

**Regulation humaner T-Zell-Antworten durch Detektion bakterieller
Vitalität in Antigen-präsentierenden Zellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jenny Gerhard, M. Sc.

aus Berlin

2017

Die Dissertation wurde von 2013 bis 2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Leif Erik Sander in dessen Arbeitsgruppe in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie & Pneumologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Leif Erik Sander
 2. Prof. Dr. Christian Freund

Disputation am: 09.04.2018

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	5
3	ABSTRACT	6
4	EINLEITUNG	7
4.1	DAS IMMUNSYSTEM	7
4.1.1	<i>Das angeborene Immunsystem</i>	8
4.1.2	<i>Das adaptive Immunsystem</i>	9
4.1.3	<i>Detektion bakterieller Vitalität als Ausdruck erhöhter infektiöser Gefahr</i>	11
4.2	CD4 ⁺ T-ZELLDIFFERENZIERUNG	12
4.3	FOLLIKULÄRE T-HELPERZELLEN	15
4.3.1	<i>Definition und Differenzierung von folliculären T-Helferzellen</i>	15
4.3.2	<i>Funktion und Bedeutung von folliculären T-Helferzellen</i>	18
4.4	ZIELSETZUNG	20
5	MATERIAL UND METHODEN	22
5.1	MATERIAL.....	22
5.1.1	<i>Substanzen/Lösungen/Zusätze</i>	22
5.1.2	<i>Puffer und Medien</i>	23
5.1.3	<i>Kits</i>	24
5.1.4	<i>FACS-Antikörper</i>	25
5.1.5	<i>Stimulierende und neutralisierende Antikörper</i>	26
5.1.6	<i>Zytokine</i>	26
5.1.7	<i>Kunststoffartikel und sonstige Materialien</i>	27
5.1.8	<i>Geräte</i>	27
5.2	METHODEN	28
5.2.1	<i>Präparation lebendiger und toter Thymidin-auxotropher Escherichia coli</i>	28
5.2.2	<i>Isolierung von humanen peripheren mononuklearen Zellen</i>	28
5.2.3	<i>Immunomagnetische Negativselektion humaner Monozyten</i>	29
5.2.4	<i>Immunomagnetische Negativselektion humaner CD4⁺ T-Zellen</i>	29
5.2.5	<i>Immunomagnetische Negativselektion humaner naiver B-Zellen</i>	30
5.2.6	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	30

5.2.7	<i>CFSE Färbung humaner CD4⁺ T-Zellen zur Bestimmung der Proliferationsrate</i>	31
5.2.8	<i>Stimulation humaner Monozyten mit ThyA⁻ E. coli</i>	31
5.2.9	<i>Co-Kultur humaner naiver CD4⁺ T-Zellen mit stimulierten humanen autologen</i> <i>Monozyten</i>	32
5.2.10	<i>Zellkultur humaner CD4⁺ T-Zellen mit konditionierten Monozyten-Überständen</i>	32
5.2.11	<i>Sequentielle Co-Kultur humaner CD4⁺ T-Zellen mit stimulierten humanen</i> <i>autologen Monozyten und B-Zellen</i>	34
5.2.12	<i>Oberflächenfärbung für die Durchflusszytometrie</i>	35
5.2.13	<i>Intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie</i>	36
5.2.14	<i>Analyse durchflusszytometrischer Daten</i>	36
5.2.15	<i>Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)</i>	36
5.2.16	<i>Quanti Gene Multiplex Assay</i>	37
5.2.17	<i>Statistische Analysen</i>	38
6	ERGEBNISSE	39
6.1	EINFLUSS DER DETEKTION VON BAKTERIELLER VITALITÄT DURCH APC AUF..... NACHFOLGENDE T-HELPERZELLANTWORTEN	39
6.2	NACHWEIS DER FUNKTIONALITÄT <i>IN VITRO</i> GENERIERTER FOLLIKULÄRER..... T-HELPERZELLEN.....	49
6.3	EINFLUSS DER DETEKTION VON BAKTERIELLER VITALITÄT AUF APC-AKTIVIERUNG	51
6.4	IDENTIFIZIERUNG APC-ABHÄNGIGER FAKTOREN, WELCHE DIE PRÄFERENTIELLE..... T-HELPERZELLPOLARISIERUNG REGULIEREN.....	53
6.5	ROLLE VON TOLL-LIKE REZEPTOR 8 IN DER POLARISIERUNG DER..... T-HELPERZELLANTWORT	63
6.6	ROLLE VON BAKTERIELLER RNA UND SELEKTIVER TLR-LIGANDEN AUF..... T-HELPERZELLANTWORTEN	65
7	DISKUSSION	70
8	LITERATURVERZEICHNIS	81
9	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	94
10	ANTEILSERKLÄRUNG AN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	95
11	PUBLIKATIONSLISTE	96
12	DANKSAGUNG	97

