pathogenese von CED ist in Abbildung 4 dargestellt.

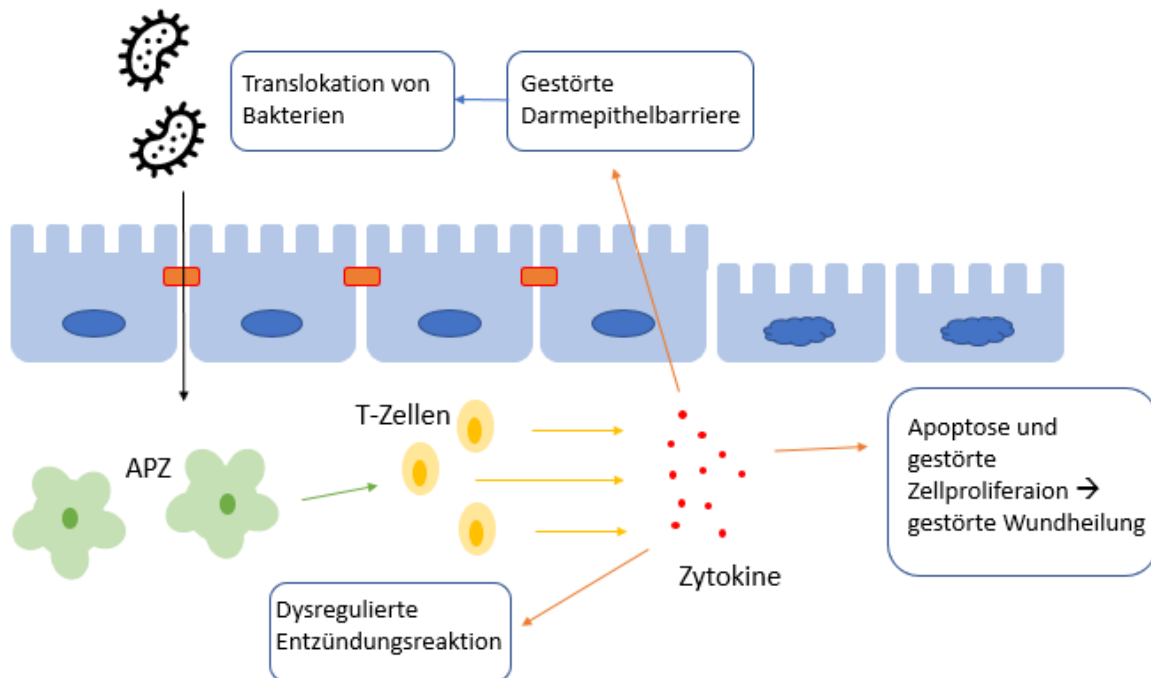


Abbildung 4 Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Bakterientranslokation durch eine gestörte Darmepithelbarriere begünstigt eine mukosale Entzündungsreaktion. Antigenpräsentierende Zellen (APZ) präsentieren T-Zellen bakterielle Antigene. T-Zellen sekretieren proinflammatorische Zytokine, die zur Dysregulation der Entzündungsreaktion führen. Zudem beeinflussen proinflammatorische Zytokine wie IL-9 die Proliferation und Apoptose von Epithelzellen sowie die Permeabilität der Tight Junction-Proteine.

Die Rolle der T-Zell-Antwort auf das Entzündungsgeschehen im Darm wurde intensiv an Mäusen untersucht. Es gibt verschiedene Kolitis-Mausmodelle, auf die hier kurz eingegangen werden soll. Mäuse mit einer Knockout-Mutation (KO) im RAG1-Gen haben eine gestörte T-Zell-Reifung und verfügen selbst daher über keine T-Zellen. Diesen Tieren können im T-Zell-Transfer-Modell T-Zellen mit bestimmten Eigenschaften injiziert werden, um deren Effekt auf den murinen Organismus zu untersuchen. TNBS (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure), DNBS (Dinitrobenzolsulfonsäure) und Oxazolone sind drei haptenisierende Substanzen, die interrektal appliziert werden. Diese Substanzen modifizieren mikrobielle Proteine, die daraufhin als Antigene vom Immunsystem erkannt werden. TNBS und DNBS verursachen eine T_H1 -assoziierte transmurale Kolitis ähnlich dem Morbus Crohn beim Menschen, während Oxazolone eine T_H2 -vermittelte Entzündung des Kolons vergleichbar mit Colitis ulcerosa induziert (Boirivant et al., 1998, Heller et al., 2002, Scheiffele and Fuss, 2002). Dextran Sodium Sulfat (DSS) auf der anderen Seite ist ein Kollitogen mit antikoagulativen Eigenschaften. Der exakte Mechanismus, über den DSS eine Kolitis induziert, ist noch nicht bekannt. Vermutlich aber schädigt es das Epithel und damit die Epithelbarriere (Chassaing et al., 2014).

Morbus Crohn ist vermutlich assoziiert mit T_H1 -Zellen, die unter anderem von IL-12 induziert werden und große Mengen an IFN γ produzieren. In einem T-Zell-Transfermodell verbesserte die Blockade von

IFN γ die Entzündung im Kolon (Powrie et al., 1994). Die Behandlung von MC-Patienten mit einem IFN γ -spezifischen Antikörper Fontolizumab jedoch war nicht effektiv (Reinisch et al., 2006). Im TNBS-Kolitismodell konnte ein IL-12 blockierender Antikörper die Entzündung abmildern (Simpson et al., 1998). Außerdem schützt eine Defizienz von STAT4 und Tbet, zwei wichtigen Transkriptionsfaktoren für die T_H1-Zelllinie, in Mäusen vor schwerer Kolitis, während eine Überexpression eine Neigung zur schweren Entzündung des Darms verursacht (Neurath et al., 2002, Wirtz et al., 1999). Ebenso wurde bei MC-Patienten höhere Mengen an T_H1-Zytokinen und eine vermehrte Expression an T_H1-assoziierten Transkriptionsfaktoren in der entzündeten Mukosa nachgewiesen (Fuss et al., 1996, Neurath et al., 2002, Sakuraba et al., 2009).

Colitis ulcerosa auf der anderen Seite steht im Verdacht eine T_H2 vermittelte Erkrankung zu sein. Im Oxazolone-induzierten Kolitismodell wurde eine exzessive Produktion von T_H2-Zytokinen beobachtet und die Therapie mit Anti-IL-4-Antikörpern schwächte die Entzündung ab (Boirivant et al., 1998). In diesem Kolitismodell ist auch das T_H2-Zytokin IL-13 von Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass IL-13 die Funktion der Tight Junctions ändert und die Apoptose von intestinalen Epithelzellen fördert (Heller et al., 2005, Heller et al., 2002). Darüber hinaus sind Mäuse mit STAT6- und GATA3-Defizienz, also mit Mangel an zwei grundlegenden Transkriptionsfaktoren für die T_H2-Polarisation, vor der Entwicklung einer Oxazolone-induzierten Kolitis geschützt (Popp et al., 2017, Rosen et al., 2013). Lamina propria-T-Zellen von CU-Patienten sekretieren überwiegend T_H2-assoziierte Zytokine IL-5 und IL-13 und exprimieren den Transkriptionsfaktor GATA3 (Neurath et al., 2002). Mehrere Studien zeigten eine gesteigerte T_H2-Immunantwort in CU-Patienten (Heller et al., 2005, Pastorelli et al., 2010, Seidelin et al., 2015). Eine Studie von Biancheri et al. jedoch konnte keine erhöhten IL-13-Level bei CU-Patienten nachweisen und der IL-13-spezifische Antikörper Tralokinumab zeigte keine Wirkung (Biancheri et al., 2014, Danese et al., 2015).

Obwohl viele Studien dieses T_H1/T_H2-Paradigma der CED unterstützen, wird es kontrovers diskutiert, da es auch einige widersprüchliche Daten gibt (Di Sabatino et al., 2012, Geremia et al., 2014). Rovedatti et al. zum Beispiel konnten keinen Unterschied in der IFN γ -Produktion von Zellen aus Biopsien von CU- und MC-Patienten feststellen und eine weitere Studie konnte kein IL-13 in Biopsien von CU-Patienten feststellen (Bernardo et al., 2012, Rovedatti et al., 2009).

Aber nicht nur T_H1- und T_H2-Zellen sind wichtige Vermittler der intestinalen Entzündung. Die Translokation von Bakterien in die Darmmukosa triggert die Produktion von IL-23, einem wichtigen Induktor der T_H17-Differenzierung, und in der Lamina propria von MC- und CU-Patienten werden vermehrt T_H17-Zytokine detektiert (Becker et al., 2003, Kobayashi et al., 2008, Mudter et al., 2011, Rovedatti et al., 2009). Überraschenderweise jedoch war der Anti-IL-17A-Antikörper klinisch ineffektiv

und verschlechterte die Entzündung sogar (Baker and Isaacs, 2018, Gerner et al., 2013, Hueber et al., 2012) zusammengefasst in (Neurath, 2014)).

Ein eher vor kurzem identifiziertes Teiglied in der Pathogenese von CED sind T_H9 -Zellen und das von ihnen produzierte IL-9.

T_H9 -Zellen/ IL-9 produzierende T-Zellen in der Pathogenese von CED

Die Bedeutung von IL-9-produzierenden T-Zellen für die Entwicklung von CED wurde bereits gut untersucht und in Übersichtsartikeln zusammengefasst (Vyas and Goswami, 2018, Weigmann and Neurath, 2017). Im T-Zell-Transfer-Modell verursachten IL-9-produzierende T-Zellen in RAG-defizienten Mäusen eine Kolitis. Ähnliche proinflammatorische Eigenschaften zeigten IL-9-produzierende T-Zellen auch im Oxazolone-induzierten Kolitis-Modell (Dardalhon et al., 2008, Gerlach et al., 2014). IL-9-KO-Mäuse, die mit Oxazolone behandelt wurden, waren weniger schwer von einer Entzündung des Kolons betroffen als Wildtyp (WT)-Mäuse (Gerlach et al., 2014). Auch Mäuse mit einer T-Zell-spezifischen Inaktivierung des T_H9 assoziierten Transkriptionsfaktors PU.1 zeigen eine geringere Krankheitsaktivität als WT-Mäuse (Gerlach et al., 2014). Die entzündungsfördernden Eigenschaften von T_H9 -Zellen werden weiter durch die Beobachtung von Gerlach et al. unterstützt, dass IL-9-Citrin-Reporter-Mäuse eine verstärkte IL-9-Genaktivität nach Behandlung mit Oxazolone zeigen (Gerlach et al., 2014). In Citrin-Reporter-Mäusen ist die Expression des fluoreszierenden Proteins Citrin an die Expression bestimmter anderer Gene gebunden, in dem Fall IL-9. Daher kann die IL-9-Genaktivität gemessen werden. Außerdem konnte eine Blockade von IL-9 durch Antikörper in diesem Kolutismodell die Entzündung verhindern (Gerlach et al., 2014). Auch im TNBS-Kolutismodell sind IL-9 KO Mäuse besser vor Entzündung geschützt als WT-Mäuse. Es wurden vermehrt PU.1 exprimierende T-Zellen und eine gesteigerte IL-9-Produktion im Darmepithel beobachtet (Gerlach et al., 2015). Bei der durch DSS induzierten Kolitis jedoch zeigten IL-9 produzierende NK-T-Zellen protektive Effekte (Kim and Chung, 2013). Eine andere Studie mit dem DSS-Kolutismodell zeigte eine schützende Wirkung für Anti-IL-9-Antikörper auf (Yuan et al., 2015). Mehrere Kolutismodelle zeigen folglich die wichtige Rolle von IL-9-produzierenden T-Zellen für die Entstehung einer intestinalen Entzündung.

Daten zu den Mechanismen, über die IL-9 zur Pathogenese der CED beiträgt, liegen ebenfalls vor. Diese zeigen, dass IL-9 alle drei Stadien der CED-Pathogenese beeinflusst: die Bakterientranslokation in die Mukosa durch eine gestörte Darmbarriere, die dysregulierte Immunantwort und die gestörte Wundheilung (Abbildung 4). Dies weist auf eine Schlüsselstellung von IL-9 in der CED-Pathogenese hin.

1. Die gestörte Darmbarriere

Tight Junction-Proteine sind ein wichtiger Teil der intestinalen Epithelbarriere. Tight Junctions werden durch bestimmte Proteine wie Claudine und Occludin gebildet. Es gibt 24 verschiedene Claudin-Proteine und sie regulieren die Permeabilität des Darmepithels. Einige Proteine der Claudin-Familie formen undurchlässige Tight Junctions, während andere die parazelluläre Diffusion von Ionen und kleinen Molekülen zulassen. Claudin-1 verhindert die parazelluläre Diffusion. Claudin-2 hingegen ist ein Poren-formendes Tight Junction-Protein. Occludin ist ein wichtiges Siegelprotein, das u.a. mit Claudin-1 und -2 interagiert (Gerlach et al., 2015). Im Oxazolone-induzierten Kolitismodell wird die Expression von Claudin-2 in IL-9-KO-Mäusen unterdrückt. Die Claudin-1-Expression jedoch wird nicht verändert (Gerlach et al., 2014). Folglich scheint IL-9 die Expression des Poren-formenden Claudin-2 zu fördern und somit die Epithelbarriere zu kompromittieren. Interessanterweise wurde gezeigt, dass im TNBS-Kolitismodell IL-9-KO-Mäuse eine verringerte Claudin-1-Expression aufweisen. Das erweckt den Eindruck, dass in diesem Kolitismodell IL-9 die Claudin-1 Expression unterstützt. Diese widersprüchlichen Daten könnten auf unterschiedliche pathologische Mechanismen der beiden Kolitis-Modelle hindeuten (Gerlach et al., 2015). Die Behandlung von Mäusen behandelt mit IL-9 bedingt eine vermehrte Translokation von Bakterien in die Darmmukosa. Diese Beobachtung unterstützt eine regulierende Rolle von IL-9 für die Darmbarriere in vivo (Gerlach et al., 2014).

2. Dysregulation der Immunantwort durch IL-9

IL-9 beeinflusst auch die Zytokinproduktion von Immunzellen in der Mukosa und fördert so den Entzündungsprozess. Dies zeigen Gerlach et al., die in IL-9-defizienten Mäusen, behandelt mit Oxazolone, eine geringere Produktion an $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokinen detektierten (Gerlach et al., 2014).

3. Beeinflussung der Wundheilung durch IL-9

Zellen des Darmepithels exprimieren den IL-9-Rezeptor in großen Mengen, was sie als potenzielle Zielzellen der IL-9-Wirkung ausweist (Gerlach et al., 2014, Nalleweg et al., 2015). In der Tat wurde gezeigt, dass IL-9 die Proliferation von Epithelzellen in Kultur unterdrückt. Darüber hinaus zeigten WT-Mäuse eine langsamere Wundheilung als IL-9-KO-Mäuse nach endoskopisch zugefügter Verletzung der Darmmukosa. Folglich scheint IL-9 die Wundheilung negativ zu regulieren (Gerlach et al., 2014). Nalleweg et al. haben ebenfalls eine gestörte Proliferation und gesteigerte STAT5-Aktivierung bei frisch isolierten Epithelzellen aus dem Darm von mit IL-9 behandelten CU-Patienten beobachtet (Nalleweg et al., 2015).

Weiterhin wurden unterstützende Beobachtungen bei menschlichen CED-Patienten gemacht. In Kolonbiopsien von CU-Patienten wurden erhöhte Level an IL-9 mRNA sowie mRNA wichtiger $\text{T}_\text{H}9$ -TF wie IRF4 und PU.1 detektiert, jedoch nicht bei MC-Patienten. Weitere Analysen identifizierten T-Zellen als die Haupt-IL-9-Produzenten (Nalleweg et al., 2015). Auch im Blutserum sind bei vielen CED-

Patienten die IL-9-Level erhöht. Die IL-9-Menge im Serum korrelierte mit der Schwere der Prognose (Defendenti et al., 2015).

Die Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Das therapeutische Ziel in der Behandlung von CED ist das schnelle Erreichen und die Erhaltung einer Krankheitsremission. In der CED-Behandlung unterscheidet man dementsprechend die Remissionsinduktion und die Erhaltungstherapie. Die am häufigsten verwendeten Medikamente sind Steroide, klassische Immunsuppressiva oder disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) und Biologika.

Steroide (Prednisolon, Budesonid) haben eine sehr starke antiinflammatorische Wirkung, aber ihre langfristige Verwendung ist mit mehreren schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden. Daher sind Steroide nur für die Remissionsinduktion in akuten Phasen von MC und CU empfohlen (Shahidi et al., 2016, Torres et al., 2017, Ungaro et al., 2017, Authors and Collaborators:, 2018, Preiß et al., 2014).

DMARDs sind eine heterogene Gruppe von immunsuppressiven Medikamenten, die sich als effektiv bei der Therapie von rheumatoider Arthritis und Autoimmunerkrankungen wie CED erwiesen haben. DMARDs werden für gewöhnlich für die Remissionserhaltung eingesetzt. Zu den DMARDs gehören unter anderem Thiopurine (Azathioprin, 6-Mercaptopurin) und Calcineurininhibitoren wie Tacrolimus. Azathioprin ist eine Medikamentenvorstufe, die zu 6-Mercaptopurin biotransformiert wird. 6-Mercaptopurin ist ein Purinanalogen, das die T-Zellproliferation durch Interferenz mit der DNA-Replikation inhibiert (Broen and van Laar, 2020). Thiopurine eignen sich für die Erhaltung von Remission sowohl bei MC als auch UC, jedoch sollte das mit der Verwendung von Thiopurinen verbundene erhöhte Risiko für Lymphome und Nicht-Melanom-Hautkrebs beachtet werden (Preiß et al., 2014, Authors and Collaborators:, 2018). Tacrolimus hingegen ist ein Calcineurininhibitor. Calcineurin ist eine Phosphatase, die den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T cells) aktiviert und so zur Aktivierung und Differenzierung der T-Zelle führt (Broen and van Laar, 2020). Tacrolimus gehört nicht zu den am häufigsten verwendeten DMARDs bei der Therapie von CED, obwohl Studien gerade bei Colitis ulcerosa eine gute Wirksamkeit zuschreiben (Damião et al., 2019). Der Einsatz von Tacrolimus wird vor allem bei mittelschweren bis schweren Verläufen und unzureichendem Ansprechen auf bzw. Kontraindikation gegen eine Steroidtherapie empfohlen (Authors and Collaborators:, 2018, Preiß et al., 2014).

Viele Patienten behandelt mit DMARDs bleiben nicht in Remission. Da Zytokine eine zentrale Rolle in der dysregulierten Immunantwort von CED-Patienten spielen, stellt die Entwicklung von zytokinspezifischen Antikörpern einen vielversprechenden Ansatz dar. Während Antikörper gegen IFN γ und IL-13 klinisch nicht wirksam waren, waren monoklonale Antikörper, die das Zytokin TNF α

blockieren, ein großer Fortschritt in der CED-Therapie. Anti-TNF α -Antikörper (wie Infliximab, Golimumab, Adalimumab) binden gelöstes und membrangebundenes TNF α und verhindern so die Bindung von TNF α an seinen Rezeptor. Dadurch werden von TNF α vermittelte proinflammatorische Signale blockiert. Auch über die Bindung an membrangebundenes TNF α vermitteln anti-TNF α -Antikörper direkt eine Herunterregulation von proinflammatorischen Signalen in der betreffenden Zelle. Darüber hinaus können anti-TNF α -Antikörper über Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität und Komplement-abhängige Zytotoxizität periphere mononukleäre Zellen, zu denen auch T-Zellen gehören, depletieren. Anti-TNF α -Antikörper werden zur Induktion und Erhaltung der Remission bei MC- und CU-Patienten mit moderater bis schwerer Erkrankung verwendet. Mit der anti-TNF α -Therapie handelt man sich jedoch ein erhöhtes Risiko an opportunistischen Infektionen und die mögliche Reaktivierung einer latenten Tuberkulose ein. Außerdem wird ein erhöhtes Malignomrisiko diskutiert (Billmeier et al., 2016, Berns and Hommes, 2016, Pugliese et al., 2017).

Einflüsse des Alters auf die Immunfunktion- die Rolle der Immunoseneszenz

Autoimmunerkrankungen wie CED oder rheumatoide Arthritis kommen gehäuft bei älteren Patienten vor. Die genauen Gründe dafür sind noch nicht bekannt, jedoch spielen altersabhängige Veränderungen des Immunsystems höchstwahrscheinlich eine grundlegende Rolle. Der Begriff „Immunoseneszenz“ beschreibt die Summe aller Veränderungen des Immunsystems im Alter. Viele dieser Veränderungen betreffen das adaptive Immunsystem.

Mit dem Alter nimmt die Frequenz naiver T-Zellen aufgrund der Involution des Thymus und einer lebenslangen Antigenexposition ab. Dies resultiert in einem schmaleren T-Zell-Rezeptor-Repertoire und beeinflusst die Fähigkeit auf neue Antigene reagieren zu können. Auf der anderen Seite steigt die Zahl der Gedächtnis-T-Zellen, die von verschiedenen Pathogenen geprägt wurden. Die Fähigkeit bekannte Infektionen zu bekämpfen, bleibt also intakt (zusammengefasst in (Bektas et al., 2017, Fulop et al., 2017)). Außerdem wurde in Älteren ein Anstieg an regulatorischen T-Zellen beobachtet. Allerdings scheint die Funktion von regulatorischen T-Zellen mit dem Alter abzunehmen (van der Geest et al., 2014, Fulop et al., 2017). Die Zahl und Funktion von B-Zellen, u.a. die Immunglobulinproduktion, nimmt ebenfalls ab. Interessanterweise werden dennoch im Alter mehr Autoantikörper produziert (zusammengefasst in (Franceschi et al., 2017, Fulop et al., 2017)). Aber auch das angeborene Immunsystem wird vom Alter beeinflusst. Die Veränderungen des angeborenen Immunsystems bedingt eine gesteigerte basale Aktivierung angeborener Immunzellen, spezifische Effektorfunktionen wie Phagozytose hingegen sind im Alter gestört (Fulop et al., 2017).

Während des Alterungsprozesses häufen sich auch seneszente Immunzellen an. Zelluläre Seneszenz ist ein stressinduzierter permanenter Zellzyklusarrest von bisher replikationsfähigen Zellen (He and

Sharpless, 2017). Dieses Phänomen wurde erstmals 1961 in humanen Fibroblasten beschrieben (HAYFLICK and MOORHEAD, 1961). Es wurde beobachtet, dass Fibroblasten nach einer gewissen Zahl an Replikationen sich aufhören zu teilen. Dieser Wachstumsstillstand wird durch die Erosion von Telomeren bedingt. Mit jedem Replikationszyklus werden die repetitiven DNA-Sequenzen am Ende von linearen Chromosomen, genannt Telomere, um 50-100 Basenpaare verkürzt. Irgendwann wird ein kritischer Punkt erreicht, an dem die verkürzten Telomere als DNA-Schaden erkannt und DNA-Reparaturmechanismen aktiviert werden, die auch den Zellzyklusarrest verursachen. Dieser Prozess wird auch Telomer-abhängige Seneszenz genannt. Im Gegensatz dazu gibt es auch Telomer-unabhängige Mechanismen, die zur Zellseneszenz führen. Infolge von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung oder reaktive Sauerstoffspezies wird ebenfalls das DNA-Reparatursystem aktiviert. Dieses induziert einen vorläufigen Zellzyklusarrest. Wenn der DNA-Schaden irreparabel ist, wird der Zellzyklusarrest permanent und die Zelle ist seneszent (zusammengefasst in (Akbar and Henson, 2011)). Seneszente Zellen exprimieren antiproliferative Moleküle wie p16INK4a, welches im Gewebe junger und gesunder Probanden nicht detektierbar ist, dessen Expression im Alter jedoch exponentiell zunimmt (He and Sharpless, 2017).

Seneszenz wird häufig mit Zellerschöpfung verwechselt. Seneszenz kann jedoch alle replikationsfähigen Zellen betreffen, nicht nur Immunzellen. Seneszente T-Zellen sind in der Regel hochdifferenzierte Effektor-Gedächtnis- oder Effektor-T-Zellen (T_{EM} und T_{EMRA}). Entgegen ursprünglichen Annahmen sind seneszente Zellen metabolisch aktiv. Tatsächlich produzieren sie große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen. Dieses Phänomen wurde zuerst bei seneszenten Fibroblasten beobachtet und SASP (senescence-associated secretory phenotype) genannt (Coppé et al., 2008). Aber auch seneszente T-Zellen produzieren vermehrt proinflammatorische Zytokine. Darüber hinaus sind seneszente Zellen apoptoseresistent und der Zustand der Seneszenz ist nicht reversibel (zusammengefasst in (He and Sharpless, 2017, Xu and Larbi, 2017)). Erschöpfung hingegen betrifft vor allen T-Zellen und beschreibt den progressiven Verlust von Effektorfunktionen, der schließlich zur Eliminierung von erschöpften T-Zellen führt. Erschöpfte T-Zellen sind Opfer eines komplexen Netzwerks inhibitorischer Signale. Dieser Zustand wird durch chronische Antigenstimulation von T-Zellen, z.B. im Rahmen chronischer Virusinfektionen oder Tumorerkrankungen, hervorgerufen. Die ständige Auseinandersetzung mit Antigenen führt zur Hochregulation von koinhibitorischen Molekülen wie CTLA-1, PD-1, TIM-3 oder TIGIT. Die inhibitorischen Signale dieser Moleküle inhibieren den Zellzyklus und schwächen die zytotoxischen Eigenschaften sowie die Zytokinproduktion ab. Erschöpfte T-Zellen sind meistens zentrale Gedächtniszellen oder Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM} und T_{EM}) und sie neigen zur Apoptose. Darüber hinaus kann der Erschöpfungszustand durch blockierende Antikörper gegen koinhibitorische Rezeptoren aufgehoben werden (zusammengefasst in (Akbar and Henson, 2011, Xu and Larbi, 2017)).

Folglich sind Erschöpfung und Seneszenz zwei verschiedene Zustände, in denen sich T-Zellen befinden können.

Die Frage stellt sich, ob in alternden Menschen neben seneszenten T-Zellen sich auch erschöpfte T-Zellen akkumulieren. T-Zellen gealterter Mäuse zeigen eine gesteigerte Expression koinhibitorischer Rezeptoren wie PD-1, TIM-3 und CTLA-4 (Decman et al., 2012, Channappanavar et al., 2009, Lee et al., 2016, Shimada et al., 2009). Es gibt bisher wenige Daten zu Expressionsunterschieden koinhibitorischer Rezeptoren auf humanen T-Zellen zwischen jungen und alten Probanden. Song et al. konnten jedoch zeigen, dass die Expression des koinhibitorischen Rezeptors TIGIT auf humanen CD4⁺ und besonders CD8⁺ T-Zellen ansteigt (Song et al., 2018). Eine weitere Studie weist eine gesteigerte TIM-3 und TIGIT-Expression im Alter nach (Gong et al., 2019). Somit könnte T-Zell-Erschöpfung im Alter ebenfalls ein Charakteristikum der Immunoseneszenz sein (Abbildung 5).

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Funktion des Immunsystems mit der Zeit einfach abnimmt. Doch, wie bereits oben beschrieben, ist das eine zu vereinfachte Sichtweise. Manche Effektorfunktionen von Immunzellen sind zwar in Älteren gestört, andere sind einfach verändert oder nehmen sogar zu. Folglich führt der Alterungsprozess nicht zum Verfall der Immunfunktionen, sondern modifiziert das Immunsystem für eine bessere Anpassung an Herausforderungen der Umwelt und eine bessere Nutzung der Körperressourcen (Fulop et al., 2017, Franceschi et al., 2017).

Besonders die angeborene Immunantwort bleibt hauptsächlich im Alter erhalten, während die adaptive Immunantwort stärker betroffen ist. Das angeborene und adaptive Immunsystem haben großen Einfluss aufeinander. Die verstärkte Produktion proinflammatorischer Zytokine durch angeborene Immunzellen und seneszente Zellen können die adaptive Immunantwort dämpfen, während die verringerte adaptive Immunantwort die angeborene Immunantwort zusätzlich aktiviert (Franceschi et al., 2000a). Dadurch überholt das gut erhaltene angeborene Immunsystem die abgeschwächte adaptive Immunantwort und führt zu einer chronischen subklinischen Entzündung, die in Älteren beobachtet werden kann. Diese chronische Entzündung wurde im Jahr 2000 von Claudio Franceschi als „Inflammaging“, eine Zusammenführung der beiden englischen Wörter „inflammation“ und „aging“, bezeichnet (Franceschi et al., 2000b). Die Gründe für die chronische niederschwellige Entzündung in Älteren sind noch nicht gut verstanden, jedoch kann sie als Reaktion des Immunsystems auf die lebenslange Auseinandersetzung mit Antigenen gesehen werden (Fulop et al., 2017, Grignolio et al., 2014). Persistente Virusinfektionen wie CMV, Akkumulation von Zellschrott und fehlgefalteten Proteinen werden für wichtige Stimuli der chronischen Entzündung gehalten.

Chronische Entzündung bedeutet chronischen Zellstress. Dies fördert auf der einen Seite die Zellseneszenz, auf der anderen Seite auch die Zellerschöpfung. Für erfolgreiches Altern muss es für die chronische Entzündung ein Gegengewicht geben, das Gewebeschäden durch zu starke

Immunreaktionen verhindert. Diese anti-inflammatorischen Mechanismen werden unter dem Begriff Anti-Inflammaging zusammengefasst. In der Tat wurde im Blut von Über-Hundertjährigen, die als Beispiel für gesundes Altern gelten, anti-inflammatorische Faktoren wie TGF β und Cortisol in größeren Mengen zusätzlich zu den proinflammatorischen Molekülen detektiert (Franceschi et al., 2017). Gerät das Verhältnis von Inflammaging und Anti-Inflammaging aus dem Gleichgewicht, kann es zur Entstehung altersbedingter Erkrankungen wie Krebs, kardiovaskulärer oder neurodegenerativer Erkrankungen sowie zu Autoimmunprozessen wie CED führen (Franceschi et al., 2000b, Fulop et al., 2017).