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Englisch	Deutsch
ACTB	Beta-Actin,	Beta-Aktin
AhR	Aryl hydrocarbon receptor	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
APC	Antigen-presenting cell	Antigen-präsentierende Zelle
ASCL2	Achaete-scute complex homolog 2	Achaete-scute Komplex Homolog 2
Bcl6	B cell lymphoma 6	B-Zell Lymphom 6
bDNA	Branched deoxyribonucleic acid	Verzweigte Desoxyribonukleinsäure
BATF	Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like	Basischer Leuzin-Zipper Transkriptionsfaktor, ATF-ähnlich
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1	B-Lymphozyten-induziertes Reifungsprotein-1
BSA	Bovine serum albumin	Rinderserum Albumin
BTLA	B- and T-lymphocyte attenuator	B-und T-Lymphozyten-abschwächendes Protein
CCR7	C-C chemokine receptor type 7	C-C Chemokin-Rezeptor Typ 7
CD	Cluster of differentiation	Differenzierungsantigene
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	Carboxy fluorescein succinimidylester	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CLR	C-type lectin receptor	C-Typ Lektin-Rezeptor
CXCL13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand 13
CXCR5	C-X-C chemokine receptor type 5	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>	Zellschaden-assoziierte molekulare Muster
DC	Dendritic cell	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxid
dsRNA	Double-stranded Ribonucleic acid	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EC, E.coli	Escherichia coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fetal calf serum	Fetales Kälberserum
FOXO1, FoxP3	Forkhead box protein O1 or 3	Forkhead-Box-Protein O1 bzw. 3
GATA3	GATA binding protein 3	GATA-bindendes Protein-3
GC	Germinal center	Keimzentrum
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HkEC	Heat-killed Escherichia coli	Hitze-getötete Escherichia coli
HPRT1	Hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase 1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
ICOS	Inducible T-cell costimulator	Induzierbarer T-Zell Kostimulator
IFN	Interferon	Interferon
IFNAR	Interferon- α/β receptor	Interferon- α/β Rezeptor
IL	Interleukin	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factors	Interferon regulierender Faktor
KLF2	Krüppel-like Factor 2	Krüppel-ähnlicher Faktor 2
LB	Luria-Bertani	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccharid
MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog	v-maf musculoaponeurotisches Fibrosarkom-Onkogen-Homolog
MHC	Major Histocompatibility Complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOI	Multiplicity of infection	Multiplizität der Infektion
MPLA	Monophosphoryl lipid A	Monophosphoryl Lipid A
mRNA	Messenger Ribonucleic acid	Boten-Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88	Knochenmark-Differenzierungs-Reaktionsgen 88
NaCl	Sodium chloride	Natriumchlorid
NEAA	Non-essential amino acid	Nicht-essentielle Aminosäure
NK	Natural killer cell	Natürliche Killerzelle

NLR	Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor	Nukleotid-bindender Oligomerisations-Domäne (NOD)-ähnlicher Rezeptor
NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3	NACHT-, LRR- und Pyrin-Domänen-enthaltendes Protein 3
OD	Optical density	Optische Dichte
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered saline	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	Programmed cell death protein 1	Programmierten Zelltod auslösendes Protein 1
Pen	Penicillin	Penicillin
PG	Peptidoglycan	Peptidoglykan
pLa	Poly-L-arginine	Poly-L-arginin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Pattern recognition receptor	Mustererkennungsrezeptor
RAR	Retinoic acid receptor	Retinsäurenrezeptor
RIG I	Retinoic acid-induced gene I	Retinsäure-induziertes Gen I
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference	RNA-Interferenz
RORc, ROR γ t	RAR (Retinoic acid receptor)-related orphan receptor C or γ t	RAR (Retinsäure)-verwandter Waisenrezeptor C bzw. γ t
ROS	Reactive oxygen species	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Room temperature	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
SAP	SLAM (Signaling lymphocytic activation molecule)-associated protein	SLAM-assoziiertes Protein
SAPE	Streptavidin phycoerythrin	Streptavidin-Phycoerythrin
SEB	Staphylococcal enterotoxin B	Staphylokokken-Enterotoxin B

siRNA	Small interfering Ribonucleic acid	Kleine eingreifende Ribonukleinsäure
ssRNA	Single-stranded Ribonucleic acid	Einsträngige Ribonukleinsäure
STAT	Signal transducer and activator of transcription	Signalgeber und- aktivator der Transkription
Strep	Streptavidin	Streptavidin
T-bet, TBX21	T-box transcription factor	T-box Transkriptionsfaktor
TCR	T cell receptor	T-Zell Rezeptor
T _{FH} -Zelle	T follicular helper cell	Follikuläre T-Helferzelle
TGF	Transforming growth factor	Transformierender Wachstumsfaktor
Thy	Thymidine	Thymidin
ThyA ⁻	Thymidine auxotroph	Thymidin-auxotroph
T _H -Zelle	T helper cell	T-Helferzelle
TLR	Toll-like receptor	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor	Tumornekrosefaktor
T _{REG} Zelle	Regulatory T cell	Regulatorische T-Zelle
TRIF	TIR (Toll/Interleukin-1 receptor)-domain-containing adapter protein-inducing IFN β	TIR (Toll/Interleukin I Rezeptor)-Domäne enthaltendes Adapterprotein-induzierendes IFN β
Trim	Trimethoprim	Trimethoprim
vita-PAMP	Viability-associated PAMP	Vitalitäts-assozierte PAMP

2 Zusammenfassung

Aufgrund rasant steigender Antibiotikaresistenzraten besteht ein dringender Bedarf an neuen Therapie- und Präventionsstrategien gegen bakterielle Infektionen. In der vorliegenden Arbeit sollten vor diesem Hintergrund grundlegende Mechanismen der antibakteriellen T-Zell-Immunität aufgeklärt und somit die Grundlage für die Entwicklung neuer Impfstrategien gegen bakterielle Infektionen gelegt werden. Aufbauend auf neuen Erkenntnissen, dass Zellen des angeborenen Immunsystems lebende von toten Bakterien unterscheiden können (Sander et al., 2011), sollte analysiert werden, welchen Einfluss die Erkennung bakterieller Vitalität durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) auf die Polarisierung von T-Helferzellen hat. Zunächst konnte gezeigt werden, dass humane Monozyten bakterielle Vitalität erkennen, da die Phagozytose von lebenden, apathogenen Bakterien im Vergleich zu toten Bakterien zu einem spezifisch veränderten Zytokinprofil und somit zu einer stärkeren Immunantwort führte. Weiterführend konnte gezeigt werden, dass diese Diskriminierung nachfolgende adaptive Immunantworten, speziell T-Helferzellantworten beeinflusste. Lebende Bakterien induzierten in Monozyten Signale, welche präferentiell zur Differenzierung von T_H1 - und T_{FH} -Zellen, nicht aber zu einer gesteigerten T_H17 -Polarisierung führten. Durch Neutralisationsversuche konnte IL-12 als entscheidendes Immunsignal für eine durch Infektion oder *vita*-PAMP-Erkennung induzierte T_{FH} -Zelldifferenzierung identifiziert werden. Neutralisierung von IL-12 in *E. coli* (EC)-aktivierten Monozyten-Überständen hemmte die T_{FH} -Zelldifferenzierung, wohingegen rekombinantes IL-12 eine T_{FH} -Zellpolarisierung induzierte. Lebende Bakterien enthalten im Gegensatz zu toten Bakterien RNA, welche durch Monozyten via TLR8 erkannt wird. Hemmung der TLR8-Expression in humanen Monozyten mittels RNA-Interferenz reduzierte die T_{FH} -Zelldifferenzierung als Antwort auf lebende EC deutlich. TLR8-abhängige Signale sind daher für die Detektion lebender Bakterien durch humane Monozyten und die anschließende T-Zellantwort entscheidend. Umgekehrt konnte durch aufgereinigte bakterielle RNA, sowie synthetische TLR8-Liganden eine effiziente T_{FH} -Zellpolarisierung induziert werden. Zusammenfassend zeigen die Daten in der vorliegenden Arbeit, dass humane Monozyten durch die Erkennung von *vita*-PAMPs in der Lage sind, zwischen lebenden und toten Bakterien zu unterscheiden. Die TLR8-abhängige Detektion lebender Bakterien führt in humanen Monozyten zur Produktion von Signalen, die eine T_{FH} -Zellpolarisierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen begünstigen. Damit stellen *vita*-PAMP Rezeptoren wie TLR8 ein vielversprechendes Target für neue Impfadjuvantien dar, die spezifisch eine verstärkte T_{FH} -Zellpolarisierung und somit humorale Immunität erzeugen.

3 Abstract

Rapidly increasing antibiotic resistance rates urgently call for novel therapeutic and prevention strategies against bacterial infections. In this context, the present work aimed to elucidate basic mechanisms of antibacterial T cell immunity, and thus to establish a basis for the development of improved vaccination strategies against bacterial infections. Based on new insights that cells of the innate immune system are able to discriminate between viable and dead bacteria (Sander et al., 2011), it was analyzed how the recognition of bacterial viability by antigen presenting cells (APC) influences subsequent T helper cell responses. Classical human monocytes or primary dendritic cells were stimulated with viable or dead *E. coli* (EC), which revealed a capacity of human APC to detect bacterial viability, since phagocytosis of viable bacteria led to a specific cytokine profile and subsequent T helper cell responses, compared to heat killed bacteria. Live avirulent thymidine auxotroph (*thyA*⁻, replication deficient) EC induced signals in human monocytes, which preferentially led to a T_H1 and T_{FH} cell differentiation, but not to a T_H17 cell polarization of autologous naïve human T cells. *De novo* generated T_{FH} cells expressed all markers of T_{FH} cells and provided help to naïve B cells. Use of neutralizing antibodies and recombinant cytokines identified IL-12, which was selectively produced by human monocytes in response to viable but not killed EC, as a crucial signal for infection- or *vita*-PAMP-induced human T_{FH} cell differentiation. Neutralization of IL-12 in EC-activated monocyte supernatants impaired T_{FH} cell differentiation, whereas addition of recombinant IL-12 stimulated T_{FH} cell polarization. Live but not killed bacteria contain RNA, which is sensed by TLR8 in human monocytes. Silencing of TLR8 expression in human monocytes by RNA interference strongly reduced their capacity to promote T_{FH} cell differentiation in response to live bacteria. In addition, treatment of human monocytes with bacterial RNA complexed to polycationic peptide poly-L-arginine (pLa) evoked efficient TLR8-dependent IL-12 production and subsequent T_{FH} cell polarization. In summary, the present study reveals that human APC are able to discriminate between live and dead bacteria through the recognition of *vita*-PAMPs. TLR8-dependent recognition of viable EC led to a production of T_{FH} cell promoting signals, most importantly IL-12. Hence, *vita*-PAMP receptors like TLR8 represent promising targets for novel T_{FH}-biased vaccine adjuvants. Vaccines that contain *vita*-PAMPs, could combine the superior protection of live attenuated vaccines with the better safety of dead vaccines.

4 Einleitung

4.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl von Zellen, Geweben und Molekülen, die den Körper vor Pathogenen und Toxinen aus der Umwelt schützen. Die Immunabwehr gegen Mikroorganismen wird traditionell in zwei Systeme unterteilt: die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität (Janeway, 2001; Murphy et al., 2009). Das angeborene Immunsystem besteht aus Zellen und Proteinen, welche dem Körper *ad hoc* zur Abwehr von Mikroben bereit stehen. Dazu gehören Epithelien, welche eine Anhaftung, Kolonisierung und ein Eindringen von Mikroorganismen verhindern und antimikrobielle Peptide, Enzyme oder Mucus sezernieren (Janeway und Medzhitov, 2002; Murphy et al., 2009). Phagozytische Leukozyten, dendritische Zellen (DC) und natürliche Killerzellen (NK) können eindringende Mikroorganismen aufnehmen bzw. infizierte Zellen zerstören. Sie lösen eine Entzündungsreaktion aus und transportieren Effektormoleküle zum Entzündungsort (Janeway, 2001; Murphy et al., 2009). Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern-recognition receptors*, PRRs), z.B. auf der Oberfläche, aber auch im Phagosom oder Zytosol von Phagozyten erkennen konservierte molekulare Muster in Mikroorganismen und unterscheiden sie so von intakten körpereigenen Geweben (Janeway und Medzhitov, 2002). Zudem interagieren zirkulierende Plasmaproteine, das sogenannte Komplementsystem, mit Mikroorganismen und fördern so deren Phagozytose oder Lyse (Murphy et al., 2009). Botenmoleküle wie Zytokine und Chemokine, welche von Phagozyten und DC als Antwort auf PRR-Aktivierung durch Mikroorganismen gebildet werden, beeinflussen die zweite Phase der angeborenen Immunantwort (Janeway und Medzhitov, 2002; Murphy et al., 2009). Das erworbene Immunsystem wird in der Regel erst aktiviert, nachdem Pathogene angeborene Abwehrmechanismen umgangen oder überwunden haben (Iwasaki und Medzhitov, 2015). Man unterscheidet zwei Arten der erworbenen Immunität: die humorale Immunantwort bezeichnet die Produktion von Antikörpern durch B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen, und die zelluläre Immunantwort, welche nach Aktivierung durch ein Antigen von T-Lymphozyten ausgelöst wird (Janeway, 2001). Diese zwei Systeme sind über T-Helferzellen eng miteinander verbunden. Adaptive Immunzellen wandern nach Aktivierung durch ein spezifisches Antigen an den Ort der Entzündung bzw. Infektion und erzeugen Antigen-spezifische Abwehrmechanismen zur Beseitigung eingedrungener Pathogene (Janeway, 2001).