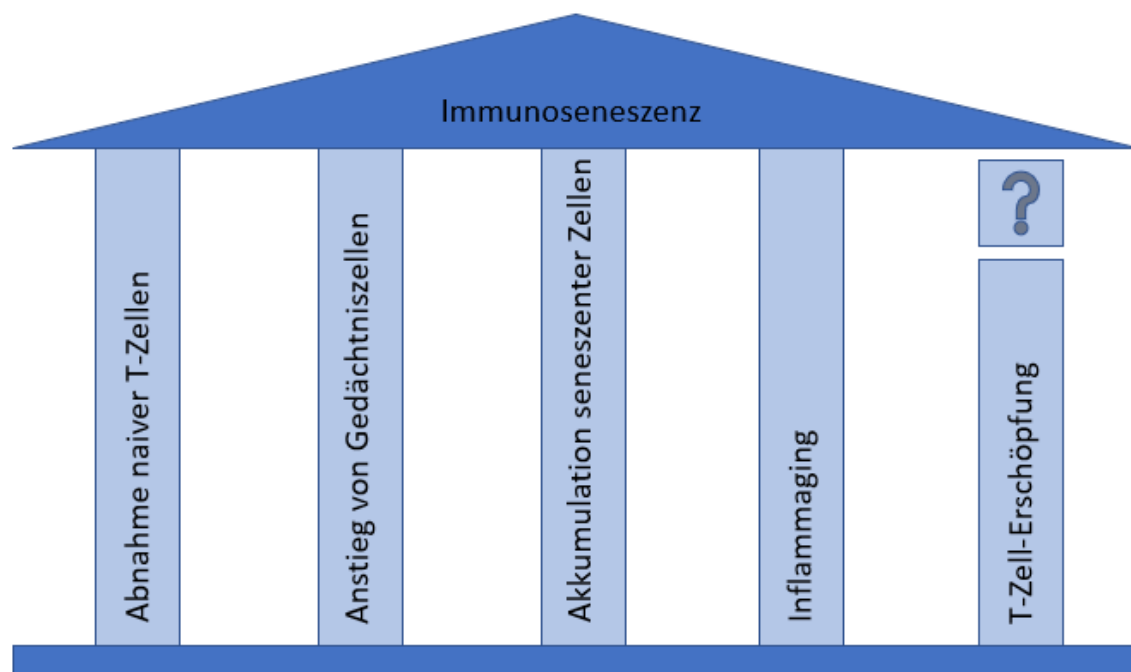


Abbildung 5 Die Hauptcharakteristika der Immunoseneszenz nach (Aiello et al., 2019)

Der Einfluss des Geschlechts auf die Immunfunktion

Neben dem Alter beeinflusst auch das Geschlecht die Funktion des Immunsystems. Eine Vielzahl von Studien haben bereits gezeigt, dass Frauen bei Antigenstimulation im Rahmen von Impfungen oder Infektionen eine stärkere humorale sowie zelluläre Immunantwort aufweisen als Männer (Klein et al., 2010, Nalbandian and Kovats, 2005, Ruggieri et al., 2016). Auch im Rahmen der aktuellen Covid-19-Pandemie zeigen Studien einen geschlechtsabhängigen Einfluss auf das Infektionsrisiko (Ya'qoub et al., 2021). Männer haben ein erhöhtes Risiko, an Covid-19 zu erkranken im Vergleich zu Frauen (Guan et al., 2020, Jin et al., 2020, Ya'qoub et al., 2021). Ebenso ist das Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf und das Mortalitätsrisiko für Männer erhöht (Jin et al., 2020, Meng et al., 2020, Vahidy et al., 2021, Ya'qoub et al., 2021). Auf der anderen Seite leiden Frauen häufiger an den

Konsequenzen einer verstärkten oder gar dysregulierten Immunantwort, wie z.B. Autoimmunerkrankungen (Voskuhl, 2011, Okoro and Kane, 2009).

Zum einen spielen Sexualhormone eine wichtige Rolle für die Entstehung der Geschlechtsunterschiede in der Immunfunktion. Sowohl T- als auch B-Zellen exprimieren Rezeptoren für Östrogen, Progesteron und Testosteron. Allgemein werden Progesteron und Androgene als immunsuppressiv und Östrogen als immunstimulierend angesehen (Klein et al., 2015). Der Effekt der Hormone auf die Zellen des erworbenen Immunsystems ist dosisabhängig. So verändert sich der Einfluss von Östrogen und Progesteron auf die Immunfunktion im Laufe des Menstruationszyklus. In der Lutealphase, in der die Östrogenkonzentration niedriger und Progesteron führend ist, wurde eine vermehrte T_H1 -Polarisation beobachtet. In der Follikularphase hingegen führen höhere Östrogenspiegel zu einer verstärkten Produktion von T_H2 -Zytokinen (Klein et al., 2015). Die veränderten Hormonlevel während der Schwangerschaft können den Verlauf von Autoimmunerkrankungen ebenfalls stark beeinflussen (Moulton, 2018). Die erhöhte Östrogenkonzentration bewirkt eine T_H2 -Polarisation, was im Falle des systemischen Lupus erythematoses zu einem Krankheitsschub führen kann. In anderen Fällen, wie der Multiplen Sklerose oder der Rheumatoiden Arthritis, beides Erkrankungen vor allem vermittelt durch T_H1 -Zellen, kommt es im Rahmen einer Schwangerschaft zur Remission (Moulton, 2018). Darüber hinaus fördert Östrogen die Antikörperproduktion durch B-Zellen, während Progesteron und Testosteron einen hemmenden Einfluss haben (Furman et al., 2014). Auch auf das angeborene Immunsystem hat Östrogen einen Einfluss. So bewirkt das Hormon eine verstärkte Zytokinproduktion durch dendritische Zellen, was wiederum die Aktivierung von T-Lymphozyten unterstützt (Griesbeck et al., 2015, Bouman et al., 2005, Ruggieri et al., 2016).

Neben dem hormonellen Einfluss auf das Immunsystem sind auch genetische Unterschiede zwischen den Geschlechtern von Bedeutung. Auf dem X-Chromosom befinden sich mehrere Gene mit Bedeutung für das Immunsystem, darunter die Toll-like-Rezeptoren 7 und 8 oder der Transkriptionsfaktor FoxP3 (Hewagama et al., 2009, Moulton, 2018). Daneben finden sich auf dem X-Chromosom 113 microRNAs (miRNAs). miRNAs sind etwa 22 Nukleotide lange nicht kodierende RNA-Moleküle, die mRNAs mit komplementären Nukleotidsequenzen binden und so deren Translation verhindern können. Auf diese Weise kann die Expression immunsuppressiver Gene wie FoxP3 oder CTLA4 posttranskriptionell reguliert werden. Auf dem Y-Chromosom hingegen finden sich nur zwei miRNA-Moleküle (Moulton, 2018).

Obwohl die Untersuchung geschlechtsabhängiger Unterschiede in der Immunfunktion vermehrt in den Fokus der Forschung gerutscht ist, ist noch Vieles im Unklaren geblieben. Mögliche Unterschiede in der Expression von Zytokinen und Korezeptoren durch Immunzellen müssen berücksichtigt werden,

wenn es um das Verständnis der Pathogenese immunvermittelter Erkrankungen sowie um die Entwicklung von Immuntherapien geht.

Fragestellung

Kostimulatorische und koinhibitorische Moleküle vermitteln Signale, die das Schicksal einer T-Zelle nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors entscheiden. Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle in der T-Zell-vermittelten Immunantwort sind kostimulatorische und koinhibitorische Rezeptoren interessante Zielstrukturen für Immuntherapien. Antagonistische CTLA-4- und PD-1/PD-L1-Antikörper werden bereits zur Therapie verschiedenster Tumorentitäten verwendet. Auch die Korezeptoren TIGIT und CD96 sind im Zusammenhang mit der Therapie maligner Tumoren in den Fokus wissenschaftlicher Studien geraten (Blake et al., 2016a, Blake et al., 2016b, Mittal et al., 2019, Harjunpää and Guillerey, 2020, Stamm et al., 2019, Dougall et al., 2017). Inzwischen werden Immuncheckpoints auch als mögliche therapeutische Zielstrukturen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen behandelt. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von CTLA-4-Antikörpern wie Ipilimumab und PD-1-Antikörpern wie Nivolumab sind aufgrund der Desinhibition der T-Zellen vielfältige Autoimmunerkrankungen, die Haut, Pankreas, Leber, Nieren, Gastrointestinaltrakt sowie das endokrine System betreffen können (Boutros et al., 2016). Da Immuncheckpoints wie CTLA-4 und PD-1 so wichtig für die zentrale und periphere Toleranzentwicklung sind, werden Therapeutika mit diesem Ansatzpunkt auch bei Autoimmunerkrankungen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, eingesetzt (Qin et al., 2019).

Um geeignete therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren, ist ein genaues Verständnis des Expressionsverhaltens und der funktionellen Auswirkung dieser Korezeptoren auf verschiedene Immunzellen in unterschiedlichen Kontexten, wie im Rahmen des Alterungsprozesses sowie im Rahmen geschlechtsbedingter Einflüsse und verschiedener Erkrankungen, unentbehrlich. Für CD226, TIGIT und auch CD96 wurde bereits mehrfach eine wichtige Rolle für die Tumorkontrolle und immunvermittelte Erkrankungen postuliert (Iguchi-Manaka et al., 2008, Gilfillan et al., 2008, Chan et al., 2010, Nabekura et al., 2010, Xiong et al., 2015, Chauvin et al., 2015, Johnston et al., 2014, Mittal et al., 2019, Dougall et al., 2017). Somit sind diese drei Korezeptoren durchaus vielversprechende therapeutische Targets. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, die Auswirkung von Alter und Geschlecht auf die Expression von CD226, CD96 und TIGIT zu untersuchen. Daneben sollte der Einfluss verschiedener Stimulationsprotokolle auf die Korezeptorexpression analysiert und der Verlauf der CD96-Expression im Rahmen der T-Zell-Differenzierung beleuchtet werden. Ein weiteres Ziel war es zu ergründen, ob CD226 und CD96 einen Einfluss auf die IL-9-Produktion haben, da IL-9 ein wichtiges Zytokin für die Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen wie CED ist. Schließlich habe ich CED-

Patienten und gesunde Probanden bezüglich der Korezeptorexpression und IL-9-Produktion verglichen.

Material und Methoden

Material

Antikörper

Tabelle 3 Antikörper

	Antigen	Klon	Reaktivität	Fluorochrom	Hersteller	Verdünnung	IZ/OF
Basis beider Panel	CD4	OKT4	Human	BV510	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:20 in 100µl FV	IZ
	CD96	NK92.39	Human	BV421	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:20 in 100µl FV	OF
	IL-9	MH9A4	Human	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:100 in 100µl FV	IZ
	TCRαβ	IP26	Human	AF700	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:20 in 100µl FV	OF
Panel 1	CD226	11A8	Human	APC	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:50 in 100 µl FV	OF
	CD25	2A3	Human	BV605	BD Biosciences, Heidelberg, Deu	1:20 in 100µl FV	OF
	PD-1	MIH4	Human	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deu	1:50 in 100 µl FV	OF
	TIGIT	MBSA43	Human	PerCP-eF710	eBioscience, jetzt Thermo Fisher	1:20 in 100µl FV	OF
	TIM-3	F38-2E2	Human	APC-eF780	eBioscience, jetzt Thermo Fisher	1:20 in 100µl FV	OF
Panel 2	CCR7	G043H7	Human	BV605	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:8 in 80µl FV	OF
	CD45RA	HI100	Human	FITC	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:20 in 100µl FV	OF
	IFNγ	B27	Human	PerCP-Cy5.5	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:20 in 100µl FV	IZ
	IL-4	MP4-25-D2	Human	APC	Biolegend, San Diego, CA, USA	1:20 in 100µl FV	IZ
	IL-17A	eBio64DEC17	Human	APC-eF780	eBioscience, jetzt Thermo Fisher	1:500 in 100 µl FV	IZ

FV = Färbevolumen; IZ = intrazelluläre Färbung; OF = Oberflächenfärbung

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DEU
Beriglobin	Biochrom, Berlin, DEU
Biocoll Separating Solution	Biochrom, Berlin, DEU
Brefeldin A	SIGMA-Aldrich, St-Louis, MO, USA
Concanavalin A (ConA)	SIGMA-Aldrich, St-Louis, MO, USA
CytoFlex Daily QC Fluorospheres	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Cytoflex Sheath Fluid	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Endotoxinfreies Wasser	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Ethanol absolut	J.T. Baker, Deventer, NLD
Fetales Kälberserum (FCS) Lot 605C	Biochrom, Berlin, DEU
FlowClean Cleaning Agent	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Ionomycin Calcium salt	Biotrend Chemikalien, Köln, DEU
Natriumazid (NaN₃)	SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml / 10.000µg/ml	Biochrom, Berlin, DEU
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phytohämagglutinin-P (PHA)	InvivoGen, San Diego, CA, USA
Streptococcus enterotoxin B (SEB)	SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau-Lösung 0,4 %	SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA
VLE RPMI 1640 Medium mit stabilem Glutamin und sehr wenig Endotoxin	Biochrom, Berlin, DEU
Wasserbadschutz Akasolv Aqua Care	Akadia Chemie, Mannheim, DEU
Zombie UV Fixable Viability Kit	Biolegend, San Diego, MA, USA

Geräte

Tabelle 5 Geräte

Geräte	Bezeichnung
Biohit Sicherheitswerkbank Antares 48	Biohit, Helsinki, FI
Computer Esprimo D956/E85+ DTF	Fujitsu Technology Solutions, München DEU
Computer ThinkCentre M83	Lenovo, Bratislava, Slowakei
Dampfsterilisator Serie EC	Webeco, Selmsdorf, DEU
Durchflusszytometer Cytoflex S	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Bulle, CHE
GFL Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel, DEU
Heraeus HeraCell CO₂ Inkubator	Heraeus, Hanau, DEU
Heraeus Multifuge X3R Zentrifuge	Heraeus, Hanau, DEU oder ThermoFisher
INTEGRA VACUSAFE Absaugsystem	INTEGRA Biosciences, Zizers, CHE
Kühlschränke	Liebherr, Bulle, CHE
Laborwaage PT150	Sartorius, Göttingen, DEU
Lichtmikroskop Nikon TMS	Nikon, Tokio, Japan
Mikrozentrifuge Galaxy Mini	VWR International, Darmstadt, DEU
Multipipette Plus	Eppendorf, Hamburg, DEU
NUAIRE Biological Safety Cabinet Class II Modell NU 440-400E	NUAIRE, Plymouth, MN, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences, Zizers, CHE
Pipette Reference 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipette Reference 20 – 200 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipette Reference 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipette Research 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipette Research 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipette Research 10 – 200 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Pipette Research 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DEU
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, DEU
Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Zählkammer Neubauer improved	Laboroptik, Lancing, GBR

Puffer und Medien

Table 6 Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS + 2 % FCS + 0,3 % NAN3
Inkubationsmedium	VLE RPMI 1640 Medium mit stabilem Glutamin und sehr wenig Endotoxin + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin

Software

Table 7 Software

Software	Entwickler
CytExpert Software für CytoFLEX	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Kaluza Analysesoftware Version 2.1	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

Verbrauchsmaterialien

Table 8 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
5 ml FALCON Polystyren Rundboden-Röhrchen mit und ohne Deckel	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
14 ml FALCON Polypropylen Rundboden-Röhrchen	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
15 ml FALCON Polypropylen, besonders klar, konisches Röhrchen	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
50 ml FALCON Polypropylen, besonders klar, konisches Röhrchen	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
BD Vacutainer Plasmaröhrchen Li-Heparin 10 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
BD Vacutainer Safety Lock Blutentnahmeset + Halter	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
96-Loch-Rundboden-Platte	SARSTEDT, Nümbrecht, DEU
FALCON 96-Loch-Rundboden-Platte	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
FALCON 96-Loch-Flachboden-Platte	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
FALCON Serologische Pipette 5, 10 und 25 ml	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
Handschuhe Vasco Nitril	B. Braun Melsungen, Melsungen, DEU
Pipettenspitze Micro Tips 2,5µl	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, DEU
Pipettenspitzen 10 µl/ 200 µl/ 1000 µl	SARSTEDT, Nümbrecht, DEU
Reagiergefäß 2,0 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, DEU
Safe-Lock Tubes 1,5 ml, amber	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
SafeSeal Gefäß 0,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, DEU
SafeSeal Gefäß 1,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, DEU
Transferpipette 3,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, DEU
VACUETTE Blutentnahmeröhrchen Li-Heparin, 9 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
VACUETTE Safety Blutentnahmeset + Halter	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Versuchskit

Tabelle 9 Versuchskit

Bezeichnung	Hersteller
FoxP3 Staining Buffer Set	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, DEU

Methoden

Blutentnahme

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin bewilligt (Ethikvoten EA4/124/17 und EA1/293/16). Alle gesunden Probanden und CED-Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben, haben uns schriftlich ihre Einwilligung mitgeteilt. Jedem Blutspender wurden zwischen 20 und 50 ml peripher venöses Blut in Heparin-Röhrchen abgenommen. Es wurden Blutproben von insgesamt 54 gesunden Probanden und 37 CED-Patienten zwischen 19 und 68 Jahren untersucht. Die gesunden Probanden wurden in 5 Altersgruppen unterteilt (20-29 Jahre, 30-39 Jahre, 40-49 Jahre, 50-59 Jahre und 60-69 Jahre). Das Verhältnis zwischen dem männlichen und weiblichen biologischen Geschlecht war in jeder Altersgruppe ausgeglichen. Die gesunden Probanden waren von europäisch-kaukasischer Ethnizität. Die Studienteilnehmer wurden als gesund definiert, wenn sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine symptomatischen Infektionen oder entzündlichen Erkrankungen aufwiesen. Die CED-Patienten wurden an der Klinik für Gastroenterologie am Campus Benjamin Franklin der Charité rekrutiert. Eingeschlossen wurden Patienten, die dort aufgrund einer Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn-Erkrankung entweder ambulant oder stationär in Behandlung waren. Ein CED-Patient stammt aus dem persönlichen Bekanntenkreis und ist kein Patient der Klinik für Gastroenterologie am Campus Benjamin Franklin der Charité. Für die statistische Analyse wurden Patienten ausgeschlossen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme oder bis zu vier Monate vor der Blutentnahme mit Vedolizumab oder Ustekinumab behandelt worden sind. Ein CED-Patient wurde ebenfalls ausgeschlossen, da er zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter 20 Jahre alt war. Die für die weitere Auswertung berücksichtigten Patienten zwischen 20 und 69 Jahren wurden mit Glukokortikoiden, klassischen Immunsuppressiva bzw. DMARDs oder Anti-TNF α -Antikörpern behandelt. Zum Vergleich mit den CED-Patienten wurden gesunde Probanden ausgewählt, die den CED-Patienten in Alter und Geschlecht entsprachen. Die CED-Patienten wurden in verschiedene Behandlungsgruppen unterteilt. Patienten, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowie bis zu vier Monate zuvor keine Therapie erhalten haben, wurden als Patienten ohne Therapie eingestuft. Patienten, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowie bis zu vier Monate zuvor mit DMARDs und/oder Prednisolon behandelt wurden, wurden in eine weitere Gruppe zusammengeschlossen, die nachfolgend der Einfachheit halber nur als „DMARD“-Gruppe bezeichnet wird. Als letzte Gruppe wurden Patienten mit einer Anti-TNF α -Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowie bis zu vier

Monate zuvor definiert. Patienten, die sowohl DMARDs als auch Anti-TNF α -Antikörper erhielten, wurden zur Anti-TNF α -Gruppe gezählt.

Tabella 10 Gesunde Probanden

	Männer		Frauen		Insgesamt	
	N	Mittleres Alter	n	Mittleres Alter	N	Mittleres Alter
20 – 29 Jahre	7	26,14	8	24	15	25
30 – 39 Jahre	6	33,8	5	33,2	11	33,54
40 – 49 Jahre	5	44,2	5	44,2	10	44,2
50 – 59 Jahre	4	55,5	5	52,8	9	54
60 – 69 Jahre	4	61,8	5	64,25	9	62,89
Insgesamt	26	41,77	28	41,14	54	41,44

Tabella 11 Überblick Altersverteilung und Verteilung des biologischen Geschlechts

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	CED	Gesunde Kontrolle
Frauen	4	2	6	6
Männer	11	9	20	15
Insgesamt	15	11	26	21
Mittleres Alter	37,93	36	37,11	36

Tabella 12 CED-Patienten – Überblick Behandlungsgruppen

	Ohne Therapie (w/o)		DMARD/Prednisolon		Anti-TNF α -Therapie	
	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Frauen	2	1	1	-	1	1
Männer	2	-	2	2	7	7
Insgesamt	4	1	3	2	8	8
Mittleres Alter	37	27	37,67	36,5	39,25	43,13

Tabelle 13 Colitis ulcerosa Patienten

	Altersgruppe	Biologisches Geschlecht	Entität	Lokalisation	Krankheitsaktivität	Therapie	Therapie bis 4 Monate vor BE
1	20 – 29	W	CU	k.A.	k.A.	keine	Keine
2	40 – 49	M	CU	E3	PMS 2	Azathioprin	Keine
3	20 – 29	M	CU	E3	k.A.	Prednisolon Tacrolimus	Keine
4	20 – 29	M	CU	E3	PMS 0	Anti TNF	Keine
5	40 – 49	M	CU	E3	PMS 0	Anti TNF Azathioprin	Keine
6	40 – 49	M	CU	E3	PMS 0	Anti-TNF Azathioprin	Keine
7	30 – 39	M	CU	E2	PMS 0	Anti-TNF Prednisolon	Keine
8	50 – 59	M	CU	E3	PMS 0	Anti-TNF 5-ASA	Keine
9	20 – 29	M	CU	E2	PMS 0	Anti-TNF	Keine
10	40 – 49	W	CU	E3	k.A.	Tacrolimus	Ciclosporin Anti TNF
11	40 – 49	M	CU	E3	k.A.	Prednisolon Tacrolimus 5-ASA	Anti TNF
12	< 20	M	CU	E3	PMS 1	Anti TNF Azathioprin	Keine
13	60 – 69	W	CU	E2	PMS 0	Vedolizumab Azathioprin 5-ASA	Keine
14	30 – 39	M	CU	E3	PMS 0	Vedolizumab 5-ASA	None
15	40 – 49	W	CU	E3	PMS 1	Vedolizumab Azathioprin	Anti TNF
16	30 – 39	M	CU	E3	PMS 0	Vedolizumab 5-ASA	Keine
17	30 – 39	W	CU	E2	PMS 0	Vedolizumab 5-ASA	Keine
18	50 – 59	M	CU	E2	PMS 0	Vedolizumab 5-ASA MTX	Keine
19	50 – 59	M	CU	E2	PMS 0	Anti TNF 5-ASA	Vedo

BE = Blutentnahme; k.A. = keine Angaben; fett gedruckte Patienten sind in der Auswertung berücksichtigt worden

Tabelle 14 Morbus Crohn Patienten

	Altersgruppe	Biologisches Geschlecht	Entität	Lokalisation	Krankheitsverhalten	Krankheitsaktivität	Therapie	Therapie bis 4 Monate vor BE
1	30 – 39	M	MC	L3	B3	k.A.	keine	Keine
2	40 – 49	M	MC	L3	B4	HBI 6	keine	Keine
3	30 – 39	W	MC	L2	B1	HBI 0	keine	Keine
4	30 – 39	W	MC	L1	B1	HBI 3	keine	Keine
5	30 – 39	M	MC	L1	B3	HBI 1	Azathioprin	Keine
6	40 – 49	W	MC	L3	k.A.	k.A.	Azathioprin	Keine
7	30 – 39	M	MC	k.A.	k.A.	HBI 14	Prednisolon	Keine
8	50 – 59	W	MC	k.A.	k.A.	HBI 4	keine	Anti-TNF
9	40 – 49	M	MC	L4	B2	k.A.	keine	Anti-TNF
10	40 – 49	M	MC	L2	k.A.	HBI 1	Anti-TNF	Keine
11	20 – 29	M	MC	L3, L4	B2	HBI 1	Anti-TNF	Keine

12	30 – 39	M	MC	L3	B1	HBI 1	Anti-TNF Prednisolon	Keine
13	30 – 39	M	MC	L1	B2	HBI 2	Anti-TNF	Keine
14	30 – 39	M	MC	L3	B1	HBI 3	Anti-TNF	Keine
15	30 – 39	M	MC	L3, L4	B2	HBI 0	Anti-TNF	Keine
16	20 – 29	W	MC	L2, L4	B2, B3, B4	HBI 1	Prednisolon Ustekinumab	Anti TNF
17	20 – 29	W	MC	L4	k.A.	HBI 0	Ustekinumab Azathioprin	Keine
18	50 – 59	M	MC	L3	B1	HBI 3	Vedolizumab	Hydrocortison

BE = Blutentnahme; k.A. = keine Angaben; fett gedruckte Patienten sind in der Auswertung berücksichtigt worden

Zellkultur

Zur Vermeidung von Kontamination wurde die PBMZ-Isolation und -Stimulation an der Sterilbank durchgeführt.

PBMC-Isolation

Das frisch abgenommene heparinisierte Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. In jedes verwendete 14 ml FALCON-Polypropylen-Rundbodenröhrchen wurden 3 ml Biocoll-Trennlösung abgefüllt. Die Trennlösung wurde anschließend vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen für 20 Minuten mit 840xg bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Die durch die Zentrifugation entstandenen Leukozytenringe in der Interphase zwischen Blutplasma und der Trennlösung, die die peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMZs) enthalten, wurden mit Einwegpasteurpipetten geerntet, in einem 50 ml FALCON-Röhrchen gesammelt und mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. Anschließend wurden die FALCON-Röhrchen mit den PBMZs für 10 Minuten mit 300xg bei 20°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt und das Zellpellet in 30ml PBS gelöst und nochmals wie im Schritt zuvor zentrifugiert.

Bestimmung der Zellzahl

Das durch die zweite Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in 10 ml RPMI1640-Medium gelöst. Das RPMI1640-Medium wurde mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt. Das FCS wurde zuvor bei 56°C inaktiviert. Die im Medium enthaltenen Zellen wurden mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer unter Zugabe von 0,4 % Trypanblaulösung zur Unterscheidung von toten und vitalen Zellen gezählt. Dazu wurden 25 µl der PBMZ-Zellsuspension mit PBS im Verhältnis 1:5 und dann mit Trypanblau im Verhältnis 1:2 verdünnt. Tote Zellen nehmen wegen ihrer gestörten Membranintegrität den Farbstoff auf und erscheinen unter dem Mikroskop im Gegensatz zu lebenden Zellen dunkel. Unter einem 40fach-Objektiv eines Mikroskops wurden vier Felder ausgezählt. Der Durchschnittswert wurde mit dem Verdünnungsfaktor (10) und dem Kammerfaktor (10^4)

multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu ermitteln. Anschließend wurde die Zellzahl auf 5×10^6 Zellen pro ml eingestellt.

PBMZ-Stimulation

5×10^6 Zellen gelöst in 1 ml RPMI 1640-Medium mit Zusätzen in einem Eppendorf-Tube wurden mit oder ohne 50 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat und 1 ng/ml Ionomycin (Iono gelöst in absolutem Ethanol) für 6 Stunden bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. PMA ist als Struktur analogon von Diacylglycerol in der Lage die Proteinkinase C zu aktivieren, während Ionomycin als Ionophor die intrazelluläre Calciumkonzentration steigern kann. Zusätzlich wurden 1×10^6 Zellen in 200 µl Medium pro Vertiefung einer 96-well-U-Bottom-Platte mit entweder 1 µg/ml PHA-P (Phytohämagglutinin-P gelöst in endotoxinfreiem Wasser) oder 1 µg/ml SEB (Staphylococcus Entertoxin B gelöst in PBS) stimuliert. Ebenso wurden 5×10^5 Zellen in 200 µl Medium pro Vertiefung einer 96-well-Flachboden-Platte mit 10 µg/ml ConA behandelt. Die Zellen stimuliert mit PHA, SEB und ConA (Concanavalin A gelöst in PBS) wurden für 24 Stunden bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. PHA gewonnen aus der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) und Concanavalin A sind Lektine, die mehrere Glykoproteine an der Zelloberfläche binden und so eine Agglutination von Zellen, auch Lymphozyten, bewirkt. Dies führt schließlich zur Aktivierung und Proliferation dieser Zellen. SEB auf der anderen Seite vermittelt als Superantigen die Bindung von T-Zell-Rezeptoren an MHC II-Komplexe und aktiviert auf diese Weise die T-Zellen. Vier Stunden vor der Ernte werden die Zellen zusätzlich mit 10 µg/ml Brefeldin A (gelöst in absolutem Ethanol) behandelt. Brefeldin A wird vom Pilz *Eupenicillium brefeldianum* produziert. Es induziert einen retrograden Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dadurch kommt es zur Akkumulation von Proteinen, unter anderem Zytokinen, im ER.

Durchflusszytometrie

Prinzip der Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie, auch FACS (fluorescence activated cell sorting) genannt, dient der quantitativen Analyse der Expression von oberflächlichen und intrazellulären Proteinen durch Zellen in flüssigem Medium. Zur Detektion werden die gewünschten Moleküle mit spezifischen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Die Fluorochrome werden im Durchflusszytometer durch Laserlicht eines definierten Wellenlängenbereiches angeregt und das von den Fluorochromen emittierte Licht wird von Detektoren nachgewiesen. Die einzelnen Fluorochrome werden anhand ihrer unterschiedlichen Emissionsspektren identifiziert. Durch die Zelle selbst wird das Licht ebenfalls vorwärts (forward scatter, FSC) und seitwärts (side scatter SSC) gestreut. Der FSC kann zur Bestimmung der Zellgröße verwendet werden, der SSC hingegen zur Bestimmung der Granularität der Zelle.