4.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist ein komplexes System aus Zellen und Molekülen, die prinzipiell zwischen körpereigenen und -fremden Strukturen unterscheiden und so eine entsprechende Immunantwort hervorrufen (Akira et al., 2006; Vabret und Blander, 2013). Für diese Diskriminierung stehen dem Immunsystem verschiedene Familien von PRRs zur Verfügung, welche von Immunzellen (Dendritische Zellen, Makrophagen und Neutrophile), aber auch von Epithelzellen exprimiert werden (Kumar et al., 2011; Vance et al., 2009). Diese Rezeptoren binden spezifisch hoch konservierte Bestandteile von Mikroorganismen (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), was zu einer Aktivierung zellulärer Signalwege führt, welche antimikrobielle Antworten auslösen (Akira et al., 2006; Blander und Sander, 2012; Kawai und Akira, 2010). Beispiele für bakterielle PAMPs sind Lipopolysaccharid (LPS) und Peptidoglykan (PG) als Zellwandbestandteile gram-negativer bzw. gram-positiver Bakterien oder mikrobielle Nukleinsäuren (Akira et al., 2006; Mahla, 2013; Medzhitov, 2007; Vance et al., 2009). Bislang wurden einige verschiedene Klassen von PRRs identifiziert. Dazu gehören zum Beispiel transmembranäre Immunrezeptoren (*Toll-like receptors*, TLRs), im Zytosol lokalisierte *Nucleotide-binding oligomerization domain* (Nod)-like Rezeptoren (NLRs) und *Retinoic acid-induced gene 1* (RIG-I)-like Rezeptoren, sowie die *C-type lectin Rezeptoren* (CLRs) und eine Gruppe zytosolischer Enzyme, die als Nukleinsäure-Rezeptoren fungieren (Iwasaki und Medzhitov, 2015; Mahla, 2013; Takeuchi und Akira, 2010). Eine Signalübertragung durch TLRs als Reaktion auf bakterielle Komponenten führt unter der Beteiligung verschiedener Adaptermoleküle wie *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) und *TIR (Toll/Interleukin-1 receptor)-domain-containing adapter protein-inducing IFN β* (TRIF) zur Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren, MAP Kinasen und von NF- κ B, sowie *Interferon regulatory factors* (IRFs), was zur Produktion von Interferonen (IFN), pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 und Tumornekrosefaktor α (TNF α) führt. Zudem bewirkt die Aktivierung von PRRs eine Ausreifung bzw. Maturation von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), was für die Einleitung einer adaptiven Immunantwort essentiell ist (Mahla, 2013; Sander et al., 2011; Vance et al., 2009). Das Immunsystem erkennt Pathogene aber nicht nur über strukturelle Merkmale, sondern auch über funktionale Eigenschaften wie die Wirkung sogenannter Virulenzfaktoren (Iwasaki und Medzhitov, 2015). Es ist bereits bekannt, dass pathogene Erreger stärkere Immunantworten auslösen als apathogene oder attenuierte Versionen desselben Erregers (Sander, 2012; Vance et al., 2009). Zudem stimulieren lebende Mikroorganismen robustere Immunantworten als tote Mikroben. Die Vitalität eines

Mikroorganismus wird vom Immunsystem als gleichbedeutend mit Infektiösität und damit als eine erhöhte mikrobielle Gefahr bewertet (Blander und Sander, 2012; Sander et al., 2011). Lebende Mikroorganismen enthalten sogenannte *viability-associated (vita)*-PAMPs, wie zum Beispiel bakterielle *messenger (m)*RNA, anhand derer das Immunsystem des Wirts zwischen lebenden und toten Bakterien unterscheiden kann und somit eine stärkere Immunantwort auslöst (Sander et al., 2011).

4.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das angeborene Immunsystem verwendet relativ unspezifische, aber dennoch zur akuten Infektabwehr essentielle Verteidigungsmechanismen wie zum Beispiel Phagozytose, sowie die Produktion antimikrobieller Moleküle (Rossi und Young, 2005). Diese sind jedoch oft nicht ausreichend, um den Organismus optimal vor der Vielzahl an Pathogenen aus der Umwelt zu schützen (Medzhitov, 2007). Zusätzlich können ausgelöste Entzündungsreaktionen zu Gewebeschäden führen (Janeway, 2001). Daher ist das Immunsystem in der Lage, die infektiöse Gefahr, die von einem mikrobiellen Stimulus ausgeht, genau einzuschätzen und so eine entsprechend dosierte Immunantwort auszulösen (Blander und Sander, 2012; Vance et al., 2009). Durch eine Antigen-spezifische Aktivierung und konsekutive Expansion von adaptiven Immunzellen bildet das adaptive Immunsystem ein selektives Gedächtnis aus, welches bei erneuter Infektion in der Lage ist, eine schnellere und stärkere Immunantwort auszulösen (Vance et al., 2009). Adaptive Immunantworten werden ausgelöst, wenn Antigen-präsentierende Zellen (APC) ein Fremdanigen aufnehmen und präsentieren. APC werden jedoch nicht über das Antigen, sondern vielmehr über PRR-PAMP-Interaktionen aktiviert, was zu einer verstärkten Phagozytose, Expression von kostimulatorischen Molekülen, sowie zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine führt (Blander und Sander, 2012; Thomas und Schroder, 2013). APC exprimieren auf ihrer Oberfläche Histokompatibilitätskomplexe (*Major histocompatibility complex*, MHC), woran sie aufgenommene Antigene nicht-kovalent binden und so an T-Zellen präsentieren können (Rossi und Young, 2005). Es werden MHC Klasse I und II Moleküle unterschieden. Antigene, welche aus der extrazellulären Umgebung aufgenommen werden, binden präferentiell an MHC II, wohingegen MHC I Moleküle bevorzugt synthetisierte Antigene aus dem Zytosol binden (Janeway, 2001; Medzhitov, 2007). Als Ausnahme gilt die sogenannte Kreuzpräsentation von extrinsischen Antigenen auf MHC I Molekülen durch spezialisierte DC. Entscheidend für adaptive Immunantworten ist die Aktivierung von T- und B-Lymphozyten. Die T-Zell-Aktivierung benötigt drei maßgebliche Signale: 1) die Antigen-

spezifische Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an das entsprechende MHC-Molekül, 2) kostimulatorische Signale über die Interaktion von Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen (z.B. CD80, CD86) und T-Zellen (z.B. CD28) (Ford et al., 2013; Holdsworth und Gan, 2015; Pennock et al., 2013), sowie 3) Zytokine, die die Polarisierung der T-Zellen maßgeblich beeinflussen. Der TCR bindet ein Antigen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Die beiden Ketten des TCR (α und β) erkennen demnach ein Antigen nur dann, wenn dessen Struktur dem präsentierten MHC-Molekül passend ist (Janeway, 2001). Die Bindung von TCR und MHC-Molekül, sowie das intrazelluläre Signal werden durch eine gleichzeitige Bindung an spezifische Co-Rezeptoren wie CD4 oder CD8 verstärkt. Dabei bindet der CD4-Rezeptor spezifisch an MHC II, was die Aktivierung und Differenzierung einer T-Helferzelle induziert. CD8 hingegen bindet ausschließlich an MHC I und leitet die Differenzierung zytotoxischer T-Zellen ein (Janeway, 2001; Pennock et al., 2013). Damit entstehen eine spezifische Bindung und ein enger Kontakt zwischen APC und T-Zelle, was zur Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen führt. Während ein Großteil der aktivierten T-Zellen sich zu kurzlebigen Effektorzellen differenziert, kann sich ein kleiner Teil der T-Zellen im Verlauf der Immunantwort zu Gedächtniszellen differenzieren, wobei die exakten Mechanismen der Gedächtniszellbildung nur unzureichend geklärt sind (Janeway, 2001). CD4⁺ T-Helferzellen differenzieren nach ihrer Aktivierung in unterschiedliche funktionelle Subtypen (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, T_{H9}, T_{FH}, und T_{reg}) und können so unterschiedliche Arme der Immunantwort instruieren (oder supprimieren), z.B. die zellvermittelte Immunantwort oder die humorale Immunantwort durch B-Lymphozyten (Holdsworth und Gan, 2015; Pennock et al., 2013). Sogenannte folliculäre T-Helferzellen (T_{FH}-Zellen), sind maßgeblich an der Ausbildung einer langlebigen humoralen Immunantwort beteiligt, indem sie B-Zellen aktivieren und sie zur Produktion Pathogen-neutralisierender Antikörper stimulieren (McDonald et al., 2016). Als Hauptbestandteil der humoralen Immunantwort können B-Zellen nach Aktivierung durch ein Antigen entweder in Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder in Gedächtnis-B-Zellen differenzieren (Nera et al., 2015). Dabei binden B-Zellen zunächst das Antigen an ihren B-Zell-Rezeptor (BCR), nehmen es anschließend ins Zellinnere auf und präsentieren das Antigen dann zusammen mit einem MHC-Molekül auf ihrer Oberfläche. An diesen Antigen-MHCII-Komplex bindet dann die T-Zelle über ihren TCR und stimuliert die B-Zelle über weitere Signale, wodurch die B-Zelle aktiviert und die Keimzentrumsreaktion initiiert wird (Nutt und Tarlinton, 2011). Die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen hängt entscheidend von T_{FH}-Zellen ab (Havenith et al., 2014; Tangye et al., 2013). T_{FH}-Zellen interagieren mit B-Zellen im Keimzentrum

(*Germinal center*, GC) durch verschiedene molekulare Signale wie zum Beispiel die Interaktion von TCR auf der T-Zelle und Antigen-MHC II-Komplex auf der B-Zelle, CD28 und B7, CD40 und CD40 Ligand, ICOS und ICOS Ligand (Nutt und Tarlinton, 2011). Zusätzlich sezernieren T_{FH}-Zellen spezialisierte Zytokine, vor allem IL-4 oder IL-21, wodurch die B-Zelle zu einer Antikörper-produzierenden Plasmazelle oder einer Gedächtnis-B-Zelle ausreift (Nutt und Tarlinton, 2011).