Live/Dead-Färbung und Fc-Rezeptorblock

Nach der Ernte wurden die mit PMA/Iono, PHA, ConA oder SEB stimulierten sowie unstimulierte Zellen auf je zwei Eppendorf-Tubes verteilt. Eine Hälfte der Färbeansätze wurde mit Antikörpern des Panels 1 und die andere Hälfte mit Antikörpern des Panels 2 behandelt. Die bis zu 5×10^6 Zellen pro Färbeansatz wurden zunächst 5 Minuten mit 300xg bei 4°C herunterzentrifugiert und anschließend mit je 1 ml PBS gewaschen (5 Minuten mit 300xg bei 4°C). Zombie-UV-Farbstoff wurde mit PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt. Zu den Zellen wurden 100 µl des verdünnten Zombie-UV-Farbstoffs gegeben und 15 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert. Der Farbstoff bindet freie Aminogruppen von Proteinen. Tote Zellen weisen keine intakte Zellmembran mehr auf, wodurch der Farbstoff nicht nur Aminogruppen extrazellulärer sondern auch intrazellulärer Proteine bindet. Dadurch sind tote Zellen durch eine höhere Fluoreszenz gekennzeichnet und können von lebenden Zellen unterschieden werden. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 Minuten mit 300xg bei 4°C). FACS-Puffer besteht aus PBS versetzt mit 10 % FCS und 1 % Natriumazid zusammen. Als nächstes wurden die Zellen mit 160 µg Beriglobin (Originalkonzentration 160 mg/ml, verdünnt 1: 50 in FACS-Puffer) pro Färbeansatz, humanen Immunglobulinen behandelt. Dadurch werden freie Fc-Rezeptoren blockiert und die unspezifische Bindung von Antikörpern später verhindert. Zusammen mit dem Beriglobin wurden die Zellen für 5 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Oberflächenfärbung

Die Oberflächenantikörper für Panel 1 wurden nach der Inkubation mit Beriglobin zu den entsprechenden Färbeansätzen gegeben und 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Das Färbevolumen wurde dazu mit FACS-Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Die Färbeansätze für das Panel 2 wurden zunächst 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit dem CCR7-bindenden Oberflächenantikörper in einem Färbevolumen von 80 µl inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die restlichen Oberflächenantikörper des Panel 2 hinzugegeben und für weitere 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 Minuten mit 300xg bei 4°C), um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Intrazelluläre Färbung

Vor der intrazellulären Färbung wurden die Zellen mit dem FOXP3 Staining Buffer Set von Miltenyi Biotec fixiert und permeabilisiert. Der Fixierungsprozess immobilisiert Antigene und erhält gleichzeitig zelluläre und subzelluläre Strukturen. Paraformaldehyd (PFA) ist eine häufig zum Fixieren verwendete Substanz. Es verbindet benachbarte Makromoleküle durch Bindung an Aminogruppen. Außerdem löst es einige Lipide aus der Zellmembran. Bei der Permeabilisierung werden mehr Lipide aus der Membran entfernt, sodass Poren entstehen, durch die Antikörper in die Zelle gelangen können. Die Zellen

wurden zunächst 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit einer Fixations/Permeabilisierungs-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 750 µl FACS-Puffer und dann mit 500 µl Permeabilisierungs-Puffer gewaschen (5 Minuten mit 500xg aufgrund der kleineren Zellgröße bei 4°C). Als nächstes wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln mit den intrazellulären Antikörpern in einem Gesamtfärbivolumen von 100 µl inkubiert und dann mit 500 µl Permeabilisierungs-Puffer gewaschen. Am Ende wurden die Zellen mit 200µl FACS-Puffer versetzt und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln in FACS-Tubes gelagert.

Messung und Auswertung

Die Proben wurden am Cytoflex S (Beckman Coulter) gemessen und anschließend mit der Kaluza-Software ausgewertet. Die Laserkonfiguration des Cytoflex S ist in Tabelle 15 dargestellt. Tote Zellen sowie Dubletten wurden bei der Datenauswertung nicht berücksichtigt (Abbildung 6).

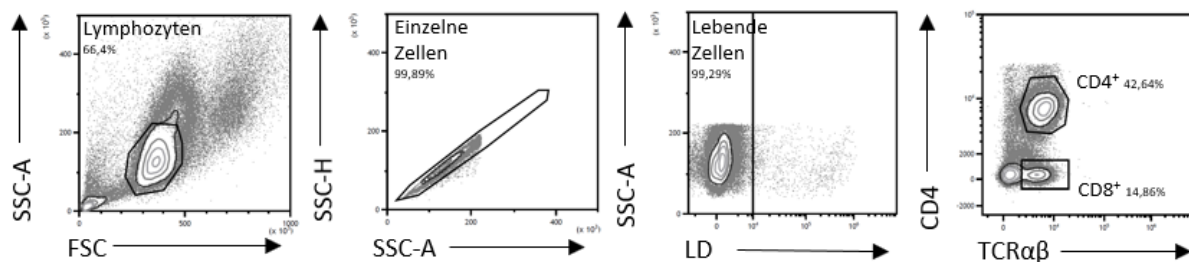


Abbildung 6 Hierarchisches Vorgating. LD= Live/Dead-Färbung. SSC-A= Side scatter- area. SSC-H= Side scatter- height. FSC= Forward scatter.

Tabelle 15 Laserkonfiguration des Cytoflex S

Laser	Filter	Fluorochrom
Violet 405 nm	405/10	-
	450/45	BV421
	525/40	BV519
	610/20	BV605
	660/20	-
	780/60	-
NUV 375 nm	405/10	-
	525/40	Zombie UV Viability
	740/35	-
Red 638 nm	712/25	AF700
	780/60	APC-eF780
	660/20	APC
Blue 488 nm	488/8	SSC
	610/20	-
	585/42	PE
	525/40	FITC
	690/50	PerCP-Cy5.5/ PerCP-eF710
	780/60	-

Statistik

Die gezeigten Daten wurden mittels Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil dargestellt. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil – 1,5-fachen IQR. Ausreißer wurden als Punkte dargestellt. Der nicht-parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde zum Vergleich von zwei gepaarten Stichproben verwendet. Zwei ungepaarte Stichproben wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests analysiert. Mehr als zwei gepaarte Stichproben wurden mittels des nicht-parametrischen Friedman-Tests verglichen, während mehr als zwei ungepaarte Stichproben durch den nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Unterschiede geprüft wurden. Sowohl auf den Friedman-Test als auch auf den Kruskal-Wallis-Test folgte post hoc der Dunn's multiple comparison Test. Bei Vergleich von zwei Gruppenvariablen bezüglich einer abhängigen Variablen wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (two way ANOVA) verwendet. Nach der zweifaktoriellen Varianzanalyse folgte der Tukey's multiple comparison Test. P-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Analyse erfolgte mit der GraphPad8 Software.

Ergebnisse

Der Einfluss von Alter und biologischem Geschlecht auf die Expression der drei Korezeptoren CD226, CD96 und TIGIT auf humanen T-Zellen ohne und nach ex-vivo Stimulation von Immunzellen ist bisher kaum erforscht worden. Daher habe ich im Rahmen dieser Arbeit gesunde Probanden verschiedenen Alters und Geschlechts rekrutiert und die gewonnenen peripheren Blutmonozyten (PBMZ) auf die Expression von CD226, TIGIT und CD96 durchflusszytometrisch untersucht. CD96 ist von den drei Rezeptoren das bisher am wenigsten gut untersuchte Molekül. Deshalb habe ich analysiert, wie die Differenzierung einer naiven T-Zelle zur Effektor- und Gedächtnis-T-Zelle die Expression von CD96 beeinflusst. Im Mausmodell beeinflusste die CD96-Expression die proinflammatorischen Eigenschaften von IL-9-produzierenden T-Zellen (Stanko et al., 2018). Aus dem Grund überprüfte ich, welche Auswirkung die CD226- und CD96-Expression auf die Produktion von IL-9 durch humane T-Zellen hat. Da IL-9 neuerdings als wichtiges Zytokin für die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) gilt (Weigmann and Neurath, 2017), habe ich geprüft, ob CED-Patienten und gesunde Probanden sich in der Produktion von IL-9 unterscheiden. Außerdem untersuchte ich Veränderungen in der Expression von CD226, CD96 und TIGIT bei CED-Patienten.

Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Korezeptoren CD226, TIGIT und CD96

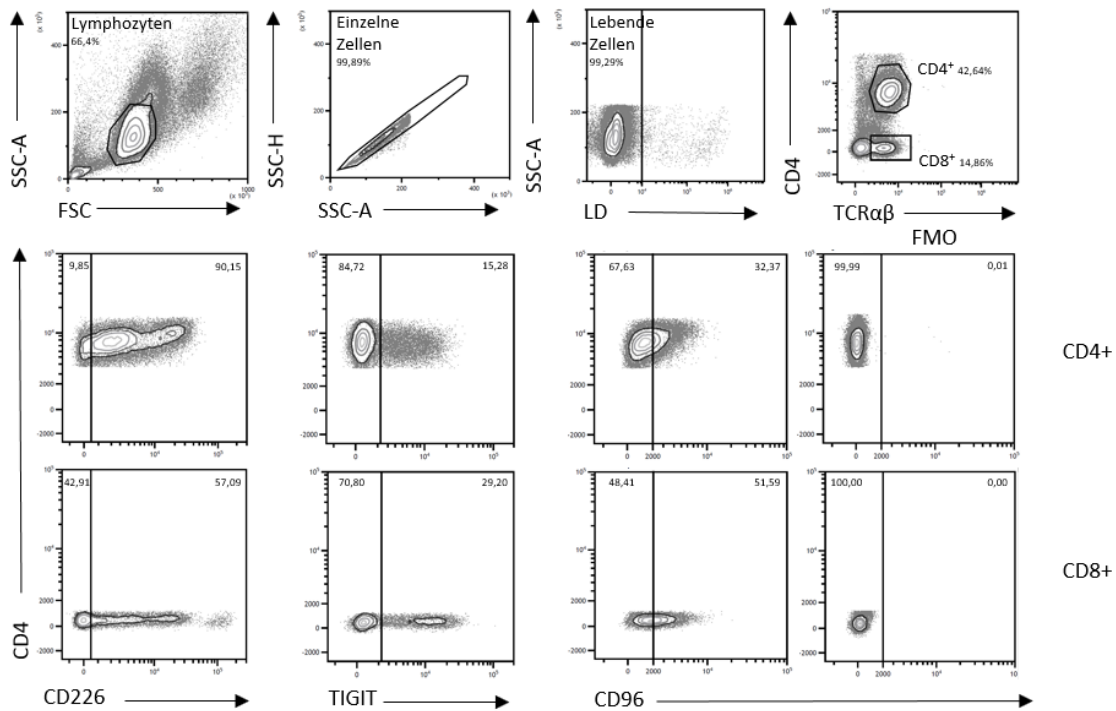


Abbildung 7 Beispielhafte Oberflächenfärbung für CD226, TIGIT und CD96 sowie FMO für CD96 auf unstimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. PBMZ eines gesunden Probanden analysiert mittels Durchflusszytometrie. FMO= Fluorescence minus one. LD= Live/Dead-Färbung. SSC-A= Side scatter- area. SSC-H= Side scatter- height. FSC= Forward scatter.

Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Oberflächenfärbung für CD226, TIGIT und CD96 auf unstimulierten T-Zellen eines gesunden Probanden. Im Vorgating wurden Zelldoubletten sowie tote Zellen aus der weiteren Auswertung ausgenommen. Die Grenze zwischen CD96⁺ und CD96⁻ T-Zellen wurde mithilfe einer FMO (fluorescence minus one) gesetzt, da die Trennung der beiden Populationen sonst nicht eindeutig festzustellen war.

Altersabhängige Änderungen der Rezeptorexpression bei gesunden Probanden

Es ist eine anerkannte Tatsache, dass sich neben dem angeborenen Immunsystem auch die Funktion

des erworbenen Immunsystems mit zunehmendem Alter verändert. Korezeptoren haben einen großen Einfluss auf die Aktivierung von Zellen des erworbenen Immunsystems (Mueller et al., 1989, Zhu et al., 2011). Daher habe ich im Rahmen dieser Arbeit untersucht, wie sich die Expression von CD226, TIGIT und CD96 mit dem Alter verändert.

Es wurden unstimulierte T-Zellen von 54 gesunden Probanden im Alter von 20 bis 69 Jahren mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ich stellte keine signifikanten Veränderungen der CD226- und CD96-Expression zwischen den verschiedenen Altersgruppen fest (Abbildung 8). Jedoch konnte ich eine deutliche Zunahme der Expression des koinhibitorischen Rezeptors TIGIT auf CD8⁺ T-Zellen nachweisen (Abbildung 8).

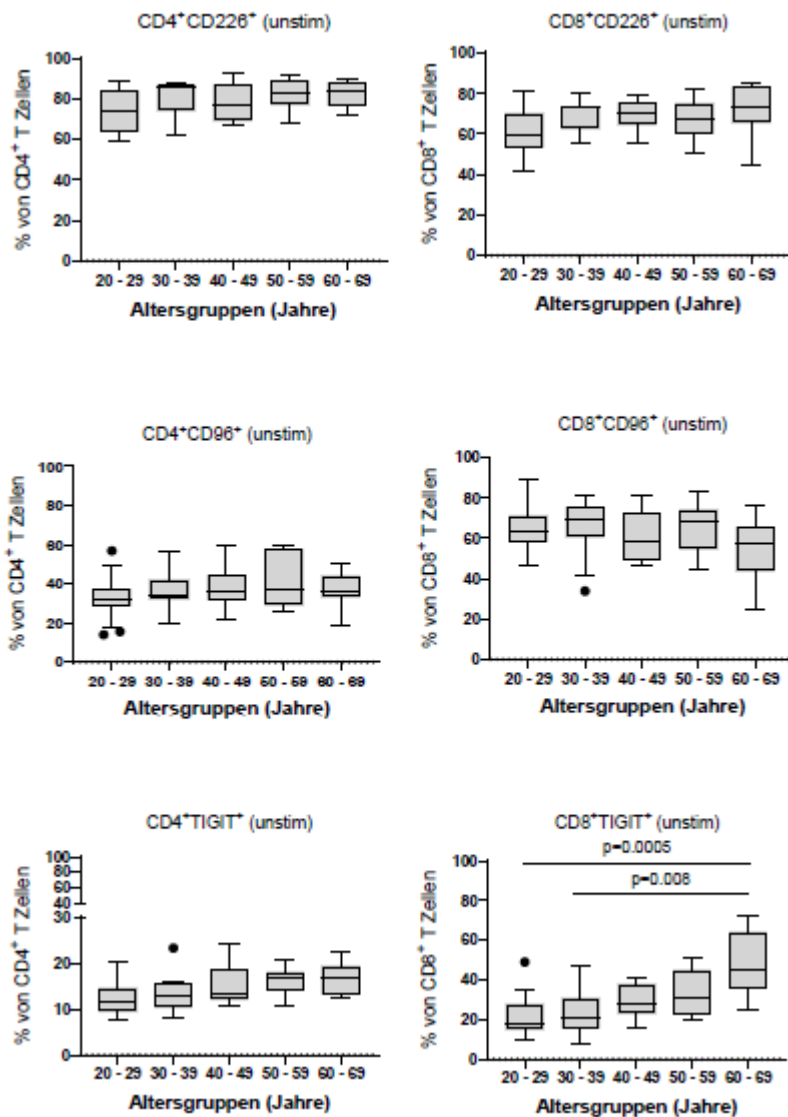


Abbildung 8 Vergleich der CD226-, CD96- und TIGIT- Expression auf unstimulierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. PBMZ von 54 gesunden Probanden unterschiedlichen Alters wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert Alters (Anzahl Probanden = 20-29: 15; 30-39: 11; 40-49: 110; 50-59: 9; 60-69: 9). Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil – 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Ein nicht-parametrischer Kruskal Wallis Test gefolgt vom Dunn's multiple comparison Test wurde angewandt.

Geschlechtsabhängige Unterschiede in der Rezeptorexpression bei gesunden Probanden

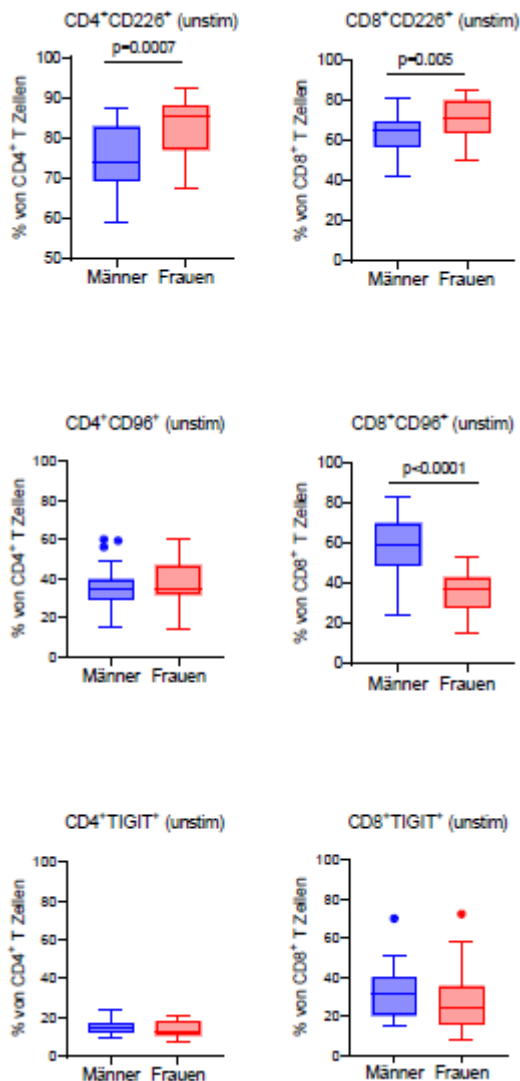


Abbildung 9 Vergleich der CD226, TIGIT und CD96 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwischen 28 Frauen und 26 Männern. Unstimulierte PBMZ gesunder Probanden wurden mit Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil - 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Es wurde ein nicht-parametrischer Mann Whitney Test angewendet.

Eine Vielzahl an Studien konnte zeigen, dass Frauen eine stärkere humorale und zelluläre Immunantwort bei Antigenstimulation aufweisen als Männer. (Ruggieri et al., 2016). Da die Funktion von T-Zellen stark von kostimulatorischen und koinhibitorischen Rezeptoren abhängt, ist es von Interesse, die Korezeptorexpression von CD226, TIGIT und CD96 zwischen Männern und Frauen zu vergleichen.

Es wurden T-Zellen von 28 gesunden Frauen und 26 gesunden Männern im Alter von 20 bis 69 Jahren mittels Durchflusszytometrie untersucht. Interessanterweise erkannte ich eine signifikant höhere Expression des kostimulatorischen Rezeptors CD226 bei Frauen sowohl auf CD8⁺ als auch auf CD4⁺ T-Zellen. Ebenfalls fiel mir eine signifikant geringere Expression des Korezeptors CD96 auf CD8⁺ T-Zellen, jedoch nicht auf CD4⁺ T-Zellen, auf. Die TIGIT-Expression hingegen wies keine geschlechtsabhängigen Unterschiede auf.

Einfluss von in-vitro-Stimuli auf die Expression von CD226, TIGIT und CD96

Es existieren eine Vielzahl an Stimulanzen, die sich zur in-vitro-Stimulation von T-Zellen eignen. Häufig verwendete Substanzen sind PMA/Ionomycin, Concanavalin A und Staphylococcus Enterotoxin B. Die drei genannten Substrate aktivieren T-Zellen über einen jeweils anderen Mechanismus. PMA ist ein Strukturanalogon von Diacylglycerol und ist in der Lage die Proteinkinase C zu aktivieren. Gemeinsam mit Ionomycin, einem Ionophor, welches die intrazelluläre Calciumkonzentration steigert, bewirkt PMA eine effektive T-Zell-Aktivierung (Ai et al., 2013). Concanavalin A hingegen ist ein Lectin, welches verschiedene Glykoproteine auf der Oberfläche von T-Zellen bindet und so eine Agglutination der Zellen verursacht (Wands et al., 1976). Staphylococcus Enterotoxin B ist ein Superantigen, das eine

unspezifische Bindung des T-Zellrezeptors an einen MHC-II-Komplex vermittelt und so die T-Zelle aktiviert (Pinchuk et al., 2010). Da diese drei Stimulanzen über verschiedene Modi / Signalwege wirken, ist es interessant zu analysieren, wie diese sich jeweils auf die Expression von CD226, CD96 und TIGIT auswirken. Dafür habe ich die T-Zellen von 54 gesunden Probanden mit ConA, SEB und PMA/Ionomycin stimuliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten zeigten, dass die Expression von CD226 auf CD4⁺ T-Zellen nach ConA-Stimulation signifikant herunterreguliert wurde im Vergleich zu unstimulierten und mit SEB beziehungsweise PMA stimulierten Zellen. Auf CD8⁺ T-Zellen hingegen wiesen mit ConA stimulierte Zellen eine höhere CD226-Expression auf als anders behandelte Zellen (Abbildung 10). Die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin bewirkte eine drastische Reduktion der CD96-Expression sowohl auf CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen. In geringerem Maße senkte eine Stimulation mit SEB die Expression von CD96 auf CD4⁺ T-Zellen, jedoch nicht auf CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 10). Wurden T-Zellen mit SEB oder ConA stimuliert, wurde die TIGIT-Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gesteigert (Abbildung 10).

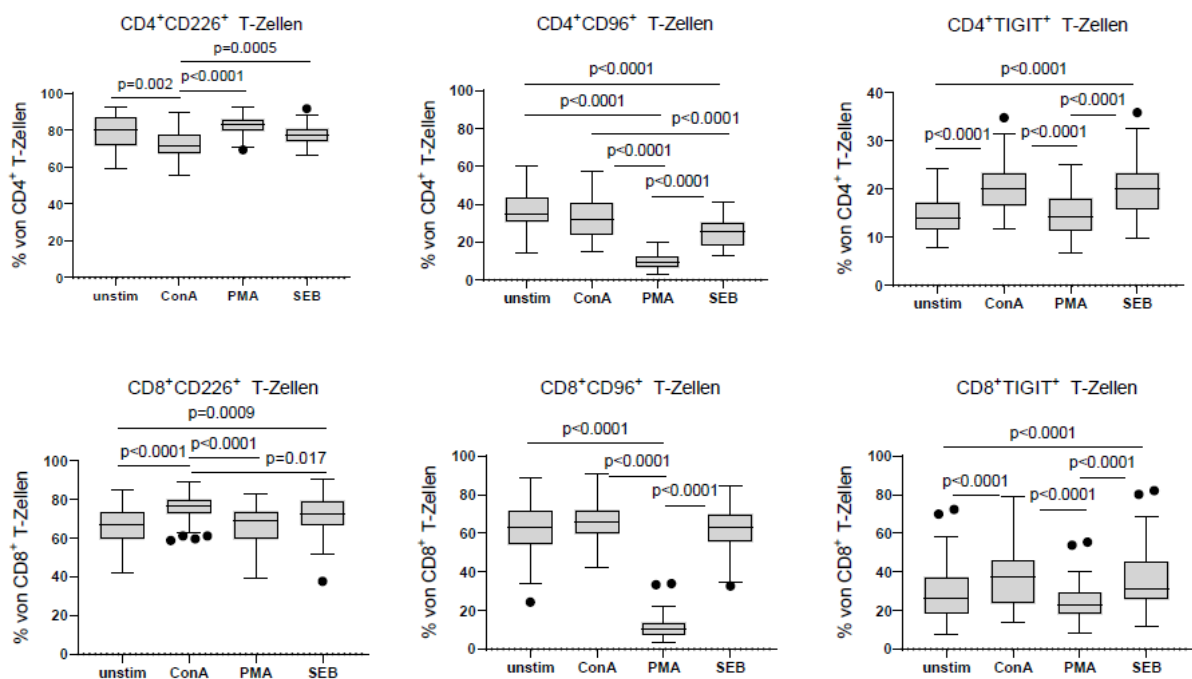


Abbildung 10 Vergleich der CD226, TIGIT und CD96 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. PBMZ von 54 gesunden Probanden wurden nach Stimulation mit verschiedenen *in vitro* Stimuli mittels Durchflusszytometrie analysiert. Unstim – unstimuliert, ConA – Concanavalin A (nach 24h Stimulation), PMA – PMA und Ionomycin (nach 6h Stimulation), SEB – Staphylococcus Enterotoxin B (nach 24h Stimulation). Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil – 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Ein nicht-parametrischer Friedman Test gefolgt vom Dunn's multiple comparison Test wurde angewandt.

Unterschiede in der differenzierungsabhängigen CD96-Expression zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Nach ihrer Aktivierung differenzieren sich naive T-Zellen (T_N) zu terminal differenzierten Effektor-T-Zellen (T_{EMRA}) und Gedächtnis-T-Zellen. Gedächtniszellen sind langlebige antigenspezifische T-Zellen, die für eine schnelle und verstärkte T-Zell-vermittelte Immunantwort bei Antigenreexposition verantwortlich sind. Gedächtnis-T-Zellen bilden eine heterogene Gruppe. Man unterscheidet die im peripheren Blut zirkulierenden zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}) und die Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) sowie die ausschließlich in peripheren Geweben auffindbaren gewebsresidenten Gedächtniszellen (T_{RM}) (Sallusto et al., 1999, Farber et al., 2014). T_{CM} exprimieren wie naive T-Zellen den Chemokinrezeptor CCR7 und sind daher in der Lage in lymphatisches Gewebe zu migrieren. Sie weisen eine deutlich höhere proliferative Kapazität auf als T_{EM} und sind ebenfalls durch eine stärkere IL-2-Produktion gekennzeichnet. T_{EM} hingegen sind CCR7-negativ und können daher nicht in lymphatischen Geweben aufgefunden werden. Stattdessen wandern diese Zellen in periphere Gewebe ein und sind zu einer deutlich höheren Produktion von Effektorzytokinen wie IFN γ und TNF α befähigt als T_{CM} (Farber et al., 2014). Gewebsresidente Gedächtniszellen (T_{RM}) differenzieren sich aus Effektor-T-Zellen oder Effektor-Gedächtniszellen, die in periphere Gewebe wie die Haut oder den Gastrointestinaltrakt eingewandert sind. Vor Ort können diese Zellen wenn nötig schnelle adaptive Immunantworten initiieren (Farber et al., 2014, Jameson and Masopust, 2018). Es ist noch nicht geklärt, ob T_{CM} und T_{EM} direkt aus naiven T-Zellen entstehen oder sich aus Effektor-T-Zellen entwickeln. Trotz des noch unklaren Verhältnisses der Subpopulationen zueinander kann man T_N , T_{CM} , T_{EM} und T_{EMRA} gemäß ihrer Proliferationsfähigkeit und Ausmaß ihrer Effektorfunktionen in eine hierarchische Ordnung bringen (Abbildung 11) (Ahmed et al., 2009, Farber et al., 2014).

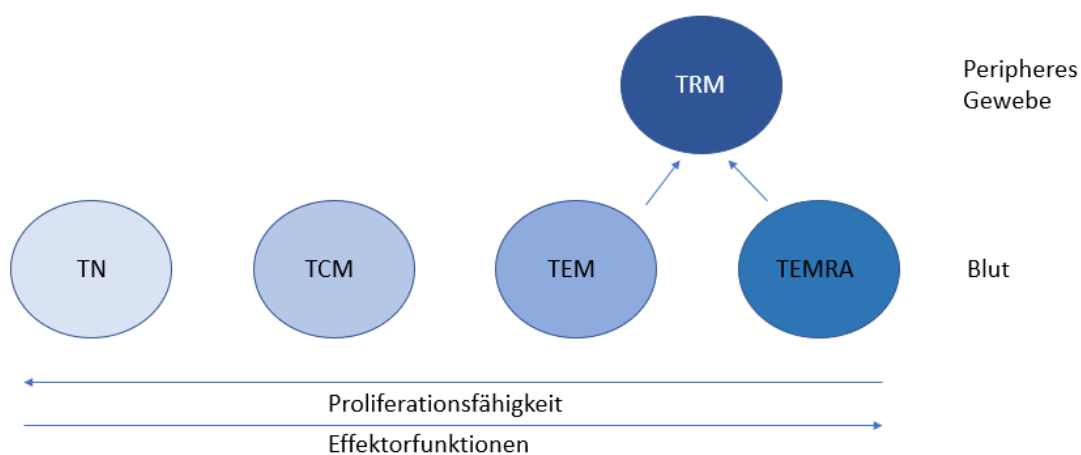


Abbildung 11 Hierarchische Ordnung der T-Zell-Subpopulationen nach (Farber et al., 2014). TN= naive T-Zelle, TCM= zentrale Gedächtniszelle, TEM= Effektor-Gedächtniszelle, TEMRA= Effektor-T-Zelle, TRM= Gewebsresidente Gedächtniszellen.

Es ist bekannt, dass sich das Expressionsprofil kosignalisierender Moleküle während der Aktivierung und Differenzierung einer T-Zelle ständig ändert. Für CD96 war die Datenlage aber noch unklar. Daher

habe ich hier untersucht, wie sich die Expression von CD96 auf den einzelnen Subpopulationen unterscheidet. Da ich als Untersuchungsmaterial nur peripheres Blut verwendet habe, beschränkte sich meine Untersuchung auf naive T-Zellen (T_N), zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}), Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) und Effektor-T-Zellen (T_{EMRA}).

Ich habe T-Zellen von 54 gesunden Probanden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Analyse sind unstimulierte und mit ConA beziehungsweise PMA stimulierte T-Zellen ausgewählt worden. Es war erkennbar, dass unter $CD4^+$ T-Zellen die CD96-Expression auf naiven T-Zellen am niedrigsten war. Sowohl $CD4^+$ T_{CM} als auch $CD4^+$ T_{EM} wiesen hingegen eine signifikant höhere CD96-Expression auf als naive und Effektor-T-Zellen. Dies galt für unstimulierte Zellen sowie für mit ConA und PMA/Ionomycin behandelte Zellen (Abbildung 12). Somit schien die CD96-Expression während des Differenzierungsprozesses zu T_{CM} und T_{EM} auf $CD4^+$ T-Zellen ansteigen, um dann bei terminal differenzierten T-Zellen wieder abzufallen. Bei $CD8^+$ T-Zellen verhielt sich dies anders. Unstimulierte naive T-Zellen und zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}) exprimierten CD96 auf besonders hohem Niveau. Im Verlauf der Differenzierung zu T_{EM} und T_{EMRA} sank die CD96-Expression hingegen immer weiter ab (Abbildung 12).

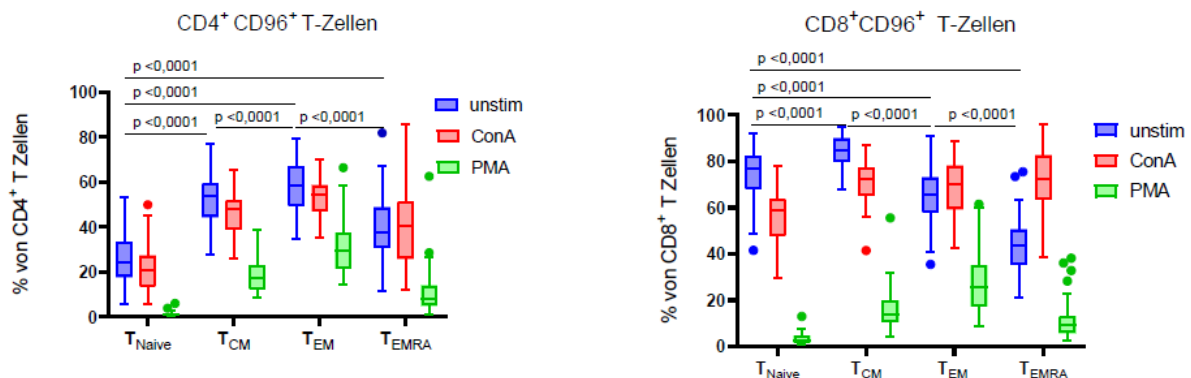


Abbildung 12 CD96-Expression auf $CD4^+$ und $CD8^+$ naiven T-Zellen (T_{Naive}), zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}), Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) und Effektor-T-Zellen (T_{EMRA}). Dargestellt sind unstimulierte sowie für 24 h mit ConA oder für 6 h mit PMA/Ionomycin stimulierte PBMZ von 54 gesunden Probanden. Analyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil - 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Die zweifaktorielle Varianzanalyse (Two way ANOVA) gefolgt von einem Tukey's multiple comparison Test wurde angewandt.

Koexpression von CD96 und dem koinhibitorischen Rezeptor PD-1

PD-1 ist ein sehr gut untersuchter koinhibitorischer Rezeptor, der die T-Zell-Proliferation und T-Zell-Effektorfunktionen nach T-Zellaktivierung hemmt (Freeman et al., 2000, Latchman et al., 2001). Als essentieller Immuncheckpoint wird PD-1 gemeinsam mit anderen koinhibitorischen Molekülen wie CTLA-4 oder TIGIT vermehrt auf erschöpften T-Zellen exprimiert (Dougall et al., 2017, Johnston et al., 2014, Seidel et al., 2018). CD96 ist noch nicht eindeutig definiert als koinhibitorischer oder kostimulatorischer Rezeptor und ist nicht so eng mit der T-Zell-Erschöpfung assoziiert wie PD-1, CTLA-

4 oder TIGIT. Dennoch gibt es einige Hinweise auf eine gesteigerte Immunantwort infolge einer CD96-Blockade. Dieser Effekt war verstärkt in Kombination mit einer PD-1-Blockade. (Mittal et al., 2019, Blake et al., 2016b). Es war daher interessant zu überprüfen, ob CD96 auch mit PD-1 auf denselben Zellen koexprimiert wird. Ich habe dazu T-Zellen von 54 gesunden Probanden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Unter CD4⁺ T-Zellen konnte ich eine signifikant höhere PD-1-Expression auf CD96⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD96⁻ T-Zellen nachweisen. Bei CD8⁺ T-Zellen hingegen exprimierten CD96⁻ T-Zellen PD-1 auf einem höheren Level als CD96⁺ T-Zellen (Abbildung 13).

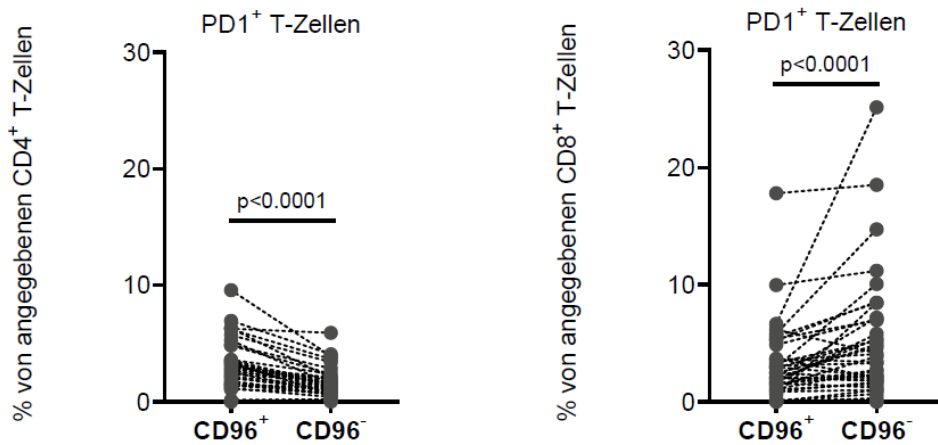


Abbildung 13 Darstellung der PD-1 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die CD96-positiv oder -negativ sind. Unstimulierte PBMZ von 54 gesunden Probanden analysiert mittels Durchflusszytometrie. CD96-positive und CD96-negative T-Zellen desselben Probanden sind mit einer Linie verbunden. Es wurde ein nicht-parametrischer Wilcoxon-Vorzeichen-Rank-Test angewandt.

T-Zell-Subpopulation mit besonders hoher CD226-Expression

Nach ConA-Stimulation war mir eine distinkte T-Zell-Population aufgefallen, die durch eine besonders hohe CD226-Expression gekennzeichnet ist (Abbildung 14). Im weiteren Verlauf wird diese Population als CD226^{hoch} bezeichnet. CD226^{hoch} T-Zellen waren kaum bei unstimulierten oder mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen zu beobachten. Für CD8⁺ T-Zellen konnten höhere Frequenzen der CD226^{hoch} Population nachgewiesen werden als bei den CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 15).

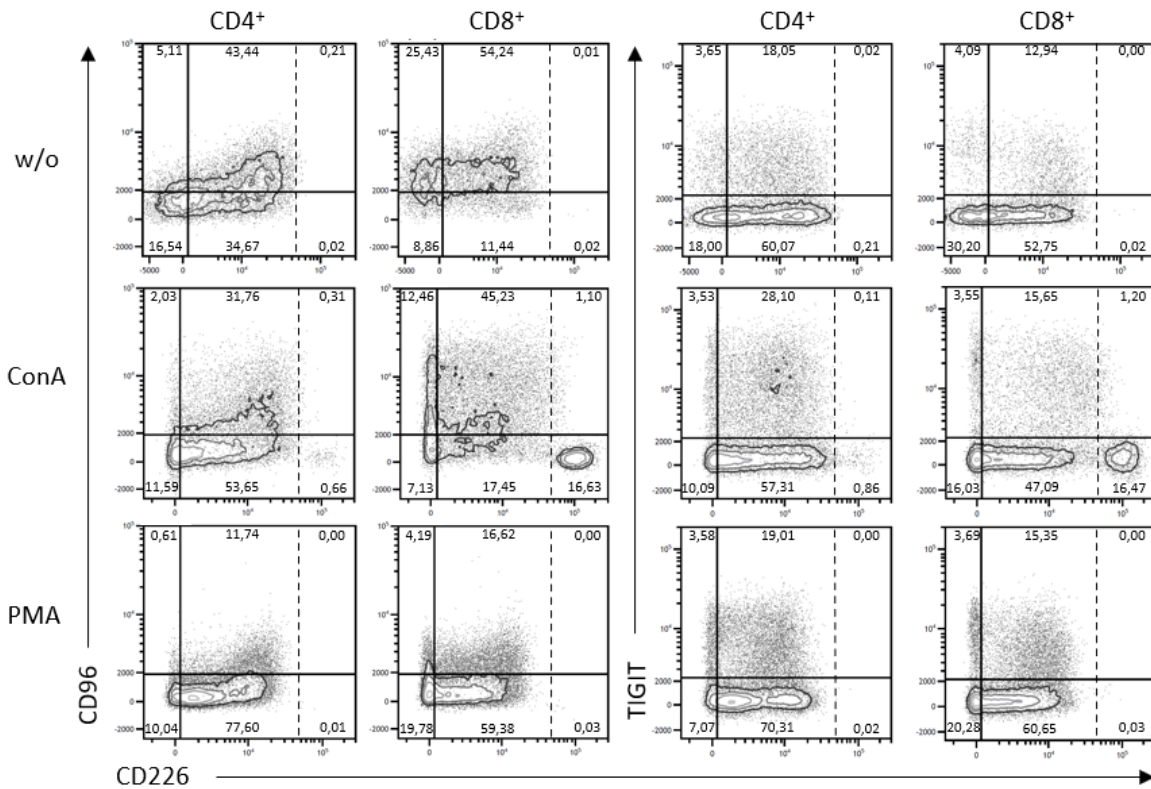


Abbildung 14 Contour-Plots der Oberflächenfärbung für CD226, TIGIT und CD96 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen. Dargestellt sind sowohl unstimulierte (w/o) als auch mit ConA (für 24 h) und PMA/Ionomycin (für 6 h) stimulierte Zellen eines gesunden Probanden.

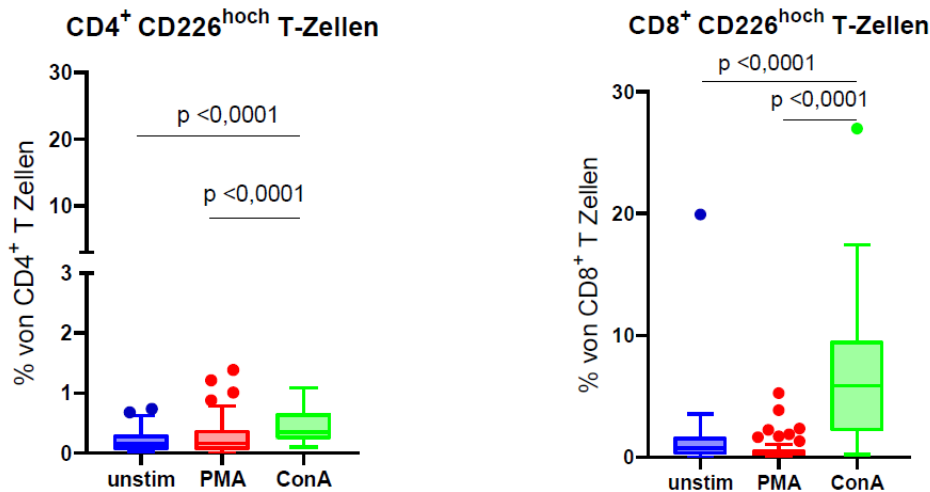


Abbildung 15 Frequenz der CD226hoch T-Zellen unter CD4+ und CD8+ T-Zellen. Dargestellt sind unstimulierte, mit PMA und mit ConA stimulierte Zellen. PBMZ von 54 gesunden Probanden. Analysiert mit Durchflusszytometrie. Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil - 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Der nicht-parametrische Friedman-Test gefolgt vom Dunn's multiple comparison-Test wurde angewandt.

Die Expression von CD226 auf T-Zellen wurde bereits mit vermehrter Zytokinproduktion in Verbindung gebracht (Lozano et al., 2013, Ayano et al., 2015, Lozano et al., 2012). CD96 hingegen scheint bei murinen T-Zellen einen inhibitorischen Einfluss auf die IL-9-Produktion zu haben (Stanko et al., 2018). Daher interessierte ich mich für die Expression von CD96 auf CD226hoch T-Zellen. Dazu habe ich T-Zellen

von 54 gesunden Probanden mit Durchflusszytometrie genauer untersucht. Interessanterweise exprimierten signifikant mehr von den CD4⁺ CD96⁺ T-Zellen als von den CD4⁺ CD96⁻ T-Zellen CD226 auf diesem besonders hohen Level. Nach ConA-Stimulation war dies sogar noch deutlicher erkennbar. Bei CD8⁺ T-Zellen war das Verhältnis umgekehrt. Deutlich mehr CD96-negative als CD96-positive T-Zellen gehörten zur CD226^{hoch} Subpopulation (Abbildung 16).

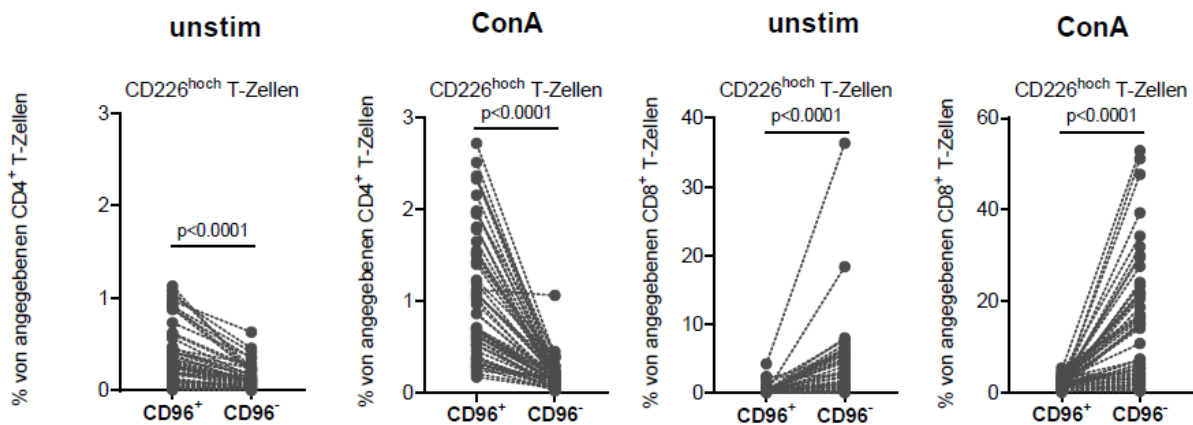


Abbildung 16 Anteil der CD226^{hoch} T-Zellen mit und ohne CD96-Koexpression unter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. PBMZ von 54 gesunden Probanden wurden mit Durchflusszytometrie analysiert. Ein nicht-parametrischer Wilcoxon-Vorzeichen-Rank-Test wurde angewandt.

Funktionelle Auswirkung einer hohen CD226-Expression auf humanen T-Zellen

CD226 ist ein kostimulatorisches Molekül, das sowohl für die Effektorfunktionen der zytotoxischen T-Zellen als auch für die T-Helferzellen eine entscheidende Rolle spielt (Iguchi-Manaka et al., 2008, Shibuya et al., 1996, Lozano et al., 2013). Daher lag die Vermutung nahe, dass eine hohe CD226-Expression mit besonders ausgeprägten Effektorfunktionen einhergeht. Das für diese Arbeit verwendete Antikörperpanel erlaubte leider nur die Analyse der IL-9-Produktion durch CD226-exprimierende Zellen. Zunächst habe ich überprüft, welcher Stimulus am stärksten die IL-9 Produktion anregt. Als Markerzytokine der T_H1- und T_H2-Zellen wurden IFN γ und IL-4 zum Vergleich mitausgewertet. Wie in Abbildung 11 erkennbar, erhielt ich eine gute IFN γ - und IL-4-Produktion nach Stimulation mit PMA/Ionomycin, jedoch nur eine geringe IL-9-Produktion. ConA erwies sich als der effektivste Stimulus für die IL-9-Produktion.

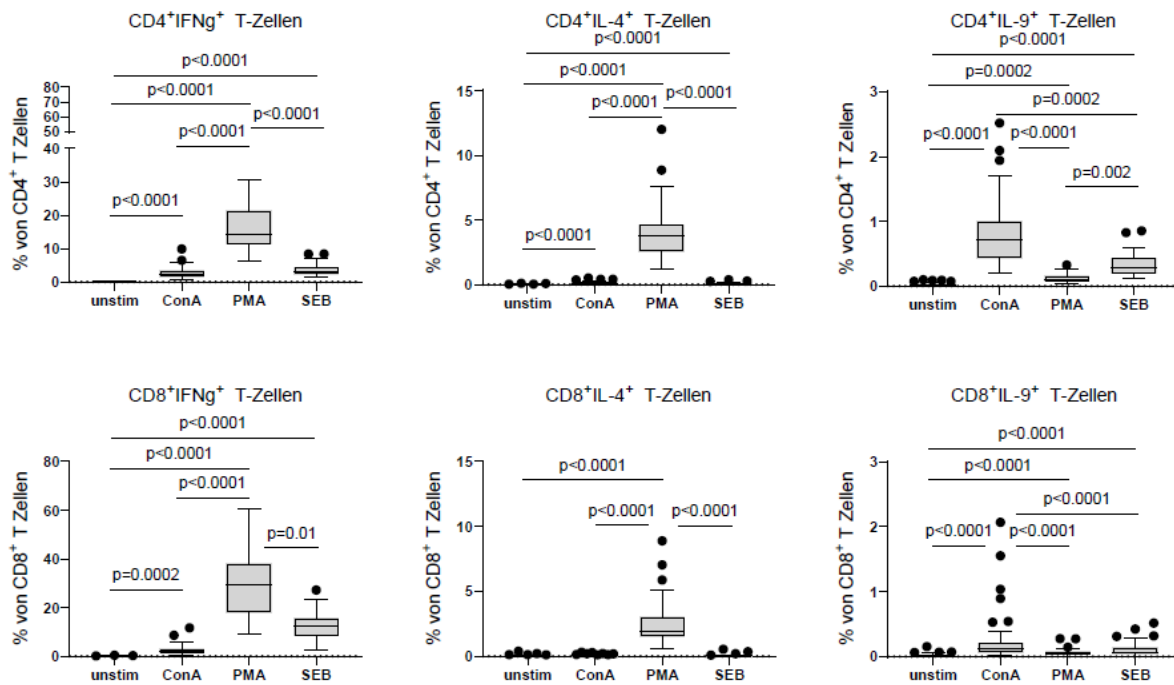


Abbildung 17 IFN γ , IL-4 und IL-9-Produktion durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt sind PBMZ von 54 gesunden Probanden, die mit entweder ConA (24 h), SEB (24 h) oder PMA/Ionomycin (6h) stimuliert wurden, sowie eine unstimulierte Kontrolle. Analyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil – 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Ein nicht-parametrischer Friedman-Test gefolgt vom Dunn's multiple comparison-Test wurde angewandt.

Da CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen mehr IL-9 produzieren, habe ich mich hier in der Auswertung auf CD4⁺ T-Zellen beschränkt. Es war deutlich erkennbar, dass mit ConA stimulierte CD226^{hoch}-exprimierende T-Zellen signifikant mehr IL-9 produzieren als T-Zellen ohne CD226-Expression (CD226⁻) oder mittlerer CD226-Expression (CD226^{int}). Die IL-9-Produktion stieg mit dem Level der CD226-Expression (Abbildung 18).

Es ist gezeigt worden, dass eine geringere CD96-Expression auf murinen T_H9-Zellen mit einer gesteigerten IL-9-Produktion einhergeht (Stanko et al., 2018). Da CD4⁺ CD226^{hoch}-exprimierende T-Zellen zum großen Teil CD96 koexprimieren, habe ich überprüft, ob die An- oder Abwesenheit von CD96 auch einen Einfluss auf die IL-9 Produktion humaner T-Zellen habe. Ich konnte jedoch keinen signifikanten Unterschied in der IL-9-Produktion zwischen CD96⁺ und CD96⁻ T-Zellen feststellen (Abbildung 18).

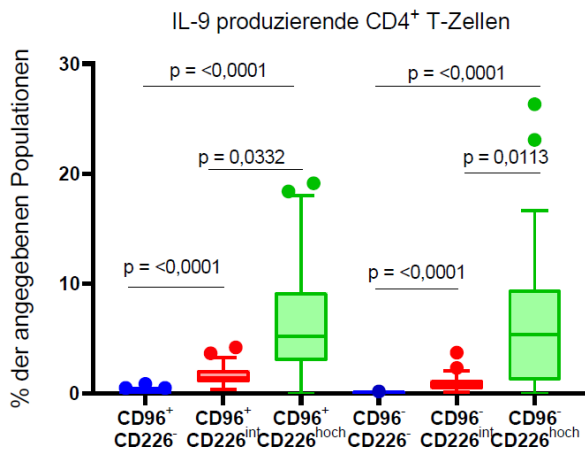


Abbildung 18 Vergleich der IL-9-Produktion durch CD4+ T-Zellen mit unterschiedlicher CD226 und CD96-Expression. Mit ConA stimulierte PBMZ von 54 gesunden Probanden analysiert mit Durchflusszytometrie. Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil - 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Ein nicht-parametrischer Friedman-Test gefolgt vom Dunn's multiple comparison-Test wurde angewandt.

Einfluss von Alter und Geschlecht auf die CD226^{hoch} T-Zell-Population

CD226^{hoch} T-Zellen könnten eine ausgeprägte T-Zell-Effektorfunktionen aufweisen und damit eine wichtige Rolle in der T-Zell-Immunantwort spielen. Wie bereits besprochen, beeinflussen Alter und Geschlecht die Immunantwort sehr. Entsprechend war es von Interesse, ob die Frequenz CD226^{hoch}-exprimierender T-Zellen mit dem Alter ansteigt als Zeichen einer gesteigerten Zytokinproduktionskapazität. Dazu habe ich T-Zellen von 54 gesunden Probanden im Alter von 20 bis 69 Jahren für 24 h mit ConA stimuliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ich konnte keine signifikanten altersbedingten Unterschiede in der Frequenz CD226^{hoch}-exprimierender T-Zellen nachweisen. Jedoch ist eine Tendenz zum alterabhängigen Abfall der CD8⁺ CD226^{hoch} Population erkennbar (Abbildung 19). Zusätzlich habe ich die Frequenz CD226^{hoch}-exprimierender T-Zellen zwischen beiden Geschlechtern verglichen. Bei Frauen sah man eine signifikant höhere Frequenz an CD8⁺ CD226^{hoch}-exprimierenden T-Zellen als bei Männern, jedoch nicht bei CD4⁺ T-Zellen.

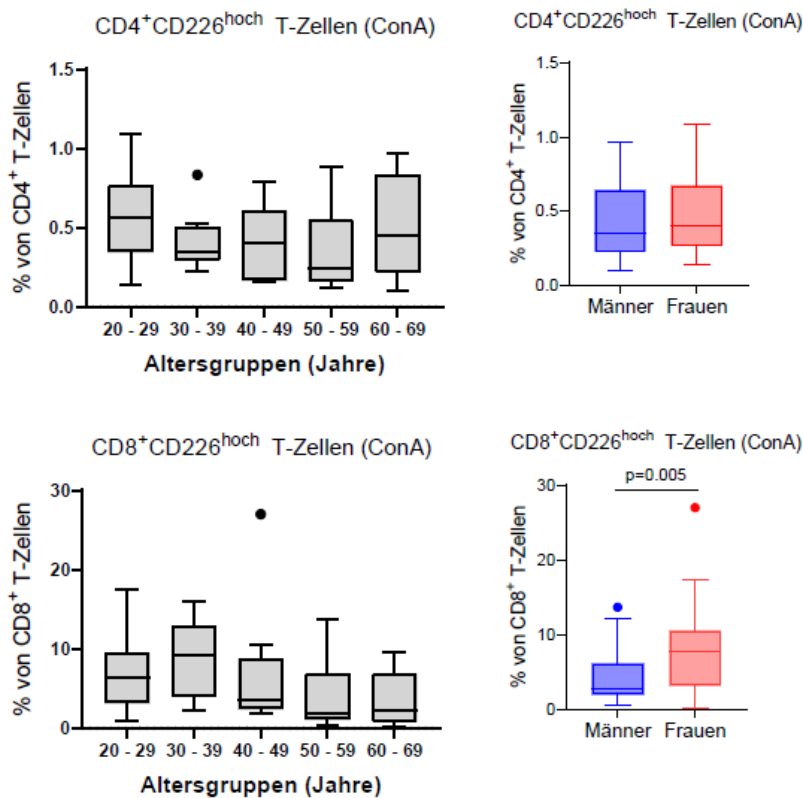


Abbildung 19 Vergleich der Frequenz CD226^{hoch}-exprimierender T-Zellen unter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von 54 gesunden Probanden unterschiedlichen Geschlechts und Alters (Anzahl Probanden = 20-29: 15; 30-39: 11; 40-49: 10; 50-59: 9; 60-69: 9; Männer: 26; Frauen: 28). Die peripheren Blutmonozyten wurden für 24 h mit ConA stimuliert und mit Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil – 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Zur statistischen Analyse der Unterschiede zwischen den Altersgruppen wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's multiple comparison-Test angewandt und zur Analyse der geschlechtsbedingten Unterschiede der two-tailed Mann-Whitney-Test.

Unterschiede in der CD226-, TIGIT- und CD96-Expression zwischen gesunden Probanden und CED-Patienten

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen. In den letzten Jahren mehrten sich Hinweise, dass T_H9-Zellen eine treibende Rolle im Entzündungsgeschehen bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa spielen (Gerlach et al., 2014, Gerlach et al., 2015, Nalleweg et al., 2015). Da die proinflammatorischen Eigenschaften von murinen T_H9-Zellen von der Expressionshöhe von CD96 determiniert zu sein scheint (Stanko et al., 2018), habe ich im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob eine erhöhte IL-9-Produktion bei CED-Patienten durch T-Zellen und ein Unterschied in der CD96-Expression zwischen gesunden Probanden und CED-Patienten nachgewiesen werden können. Dazu wurden T-Zellen von 26 CED-Patienten mittels Durchflusszytometrie untersucht. 11 dieser Patienten sind mit Colitis ulcerosa diagnostiziert worden, 15 Patienten litten an Morbus Crohn. Als Kontrollgruppe wurden 21 gesunde Probanden ausgewählt, die im Alter und Geschlecht den CED-Patienten entsprechen. Enttäuschenderweise konnte ich keine

Unterschiede in der IL-9-Produktion durch T-Zellen zwischen Kontrollgruppe und CED-Patienten nachweisen. Auch die CD96-Expression auf CD4⁺-T-Zellen war nicht verändert bei CED-Patienten. Jedoch sah man eine signifikant geringere CD96-Expression auf CD8⁺ T-Zellen von CED-Patienten (Abbildung 20).

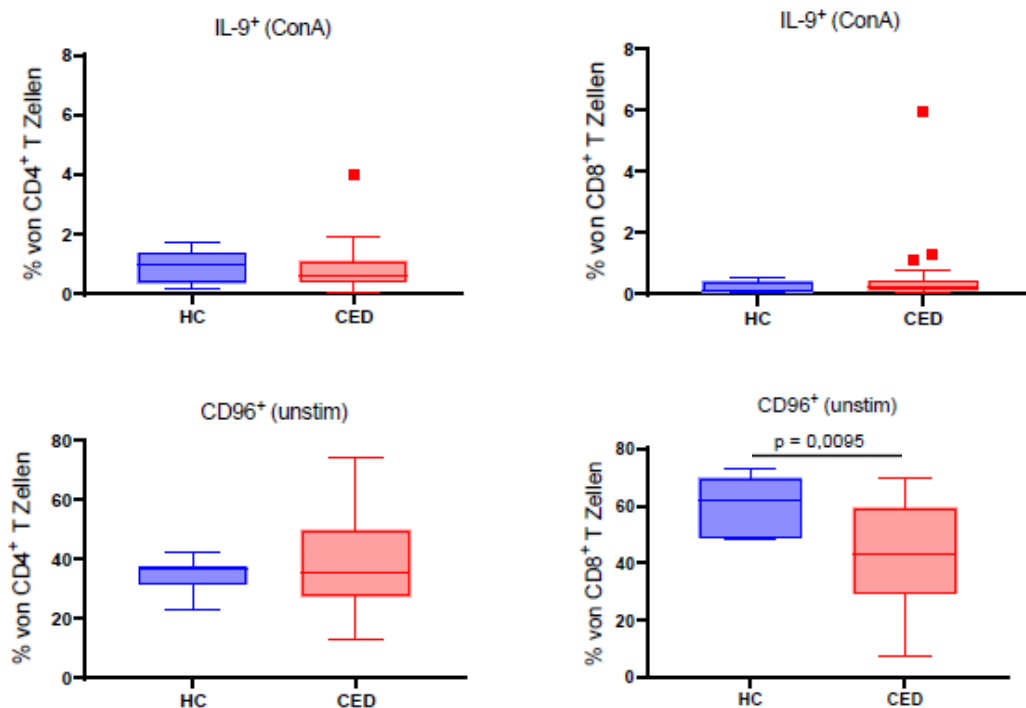


Abbildung 20 Vergleich der CD96-Expression und IL-9-Produktion durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt sind PBMC von 26 CED-Patienten (11 mit Colitis ulcerosa, 15 mit Morbus Crohn) und 21 geschlechts- und altersentsprechenden gesunden Probanden. Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil – 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Die CD96 Expression wurde auf unstimulierten T-Zellen verglichen. Die IL-9-Produktion wurde nach 24-stündiger ConA-Stimulation gemessen. Analyse mittels Durchflusszytometrie. Es wurde ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-Test angewendet. HC = gesunde Probanden (healthy control)

Ich habe anschließend überprüft, ob die geringere CD96-Expression auf CD8⁺ T-Zellen sowohl bei Colitis ulcerosa- als auch Morbus Crohn-Patienten festzustellen ist. Dazu habe ich die Daten von 11 Colitis ulcerosa-Patienten und 15 Morbus Crohn Patienten mit 11 gesunden Probanden, die dem Alter und Geschlecht der Patientengruppe entsprechen, verglichen. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, exprimieren Colitis ulcerosa-Patienten CD96 auf einem deutlich niedrigerem Niveau als gesunde Probanden desselben Alters und Geschlechts. Bei Morbus Crohn-Patienten ist der Expressionsunterschied jedoch nicht signifikant. Dennoch ist eine Tendenz zur geringeren CD96-Expression auf CD8⁺ T-Zellen von Morbus Crohn-Patienten erkennbar (Abbildung 21).