4.1.3 Detektion bakterieller Vitalität als Ausdruck erhöhter infektiöser Gefahr

Infektionskrankheiten gehören weltweit zu den führenden Todesursachen und sind somit eine der wichtigsten Herausforderungen für das Gesundheitswesen und die biomedizinische Forschung (Medzhitov, 2007; Moxon et al., 2011). Es besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung neuartiger Prophylaxe- und Therapiestrategien gegen bakterielle Infektionen. Dies erfordert ein genaues Verständnis der molekularen Mechanismen, die dazu beitragen, mikrobielle Signale in immunologische Informationen zu übersetzen. Seit Langem ist bekannt, dass lebende und somit infektiöse Erreger eine stärkere Immunantwort auslösen als inaktivierte / tote Formen desselben Erregers (Detmer und Glenting, 2006; Sander, 2012; Vance et al., 2009). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass lebende Mikroorganismen in der Lage sind, sich zu reproduzieren und Virulenzfaktoren zu bilden, welche ein Eindringen in den Wirtsorganismus und das Auslösen einer Infektion ermöglichen (Blander und Sander, 2012). Darüberhinaus ist jedoch auch bekannt, dass Lebendimpfungen trotz des Einsatzes stark attenuierter Erreger, und somit geringer Virulenz und Invasivität, zumeist einen besseren Schutz gegen erneute Infektionen bieten als Totimpfstoffe (Detmer and Glenting, 2006; Lauvau, 2001). Dies lässt darauf schließen, dass das Immunsystem die mikrobielle Gefahr eines Mikroorganismus, unabhängig von der Wirkung von Virulenzfaktoren, allein aufgrund der Lebensfähigkeit / Vitalität erkennt (Blander und Sander, 2012). In diesem Zusammenhang wurde eine spezielle Klasse von PAMPs, den sogenannten Vitalitäts-assoziierten (*vita*)-PAMPs beschrieben, welche nur in lebenden Bakterien vorkommen und so dem angeborenen Immunsystem ermöglichen, bakterielle Vitalität zu erkennen (Sander et al., 2011). Sander *et al.* konnten bakterielle mRNA als erstes *vita*-PAMP identifizieren, welches nur nach Phagozytose lebender, nicht aber toter Bakterien vom Wirt erkannt wird (Sander et al., 2011). Dies führte zu einer deutlich stärkeren Immunantwort mit Aktivierung des *NOD*-, *LRR*- and *pyrin domain-containing-3* (NLRP3) Inflammasome-Komplexes und anschließender Caspase-1-abhängiger Sekretion von IL-1 β und Pyroptose (inflammatorischer Zelltod) (Blander und Sander, 2012; Helbig et al., 2013; Sander et al.,

2011). Interessanterweise induzierten tote Bakterien bei gleichzeitiger Gabe von aufgereinigter bakterieller mRNA aus lebenden Bakterien eine vergleichbare Immunantwort, was darauf hinweist, dass prokaryotische mRNA mikrobielle Vitalität anzeigt (Helbig et al., 2013; Sander, 2012; Sander et al., 2011). Lebende Bakterien lösen durch die Anwesenheit von *vita*-PAMPs aber nicht nur starke angeborene Immunantworten aus, bakterielle RNA kann außerdem die adaptive Immunität stimulieren. Sander *et al.* zeigten, dass eine Immunisierung von Mäusen mit lebenden, im Vergleich zu toten *E. coli*, zu einer erhöhten Produktion von Klassen-gewechselten *E. coli*-spezifischen Antikörpern führte (Sander et al., 2011). Jedoch konnte eine gleichwertige oder sogar erhöhte Produktion von IgG-Antikörpern durch eine Immunisierung von Mäusen mit einer Kombination aus toten *E. coli* und bakterieller mRNA wiederhergestellt werden (Sander et al., 2011). Dies zeigt, dass Impfantworten durch den Einsatz von *vita*-PAMPs signifikant verbessert werden könnten (Sander, 2012).

4.2 CD4⁺ T-Zelldifferenzierung

CD4⁺ T-Zellen sind essentiell für eine adäquate Abwehrleistung des menschlichen Immunsystems, indem sie angeborene Immunzellen regulieren, B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern aktivieren, Immunantworten zytotoxischer T-Zellen (CD8⁺ T-Zellen) lizenzieren bzw. verstärken und aufrecht erhalten. Zudem regulieren und unterdrücken sie Immunantworten, unter anderem zur Kontrolle von Autoimmunreaktionen und können ein immunologisches Gedächtnis ausbilden (Luckheeram et al., 2012; Zhu et al., 2010). Diese vielseitigen Funktionen können sie durch eine Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in Effektor- und / oder Gedächtniszellen mit einem spezifischen Phänotyp ausüben. CD4⁺ T-Helferzell-Subtypen werden durch charakteristische Transkriptionsfaktoren und ein spezifisches Zytokin-Milieu definiert (Adair et al., 2016; Christie und Zhu, 2014). Die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in T-Effektor-Helferzellen wird durch extrinsische Faktoren wie das APC-abhängige Zytokinmilieu, die Art des Antigenkontakts, den Typ Antigen-präsentierender Zellen und durch co-stimulatorische Signale, sowie intrinsische Faktoren wie zum Beispiel die Stärke des TCR-Signals oder die Sensitivität von Signalwegen kontrolliert (Adair et al., 2016; Chang et al., 2014; Keck et al., 2014). Ein erstes Signal für die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung ist die Interaktion von TCR und CD4 als Co-Rezeptor mit dem Antigen-MHC II-Komplex auf APC, welches zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der CD4⁺ T-Zelle führt (Adair et al., 2016; Luckheeram et al., 2012; Smith-Garvin et al., 2009). Als zweites Signal exprimieren APC co-stimulatorische Moleküle wie

CD80 und CD86, welche an den CD28 Rezeptor auf T-Zellen binden, was das Überleben der CD4⁺ T-Zelle sichert und vor einer abnormalen T-Zellaktivität schützt (Adair et al., 2016; Smith-Garvin et al., 2009). Der dritte Stimulus wird durch das Zytokinmilieu der Mikroumgebung gebildet, welches hauptsächlich durch angeborene Immunzellen bestimmt wird, die durch PRRs aktiviert wurden (Adair et al., 2016). Abhängig von diesen Faktoren differenzieren naive CD4⁺ T-Zellen in unterschiedliche T-Helferzellsubtypen (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, T_{H22}, T_{H9}, T_{reg} und T_{FH}) (Christie und Zhu, 2014; Kaplan et al., 2015; Luckheeram et al., 2012; Schmitt und Ueno, 2015).