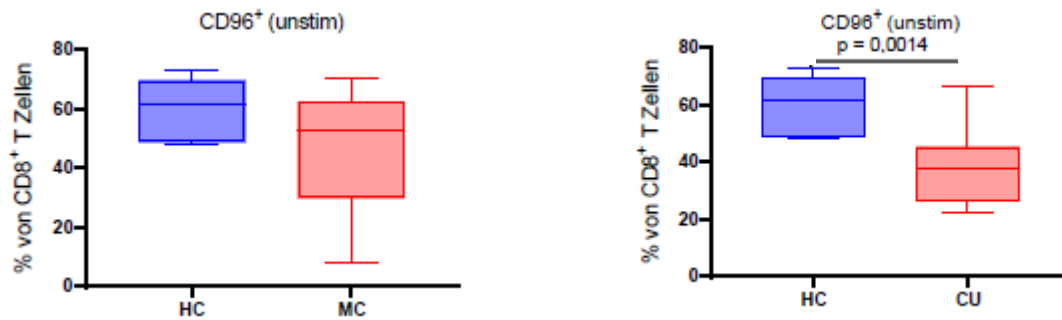


Abbildung 21 Vergleich der CD96-Expression auf CD8⁺ T-Zellen. Unstimulierte PBMZ von 11 Colitis ulcerosa-Patienten (CU) und 15 Morbus Crohn-Patienten (MC) sowie 11 gesunden Probanden (HC) mit entsprechendem Alter und Geschlecht. Analyse mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil – 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Es wurde ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-Test angewendet.

Da CD96 mit CD226 und TIGIT ein Signalnetzwerk bildet und ich in dieser Arbeit bereits zeigen konnte, dass die CD226-Expression bei humanen T-Zellen wichtig für die IL-9-Produktion ist, habe ich für diese Arbeit ebenfalls diese Rezeptoren bei gesunden Probanden und CED-Patienten verglichen. Jedoch erkannte ich bezüglich der CD226-Expression und TIGIT-Expression auf unstimulierten T-Zellen keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen. Da gerade T-Zellen mit besonders hoher CD226-Expression zur IL-9-Produktion beitragen, wurde ebenfalls die Frequenz von ConA-stimulierten CD226^{hoch} T-Zellen verglichen. Während sich allgemein die Frequenzen von CD226^{hoch} T-Zellen zwischen gesunden Probanden und CED-Patienten nicht signifikant unterschieden, gab es doch einzelne Individuen in der CED-Gruppe, die mit deutlich erhöhten CD226^{hoch} T-Zellzahlen im Vergleich zum Median herausstachen (Abbildung 22).

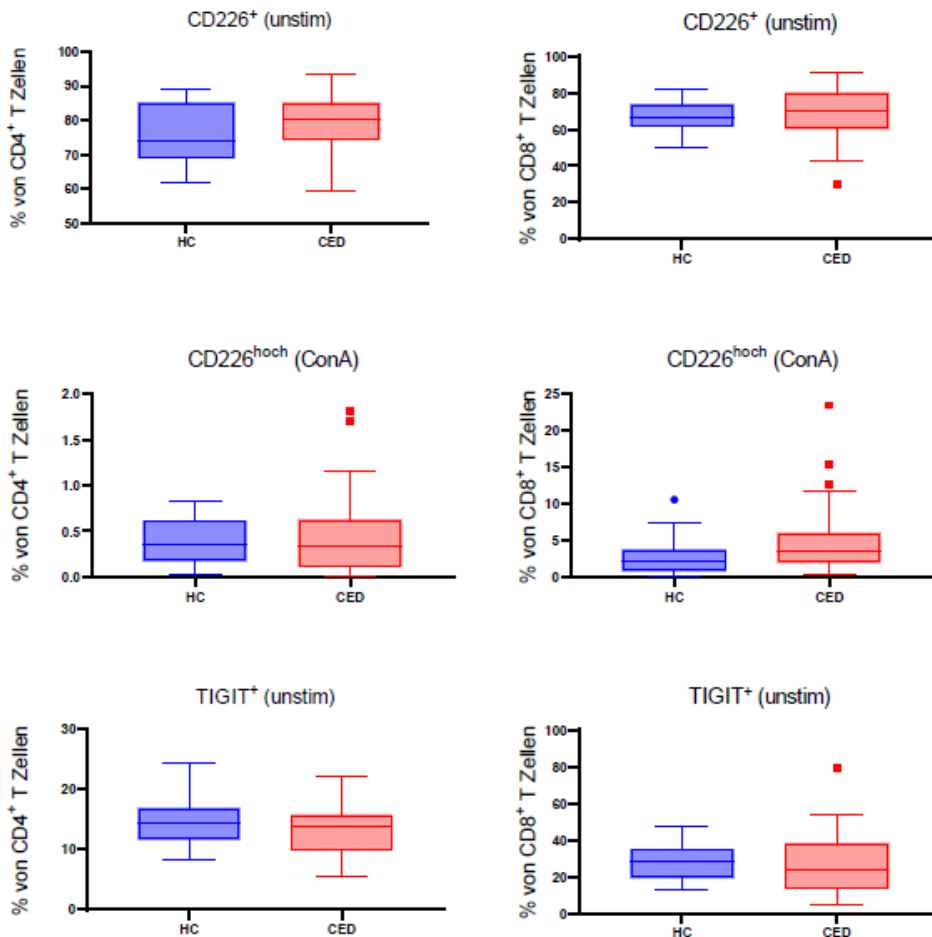


Abbildung 22 Vergleich der CD226, CD226^{hoch} und der TIGIT-Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt sind PBMZ von 26 CED-Patienten (11 mit Colitis ulcerosa, 15 mit Morbus Crohn) und 21 geschlechts- und altersentsprechenden gesunden Probanden. Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil - 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Die TIGIT- und CD226-Expression wurde auf unstimulierten T-Zellen verglichen. Die Frequenz der CD226^{hoch} T-Zellen wurde nach 24-stündiger ConA-Stimulation gemessen. Analyse mittels Durchflusszytometrie. Es wurde ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-Test angewandt. HC = gesunde Probanden (healthy control)

Einfluss verschiedener Therapiestrategien auf IL-9-Produktion und CD226-, CD96- und TIGIT-Expression

In der CED-Behandlung unterscheidet man die Induktion und die Erhaltung von Krankheitsremission. Die am häufigsten verwendeten Medikamente sind Steroide, Basistherapeutika auch bezeichnet als DMARDs (disease modifying antirheumatic drugs) und Biologika. Steroide haben eine starke antiinflammatorische Wirkung, sind aber aufgrund eines ungünstigen Nebenwirkungsprofils bei langfristiger Anwendung nur zur Remissionsinduktion geeignet (Ungaro et al., 2017, Torres et al., 2017). DMARDs sind eine heterogene Gruppe von immunsuppressiven Medikamenten, die effektiv in der Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen wie CED sind. Dazu gehören unter anderem Methotrexat, Azathioprin, Tacrolimus und 5-Aminosalicylsäure. Sie werden gewöhnlich für den Remissionserhalt verwendet (Torres et al., 2017, Ungaro et al., 2017). Zytokine spielen eine zentrale

Rolle in der dysregulierten Immunantwort von CED-Patienten. Anti-TNF α -Antikörper stellen daher einen wertvollen Fortschritt in der CED-Therapie dar. Diese Biologika werden bei moderat bis schwerer CED-Erkrankung angewendet, insbesondere wenn eine Behandlung mit DMARDs nicht ausreicht (Berns and Hommes, 2016, Pugliese et al., 2017). Es stehen weitere Biologika zur CED-Therapie zur Verfügung wie der α 4 β 7-Integrin-Antikörper Vedolizumab oder Ustekinumab, ein Antikörper gegen die p40-Untereinheit der Zytokine IL-12 und IL-23.

Die in dieser Arbeit betrachtete Patientenkohorte ist sehr heterogen hinsichtlich der verwendeten Therapeutika. Für diese Arbeit habe ich mich auf Patienten beschränkt, die entweder keine Therapie erhielten oder mit Steroiden bzw. DMARDs behandelt wurden oder die einen Anti-TNF α -Antikörper erhalten haben. Fünf der eingeschlossenen CED-Patienten, erhielten zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowie vier Monate zuvor keine Therapie. Weitere fünf Patienten erhielten entweder DMARDs (3 Patienten erhielten Azathioprin) oder ein Steroid (1 Patient erhielt Prednisolon und 1 Patient Prednisolon mit Tacrolimus). 16 Patienten wurden mit Anti-TNF α -Antikörpern zum Zeitpunkt des Einschlusses oder bis zu vier Monate vor Einschluss behandelt.

Jede der genannten Medikamentengruppen hat eine immunmodulierende Wirkung. Eine Anti-TNF α -Therapie verhindert die Aktivierung von TNF-Rezeptoren und deren intrazelluläre Signalkaskaden. Dies beeinflusst unter anderem die Produktion proinflammatorischer Zytokine und die T-Zell-Differenzierung (Billmeier et al., 2016). Azathioprin blockiert als Purinanalogon die Nukleotidsynthese und damit die Leukozytenproliferation. Auch konnte ein Einfluss von Azathioprin auf den NF κ B-Signalweg nachgewiesen werden (Broen and van Laar, 2020). NF κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Expression proinflammatorischer Zytokine sowie die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen beeinflusst (Liu et al., 2017). Tacrolimus hingegen ist ein Calcineurininhibitor. Calcineurin ist eine Phosphatase, die den Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert (Broen and van Laar, 2020). Dieser fördert über eine Induktion der IL-2-Produktion die Differenzierung von T-Zellen. Darüber hinaus inhibiert Tacrolimus die Funktion von NF κ B (Broen and van Laar, 2020). Prednisolon hingegen ist ein Glukokortikoid, welches an seinen intrazellulären Rezeptor bindet und über diesen den Transkriptionsfaktor NF κ B inhibieren und die Expression proinflammatorischer Gene unterdrücken kann (Ingawale and Mandlik, 2020).

Aufgrund des Einflusses dieser Medikamente auf die Zytokinproduktion durch T-Zellen, war es interessant zu untersuchen, ob sich die CED-Patienten in den verschiedenen Behandlungsgruppen in ihrer IL-9-Produktion unterscheiden. Beim Vergleich der IL-9-Produktion durch CD4⁺ T-Zellen fiel in der Tat eine signifikant geringere IL-9-Produktion bei CED-Patienten behandelt mit DMARDs und anti-TNF α -Antikörpern im Vergleich zu unbehandelten Patienten auf (Abbildung 18). Die IL-9-Produktion durch CD8⁺ T-Zellen zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den

Behandlungsgruppen. Da CD226^{hoch} T-Zellen die Hauptquelle der IL-9-Produktion zu sein schienen, vermutete ich ebenfalls einen Unterschied in der Frequenz dieser T-Zell-Subpopulation unter CD4⁺ T-Zellen. Jedoch konnte ich einen solchen Unterschied nicht nachweisen. Auch CD8⁺ CD226^{hoch} T-Zellen differierten in ihrer Frequenz nicht signifikant zwischen den unterschiedlich behandelten Patienten. Allerdings sah man einzelne Patienten ohne Therapie und Patienten in der Anti-TNF α -Gruppe, die im Vergleich zu den anderen Patienten eine deutlich höhere Frequenz an CD4⁺ und CD8⁺ CD226^{hoch} T-Zellen aufweisen (Abbildung 23).

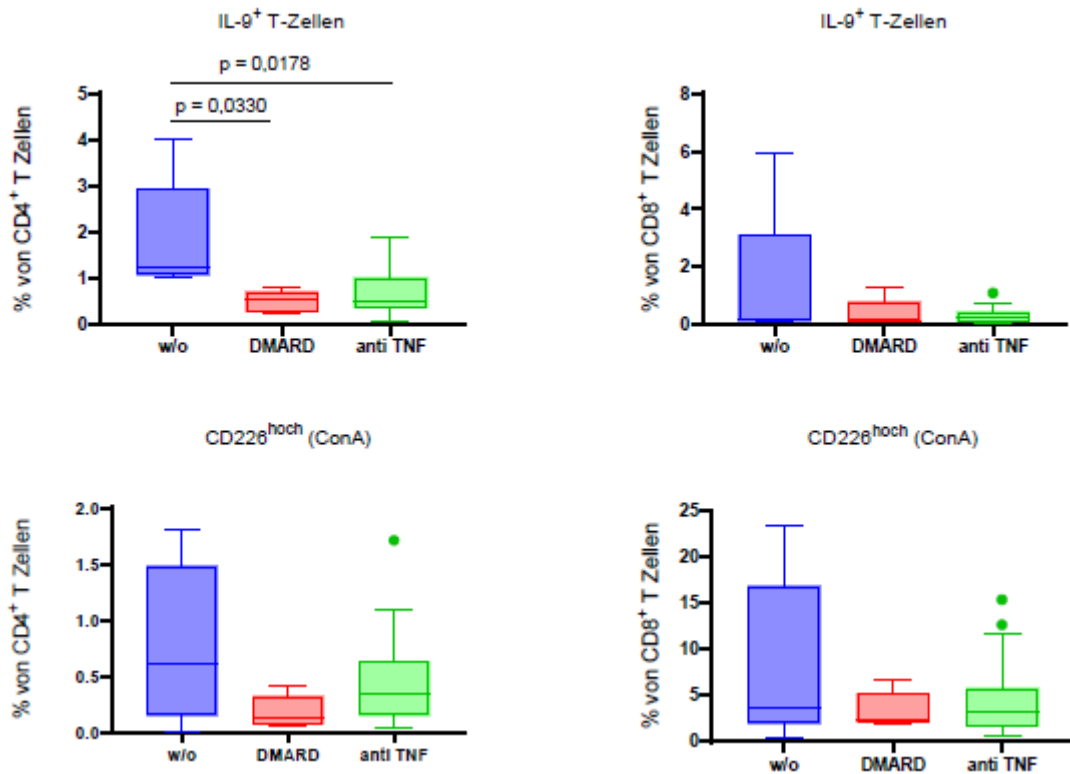


Abbildung 23 Vergleich der IL-9-Produktion und Frequenz der CD226^{hoch} T-Zellen zwischen CED-Patienten mit unterschiedlichen Therapien. PBMZ wurden für 24 h mit ConA stimuliert. Analyse mit Durchflusszytometrie. w/o (ohne Therapie) = 5 Patienten (4 MC, 1 CU); DMARD (Azathioprin, Tacrolimus, Prednisolon) = 5 Patienten (3 MC, 2 CU); anti TNF = 16 Patienten (8 MC, 8 CU). Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil – 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's multiple comparison-Test wurde angewandt.

Durch Beeinflussung des Zytokinmilieus sowie der Genexpression der T-Zellen und in der Folge auch der T-Zelldifferenzierung ist es denkbar, dass die CED-Therapien auch die Korezeptorexpression modulieren. Da ich einen signifikanten Unterschied in der CD96-Expression auf CD8⁺ T-Zellen zwischen gesunden Probanden und CED-Patienten, insbesondere CU-Patienten, aufzeigen konnte, war für mich die differenzierte Betrachtung der Behandlungsgruppen bezüglich der CD96-Expression besonders interessant. Einen therapiebedingten Unterschied konnte ich allerdings weder bei CD4⁺ noch bei CD8⁺ T-Zellen nachweisen (Abbildung 24).

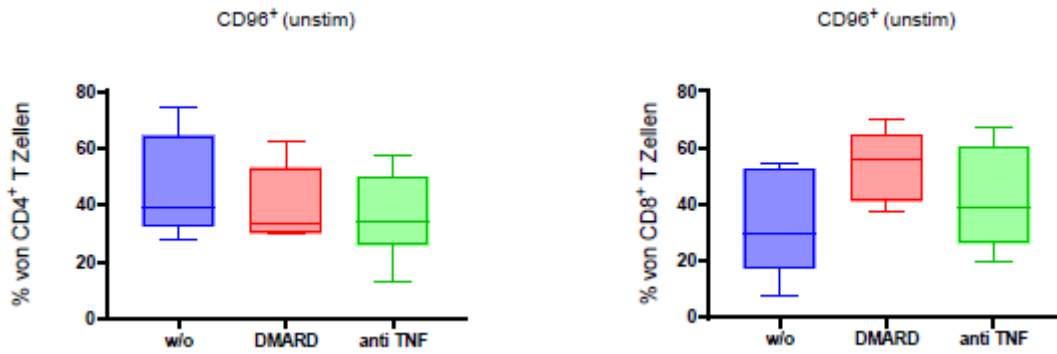


Abbildung 24 Vergleich der CD96⁺ T-Zellen zwischen CED-Patienten mit unterschiedlichen Therapien. PBMZ wurden für 24 h mit ConA stimuliert. Analyse mit Durchflusszytometrie. w/o (ohne Therapie) = 5 Patienten (4 MC, 1 CU); DMARD (Azathioprin, Tacrolimus, Prednisolon) = 5 Patienten (3 MC, 2 CU); anti TNF = 16 Patienten (8 MC, 8 CU). Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil – 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's multiple comparison-Test wurde angewandt.

Schließlich habe ich auch die Frequenzen CD226⁺ T-Zellen und TIGIT⁺ T-Zellen in den einzelnen Behandlungsgruppen verglichen. Doch auch hier konnte ich keine signifikanten Unterschiede auf CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen erkennen (Abbildung 25).

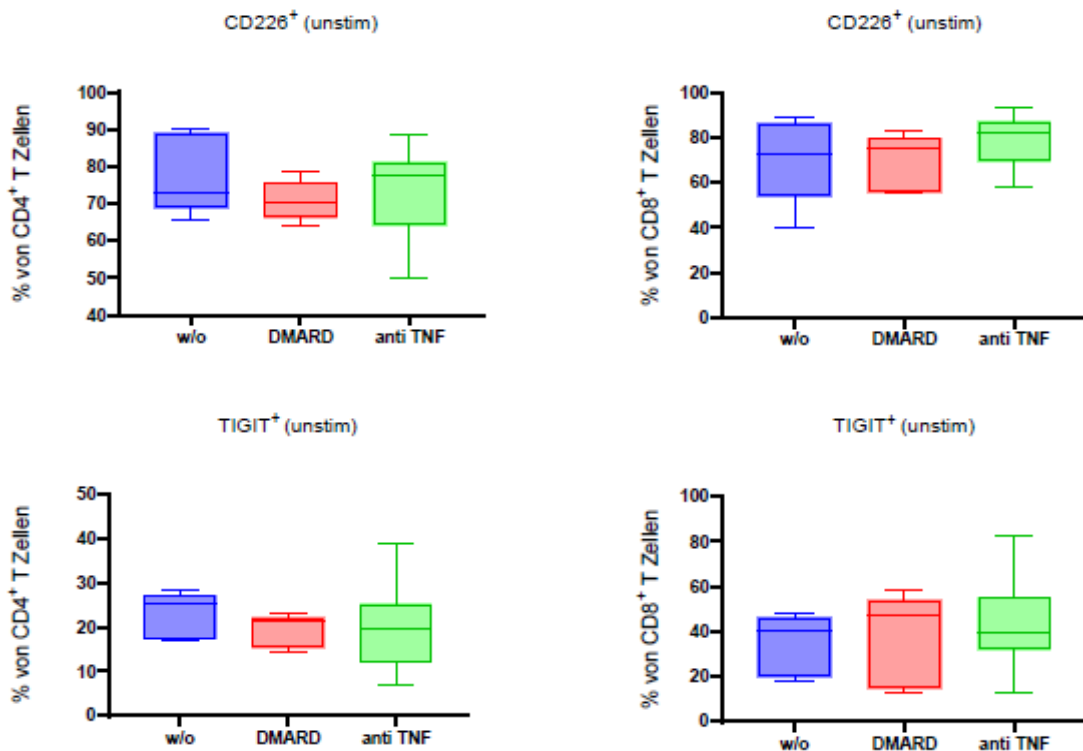


Abbildung 25 Vergleich der CD96⁺ T-Zellen zwischen CED-Patienten mit unterschiedlichen Therapien. PBMZ wurden für 24 h mit ConA stimuliert. Analyse mit Durchflusszytometrie. w/o (ohne Therapie) = 5 Patienten (4 MC, 1 CU); DMARD (Azathioprin, Tacrolimus, Prednisolon) = 5 Patienten (3 MC, 2 CU); anti TNF = 16 Patienten (8 MC, 8 CU). Dargestellt sind Boxplots mit Median, oberem und unterem Quartil. Die Whisker reichen bis zum 3. Quartil + 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) bzw. 1. Quartil – 1,5-fachen IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's multiple comparison-Test wurde angewandt.

Diskussion

Die Expression kosignalisierender Rezeptoren wie CD226, CD96 und TIGIT auf T-Zellen hängt von vielen Faktoren ab. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der koinhibitorische Rezeptor TIGIT in der Expression mit dem Alter anstieg. Die Rezeptoren CD226 und CD96 hingegen zeigten geschlechtsabhängige Expressionsunterschiede. Während CD226 auf T-Zellen gewonnen von weiblichem Probanden verstärkt exprimiert wurde, war die Expression von CD96 auf CD8⁺ T-Zellen bei Frauen verringert. Gleichzeitig war die Frequenz CD8⁺ CD226^{hoch}-T-Zellen bei Frauen signifikant erhöht. Zusätzlich wurde hier gezeigt, dass die Wahl des Stimulationsprotokolls für die T-Zellaktivierung die Expressionsstärke von CD226, CD96 und TIGIT entscheidend beeinflusste. CD96 wurde unter CD4⁺ T-Helferzellen vor allem auf zentralen und Effektor-Gedächtniszellen (T_{CM} und T_{EM}) exprimiert, bei CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen mehr auf naiven und zentralen Gedächtniszellen (T_N und T_{CM}). Bei Differenzierung zu CD8⁺ T_{EM} und T_{EMRA} fiel die CD96-Expression ab. Diese Verteilung änderte sich bei CD8⁺ T-Zellen jedoch nach Stimulation der Zellen mit ConA, die zu einem Anstieg der CD96-Expression auf terminal differenzierten Effektorzellen (T_{EMRA}) bewirkte. Die hier vorgestellten Daten zeigten außerdem die Verstärkung einer CD226^{hoch}-T-Zellpopulation nach ConA-Stimulation, die die Hauptquelle der IL-9-Produktion zu sein schien. Ebenso wird hier beschrieben, dass auf CD8⁺-T-Zellen von CED-Patienten, vor allem Colitis ulcerosa-Patienten, CD96 signifikant geringer exprimiert wurde. Ich konnte keinen signifikanten Unterschied in der IL-9-Produktion zwischen gesunden Probanden und CED-Patienten nachweisen, jedoch war eine geringere Anzahl an IL-9-produzierenden T-Zellen bei CED-Patienten mit immunmodulatorischer Therapie im Vergleich zu untherapierten Patienten detektierbar.

Relevanz für die Immunoseneszenz und Immunocheckpointtherapie

Immunoseneszenz hat vier Hauptcharakteristika: die abnehmende Frequenz naiver T-Zellen und damit die verringerte Fähigkeit auf neue Antigene zu reagieren, der Anstieg von Gedächtnis-T-Zellen, die Akkumulation seneszenten Immunzellen sowie die chronische Entzündung (inflammaging) als Ausdruck lebenslanger Auseinandersetzung mit Antigenen (Aiello et al., 2019). Die Rolle von T-Zell-Erschöpfung für den Alterungsprozess des Immunsystems ist weniger gut untersucht. Ein wichtiges Merkmal für T-Zell-Erschöpfung ist die gesteigerte Expression koinhibitorischer Moleküle. Einige Studien konnten eine gesteigerte Expression von koinhibitorischen Rezeptoren wie PD-1, CTLA-4 oder TIM-3 auf T-Zellen gealterter Mäuse nachweisen (Sekido et al., 2019, Lee et al., 2016, Shimada et al., 2009, Song et al., 2018). Ähnliche Daten für humane T-Zellen fehlten, bis Song et al. einen altersbedingten Anstieg der TIGIT-Expression auf humanen CD8⁺ T-Zellen nachweisen konnte (Song et al., 2018). Eine weitere Studie konnte bei älteren Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge eine gesteigerte Tim-3 und TIGIT-Expression im Vergleich zu jüngeren Patienten mit derselben Diagnose

nachweisen (Gong et al., 2019). Unsere Daten bezüglich einer gesteigerten TIGIT-Expression im Alter entsprechen folglich den zuvor veröffentlichten Studien. Diese Informationen suggerieren die T-Zell-Erschöpfung als weiteres wichtiges Charakteristikum der Immunoseneszenz. Interessant ist zu überlegen, welche klinische Bedeutung diese Erkenntnis hat. Aktuell gewinnen Immuncheckpoint-Inhibitoren in der Therapie vieler Tumorentitäten an Bedeutung. Die vermehrte Expression dieser Immuncheckpoints im höheren Alter könnte zu einer erhöhten Effektivität der Immuntherapien führen. Auf der anderen Seite könnte eine durch Immunoseneszenz beeinträchtigte Immunantwort, sowie Komorbiditäten und Medikamenteninteraktionen bei älteren Patienten die Wirksamkeit verringern und das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen steigern. Es fehlen jedoch klinische Studien mit besonderem Augenmerk auf ältere Patienten, um den Einfluss des Alters auf die Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren einschätzen zu können (Granier et al., 2021, Hong et al., 2019).

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression kosignalisierender Rezeptoren und deren Einfluss auf die Wirksamkeit von Immuncheckpointinhibitoren

Neuerdings wird auch das Geschlecht des Patienten als wichtiger Einflussfaktor für die Wirksamkeit von Immuntherapien diskutiert (Conforti et al., 2018, Botticelli et al., 2017, Irelli et al., 2020). Mehrere Metaanalysen berichten von einem besseren Überleben von männlichen Patienten gegenüber Frauen unter Behandlung von Immuncheckpoint-Inhibitoren wie anti-CTLA-4 und anti-PD-1-Antikörpern (Conforti et al., 2018, Conforti et al., 2019, Conforti et al., 2021, Pinto et al., 2018, Irelli et al., 2020). Da Frauen bereits von sich aus eine gesteigerte Immunantwort aufweisen, wird diskutiert, dass nur noch eine geringere Verstärkung der Immunantwort durch Immuncheckpoint-Inhibitoren bei Frauen im Vergleich zu Männern erreicht werden kann (Irelli et al., 2020). Diese gesteigerte innate und adaptive Immunantwort bei Frauen ist auf eine Vielzahl an Faktoren wie Genetik, Sexualhormone und psychosoziale Faktoren zurückzuführen (Ruggieri et al., 2016, Klein et al., 2015, Moulton, 2018). Daten aus präklinischen Studien an Tiermodellen zeigen, dass die Expression und Funktion des koinhibitorischen Rezeptors PD-1 und dessen Liganden PD-L1 durch Sexualhormone beeinflusst werden kann (Irelli et al., 2020). Somit könnten geschlechtsspezifische Unterschiede in der T-Zellfunktion und auch Unterschiede in der Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren unter anderem auf distinkte Expressionsmuster kostimulatorischer Moleküle zurückgeführt werden. Geschlechtsbedingte Expressionsunterschiede von kostimulatorischen Rezeptoren sind beim Menschen bisher kaum untersucht worden. Die hier dargestellten Daten zeigen, dass der aktivierende Rezeptor CD226 bei Frauen sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Zellen höher exprimiert wird als bei Männern. Auch die sich nach ConA-Stimulation herausbildende CD226^{hoch}-Population unter den CD8⁺ T-Zellen wird bei Frauen mit einer signifikant höheren Frequenz detektiert als bei Männern.

Gleichzeitig wird der als koinhibitorisch diskutierte Rezeptor CD96 auf CD8⁺ T-Zellen von weiblichen Probanden niedriger exprimiert als von männlichen. Für TIGIT hingegen sehen wir keinen geschlechterspezifischen Unterschied in der Expression. Zusammengefasst indizieren diese Daten, dass das Signalnetzwerk von CD226, CD96 und TIGIT bei Frauen mehr zur T-Zellaktivierung tendiert als bei Männern.