Die Differenzierung von T_{H1}-Zellen wird durch die Zytokine IL-12 und IFN γ befördert. Dabei wird IL-12 in großen Mengen von aktivierten APC freigesetzt und IL-12 wiederum stimuliert natürliche Killerzellen zur Produktion von IFN γ (Luckheeram et al., 2012; Schmitt und Ueno, 2015). Die vollständige Differenzierung zu T_{H1}-Zellen erfolgt hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor T-bet (*T-box Transkriptionsfaktor*, auch TBX21), der T_{H1}-polarisierende Gene aktiviert, die Produktion von IFN γ stimuliert und die Ausbildung von T_{H2}- und T_{H17}-Zellen hemmt (Luckheeram et al., 2012; Szabo et al., 2000). Die Expression von T-bet ist abhängig von *Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)*, welcher durch IFN γ aktiviert wird, und STAT4, welcher IL-12-abhängig eine IFN γ -Produktion induziert, die wiederum zur weiteren Aktivierung von T-bet führt (Afkarian et al., 2002; Cosmi et al., 2014; Schmitt und Ueno, 2015). T_{H1}-Zellen produzieren die entzündungsfördernden Zytokine IFN γ und TNF α und spielen eine Rolle bei der Aktivierung von Makrophagen und dem Schutz vor intrazellulären Pathogenen (Cosmi et al., 2014).

Eine T_{H2}-Zellpolarisierung wird durch das Zytokin IL-4 stimuliert, und die Expression des Transkriptionsfaktors für T_{H2}-Zellen *GATA-bindendes Protein 3 (GATA3)* erfolgt durch eine IL-4-abhängige Aktivierung von STAT6 (Cosmi et al., 2014; Luckheeram et al., 2012; Schmitt und Ueno, 2015). T_{H2}-Zellen sezernieren u.a. IL-3, IL-4, IL-5 und IL-13 (Zhu et al., 2010). T_{H2}-Antworten haben eine wichtige Funktion in der parasitären Abwehr und werden durch eine IL-4-vermittelte Induktion von allergenspezifischen IgE-Antikörpern, sowie der IL-5 abhängigen Aktivierung von eosinophilen Granulozyten mit Allergien und Asthma in Verbindung gebracht (Swain et al., 2012).

Das lange geltende T_{H1}/T_{H2}-Schema wurde durch die pro-inflammatorischen T_{H17}-Zellen erweitert (Leipe und Chang, 2015). Die wichtigste Aufgabe von T_{H17}-Zellen ist die Abwehr von extrazellulären Bakterien in peripheren Organen durch die Aktivierung neutrophiler Granulozyten (Cosmi et al., 2014). T_{H17}-Zellen sind aber auch an der Entstehung von autoimmunen und autoinflammatorischen Erkrankungen beteiligt (Leipe und Chang, 2015).

T_H17-Zellen sind durch die Expression der Zytokine IL-17A und IL-17F charakterisiert (Swain et al., 2012; Zhu et al., 2010). An der Differenzierung muriner T_H17-Zellen sind hauptsächlich die Zytokine IL-6 und TGFβ beteiligt, jedoch induzieren diese allein keine Produktion von IL-17 in humanen CD4⁺ T-Zellen (Schmitt und Ueno, 2015). Für eine Differenzierung humaner T_H17-Zellen werden zusätzlich IL-1β und IL-23 benötigt, wobei IL-23 darüber hinaus auch für das Überleben der T_H17-Zelle erforderlich ist (Cosmi et al., 2014; Schmitt und Ueno, 2015). *Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-T* (RORγt, auch RORC) ist der Haupt-Transkriptionsfaktor von T_H17-Zellen, aber auch STAT3 ist entscheidend an deren Differenzierung beteiligt, da es die Expression von RORγt induziert (Luckheeram et al., 2012; Schmitt und Ueno, 2015).

T_H9-Zellen wurden ursprünglich als Subtyp von T_H2-Zellen definiert, wurden später aber durch die spezifische Produktion von IL-9 als eigenständiger T-Helferzelltyp charakterisiert, der durch eine Kombination von IL-4 und TGFβ und die Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren PU.1 und STAT6 gebildet wird (Cosmi et al., 2014; Kaplan et al., 2015; Luckheeram et al., 2012; Schmitt und Ueno, 2015). T_H9-Zellen gelten als pro-inflammatorische Zellen, die eine pathogene Funktion bei autoimmunen Erkrankungen haben und eine Rolle bei Allergien spielen (Cosmi et al., 2014; Kaplan et al., 2015).

Humane T_H22-Zellen werden durch die Produktion von IL-22 ohne gleichzeitige Produktion von IL-17 definiert (Liu et al., 2009). Die Differenzierung erfolgt in Anwesenheit der Zytokine IL-6 und TNFα, sowie des Transkriptionsfaktors AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) (Schmitt und Ueno, 2015; Stockinger et al., 2011). IL-22 stimuliert die Produktion antimikrobieller Proteine und hält Körperbarrieren aufrecht. Daher wird angenommen, dass T_H22-Zellen an der Abwehr von Bakterien, Pilzen und Viren beteiligt sind (Liu et al., 2009). Darüberhinaus spielen sie aber auch eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen (Liu et al., 2009).