Stimulations- und differenzierungsabhängige Effekte auf die Expression der kosignalisierenden Rezeptoren

Um die Korezeptorexpression auf aktivierten T-Zellen zu untersuchen, müssen geeignete in vitro-Stimuli identifiziert werden. Häufig verwendete Substanzen zur T-Zellaktivierung sind ConA, SEB und PMA/Ionomycin, die jeweils über einen anderen Mechanismus wirken. Besonders beeindruckend war die Herunterregulation von CD96 nach Stimulation mit PMA/Ionomycin im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle sowie im Vergleich zu mit ConA oder SEB stimulierten Zellen. Es muss hier jedoch mitberücksichtigt werden, dass die T-Zellen mit PMA/Ionomycin für 6 Stunden inkubiert wurden. Die mit ConA- oder SEB-behandelten Zellen hingegen wurden nach 24 Stunden geerntet. Es ist bereits beschrieben worden, dass CD96 sechs bis zwölf Stunden nach T-Zellaktivierung herunterreguliert wird und zu einem späteren Zeitpunkt (ab dem dritten Tag nach Stimulation) wieder hochreguliert wird (Chan et al., 2014, Lepletier et al., 2019). Daher leitete sich auch der alternative Name für CD96 ab: TACTILE, ein Akronym, das für „T cell activation increased late expression“ steht (Wang et al., 1992). Für CD226 und TIGIT hingegen wurde eine andere Expressionskinetik nachgewiesen. CD226 wird in der Expression bereits am ersten Tag nach Stimulation hochreguliert, TIGIT sogar bereits nach vier Stunden (Lepletier et al., 2019). Dies ist eine mögliche Erklärung, warum nicht eine ähnliche Verminderung der Expression von CD226 und TIGIT nach PMA/Ionomycin-Stimulation beobachtet wurde. Folglich könnte die verringerte CD96-Expression nach Stimulation mit PMA und Ionomycin auch auf den frühen Zeitpunkt der Zellernte zurückgeführt werden. Ähnlich konnte nach 24-stündiger ConA- oder SEB-Stimulation ein Anstieg der TIGIT-Expression beobachtet werden, jedoch nicht nach sechsständiger PMA-Stimulation. Möglich ist, dass eine längere Inkubationszeit der T-Zellen ebenfalls der Grund für die höhere TIGIT-Expression ist. Zu bedenken ist jedoch, dass in dem zitierten Artikel von Lepletier et al. die T-Zellen mit CD3/CD28-Microbeads stimuliert wurden. Die Expressionskinetik von CD226, CD96 und TIGIT nach anderen Stimuli könnte sich somit durchaus von der bei Lepletier et al. beschriebenen Kinetik unterscheiden. Es ist aus den in dieser Arbeit aufgeführten Daten daher noch nicht absehbar, ob die Expressionsunterschiede der Rezeptoren auf die Wahl des Stimulus oder die verschiedenen Inkubationszeiten zurückzuführen sind. Weitere Untersuchungen sind daher nötig.

Von den drei Rezeptoren CD226, CD96 und TIGIT ist CD96 bisher das am wenigsten gut untersuchte Molekül. Nicht nur seine Rolle als kostimulatorischer oder koinhibitorischer Rezeptor ist Gegenstand aktueller Diskussionen, auch dessen Expressionsverhalten ist bisher von Wenigen genauer untersucht worden. In dem bereits erwähnten Artikel von Lepletier et al. wird die CD96-Expression auf verschiedenen unstimulierten T-Zell-Subpopulationen verglichen. Es wurde in Übereinstimmung mit den hier präsentierten Daten berichtet, dass bei CD4⁺ T-Zellen die CD96-Expression auf Effektor-Gedächtniszellen am höchsten sei. Bei CD8⁺ T-Zellen hingegen sei laut Lepletier et al. die CD96-Expression auf zentralen und Effektor-Gedächtniszellen am ausgeprägtesten (Lepletier et al., 2019). Meine Daten jedoch suggerieren eine signifikant höhere Expression auf unstimulierten naiven CD8⁺ T-Zellen als auf CD8⁺ Effektor-Gedächtniszellen. Weitere Datenerhebungen sind daher dahingehend notwendig. Nach Stimulation der T-Zellen mit ConA sank interessanterweise die CD96-Expression auf naiven CD8⁺ T-Zellen ab und stieg deutlich auf Effektor-T-Zellen an. Dies könnte ein Hinweis sein, dass CD96 nach T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle für terminal differenzierte CD8⁺ Effektor-T-Zellen spielt. Bisher existieren nur wenige Publikationen, die sich mit der Funktion von CD96 auf CD8⁺ T-Zellen auseinandersetzen. Es wurde gezeigt, dass HIV-Patienten mit einer hohen Viruslast eine geringere CD96-Expression auf CD8⁺ T-Zellen aufweisen und dass ausschließlich die CD96⁻ T-Zellen zytolytische Proteine sekretieren (Eriksson et al., 2012). Somit könnte CD96 die zytotoxischen Eigenschaften der CD8⁺ T-Zellen negativ beeinflussen. Dem widersprechende Daten lieferte ein kürzlich veröffentlichter Artikel von Chiang et al. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass CD96 in murinen und humanen CD8⁺ T-Zellen Signalwege des T-Zellrezeptors und mehrerer Effektorfunktionen positiv reguliert. Eine Blockade von CD96 bei murinen CD8⁺ T-Zellen führte zu einer verringerten T-Zell-vermittelten Zytotoxizität (Chiang et al., 2020). Hingegen gibt es Daten, die eine gesteigerte von CD8⁺ T-Zellen vermittelte Antitumorantwort bei Blockade von CD96 in Mäusen nachweisen. Dieser Effekt war in Kombination einer PD-1-Blockade sogar verstärkt (Mittal et al., 2019). Alle drei Publikationen postulieren eine entscheidende Rolle von CD96 für zytotoxische T-Zellen. Die vorliegenden Daten reichen jedoch nicht aus, um CD96 endgültig als koinhibitorischen oder kostimulatorischen Rezeptor für CD8⁺ T-Zellen zu charakterisieren. Es ist daher unabdingbar, abzuwarten, was zukünftige Studien zu dieser Diskussion beitragen werden.

Für das weitere Verständnis des Expressionsverhaltens eines Rezeptors, ist ebenfalls der Vergleich zu Expressionsmustern anderer bereits gut charakterisierter Korezeptoren wie z.B. PD-1 interessant. Mittal et al., die in ihrer Arbeit CD96 als koinhibitorischen Rezeptor auf CD8⁺ T-Zellen beschreiben, zeigten ebenfalls, dass CD96 mit PD-1 auf murinen und humanen tumorinfiltrierenden Lymphozyten koexprimiert wird. Diese Beobachtung scheint eine funktionelle Bedeutung zu haben, da eine Blockade beider Rezeptoren einen größeren Effekt auf die Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen hat als die Blockade

eines der beiden Rezeptoren (Mittal et al., 2019). In dieser Arbeit wurde daher die Expression von PD-1 auf unstimulierten CD96-positiven und -negativen T-Zellen aus dem peripheren Blut verglichen. Während auf CD4⁺ T-Zellen PD-1 eher auf CD96⁺ T-Zellen exprimiert wurde, fand sich PD-1 bei CD8⁺ T-Zellen entgegen der ursprünglichen Erwartung jedoch eher auf CD96⁻ T-Zellen. Lepletier et al. haben sich in ihrer Studie ebenfalls für die Koexpression von CD96 und PD-1 auf T-Zellen aus dem peripheren Blut interessiert. Sie beobachteten eine gesteigerte Koexpression von CD96 und PD-1 auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen sieben Tage nach Stimulation der T-Zellen entweder mit CD3/CD28-Microbeads oder durch ein Memory Recall Assay mit EBV-transformierten autologen lymphoblastoiden B-Zelllinien (LCL). Diese gesteigerte Koexpression wurde vor allem bei nicht proliferierenden Zellen beobachtet, weshalb sie als ein Zeichen der Hyporesponsivität angesehen werden kann (Lepletier et al., 2019). Das würde erklären, warum Mittal et al. eine so deutliche Steigerung der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Antitumorantwort nach doppelter Blockade beobachten konnten. In der Zusammenschau dieser Daten scheint die Koexpression von CD96 und PD-1 auf T-Zellen nach deren Aktivierung hochreguliert zu werden und könnte auf eine Hyporeaktivität dieser Zellen im Rahmen einer T-Zell-Erschöpfung hinweisen.

Bedeutung der CD96-Expression und IL-9-Produktion für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Vor dem Hintergrund der Diskussion um die Bedeutung von CD96 für CD8⁺ T-Zellen ist der beobachtete Expressionsunterschied von CD96 auf CD8⁺ T-Zellen zwischen gesunden Probanden und CED-Patienten besonders interessant. Die Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde bisher grundsätzlich mehr mit T-Helferzellen als mit zytotoxischen T-Zellen assoziiert. Allerdings mehren sich Publikationen, die den CD8⁺ T-Zellen auch eine bedeutende Rolle in dem Zusammenhang zuschreiben. So wurden in der Darmmukosa von CED-Patienten gesteigerte Zahlen an zytotoxischen T-Zellen sowie eine verstärkte MHC-I-vermittelte zytotoxische Aktivität gegen autologe Zellen detektiert (Okazaki et al., 1993, Müller et al., 1998). Die Interaktion von CD8⁺ T-Zellen mit intestinalen Epithelzellen bei CED-Patienten induziert eine starke IFN γ -Produktion (Bisping et al., 2001). Auch in zwei Kolitis-Mausmodellen induzierten CD8⁺ T-Zellen eine Entzündung im Darm durch Erkennung von epithelialen Antigenen und anschließende Granzym-B- und IFN γ -Produktion (Nancey et al., 2006, Westendorf et al., 2006). In Anbetracht dieser Daten wurde die Hypothese formuliert, dass CD8⁺ T-Zellen eventuell wichtige Initiatoren der intestinalen Entzündung sind. Durch ihre zytotoxische Aktivität gegen das Darmepithel beschädigen sie die Darmbarriere, wodurch die Translokation von antigenem Material aus dem Darmlumen in die Darmmukosa ermöglicht wird. Dies wirkt dann als Trigger für die dysregulierte Entzündungsreaktion, die von T-Helferzellen vermittelt wird (Cheroutre, 2006). Dass CD8⁺ T-Zellen zur Entstehung von CED beitragen, wird weiterhin durch die Entdeckung prognostischer Transkriptionsmarker in CD8⁺ T-Zellen bei CED-Patienten unterstützt, die zytotoxische

T-Zellen mit der Pathogenese von CED in Verbindung bringen (Lee et al., 2011, McKinney et al., 2010, Gasparetto et al., 2021). Ebenso kann in postoperativen Morbus Crohn-Patienten ein Anstieg von CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut und der Lamina propria des Ileums, die Granzym B und Perforin exprimieren, das endoskopische Wiederauftreten der Erkrankung vorhersagen. Das Ausmaß des Anstiegs zytotoxischer T-Zellen korrelierte mit der Krankheitsschwere (Boschetti et al., 2016). Eine neue Studie von Corridoni et al. verglich aus dem Kolon von Colitis ulcerosa Patienten gewonnene CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen mit Zellen von gesunden Probanden durch eine Vielzahl von Methoden, unter anderem Einzelzell-Transkriptionsanalyse und Massen-Zytometrie. Es wurden knapp unter 1000 Gene identifiziert, die sich in ihrer Expression zwischen CED-Patienten und gesunden Probanden unterscheiden und zu veränderten Signalwegaktivitäten und stärkeren kostimulatorischen Signalen in Effektorzellen von CED-Patienten führen. Unter diesen anders exprimierten Genen ist auch CD96 (Corridoni et al., 2020). Die Daten meiner Arbeit zeigen, dass CD96 bei CED Patienten, besonders bei Colitis ulcerosa-Patienten, auf CD8⁺ T-Zellen signifikant geringer exprimiert wird. Wie oben bereits diskutiert, ist nicht geklärt, ob CD96 eher kostimulatorische oder koinhibierende Funktion auf CD8⁺ T-Zellen hat. Geht man von einer inhibitorischen Rolle aus, könnte dies ein weiterer Hinweis auf vermehrte zytotoxische Aktivität durch CD8⁺ T-Zellen bei CED-Patienten sein. Um herauszufinden, ob diese geringere CD96-Expression auch auf Morbus Crohn-Patienten zutrifft, ist eine Studie mit größeren Fallzahlen erforderlich. Eine endgültige Aussage zur Rolle von CD96 bei CED lässt sich mit den vorliegenden Daten natürlich noch nicht treffen, jedoch wären weitere Untersuchungen mit der Analyse zusätzlicher Parameter wie z.B. zytotoxischer Moleküle von großem Interesse.

Ein weiterer Faktor, dessen Beteiligung an der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in letzter Zeit vermehrt diskutiert wurde, ist das Zytokin Interleukin 9. Im Rahmen dieser Arbeit wurden CD4⁺ CD226^{hoch} T-Zellen als Hauptquelle der IL-9-Produktion identifiziert. Es ist bekannt, dass CD226 ein wichtiger Modulator von T-Zell-Effektorfunktionen ist. Unter CD4⁺ T-Zellen wird CD226 vor allem auf T_H1-Zellen exprimiert. Die Expression dieses kostimulierenden Rezeptors wird unter Bedingungen, die eine T_H2-Polarisation begünstigen, herunterreguliert (Dardalhon et al., 2005, Lozano et al., 2013). Die hohe Expression von CD226 auf IL-9-produzierenden T-Zellen war zunächst etwas überraschend. Denn es ist bereits gezeigt worden, dass CD226 die Expression des für T_H2-Zellen wichtigen Transkriptionsfaktors GATA3 herunterreguliert und dadurch die T_H2-Polarisation verhindert (Lozano et al., 2013). GATA3 wird auf einem geringeren Niveau auch von T_H9-Zellen exprimiert (Veldhoen et al., 2008). In geringen Mengen fördert GATA3 die T_H9-Differenzierung, unter anderem durch Hemmung der Aktivierung von FoxP3, einem wichtigen Transkriptionsfaktor der regulatorischen T-Zellen (Kaplan et al., 2015). Folglich ist eine hohe CD226-Expression, die den Transkriptionsfaktor GATA3 unterdrücken müsste, auf IL-9-produzierenden Zellen kontrainditiv. Wird GATA3 allerdings auf zu hohem Niveau exprimiert, werden T_H2-assoziierte Gene aktiviert und die

Expression eines für die T_H9 -Polarisation wichtigen Transkriptionsfaktors PU.1 wird geblockt (Dardalhon et al., 2008, Chang et al., 2005, Chang et al., 2009, Chang et al., 2010). Also könnte die hohe CD226-Expression notwendig sein, um die GATA3-Expression auf einem Level zu halten, die einer IL-9-Produktion förderlich ist, aber nicht zu einer T_H2 -Polarisation führt (Abbildung 26). Neben dem Einfluss von CD226 auf die IL-9-Produktion, war auch die Bedeutung von CD96 für dieses Zytokin interessant. Da bei Mäusen bereits gezeigt worden ist, dass CD96 einen hemmenden Einfluss auf die IL-9-Produktion hat (Stanko et al., 2018), wurde auch in den hier dargestellten Daten ein ähnlicher Zusammenhang erwartet. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied in der IL-9-Produktion zwischen CD96-positiven und negativen T-Zellen festgestellt werden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass sich die Funktion von CD96 bei Maus und Mensch deutlich unterscheiden könnte und weitere Informationen gesammelt werden müssen.

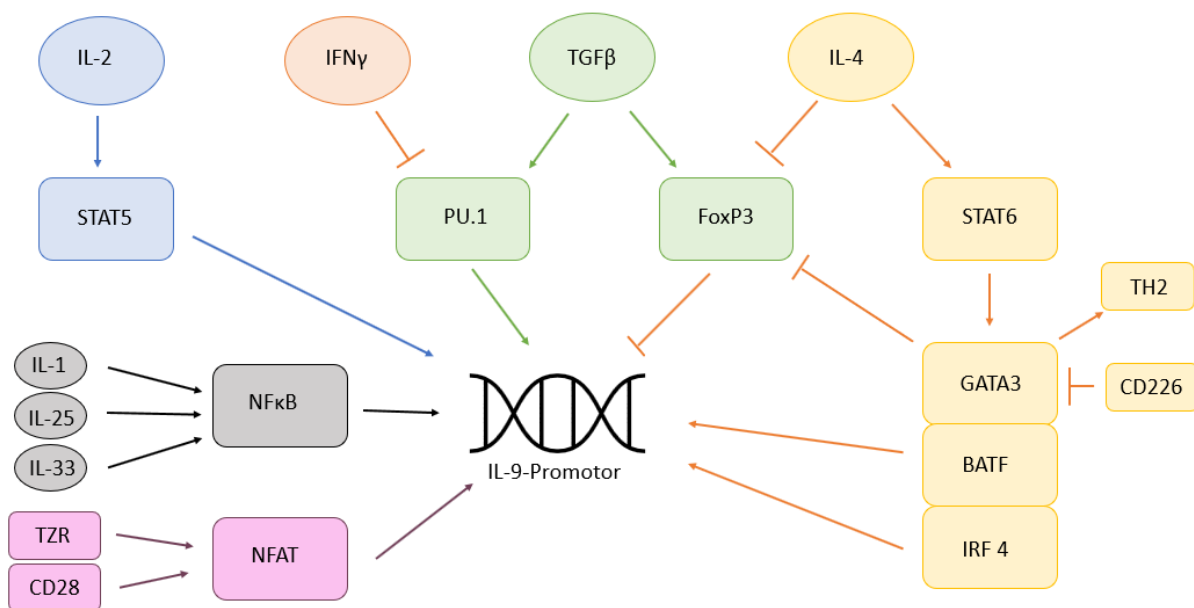


Abbildung 26 Darstellung relevanter Zytokine und Transkriptionsfaktoren für die T_H9 -Differenzierung und IL-9-Produktion nach (Kaplan et al., 2015). Die Herunterregulation von GATA3 unter CD226-Einfluss könnte eine T_H9 -Differenzierung gegenüber einer T_H2 -Differenzierung begünstigen (Lozano et al., 2013). IL=Interleukin, IFN γ = Interferon gamma, TGF β = Transforming growth factor beta, STAT= Signal Transducers and Activators of Transcription, PU.1= PU box binding protein 1, FoxP3= Forkhead-Box-Protein 3, GATA3= GATA binding protein 3, BATF= Basic Leucin Zipper ATF-like transcription factor, IRF 4= Interferon regulatory factor 4, NF κ B= nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, NFAT= Nuclear factor of activated T cells, TZR= T-Zell-Rezeptor, CD= Cluster of differentiation

Es ist bereits beschrieben worden, dass IL-9-Level im Serum von CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht sind (Defendenti et al., 2015). Daher wurde erwartet, ähnliche Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zu erhalten. Leider konnte kein signifikanter Unterschied zwischen CED-Patienten und gesunden Probanden bezüglich der IL-9-Produktion dargestellt werden. Damit im Einklang steht die Tatsache, dass auch die Frequenzen CD226^{hoch}-exprimierender T-Zellen sich nicht zwischen CED-Patienten und gesunden Probanden unterschieden. Defendenti et al. analysierten Serum-IL-9-Level mittels ELISA, während in dieser Arbeit ausschließlich mit Durchflusszytometrie

gearbeitet wurde. Eventuell ist die von Defendenti et al. verwendete Methodik sensitiver als die Durchflusszytometrie bezüglich der Zytokindetektion. Jedoch konnte ich eine signifikant höhere IL-9-Produktion durch CD4⁺ T-Zellen bei untherapierten Patienten im Vergleich zu CED-Patienten behandelt mit DMARDs, Prednisolon oder Anti-TNF α -Antikörpern nachweisen. Es ist schon gezeigt worden, dass die genannten Therapeutika die Zytokinproduktion durch T-Zellen beeinflussen können, entweder direkt durch Beeinflussung der Genexpression oder indirekt über Depletion der zytokinproduzierenden T-Zellen (Billmeier et al., 2016, Broen and van Laar, 2020, Ingawale and Mandlik, 2020). Durch Inhibition der Transkriptionsfaktoren NF κ B und NFAT können DMARDs, Prednisolon oder anti-TNF α -Antikörper die IL-9-Genexpression direkt beeinflussen (Abbildung 27). Folglich ist die Detektion von geringeren Leveln an IL-9 bei mit immunmodulatorischen Medikamenten therapierten Patienten durchaus schlüssig. Entsprechend habe ich eine höhere Frequenz an CD226^{hoch} T-Zellen in der untherapierten Behandlungsgruppe erwartet. Allerdings unterschieden sich die Frequenzen von CD226^{hoch} T-Zellen nicht signifikant zwischen den einzelnen Patientengruppen. Auch die Expression von CD96, TIGIT und allgemein CD226 differierte nicht signifikant zwischen den verschiedenen Therapiegruppen. Dies könnte durch zu geringe Fallzahlen bedingt gewesen sein. Möglicherweise werden aber nur die IL-9-Transkription und -Produktion durch die immunmodulatorischen Therapien beeinflusst, während die Expression der Korezeptoren unbeeinflusst bleibt.

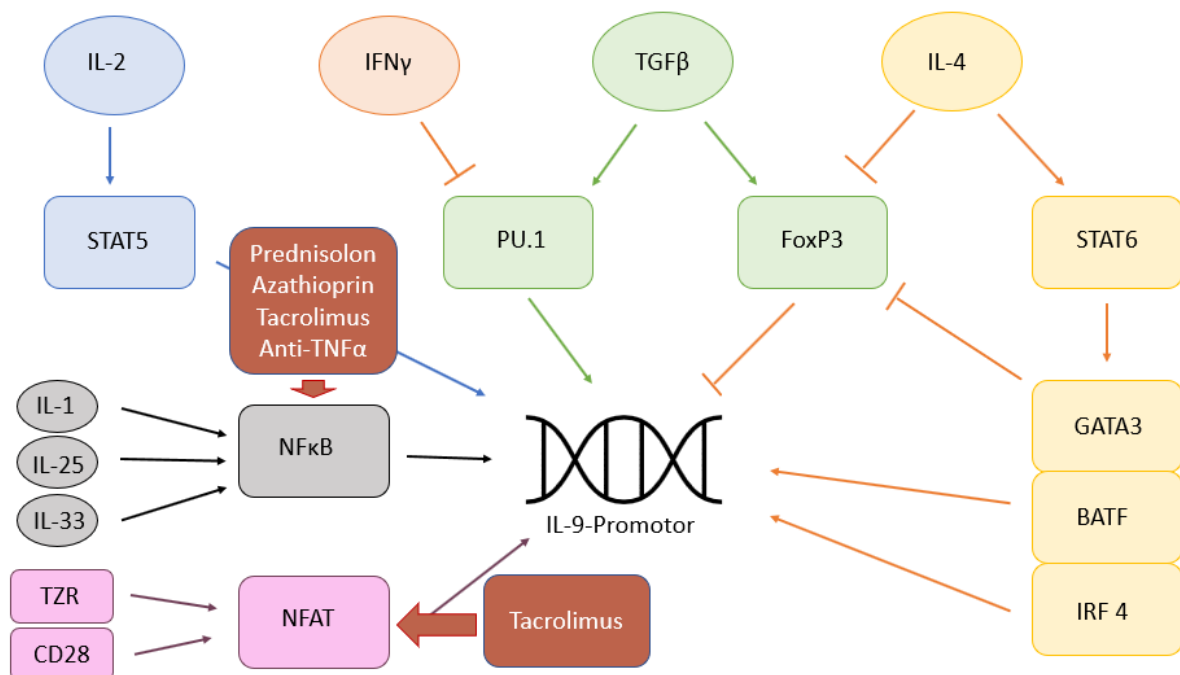


Abbildung 27 Darstellung relevanter Zytokine und Transkriptionsfaktoren für die TH9-Differenzierung und IL-9-Produktion nach (Kaplan et al., 2015). Einfluss von CED-Medikamenten auf IL-9-Genexpression (Billmeier et al., 2016, Broen and van Laar, 2020, Ingawale and Mandlik, 2020). IL=Interleukin, IFN γ = Interferon gamma, TGF β = Transforming growth factor beta, STAT= Signal Transducers and Activators of Transcription, PU.1= PU box binding protein 1, FoxP3= Forkhead-Box-Protein 3, GATA3= GATA binding protein 3, BATF= Basic Leucin Zipper ATF-like transcription factor, IRF 4= Interferon regulatory factor 4, NF κ B= nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, NFAT= Nuclear factor of activated T cells, TZR= T-Zell-Rezeptor, CD= Cluster of differentiation

Limitationen

Diese Arbeit hat die Einschränkung, dass mit den durchgeführten Untersuchungen nur Assoziationen erstellt werden konnten und keine Aussagen zu kausalen Zusammenhängen möglich sind. Des Weiteren muss bedacht werden, dass es sich hier um in vitro generierte Daten handelt. Die gewonnenen peripheren Blutmonozyten wurden mit Substanzen behandelt, um eine künstliche Aktivierung der Zellen zu erreichen. Die hier verwendeten Stimuli stellen keine natürlichen Antigene dar. Der Stimulationsmechanismus dieser Substanzen unterscheidet sich somit erheblich von der natürlichen T-Zellaktivierung. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, hat die Wahl des Stimulationsprotokolls mit künstlichen Stimuli große Auswirkungen auf die Korezeptorexpression und Zytokinproduktion. Durch Stimulationen hingegen mit natürlichen z.B. Recall-Antigenen wie CMV-Peptiden können Daten generiert werden, die Daten aus in-vivo-Versuchen näher sind.

Eine weitere Einschränkung dieser Arbeit ergab sich aus dem Design des genutzten Antikörperpanels. Zur Untersuchung der Effektorfunktionen der CD226^{hoch}-Population stand nur die Auswertung der IL-9-Produktion zur Verfügung. Daraus lässt sich nicht schließen, ob diese Zellpopulation allgemein über starke Effektorfunktionen verfügt. Vor allem ob die zytotoxischen Eigenschaften der CD8⁺ T-Zellen durch die hohe CD226-Expression beeinflusst wird, konnte im Rahmen dieses Projektes nicht beantwortet werden.

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind in ihrer klinischen Präsentation höchst vielfältig. Nicht nur die beiden Hauptentitäten der CED, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, unterscheiden sich stark in klinischen und pathogenetischen Aspekten. Auch innerhalb der beiden Entitäten gibt es eine Vielzahl an Erscheinungsformen. Die für diese Arbeit rekrutierte Gruppe an CED-Patienten ist daher sehr heterogen bezüglich Krankheitsdauer, Krankheitsaktivität, klinischer Präsentation, Zahl der Vortherapien und Ansprechen auf die aktuelle Therapie. Bei Betrachtung dieser Patienten als einer Population sind möglicherweise einige Informationen verloren gegangen, die bei einer differenzierten Betrachtung eventuell zugänglich gewesen wären. Dies hätte jedoch eine deutlich größere Anzahl an rekrutierten CED-Patienten erfordert, die ich aufgrund zeitlicher Beschränkungen und mit meinen begrenzten Ressourcen in diese Studie nicht hätte einschließen können. Beim Vergleich der Behandlungsgruppen fällt eine ungleiche Verteilung der Anzahl der Patienten in den einzelnen Gruppen auf (5 untherapiert, 5 DMARDs/Prednisolon vs 16 Anti TNF). Die kleinen Fallzahlen in zwei der Behandlungsgruppen können dazu geführt haben, dass vorhandene Unterschiede zwischen den Gruppen in der Rezeptorexpression nicht detektiert wurden. Ein weiterer Punkt, der bei Betrachtung der Gruppe der CED-Patienten beachtet werden muss, ist die ungleiche Geschlechterverteilung. Unter den CED befinden sich deutlich mehr Männer als Frauen (20 Männer versus 6 Frauen). Da in dieser

Arbeit gezeigt wurde, dass das Geschlecht die Expression von Korezeptoren wie CD226 und CD96 signifikant beeinflussen kann, sollte dieser Umstand nicht unbeachtet bleiben.

Ausblick und Schlussfolgerung

Somit muss diese Arbeit einige interessante Aspekte noch unbeantwortet lassen, wirft aber so manche neue Frage auf. Weist ein Anstieg in der Expression koinhibitorischer Rezeptoren wie TIGIT auf eine vermehrte T-Zellerschöpfung im Alter hin? Welchen Einfluss haben geschlechtsspezifische Faktoren wie Sexualhormone auf die Balance von kostimulatorischen und koinhibitorischen Molekülen und welche klinischen Konsequenzen hat ein solcher Einfluss? Hat CD96 eine kostimulatorische oder koinhibitorische Rolle für humane T-Zellen und welche Bedeutung hat die verminderte CD96-Expression bei CED-Patienten? Ist eine hohe CD226-Expression tatsächlich essenziell für die IL-9-Produktion durch T-Zellen und über welchen Mechanismus wird dies vermittelt? Beeinflusst eine hohe CD226-Expression auch andere T-Zell-Effektorfunktionen? Um diese Fragen zu beantworten, sind selbstverständlich weitere Untersuchungen notwendig. Das Signalnetzwerk von CD226, CD96 und TIGIT scheint Bedeutung für den Alterungsprozess, die T-Zell-Erschöpfung, geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort sowie in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu haben. Gleichzeitig stellt sich gerade der CD226/TIGIT/CD96-Signalweg als zunehmend komplex heraus und bedarf näherer Untersuchung (Dougall et al., 2017). Dies sind Fragen, auf die wir in einem Zeitalter individualisierter Medizin und zielgerichteter Therapien eine Antwort brauchen.

Literaturverzeichnis

- AHMED, R., BEVAN, M. J., REINER, S. L. & FEARON, D. T. 2009. The precursors of memory: models and controversies. *Nat Rev Immunol*, 9, 662-8.
- AI, W., LI, H., SONG, N., LI, L. & CHEN, H. 2013. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int J Environ Res Public Health*, 10, 3834-42.
- AIELLO, A., FARZANEH, F., CANDORE, G., CARUSO, C., DAVINELLI, S., GAMBINO, C. M., LIGOTTI, M. E., ZAREIAN, N. & ACCARDI, G. 2019. Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Front Immunol*, 10, 2247.
- AKBAR, A. N. & HENSON, S. M. 2011. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol*, 11, 289-95.
- APPLEMAN, L. J., BEREZOVSKAYA, A., GRASS, I. & BOUSSIOTIS, V. A. 2000. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol*, 164, 144-51.
- AUTHORS & COLLABORATORS: 2018. [Updated S3-Guideline Colitis ulcerosa. German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) - AWMF Registry 021/009]. *Z Gastroenterol*, 56, 1087-1169.
- AYANO, M., TSUKAMOTO, H., KOHNO, K., UEDA, N., TANAKA, A., MITOMA, H., AKAHOSHI, M., ARINOBU, Y., NIRO, H., HORIUCHI, T. & AKASHI, K. 2015. Increased CD226 Expression on CD8+ T Cells Is Associated with Upregulated Cytokine Production and Endothelial Cell Injury in Patients with Systemic Sclerosis. *J Immunol*, 195, 892-900.
- AZUMA, M., ITO, D., YAGITA, H., OKUMURA, K., PHILLIPS, J. H., LANIER, L. L. & SOMOZA, C. 1993. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature*, 366, 76-9.
- BAKER, K. F. & ISAACS, J. D. 2018. Novel therapies for immune-mediated inflammatory diseases: What can we learn from their use in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis? *Ann Rheum Dis*, 77, 175-187.
- BECKER, C., WIRTZ, S., BLESSING, M., PIRHONEN, J., STRAND, D., BECHTHOLD, O., FRICK, J., GALLE, P. R., AUTENRIETH, I. & NEURATH, M. F. 2003. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest*, 112, 693-706.
- BEKTAS, A., SCHURMAN, S. H., SEN, R. & FERRUCCI, L. 2017. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging. *J Leukoc Biol*, 102, 977-988.
- BERNARDO, D., VALLEJO-DÍEZ, S., MANN, E. R., AL-HASSI, H. O., MARTÍNEZ-ABAD, B., MONTALVILLO, E., TEE, C. T., MURUGANANTHAN, A. U., NÚÑEZ, H., PEAKE, S. T., HART, A. L., FERNÁNDEZ-SALAZAR, L., GARROTE, J. A., ARRANZ, E. & KNIGHT, S. C. 2012. IL-6 promotes immune responses in human ulcerative colitis and induces a skin-homing phenotype in the dendritic cells and T cells they stimulate. *Eur J Immunol*, 42, 1337-53.
- BERNHARDT, G. 2014. TACTILE becomes tangible: CD96 discloses its inhibitory peculiarities. *Nat Immunol*, 15, 406-8.
- BERNS, M. & HOMMES, D. W. 2016. Anti-TNF- α therapies for the treatment of Crohn's disease: the past, present and future. *Expert Opin Investig Drugs*, 25, 129-43.
- BIANCHERI, P., DI SABATINO, A., AMMOSCATO, F., FACCIOTTI, F., CAPRIOLI, F., CURCIARELLO, R., HOQUE, S. S., GHANBARI, A., JOE-NJOKU, I., GIUFFRIDA, P., ROVEDATTI, L., GEGINAT, J., CORAZZA, G. R. & MACDONALD, T. T. 2014. Absence of a role for interleukin-13 in inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol*, 44, 370-85.
- BILLMEIER, U., DIETERICH, W., NEURATH, M. F. & ATREYA, R. 2016. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 22, 9300-9313.
- BISPING, G., LÜGERING, N., LÜTKE-BRINTRUP, S., PAUELS, H. G., SCHÜRSMANN, G., DOMSCHKE, W. & KUCHARZIK, T. 2001. Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased

- induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol*, 123, 15-22.
- BLAKE, S. J., DOUGALL, W. C., MILES, J. J., TENG, M. W. & SMYTH, M. J. 2016a. Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 22, 5183-5188.
- BLAKE, S. J., STANNARD, K., LIU, J., ALLEN, S., YONG, M. C., MITTAL, D., AGUILERA, A. R., MILES, J. J., LUTZKY, V. P., DE ANDRADE, L. F., MARTINET, L., COLONNA, M., TAKEDA, K., KÜHNEL, F., GURLEVIK, E., BERNHARDT, G., TENG, M. W. & SMYTH, M. J. 2016b. Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov*, 6, 446-59.
- BOIRIVANT, M., FUSS, I. J., CHU, A. & STROBER, W. 1998. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med*, 188, 1929-39.
- BOISE, L. H., MINN, A. J., NOEL, P. J., JUNE, C. H., ACCAVITTI, M. A., LINDSTEN, T. & THOMPSON, C. B. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*, 3, 87-98.
- BOLES, K. S., VERMI, W., FACCHETTI, F., FUCHS, A., WILSON, T. J., DIACOVO, T. G., CELLA, M. & COLONNA, M. 2009. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur J Immunol*, 39, 695-703.
- BOSCHETTI, G., NANCEY, S., MOUSSATA, D., COTTE, E., FRANCOIS, Y., FLOURIÉ, B. & KAISERLIAN, D. 2016. Enrichment of Circulating and Mucosal Cytotoxic CD8+ T Cells Is Associated with Postoperative Endoscopic Recurrence in Patients with Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*, 10, 338-45.
- BOTTICELLI, A., ONESTI, C. E., ZIZZARI, I., CERBELLI, B., SCIATTELLA, P., OCCHIPINTI, M., ROBERTO, M., DI PIETRO, F., BONIFACINO, A., GHIDINI, M., VICI, P., PIZZUTI, L., NAPOLETANO, C., STRIGARI, L., D'AMATI, G., MAZZUCA, F., NUTI, M. & MARCHETTI, P. 2017. The sexist behaviour of immune checkpoint inhibitors in cancer therapy? *Oncotarget*, 8, 99336-99346.
- BOTTINO, C., CASTRICONI, R., PENDE, D., RIVERA, P., NANNI, M., CARNEMOLLA, B., CANTONI, C., GRASSI, J., MARCENARO, S., REYMOND, N., VITALE, M., MORETTA, L., LOPEZ, M. & MORETTA, A. 2003. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*, 198, 557-67.
- BOUMAN, A., HEINEMAN, M. J. & FAAS, M. M. 2005. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*, 11, 411-23.
- BOUTROS, C., TARHINI, A., ROUTIER, E., LAMBOTTE, O., LADURIE, F. L., CARBONNEL, F., IZZEDDINE, H., MARABELLE, A., CHAMPIAT, S., BERDELOU, A., LANOY, E., TEXIER, M., LIBENCIUC, C., EGGERMONT, A. M., SORIA, J. C., MATEUS, C. & ROBERT, C. 2016. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol*, 13, 473-86.
- BROEN, J. C. A. & VAN LAAR, J. M. 2020. Mycophenolate mofetil, azathioprine and tacrolimus: mechanisms in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol*, 16, 167-178.
- CARLSTEN, M., BJÖRKSTRÖM, N. K., NORELL, H., BRYCESON, Y., VAN HALL, T., BAUMANN, B. C., HANSON, M., SCHEDVINS, K., KIESSLING, R., LJUNGGREN, H. G. & MALMBERG, K. J. 2007. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res*, 67, 1317-25.
- CHAN, C. J., ANDREWS, D. M., MCLAUGHLIN, N. M., YAGITA, H., GILFILLAN, S., COLONNA, M. & SMYTH, M. J. 2010. DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J Immunol*, 184, 902-11.
- CHAN, C. J., MARTINET, L., GILFILLAN, S., SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F., CHOW, M. T., TOWN, L., RITCHIE, D. S., COLONNA, M., ANDREWS, D. M. & SMYTH, M. J. 2014. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol*, 15, 431-8.
- CHANG, H. C., HAN, L., JABEEN, R., CAROTTA, S., NUTT, S. L. & KAPLAN, M. H. 2009. PU.1 regulates TCR expression by modulating GATA-3 activity. *J Immunol*, 183, 4887-94.
- CHANG, H. C., SEHRA, S., GOSWAMI, R., YAO, W., YU, Q., STRITESKY, G. L., JABEEN, R., MCKINLEY, C., AHYI, A. N., HAN, L., NGUYEN, E. T., ROBERTSON, M. J., PERUMAL, N. B., TEPPER, R. S., NUTT,

- S. L. & KAPLAN, M. H. 2010. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*, 11, 527-34.
- CHANG, H. C., ZHANG, S., THIEU, V. T., SLEE, R. B., BRUNS, H. A., LARIBEE, R. N., KLEMSZ, M. J. & KAPLAN, M. H. 2005. PU.1 expression delineates heterogeneity in primary Th2 cells. *Immunity*, 22, 693-703.
- CHANNAPPANAVAR, R., TWARDY, B. S., KRISHNA, P. & SUVAS, S. 2009. Advancing age leads to predominance of inhibitory receptor expressing CD4 T cells. *Mech Ageing Dev*, 130, 709-12.
- CHAPLIN, D. D. 2010. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S3-23.
- CHASSAING, B., AITKEN, J. D., MALLESHAPPA, M. & VIJAY-KUMAR, M. 2014. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*, 104, Unit 15.25.
- CHAUVIN, J. M., PAGLIANO, O., FOURCADE, J., SUN, Z., WANG, H., SANDER, C., KIRKWOOD, J. M., CHEN, T. H., MAURER, M., KORMAN, A. J. & ZAROOUR, H. M. 2015. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients. *J Clin Invest*, 125, 2046-58.
- CHEN, L. & FLIES, D. B. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13, 227-42.
- CHEROUTRE, H. 2006. In IBD eight can come before four. *Gastroenterology*, 131, 667-70.
- CHIANG, E. Y., DE ALMEIDA, P. E., DE ALMEIDA NAGATA, D. E., BOWLES, K. H., DU, X., CHITRE, A. S., BANTA, K. L., KWON, Y., MCKENZIE, B., MITTMAN, S., CUBAS, R., ANDERSON, K. R., WARMING, S. & GROGAN, J. L. 2020. CD96 functions as a co-stimulatory receptor to enhance CD8. *Eur J Immunol*.
- CHIKUMA, S. 2016. Basics of PD-1 in self-tolerance, infection, and cancer immunity. *Int J Clin Oncol*, 21, 448-55.
- CONFORTI, F., PALA, L., BAGNARDI, V., DE PAS, T., MARTINETTI, M., VIALE, G., GELBER, R. D. & GOLDBIRSCHE, A. 2018. Cancer immunotherapy efficacy and patients' sex: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*, 19, 737-746.
- CONFORTI, F., PALA, L., BAGNARDI, V., VIALE, G., DE PAS, T., PAGAN, E., PENNACCHIOLI, E., COCOROCCHIO, E., FERRUCCI, P. F., DE MARINIS, F., GELBER, R. D. & GOLDBIRSCHE, A. 2019. Sex-Based Heterogeneity in Response to Lung Cancer Immunotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst*, 111, 772-781.
- CONFORTI, F., PALA, L., PAGAN, E., CORTI, C., BAGNARDI, V., QUEIROLO, P., CATANIA, C., DE PAS, T. & GIACCONE, G. 2021. Sex-based differences in response to anti-PD-1 or PD-L1 treatment in patients with non-small-cell lung cancer expressing high PD-L1 levels. A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *ESMO Open*, 6, 100251.
- COPPÉ, J. P., PATIL, C. K., RODIER, F., SUN, Y., MUÑOZ, D. P., GOLDSTEIN, J., NELSON, P. S., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6, 2853-68.
- CORRIDONI, D., ANTANAVICIUTE, A., GUPTA, T., FAWKNER-CORBETT, D., AULICINO, A., JAGIELOWICZ, M., PARIKH, K., REPAPI, E., TAYLOR, S., ISHIKAWA, D., HATANO, R., YAMADA, T., XIN, W., SLAWINSKI, H., BOWDEN, R., NAPOLITANI, G., BRAIN, O., MORIMOTO, C., KOOHY, H. & SIMMONS, A. 2020. Single-cell atlas of colonic CD8. *Nat Med*, 26, 1480-1490.
- DAMIÃO, A. O. M. C., DE AZEVEDO, M. F. C., CARLOS, A. S., WADA, M. Y., SILVA, T. V. M. & FEITOSA, F. C. 2019. Conventional therapy for moderate to severe inflammatory bowel disease: A systematic literature review. *World J Gastroenterol*, 25, 1142-1157.
- DANESE, S., RUDZIŃSKI, J., BRANDT, W., DUPAS, J. L., PEYRIN-BIROULET, L., BOUHNİK, Y., KLECZKOWSKI, D., UEBEL, P., LUKAS, M., KNUTSSON, M., ERLANDSSON, F., HANSEN, M. B. & KESHAV, S. 2015. Tralokinumab for moderate-to-severe UC: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase IIa study. *Gut*, 64, 243-9.
- DARDALHON, V., AWASTHI, A., KWON, H., GALILEOS, G., GAO, W., SOBEL, R. A., MITSDOERFFER, M., STROM, T. B., ELYAMAN, W., HO, I. C., KHOURY, S., OUKKA, M. & KUCHROO, V. K. 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*, 9, 1347-55.

- DARDALHON, V., SCHUBART, A. S., REDDY, J., MEYERS, J. H., MONNEY, L., SABATOS, C. A., AHUJA, R., NGUYEN, K., FREEMAN, G. J., GREENFIELD, E. A., SOBEL, R. A. & KUCHROO, V. K. 2005. CD226 is specifically expressed on the surface of Th1 cells and regulates their expansion and effector functions. *J Immunol*, 175, 1558-65.
- DECMAN, V., LAIDLAW, B. J., DOERING, T. A., LENG, J., ERTL, H. C., GOLDSTEIN, D. R. & WHERRY, E. J. 2012. Defective CD8 T cell responses in aged mice are due to quantitative and qualitative changes in virus-specific precursors. *J Immunol*, 188, 1933-41.
- DEFENDENTI, C., SARZI-PUTTINI, P., SAIBENI, S., BOLLANI, S., BRUNO, S., ALMASIO, P. L., DECLICH, P. & ATZENI, F. 2015. Significance of serum IL-9 levels in inflammatory bowel disease. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 28, 569-75.
- DI SABATINO, A., BIANCHERI, P., ROVEDATTI, L., MACDONALD, T. T. & CORAZZA, G. R. 2012. New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 18, 368-71.
- DOSTERT, C., GRUSDAT, M., LETELLIER, E. & BRENNER, D. 2019. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiol Rev*, 99, 115-160.
- DOUGALL, W. C., KURTULUS, S., SMYTH, M. J. & ANDERSON, A. C. 2017. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*, 276, 112-120.
- ERIKSSON, E. M., KEH, C. E., DEEKS, S. G., MARTIN, J. N., HECHT, F. M. & NIXON, D. F. 2012. Differential expression of CD96 surface molecule represents CD8⁺ T cells with dissimilar effector function during HIV-1 infection. *PLoS One*, 7, e51696.
- FARBER, D. L., YUDANIN, N. A. & RESTIFO, N. P. 2014. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14, 24-35.
- FRANCESCHI, C., BONAFÈ, M. & VALENSIN, S. 2000a. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine*, 18, 1717-20.
- FRANCESCHI, C., BONAFÈ, M., VALENSIN, S., OLIVIERI, F., DE LUCA, M., OTTAVIANI, E. & BENEDICTIS, G. 2000b. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, 908, 244-54.
- FRANCESCHI, C., GARAGNANI, P., VITALE, G., CAPRI, M. & SALVIOLI, S. 2017. Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab*, 28, 199-212.
- FREEMAN, G. J., LONG, A. J., IWAI, Y., BOURQUE, K., CHERNOVA, T., NISHIMURA, H., FITZ, L. J., MALENKOVICH, N., OKAZAKI, T., BYRNE, M. C., HORTON, H. F., FOUSSER, L., CARTER, L., LING, V., BOWMAN, M. R., CARRENO, B. M., COLLINS, M., WOOD, C. R. & HONJO, T. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192, 1027-34.
- FUCHS, A., CELLA, M., GIURISATO, E., SHAW, A. S. & COLONNA, M. 2004. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol*, 172, 3994-8.
- FUHRMAN, C. A., YEH, W. I., SEAY, H. R., SAIKUMAR LAKSHMI, P., CHOPRA, G., ZHANG, L., PERRY, D. J., MCCLYMONT, S. A., YADAV, M., LOPEZ, M. C., BAKER, H. V., ZHANG, Y., LI, Y., WHITLEY, M., VON SCHACK, D., ATKINSON, M. A., BLUESTONE, J. A. & BRUSKO, T. M. 2015. Divergent Phenotypes of Human Regulatory T Cells Expressing the Receptors TIGIT and CD226. *J Immunol*, 195, 145-55.
- FULOP, T., LARBI, A., DUPUIS, G., LE PAGE, A., FROST, E. H., COHEN, A. A., WITKOWSKI, J. M. & FRANCESCHI, C. 2017. Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Front Immunol*, 8, 1960.
- FURMAN, D., HEJBLUM, B. P., SIMON, N., JOJIC, V., DEKKER, C. L., THIÉBAUT, R., TIBSHIRANI, R. J. & DAVIS, M. M. 2014. Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 869-74.
- FUSS, I. J., NEURATH, M., BOIRIVANT, M., KLEIN, J. S., DE LA MOTTE, C., STRONG, S. A., FIOCCHI, C. & STROBER, W. 1996. Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in

- inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*, 157, 1261-70.
- FÖRSTER, R., DAVALOS-MISLITZ, A. C. & ROT, A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*, 8, 362-71.
- GAO, J., ZHENG, Q., XIN, N., WANG, W. & ZHAO, C. 2017. CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Sci*, 108, 1934-1938.
- GASPARETTO, M., PAYNE, F., NAYAK, K., KRAICZY, J., GLEMAS, C., PHILIP-MCKENZIE, Y., ROSS, A., EDGAR, R. D., ZERBINO, D. R., SALVESTRINI, C., TORRENTE, F., VENTHAM, N. T., KALLA, R., SATSANGI, J., SARKIES, P., HEUSCHKEL, R. & ZILBAUER, M. 2021. Transcription and DNA Methylation Patterns of Blood-Derived CD8. *Gastroenterology*, 160, 232-244.e7.
- GEREMIA, A., BIANCHERI, P., ALLAN, P., CORAZZA, G. R. & DI SABATINO, A. 2014. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*, 13, 3-10.
- GERLACH, K., HWANG, Y., NIKOLAEV, A., ATREYA, R., DORNHOFF, H., STEINER, S., LEHR, H. A., WIRTZ, S., VIETH, M., WAISMAN, A., ROSENBAUER, F., MCKENZIE, A. N., WEIGMANN, B. & NEURATH, M. F. 2014. TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat Immunol*, 15, 676-86.
- GERLACH, K., MCKENZIE, A. N., NEURATH, M. F. & WEIGMANN, B. 2015. IL-9 regulates intestinal barrier function in experimental T cell-mediated colitis. *Tissue Barriers*, 3, e983777.
- GERNER, R. R., MOSCHEN, A. R. & TILG, H. 2013. Targeting T and B lymphocytes in inflammatory bowel diseases: lessons from clinical trials. *Dig Dis*, 31, 328-35.
- GILFILLAN, S., CHAN, C. J., CELLA, M., HAYNES, N. M., RAPAPORT, A. S., BOLES, K. S., ANDREWS, D. M., SMYTH, M. J. & COLONNA, M. 2008. DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med*, 205, 2965-73.
- GONG, Z., JIA, Q., CHEN, J., DIAO, X., GAO, J., WANG, X. & ZHU, B. 2019. Impaired Cytolytic Activity and Loss of Clonal Neoantigens in Elderly Patients With Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 14, 857-866.
- GOUGH, S. C., WALKER, L. S. & SANSOM, D. M. 2005. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev*, 204, 102-15.
- GRANIER, C., GEY, A., RONCELIN, S., WEISS, L., PAILLAUD, E. & TARTOUR, E. 2021. Immunotherapy in older patients with cancer. *Biomed J*, 44, 260-271.
- GRIESBECK, M., ZIEGLER, S., LAFFONT, S., SMITH, N., CHAUVEAU, L., TOMEZSKO, P., SHAREI, A., KOURJIAN, G., PORICHIS, F., HART, M., PALMER, C. D., SIRIGNANO, M., BEISEL, C., HILDEBRANDT, H., CÉNAC, C., VILLANI, A. C., DIEFENBACH, T. J., LE GALL, S., SCHWARTZ, O., HERBEUVAL, J. P., AUTRAN, B., GUÉRY, J. C., CHANG, J. J. & ALTFELD, M. 2015. Sex Differences in Plasmacytoid Dendritic Cell Levels of IRF5 Drive Higher IFN- α Production in Women. *J Immunol*, 195, 5327-36.
- GRIGNOLIO, A., MISHTO, M., FARIA, A. M., GARAGNANI, P., FRANCESCHI, C. & TIERI, P. 2014. Towards a liquid self: how time, geography, and life experiences reshape the biological identity. *Front Immunol*, 5, 153.
- GUAN, W. J., LIANG, W. H., ZHAO, Y., LIANG, H. R., CHEN, Z. S., LI, Y. M., LIU, X. Q., CHEN, R. C., TANG, C. L., WANG, T., OU, C. Q., LI, L., CHEN, P. Y., SANG, L., WANG, W., LI, J. F., LI, C. C., OU, L. M., CHENG, B., XIONG, S., NI, Z. Y., XIANG, J., HU, Y., LIU, L., SHAN, H., LEI, C. L., PENG, Y. X., WEI, L., LIU, Y., HU, Y. H., PENG, P., WANG, J. M., LIU, J. Y., CHEN, Z., LI, G., ZHENG, Z. J., QIU, S. Q., LUO, J., YE, C. J., ZHU, S. Y., CHENG, L. L., YE, F., LI, S. Y., ZHENG, J. P., ZHANG, N. F., ZHONG, N. S., HE, J. X. & COVID-19, C. M. T. E. G. F. 2020. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. *Eur Respir J*, 55.
- HARJUNPÄÄ, H. & GUILLEREY, C. 2020. TIGIT as an emerging immune checkpoint. *Clin Exp Immunol*, 200, 108-119.
- HATHCOCK, K. S., LASZLO, G., DICKLER, H. B., BRADSHAW, J., LINSLEY, P. & HODES, R. J. 1993. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science*, 262, 905-7.

- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- HE, S. & SHARPLESS, N. E. 2017. Senescence in Health and Disease. *Cell*, 169, 1000-1011.
- HELLER, F., FLORIAN, P., BOJARSKI, C., RICHTER, J., CHRIST, M., HILLENBRAND, B., MANKERTZ, J., GITTER, A. H., BÜRCEL, N., FROMM, M., ZEITZ, M., FUSS, I., STROBER, W. & SCHULZKE, J. D. 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, 129, 550-64.
- HELLER, F., FUSS, I. J., NIEUWENHUIS, E. E., BLUMBERG, R. S. & STROBER, W. 2002. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity*, 17, 629-38.
- HEWAGAMA, A., PATEL, D., YARLAGADDA, S., STRICKLAND, F. M. & RICHARDSON, B. C. 2009. Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. *Genes Immun*, 10, 509-16.
- HONG, H., WANG, Q., LI, J., LIU, H., MENG, X. & ZHANG, H. 2019. Aging, Cancer and Immunity. *J Cancer*, 10, 3021-3027.
- HUEBER, W., SANDS, B. E., LEWITZKY, S., VANDEMEULEBROECKE, M., REINISCH, W., HIGGINS, P. D., WEHKAMP, J., FEAGAN, B. G., YAO, M. D., KARCZEWSKI, M., KARCZEWSKI, J., PEZOUS, N., BEK, S., BRUIN, G., MELLGARD, B., BERGER, C., LONDEI, M., BERTOLINO, A. P., TOUGAS, G., TRAVIS, S. P. & GROUP, S. I. C. S. D. S. 2012. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*, 61, 1693-700.
- IGUCHI-MANAKA, A., KAI, H., YAMASHITA, Y., SHIBATA, K., TAHARA-HANAOKA, S., HONDA, S., YASUI, T., KIKUTANI, H., SHIBUYA, K. & SHIBUYA, A. 2008. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J Exp Med*, 205, 2959-64.
- INGAWALE, D. K. & MANDLIK, S. K. 2020. New insights into the novel anti-inflammatory mode of action of glucocorticoids. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 42, 59-73.
- IRELLI, A., SIRUFO, M. M., D'UGO, C., GINALDI, L. & DE MARTINIS, M. 2020. Sex and Gender Influences on Cancer Immunotherapy Response. *Biomedicines*, 8.
- ISHIDA, Y., AGATA, Y., SHIBAHARA, K. & HONJO, T. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, 11, 3887-95.
- JABEEN, R., GOSWAMI, R., AWE, O., KULKARNI, A., NGUYEN, E. T., ATTENASIO, A., WALSH, D., OLSON, M. R., KIM, M. H., TEPPER, R. S., SUN, J., KIM, C. H., TAPAROWSKY, E. J., ZHOU, B. & KAPLAN, M. H. 2013. Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J Clin Invest*, 123, 4641-53.
- JAMESON, S. C. & MASOPUST, D. 2018. Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity*, 48, 214-226.
- JIN, J. M., BAI, P., HE, W., WU, F., LIU, X. F., HAN, D. M., LIU, S. & YANG, J. K. 2020. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity and Mortality. *Front Public Health*, 8, 152.
- JOHNSTON, R. J., COMPS-AGRAR, L., HACKNEY, J., YU, X., HUSENI, M., YANG, Y., PARK, S., JAVINAL, V., CHIU, H., IRVING, B., EATON, D. L. & GROGAN, J. L. 2014. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell*, 26, 923-937.
- JOLLER, N., HAFNER, J. P., BRYNEDAL, B., KASSAM, N., SPOERL, S., LEVIN, S. D., SHARPE, A. H. & KUCHROO, V. K. 2011. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J Immunol*, 186, 1338-42.
- JOLLER, N., LOZANO, E., BURKETT, P. R., PATEL, B., XIAO, S., ZHU, C., XIA, J., TAN, T. G., SEFIK, E., YAJNIK, V., SHARPE, A. H., QUINTANA, F. J., MATHIS, D., BENOIST, C., HAFNER, D. A. & KUCHROO, V. K. 2014. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity*, 40, 569-81.
- KAPLAN, M. H. 2017. The transcription factor network in Th9 cells. *Semin Immunopathol*, 39, 11-20.
- KAPLAN, M. H., GLOSSON, N. L., STRITESKY, G. L., YEH, N., KINZFOGL, J., ROHRBAUGH, S. L., GOSWAMI, R., PHAM, D., LEVY, D. E., BRUTKIEWICZ, R. R., BLUM, J. S., COOPER, S., HANGOC,

- G. & BROXMEYER, H. E. 2011. STAT3-dependent IL-21 production from T helper cells regulates hematopoietic progenitor cell homeostasis. *Blood*, 117, 6198-201.
- KAPLAN, M. H., HUFFORD, M. M. & OLSON, M. R. 2015. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol*, 15, 295-307.
- KEIR, M. E. & SHARPE, A. H. 2005. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev*, 204, 128-43.
- KIM, H. S. & CHUNG, D. H. 2013. IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. *Mucosal Immunol*, 6, 347-57.
- KLEIN, S. L., JEDLICKA, A. & PEKOSZ, A. 2010. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect Dis*, 10, 338-49.
- KLEIN, S. L., MARRIOTT, I. & FISH, E. N. 2015. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 109, 9-15.
- KOBAYASHI, T., OKAMOTO, S., HISAMATSU, T., KAMADA, N., CHINEN, H., SAITO, R., KITAZUME, M. T., NAKAZAWA, A., SUGITA, A., KOGANEI, K., ISOBE, K. & HIBI, T. 2008. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, 57, 1682-9.
- KOUREPINI, E., PASCHALIDIS, N., SIMOES, D. C., AGGELAKOPOULOU, M., GROGAN, J. L. & PANOUTSAKOPOULOU, V. 2016. TIGIT Enhances Antigen-Specific Th2 Recall Responses and Allergic Disease. *J Immunol*, 196, 3570-80.
- LAFFERTY, K. J., ANDRUS, L. & PROWSE, S. J. 1980. Role of lymphokine and antigen in the control of specific T cell responses. *Immunol Rev*, 51, 279-314.
- LATCHMAN, Y., WOOD, C. R., CHERNOVA, T., CHAUDHARY, D., BORDE, M., CHERNOVA, I., IWAI, Y., LONG, A. J., BROWN, J. A., NUNES, R., GREENFIELD, E. A., BOURQUE, K., BOUSSIOTIS, V. A., CARTER, L. L., CARRENO, B. M., MALENKOVICH, N., NISHIMURA, H., OKAZAKI, T., HONJO, T., SHARPE, A. H. & FREEMAN, G. J. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*, 2, 261-8.
- LEE, J. C., LYONS, P. A., MCKINNEY, E. F., SOWERBY, J. M., CARR, E. J., BREDIN, F., RICKMAN, H. M., RATLAMWALA, H., HATTON, A., RAYNER, T. F., PARKES, M. & SMITH, K. G. 2011. Gene expression profiling of CD8+ T cells predicts prognosis in patients with Crohn disease and ulcerative colitis. *J Clin Invest*, 121, 4170-9.
- LEE, K. A., SHIN, K. S., KIM, G. Y., SONG, Y. C., BAE, E. A., KIM, I. K., KOH, C. H. & KANG, C. Y. 2016. Characterization of age-associated exhausted CD8+ T cells defined by increased expression of Tim-3 and PD-1. *Aging Cell*, 15, 291-300.
- LEPLETIER, A., LUTZKY, V. P., MITTAL, D., STANNARD, K., WATKINS, T. S., RATNATUNGA, C. N., SMITH, C., MCGUIRE, H. M., KEMP, R. A., MUKHOPADHYAY, P., WADDELL, N., SMYTH, M. J., DOUGALL, W. C. & MILES, J. J. 2019. The immune checkpoint CD96 defines a distinct lymphocyte phenotype and is highly expressed on tumor-infiltrating T cells. *Immunol Cell Biol*, 97, 152-164.
- LEVIN, S. D., TAFT, D. W., BRANDT, C. S., BUCHER, C., HOWARD, E. D., CHADWICK, E. M., JOHNSTON, J., HAMMOND, A., BONTADELLI, K., ARDOUREL, D., HEBB, L., WOLF, A., BUKOWSKI, T. R., RIXON, M. W., KUIJPER, J. L., OSTRANDER, C. D., WEST, J. W., BILSBOROUGH, J., FOX, B., GAO, Z., XU, W., RAMSDELL, F., BLAZAR, B. R. & LEWIS, K. E. 2011. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur J Immunol*, 41, 902-15.
- LI, M., XIA, P., DU, Y., LIU, S., HUANG, G., CHEN, J., ZHANG, H., HOU, N., CHENG, X., ZHOU, L., LI, P., YANG, X. & FAN, Z. 2014. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) receptor/poliovirus receptor (PVR) ligand engagement suppresses interferon-gamma production of natural killer cells via beta-arrestin 2-mediated negative signaling. *J Biol Chem*, 289, 17647-57.
- LINSLEY, P. S., BRADY, W., URNES, M., GROSMIRE, L. S., DAMLE, N. K. & LEDBETTER, J. A. 1991. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*, 174, 561-9.
- LINSLEY, P. S., CLARK, E. A. & LEDBETTER, J. A. 1990. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5031-5.

- LIU, S., ZHANG, H., LI, M., HU, D., LI, C., GE, B., JIN, B. & FAN, Z. 2013. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death Differ*, 20, 456-64.
- LIU, T., ZHANG, L., JOO, D. & SUN, S. C. 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2.
- LOZANO, E., DOMINGUEZ-VILLAR, M., KUCHROO, V. & HAFNER, D. A. 2012. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol*, 188, 3869-75.
- LOZANO, E., JOLLER, N., CAO, Y., KUCHROO, V. K. & HAFNER, D. A. 2013. The CD226/CD155 interaction regulates the proinflammatory (Th1/Th17)/anti-inflammatory (Th2) balance in humans. *J Immunol*, 191, 3673-80.
- MARSHALL, J. S., WARRINGTON, R., WATSON, W. & KIM, H. L. 2018. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 14, 49.
- MCKINNEY, E. F., LYONS, P. A., CARR, E. J., HOLLIS, J. L., JAYNE, D. R., WILLCOCKS, L. C., KOUKOULAKI, M., BRAZMA, A., JOVANOVIĆ, V., KEMENY, D. M., POLLARD, A. J., MACARY, P. A., CHAUDHRY, A. N. & SMITH, K. G. 2010. A CD8+ T cell transcription signature predicts prognosis in autoimmune disease. *Nat Med*, 16, 586-91, 1p following 591.
- MENG, Y., WU, P., LU, W., LIU, K., MA, K., HUANG, L., CAI, J., ZHANG, H., QIN, Y., SUN, H., DING, W. & GUI, L. 2020. Sex-specific clinical characteristics and prognosis of coronavirus disease-19 infection in Wuhan, China: A retrospective study of 168 severe patients. *PLoS Pathog*, 16, e1008520.
- MEYER, D., SETH, S., ALBRECHT, J., MAIER, M. K., DU PASQUIER, L., RAVENS, I., DREYER, L., BURGER, R., GRAMATZKI, M., SCHWINZER, R., KREMMER, E., FOERSTER, R. & BERNHARDT, G. 2009. CD96 interaction with CD155 via its first Ig-like domain is modulated by alternative splicing or mutations in distal Ig-like domains. *J Biol Chem*, 284, 2235-44.
- MITTAL, D., LEPLETIER, A., MADORE, J., AGUILERA, A. R., STANNARD, K., BLAKE, S. J., WHITEHALL, V. L. J., LIU, C., BETTINGTON, M. L., TAKEDA, K., LONG, G. V., SCOLYER, R. A., LAN, R., SIEMERS, N., KORMAN, A., TENG, M. W. L., JOHNSTON, R. J., DOUGALL, W. C. & SMYTH, M. J. 2019. CD96 Is an Immune Checkpoint That Regulates CD8. *Cancer Immunol Res*, 7, 559-571.
- MOSMANN, T. R. & COFFMAN, R. L. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7, 145-73.
- MOULTON, V. R. 2018. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front Immunol*, 9, 2279.
- MUDTER, J., YU, J., ZUFFEREY, C., BRÜSTLE, A., WIRTZ, S., WEIGMANN, B., HOFFMAN, A., SCHENK, M., GALLE, P. R., LEHR, H. A., MUELLER, C., LOHOFF, M. & NEURATH, M. F. 2011. IRF4 regulates IL-17A promoter activity and controls ROR γ t-dependent Th17 colitis in vivo. *Inflamm Bowel Dis*, 17, 1343-58.
- MUELLER, D. L., JENKINS, M. K. & SCHWARTZ, R. H. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol*, 7, 445-80.
- MUELLER, S. N., GEBHARDT, T., CARBONE, F. R. & HEATH, W. R. 2013. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol*, 31, 137-61.
- MÜLLER, S., LORY, J., CORAZZA, N., GRIFFITHS, G. M., Z'GRAGGEN, K., MAZZUCHELLI, L., KAPPELER, A. & MUELLER, C. 1998. Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am J Pathol*, 152, 261-8.
- NABEKURA, T., SHIBUYA, K., TAKENAKA, E., KAI, H., SHIBATA, K., YAMASHITA, Y., HARADA, K., TAHARA-HANAOKA, S., HONDA, S. & SHIBUYA, A. 2010. Critical role of DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of acute graft-versus-host disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 18593-8.
- NALBANDIAN, G. & KOVATS, S. 2005. Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol Res*, 31, 91-106.

- NALLEWEG, N., CHIRIAC, M. T., PODSTAWA, E., LEHMANN, C., RAU, T. T., ATREYA, R., KRAUSS, E., HUNDORFEAN, G., FICHTNER-FEIGL, S., HARTMANN, A., BECKER, C. & MUDTER, J. 2015. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. *Gut*, 64, 743-55.
- NANCEY, S., HOLVÖET, S., GRABER, I., JOUBERT, G., PHILIPPE, D., MARTIN, S., NICOLAS, J. F., DESREUMAUX, P., FLOURIÉ, B. & KAISERLIAN, D. 2006. CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. *Gastroenterology*, 131, 485-96.
- NEURATH, M. F. 2014. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 14, 329-42.
- NEURATH, M. F., WEIGMANN, B., FINOTTO, S., GLICKMAN, J., NIEUWENHUIS, E., IJIMA, H., MIZOGUCHI, A., MIZOGUCHI, E., MUDTER, J., GALLE, P. R., BHAN, A., AUTSCHBACH, F., SULLIVAN, B. M., SZABO, S. J., GLIMCHER, L. H. & BLUMBERG, R. S. 2002. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med*, 195, 1129-43.
- NISHIMURA, H. & HONJO, T. 2001. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol*, 22, 265-8.
- NISHIMURA, H., NOSE, M., HIAI, H., MINATO, N. & HONJO, T. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11, 141-51.
- OH-OKA, K., ABE, F., SHIBUYA, A. & SHIBUYA, K. 2022. CD96 Blockade Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Dermatitis via Suppression of IL-17A Production by Dermal $\gamma\delta$ T Cells. *J Immunol*.
- OKAZAKI, K., MORITA, M., NISHIMORI, I., SANO, S., TOYONAGA, M., NAKAZAWA, Y. & YAMAMOTO, Y. 1993. Major histocompatibility antigen-restricted cytotoxicity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 104, 384-91.
- OKORO, N. I. & KANE, S. V. 2009. Gender-related issues in the female inflammatory bowel disease patient. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 3, 145-54.
- PARK, J., LI, H., ZHANG, M., LU, Y., HONG, B., ZHENG, Y., HE, J., YANG, J., QIAN, J. & YI, Q. 2014. Murine Th9 cells promote the survival of myeloid dendritic cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 63, 835-45.
- PASTORELLI, L., DE SALVO, C., MERCADO, J. R., VECCHI, M. & PIZARRO, T. T. 2013. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. *Front Immunol*, 4, 280.
- PASTORELLI, L., GARG, R. R., HOANG, S. B., SPINA, L., MATTIOLI, B., SCARPA, M., FIOCCHI, C., VECCHI, M. & PIZARRO, T. T. 2010. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8017-22.
- PENDE, D., CASTRICONI, R., ROMAGNANI, P., SPAGGIARI, G. M., MARCENARO, S., DONDERO, A., LAZZERI, E., LASAGNI, L., MARTINI, S., RIVERA, P., CAPOBIANCO, A., MORETTA, L., MORETTA, A. & BOTTINO, C. 2006. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood*, 107, 2030-6.
- PENNOCK, N. D., WHITE, J. T., CROSS, E. W., CHENEY, E. E., TAMBURINI, B. A. & KEDL, R. M. 2013. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ*, 37, 273-83.
- PINCHUK, I. V., BESWICK, E. J. & REYES, V. E. 2010. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins (Basel)*, 2, 2177-97.
- PINTO, J. A., VALLEJOS, C. S., RAEZ, L. E., MAS, L. A., RUIZ, R., TORRES-ROMAN, J. S., MORANTE, Z., ARAUJO, J. M., GÓMEZ, H. L., AGUILAR, A., BRETTEL, D., FLORES, C. J. & ROLFO, C. 2018. Gender and outcomes in non-small cell lung cancer: an old prognostic variable comes back for targeted therapy and immunotherapy? *ESMO Open*, 3, e000344.
- POPP, V., GERLACH, K., MOTT, S., TUROWSKA, A., GARN, H., ATREYA, R., LEHR, H. A., HO, I. C., RENZ, H., WEIGMANN, B. & NEURATH, M. F. 2017. Rectal Delivery of a DNzyme That Specifically Blocks the Transcription Factor GATA3 and Reduces Colitis in Mice. *Gastroenterology*, 152, 176-192.e5.

- POWRIE, F., LEACH, M. W., MAUZE, S., MENON, S., CADDLE, L. B. & COFFMAN, R. L. 1994. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*, 1, 553-62.
- PREIß, J. C., BOKEMEYER, B., BUHR, H. J., DIGNAß, A., HÄUSER, W., HARTMANN, F., HERRLINGER, K. R., KALTZ, B., KIENLE, P., KRUIS, W., KUCHARZIK, T., LANGHORST, J., SCHREIBER, S., SIEGMUND, B., STALLMACH, A., STANGE, E. F., STEIN, J., HOFFMANN, J. C. & GASTROENTEROLOGY, G. S. O. 2014. [Updated German clinical practice guideline on "Diagnosis and treatment of Crohn's disease" 2014]. *Z Gastroenterol*, 52, 1431-84.
- PUGLIESE, D., FELICE, C., PAPA, A., GASBARRINI, A., RAPACCINI, G. L., GUIDI, L. & ARMUZZI, A. 2017. Anti TNF- α therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future. *Expert Rev Clin Immunol*, 13, 223-233.
- QIN, W., HU, L., ZHANG, X., JIANG, S., LI, J., ZHANG, Z. & WANG, X. 2019. The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. *Front Immunol*, 10, 2298.
- RAMSBOTTOM, K. M., HAWKINS, E. D., SHIMONI, R., MCGRATH, M., CHAN, C. J., RUSSELL, S. M., SMYTH, M. J. & OLIARO, J. 2014. Cutting edge: DNAX accessory molecule 1-deficient CD8+ T cells display immunological synapse defects that impair antitumor immunity. *J Immunol*, 192, 553-7.
- REINISCH, W., HOMMES, D. W., VAN ASSCHE, G., COLOMBEL, J. F., GENDRE, J. P., OLDENBURG, B., TEML, A., GEBOES, K., DING, H., ZHANG, L., TANG, M., CHENG, M., VAN DEVENTER, S. J., RUTGEERTS, P. & PEARCE, T. 2006. A dose escalating, placebo controlled, double blind, single dose and multidose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut*, 55, 1138-44.
- ROSEN, M. J., CHATURVEDI, R., WASHINGTON, M. K., KUHNHEIN, L. A., MOORE, P. D., COGGESHALL, S. S., MCDONOUGH, E. M., WEITKAMP, J. H., SINGH, A. B., COBURN, L. A., WILLIAMS, C. S., YAN, F., VAN KAER, L., PEEBLES, R. S. & WILSON, K. T. 2013. STAT6 deficiency ameliorates severity of oxazolone colitis by decreasing expression of claudin-2 and Th2-inducing cytokines. *J Immunol*, 190, 1849-58.
- ROVEDATTI, L., KUDO, T., BIANCHERI, P., SARRA, M., KNOWLES, C. H., RAMPTON, D. S., CORAZZA, G. R., MONTELEONE, G., DI SABATINO, A. & MACDONALD, T. T. 2009. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut*, 58, 1629-36.
- RUDD, C. E., TAYLOR, A. & SCHNEIDER, H. 2009. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*, 229, 12-26.
- RUGGIERI, A., ANTICOLI, S., D'AMBROSIO, A., GIORDANI, L. & VIORA, M. 2016. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. *Ann Ist Super Sanita*, 52, 198-204.
- SAKURABA, A., SATO, T., KAMADA, N., KITAZUME, M., SUGITA, A. & HIBI, T. 2009. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 137, 1736-45.
- SALLUSTO, F., LENIG, D., FÖRSTER, R., LIPP, M. & LANZAVECCHIA, A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401, 708-12.
- SANSOM, D. M., MANZOTTI, C. N. & ZHENG, Y. 2003. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol*, 24, 314-9.
- SCHEIFFELE, F. & FUSS, I. J. 2002. Induction of TNBS colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 15, Unit 15.19.
- SCHMITT, E., GERMANN, T., GOEDERT, S., HOEHN, P., HUELS, C., KOELSCH, S., KÜHN, R., MÜLLER, W., PALM, N. & RÜDE, E. 1994. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol*, 153, 3989-96.
- SCHMITT, E., VAN BRANDWIJK, R., VAN SNICK, J., SIEBOLD, B. & RÜDE, E. 1989. TCGF III/P40 is produced by naive murine CD4+ T cells but is not a general T cell growth factor. *Eur J Immunol*, 19, 2167-70.

- SCHNEIDER, H. & RUDD, C. E. 2014. Diverse mechanisms regulate the surface expression of immunotherapeutic target *ctla-4*. *Front Immunol*, 5, 619.
- SCHWARTZ, R. H., MUELLER, D. L., JENKINS, M. K. & QUILL, H. 1989. T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 2, 605-10.
- SEIDEL, J. A., OTSUKA, A. & KABASHIMA, K. 2018. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol*, 8, 86.
- SEIDELIN, J. B., COSKUN, M., KVIST, P. H., HOLM, T. L., HOLGERSEN, K. & NIELSEN, O. H. 2015. IL-33 promotes GATA-3 polarization of gut-derived T cells in experimental and ulcerative colitis. *J Gastroenterol*, 50, 180-90.
- SEKIDO, K., TOMIHARA, K., TACHINAMI, H., HESHIKI, W., SAKURAI, K., MONIRUZZAMAN, R., IMAUE, S., FUJIWARA, K. & NOGUCHI, M. 2019. Alterations in composition of immune cells and impairment of anti-tumor immune response in aged oral cancer-bearing mice. *Oral Oncol*, 99, 104462.
- SETH, S., GEORGOUDAKI, A. M., CHAMBERS, B. J., QIU, Q., KREMMER, E., MAIER, M. K., CZELOTH, N., RAVENS, I., FOERSTER, R. & BERNHARDT, G. 2009. Heterogeneous expression of the adhesion receptor CD226 on murine NK and T cells and its function in NK-mediated killing of immature dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 86, 91-101.
- SETH, S., MAIER, M. K., QIU, Q., RAVENS, I., KREMMER, E., FÖRSTER, R. & BERNHARDT, G. 2007. The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 364, 959-65.
- SHAHIDI, N., BRESSLER, B. & PANACCIONE, R. 2016. Vedolizumab for the treatment of ulcerative colitis. *Expert Opin Biol Ther*, 16, 129-35.
- SHIBUYA, A., CAMPBELL, D., HANNUM, C., YSSEL, H., FRANZ-BACON, K., MCCLANAHAN, T., KITAMURA, T., NICHOLL, J., SUTHERLAND, G. R., LANIER, L. L. & PHILLIPS, J. H. 1996. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity*, 4, 573-81.
- SHIBUYA, K., LANIER, L. L., PHILLIPS, J. H., OCHS, H. D., SHIMIZU, K., NAKAYAMA, E., NAKAUCHI, H. & SHIBUYA, A. 1999. Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity*, 11, 615-23.
- SHIMADA, Y., HAYASHI, M., NAGASAKA, Y., OHNO-IWASHITA, Y. & INOMATA, M. 2009. Age-associated up-regulation of a negative co-stimulatory receptor PD-1 in mouse CD4+ T cells. *Exp Gerontol*, 44, 517-22.
- SHLAPATSKA, L. M., MIKHALAP, S. V., BERDOVA, A. G., ZELENSKY, O. M., YUN, T. J., NICHOLS, K. E., CLARK, E. A. & SIDORENKO, S. P. 2001. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol*, 166, 5480-7.
- SIMPSON, S. J., SHAH, S., COMISKEY, M., DE JONG, Y. P., WANG, B., MIZOGUCHI, E., BHAN, A. K. & TERHORST, C. 1998. T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells. *J Exp Med*, 187, 1225-34.
- SO, T. & ISHII, N. 2019. The TNF-TNFR Family of Co-signal Molecules. *Adv Exp Med Biol*, 1189, 53-84.
- SONG, Y., WANG, B., SONG, R., HAO, Y., WANG, D., LI, Y., JIANG, Y., XU, L., MA, Y., ZHENG, H., KONG, Y. & ZENG, H. 2018. T-cell Immunoglobulin and ITIM Domain Contributes to CD8(+) T-cell Immunosenescence. *Aging Cell*, 17.
- SPERLING, A. I., AUGER, J. A., EHST, B. D., RULIFSON, I. C., THOMPSON, C. B. & BLUESTONE, J. A. 1996. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J Immunol*, 157, 3909-17.
- STAMM, H., OLIVEIRA-FERRER, L., GROSSJOHANN, E. M., MUSCHHAMMER, J., THADEN, V., BRAUNECK, F., KISCHEL, R., MÜLLER, V., BOKEMEYER, C., FIEDLER, W. & WELLBROCK, J. 2019. Targeting the TIGIT-PVR immune checkpoint axis as novel therapeutic option in breast cancer. *Oncoimmunology*, 8, e1674605.

- STANIETSKY, N., ROVIS, T. L., GLASNER, A., SEIDEL, E., TSUKERMAN, P., YAMIN, R., ENK, J., JONJIC, S. & MANDELBOIM, O. 2013. Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR. *Eur J Immunol*, 43, 2138-50.
- STANIETSKY, N., SIMIC, H., ARAPOVIC, J., TOPORIK, A., LEVY, O., NOVIK, A., LEVINE, Z., BEIMAN, M., DASSA, L., ACHDOUT, H., STERN-GINOSSAR, N., TSUKERMAN, P., JONJIC, S. & MANDELBOIM, O. 2009. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 17858-63.
- STANKO, K., IWERT, C., APPELT, C., VOGT, K., SCHUMANN, J., STRUNK, F. J., AHRlich, S., SCHLICKEISER, S., ROMAGNANI, C., JÜRCHOTT, K., MEISEL, C., WILLIMSKY, G., KÜHL, A. A. & SAWITZKI, B. 2018. CD96 expression determines the inflammatory potential of IL-9-producing Th9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E2940-E2949.
- STAUDT, V., BOTHUR, E., KLEIN, M., LINGNAU, K., REUTER, S., GREBE, N., GERLITZKI, B., HOFFMANN, M., ULGES, A., TAUBE, C., DEHZAD, N., BECKER, M., STASSEN, M., STEINBORN, A., LOHOFF, M., SCHILD, H., SCHMITT, E. & BOPP, T. 2010. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*, 33, 192-202.
- SU, E. W., LIN, J. Y. & KANE, L. P. 2008. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation. *Cytokine*, 44, 9-13.
- TAHARA-HANAOKA, S., SHIBUYA, K., ONODA, Y., ZHANG, H., YAMAZAKI, S., MIYAMOTO, A., HONDA, S., LANIER, L. L. & SHIBUYA, A. 2004. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int Immunol*, 16, 533-8.
- TAMIYA, T., ICHIYAMA, K., KOTANI, H., FUKAYA, T., SEKIYA, T., SHICHITA, T., HONMA, K., YUI, K., MATSUYAMA, T., NAKAO, T., FUKUYAMA, S., INOUE, H., NOMURA, M. & YOSHIMURA, A. 2013. Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction. *J Immunol*, 191, 2360-71.
- TIVOL, E. A., BORRIELLO, F., SCHWEITZER, A. N., LYNCH, W. P., BLUESTONE, J. A. & SHARPE, A. H. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3, 541-7.
- TORRES, J., MEHANDRU, S., COLOMBEL, J. F. & PEYRIN-BIROULET, L. 2017. Crohn's disease. *Lancet*, 389, 1741-1755.
- TURVEY, S. E. & BROIDE, D. H. 2010. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S24-32.
- UNGARO, R., MEHANDRU, S., ALLEN, P. B., PEYRIN-BIROULET, L. & COLOMBEL, J. F. 2017. Ulcerative colitis. *Lancet*, 389, 1756-1770.
- UYTTENHOVE, C., SIMPSON, R. J. & VAN SNICK, J. 1988. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6934-8.
- VAHIDY, F. S., PAN, A. P., AHNSTEDT, H., MUNSHI, Y., CHOI, H. A., TIRUNEH, Y., NASIR, K., KASH, B. A., ANDRIENI, J. D. & MCCULLOUGH, L. D. 2021. Sex differences in susceptibility, severity, and outcomes of coronavirus disease 2019: Cross-sectional analysis from a diverse US metropolitan area. *PLoS One*, 16, e0245556.
- VAN DER GEEST, K. S., ABDULAHAD, W. H., TETE, S. M., LORENCETTI, P. G., HORST, G., BOS, N. A., KROESEN, B. J., BROUWER, E. & BOOTS, A. M. 2014. Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4+ T cells. *Exp Gerontol*, 60, 190-6.
- VELDHOEN, M., UYTTENHOVE, C., VAN SNICK, J., HELMBY, H., WESTENDORF, A., BUER, J., MARTIN, B., WILHELM, C. & STOCKINGER, B. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 9, 1341-6.
- VOSKUHL, R. 2011. Sex differences in autoimmune diseases. *Biol Sex Differ*, 2, 1.
- VYAS, S. P. & GOSWAMI, R. 2018. A Decade of Th9 Cells: Role of Th9 Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*, 9, 1139.
- WANDS, J. R., PODOLSKY, D. K. & ISSELBACHER, K. J. 1976. Mechanism of human lymphocyte stimulation by concanavalin A: role of valence and surface binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 2118-22.

- WANG, C. Q., CHOY, F. C., SANNY, A., MURAKAMI, T., TAN, A. H. & LAM, K. P. 2023. An Inhibitory Role for Human CD96 Endodomain in T Cell Anti-Tumor Responses. *Cells*, 12.
- WANG, F., HOU, H., WU, S., TANG, Q., LIU, W., HUANG, M., YIN, B., HUANG, J., MAO, L., LU, Y. & SUN, Z. 2015. TIGIT expression levels on human NK cells correlate with functional heterogeneity among healthy individuals. *Eur J Immunol*, 45, 2886-97.
- WANG, P. L., O'FARRELL, S., CLAYBERGER, C. & KRENSKY, A. M. 1992. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J Immunol*, 148, 2600-8.
- WATERHOUSE, P., PENNINGER, J. M., TIMMS, E., WAKEHAM, A., SHAHINIAN, A., LEE, K. P., THOMPSON, C. B., GRIESSER, H. & MAK, T. W. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*, 270, 985-8.
- WEIGMANN, B. & NEURATH, M. F. 2017. Th9 cells in inflammatory bowel diseases. *Semin Immunopathol*, 39, 89-95.
- WESTENDORF, A. M., FLEISSNER, D., DEPPENMEIER, S., GRUBER, A. D., BRUDER, D., HANSEN, W., LIBLAU, R. & BUER, J. 2006. Autoimmune-mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen-specific CD8+ T cells. *Gastroenterology*, 131, 510-24.
- WHERRY, E. J. 2011. T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 12, 492-9.
- WHERRY, E. J. & KURACHI, M. 2015. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, 15, 486-99.
- WIRTZ, S., FINOTTO, S., KANZLER, S., LOHSE, A. W., BLESSING, M., LEHR, H. A., GALLE, P. R. & NEURATH, M. F. 1999. Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *J Immunol*, 162, 1884-8.
- WU, F., YANG, H., XU, X., REN, C., ZHENG, Y., ZHANG, H., CAI, B., QIU, R., REN, W. & QUAN, R. 2022. CD96 Downregulation Promotes the Immune Response of CD4 T Cells and Associates with Ankylosing Spondylitis. *Biomed Res Int*, 2022, 3946754.
- XIONG, P., SANG, H. W. & ZHU, M. 2015. Critical roles of co-activation receptor DNAX accessory molecule-1 in natural killer cell immunity. *Immunology*, 146, 369-78.
- XU, W. & LARBI, A. 2017. Markers of T Cell Senescence in Humans. *Int J Mol Sci*, 18.
- YA'QOUB, L., ELGENDY, I. Y. & PEPINE, C. J. 2021. Sex and gender differences in COVID-19: More to be learned! *Am Heart J Plus*, 3, 100011.
- YAMAZAKI, T., AKIBA, H., IWAI, H., MATSUDA, H., AOKI, M., TANNO, Y., SHIN, T., TSUCHIYA, H., PARDOLL, D. M., OKUMURA, K., AZUMA, M. & YAGITA, H. 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol*, 169, 5538-45.
- YANG, Y. C., RICCIARDI, S., CIARLETTA, A., CALVETTI, J., KELLEHER, K. & CLARK, S. C. 1989. Expression cloning of cDNA encoding a novel human hematopoietic growth factor: human homologue of murine T-cell growth factor P40. *Blood*, 74, 1880-4.
- YU, X., HARDEN, K., GONZALEZ, L. C., FRANCESCO, M., CHIANG, E., IRVING, B., TOM, I., IVELJA, S., REFINO, C. J., CLARK, H., EATON, D. & GROGAN, J. L. 2009. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*, 10, 48-57.
- YUAN, A., YANG, H., QI, H., CUI, J., HUA, W., LI, C., PANG, Z., ZHENG, W. & CUI, G. 2015. IL-9 antibody injection suppresses the inflammation in colitis mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 468, 921-6.
- ZHAO, L., CHENG, S., FAN, L., ZHANG, B. & XU, S. 2021. TIM-3: An update on immunotherapy. *Int Immunopharmacol*, 99, 107933.
- ZHU, J. & PAUL, W. E. 2010. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*, 238, 247-62.
- ZHU, J., YAMANE, H. & PAUL, W. E. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, 28, 445-89.
- ZHU, Y., YAO, S. & CHEN, L. 2011. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity*, 34, 466-78.

- ZINKERNAGEL, R. M. & DOHERTY, P. C. 1997. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today*, 18, 14-7.
- ZUNDLER, S. & NEURATH, M. F. 2017. Pathogenic T cell subsets in allergic and chronic inflammatory bowel disorders. *Immunol Rev*, 278, 263-276.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Franziska Strunk, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des Signalnetzwerks von CD226, TIGIT und CD96 für die humane T-Zell-Antwort und die Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen“ / „The role of the signalling network of CD226, TIGIT and CD96 for the human T cell response and the pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Franziska Strunk hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

STANKO, K., IWERT, C., APPELT, C., VOGT, K., SCHUMANN, J., **STRUNK, F. J.**, AHRlich, S., SCHLICKEISER, S., ROMAGNANI, C., JÜRCHOTT, K., MEISEL, C., WILLIMSKY, G., KÜHL, A. A. & SAWITZKI, B. 2018. CD96 expression determines the inflammatory potential of IL-9-producing Th9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E2940-E2949.

Beitrag im Einzelnen (bitte detailliert ausführen):

Franziska Strunk führte die Versuche zur Generierung der Daten dargestellt in Abbildung 3F der oben genannten Publikation durch. Periphere Blutmonozyten aus dem Blut von 10 gesunden Probanden wurden für 24 Stunden mit SEB stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer IFN γ - und IL-9-Produktion sowie ihrer CD96-Expression analysiert.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Birgit Sawitzki für die Bereitstellung meines Promotionsthemas sowie für die intensive Betreuung während des gesamten Promotionsprojekts bedanken. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung von Anfang bis Ende wäre mein Promotionsvorhaben nie so weit gekommen. Darüber hinaus unterstützte sie mich bei der Vorbereitung auf die Präsentation meiner Daten vor Fachpublikum und bei meiner Bewerbung für den Advanced Track Promotionsstudiengang. An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei Katarina Stanko, Christina Iwert und Christine Appelt bedanken. Frau Appelt arbeitete mich im Labor ein und brachte mir die Grundlagen der Zellkultur und Durchflusszytometrie bei und unterstützte mich stets bei Fragen und Problemen. Frau Dr. Stanko und Frau Iwert halfen mir ebenfalls im großen Maße bei methodischen Problemen im Labor, bei der Datenauswertung oder auch bei fachlichen Fragen. Herr Dr. Schlickeiser half mir beim Import meiner Daten in das statistische Analyseprogramm GraphPad Prism und bei Fragen zur Statistik. Mathias Streit zeigte mir den Umgang mit dem Durchflusszytometer Cytoflex S und der Auswertungssoftware KALUZA und unterstützte mich bei technischen Problemen. Des Weiteren gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Britta Siegmund, die mir ermöglicht hat, in ihrer Klinik CED-Patienten für meine Studie zu rekrutieren und mich persönlich dabei unterstützt hat. Ebenso haben PD Dr. med. Michael Schumann, Dr. med. Elena Sonnenberg und Dr. med. Donata Lissner mir beim Einschluss von Patienten geholfen. Frau Prof. Siegmund und Dr. med. Sonnenberg berieten mich ebenso hinsichtlich der Einteilung der CED-Patienten in Untergruppen und halfen mir, fehlende Informationen zu den eingeschlossenen Patienten zu ergänzen. Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt hat.

Bescheinigung eines akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzke

Name, Vorname: Strunk, Franziska Janina
Emailadresse: franziska.strunk@charite.de
Matrikelnummer: 219388
PromotionsbetreuerIn: Univ.-Prof. Dr. Birgit Sawitzki
Promotionsinstitution / Klinik: CC12 Institut für Medizinische Immunologie

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietzke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, Stephen Schüürhuis, dass Frau Franziska Strunk innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 13.03.2023
- Termin 2: 24.03.2023

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Diskussion der Testauswahl; Interpretation der Ergebnisse
- Ergänzung der Testergebnisse durch deskriptive Statistik
- Visualisierung metrischer Daten mit Boxplot anstelle von Barplot
- Erläuterung des Vorliegens des Multiplizitätsproblems
- P-Werte sollten explorativ interpretiert werden

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 24.03.2023

Name des Beraters: Stephen Schüürhuis

Unterschrift Beraterin, Institutsstempel