Induzierbare regulatorische T-Zellen (iT_{reg}) werden durch die Produktion von TGFβ und IL-10, sowie die Expression des Transkriptionsfaktors *Forkhead-Box-Protein P3* (FoxP3) charakterisiert (Luckheeram et al., 2012; Schmitt und Ueno, 2015; Zheng, 2013). Ihre Differenzierung erfolgt vor allem durch die Anwesenheit von TGFβ (und all-trans-Retinolsäure), und sie sind hauptsächlich daran beteiligt, Entzündungsreaktionen und Immunantworten, sowie Autoimmunprozesse zu regulieren. Sie sind somit essentiell für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase (Luckheeram et al., 2012; Zheng, 2013).

4.3 Follikuläre T-Helferzellen

4.3.1 Definition und Differenzierung von folliculären T-Helferzellen

Humane folliculäre T-Helferzellen wurden erstmals im Jahr 2000 beschrieben und wurden hauptsächlich durch ihre anatomische Lokalisierung und Funktion definiert, da sie typischerweise in der B-Zell-Zone der Lymphfollikel sekundärer lymphatischer Gewebe vorkommen (Breitfeld et al., 2000; Crotty, 2011, 2014; Ma und Deenick, 2014; Ueno et al., 2015). T_{FH}-Zellen exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR5 (*C-X-C chemokine receptor type 5*) und regulieren gleichzeitig den primären Rezeptor für die T-Zellzone CCR7 (*C-C chemokine receptor type 7*) herunter, wodurch sie die T-Zellzone verlassen und zu B-Zellfollikeln migrieren können. Im Keimzentrum der Lymphfollikel interagieren T_{FH}-Zellen mit B-Zellen und tragen zu deren Aktivierung und Differenzierung bei (Ma und Deenick, 2014; Ma et al., 2012; Tangye et al., 2013). Außerdem werden T_{FH}-Zellen durch eine eher geringe Expression der Zytokine IFN γ , IL-4 und IL-17, sowie der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA3 und ROR γ t, welche charakteristisch für T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen sind, von anderen CD4⁺ T-Zellsubtypen unterschieden (Crotty, 2011; Ma et al., 2012a). Allerdings werden von einigen Autoren auch Subtypen der T_{FH}-Zellen definiert, die den klassischen T-Helferzellsubtypen entsprechen (T_{FH}-1, -2, -17) (Ueno et al., 2015). Durch die Beschreibung des T_{FH}-Zell-Transkriptionsfaktors *B cell lymphoma 6* (Bcl6) im Jahr 2009 wurden T_{FH}-Zellen schließlich als eigenständiger T-Helferzell-Subtyp eingeordnet (Crotty, 2011; Ise, 2015; Schmitt und Ueno, 2015; Ueno et al., 2015). Diese Definition von T_{FH}-Zellen wurde durch die Expression einer Kombination verschiedener Effektor-Moleküle erweitert. Dazu gehören die Oberflächenmoleküle *Inducible T-cell costimulator* (ICOS) und *Programmed cell death protein 1* (PD-1), CXCR5, CD40 Ligand (CD40L) und OX40, *B- and T-lymphocyte attenuator* (BTLA) und CD84. T_{FH}-Zellen exprimieren präferentiell das Zytokin IL-21, das zytoplasmatische Adapterprotein *SLAM-associated protein* (SAP), sowie die Transkriptionsfaktoren STAT3 und *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog* (c-Maf) (Cosmi et al., 2014; Crotty, 2011; Deenick und Ma, 2011; Ma et al., 2012; Schmitt und Ueno, 2015). Diese Moleküle tragen zur Aktivierung von B-Zellen, der Ausbildung von hochaffinen Antikörpern und der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen bei (Leipe und Chang, 2015; Tangye et al., 2012). Dabei fördert CD40L die Proliferation von B-Zellen und schützt sie vor Apoptose (Tangye et al., 2012), IL-21 begünstigt die Differenzierung humaner B-Zellen und ist an der Ausbildung und der Funktion des Keimzentrums beteiligt (Barnett et al., 2014), die Expression von ICOS auf T-Zellen

begünstigt die Produktion von Zytokinen (IL-21 und IL-10) zur B-Zellhilfe (Chevalier et al., 2011; Hutloff et al., 1999) und stabilisiert den T_{FH}-Phänotyp (Weber et al., 2015). CD84 und SAP werden für eine stabile Bindung zwischen T- und B-Zellen benötigt, um die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen zu unterstützen (McHeyzer-Williams et al., 2011; Vanderleyden et al., 2014). BTLA und PD-1 regulieren die IL-21 Expression durch T_{FH}-Zellen und die nachfolgende IgG-Produktion durch B-Zellen (Kashiwakuma et al., 2010; Ueno, 2016). Obwohl folliculäre T-Helferzellen zunächst hauptsächlich durch ihre Lokalisierung in lymphatischen Geweben definiert wurden, konnten ebenso zirkulierende T_{FH}-Zellen im Blut identifiziert werden (Schmitt et al., 2014a). Diese sind ebenfalls durch eine Expression von CXCR5 und IL-21 gekennzeichnet, jedoch exprimieren sie ICOS und PD-1 nur in geringerem Maße und der Transkriptionsfaktor Bcl6 kann nicht nachgewiesen werden (Ma und Deenick, 2014; Tangye et al., 2013; Vinuesa et al., 2016). Die Rolle von Bcl6 in zirkulierenden humanen T_{FH}-Zellen ist somit unklar, da es für ihr Überleben, die Expression von CXCR5 und IL-21, sowie ihre Fähigkeit die B-Zelldifferenzierung zu induzieren, nicht notwendig zu sein scheint (Tangye et al., 2013).

Die Differenzierung humaner T_{FH}-Zellen ist ein mehrstufiger Prozess, an dem viele verschiedene Zytokine, Oberflächenmoleküle und Transkriptionsfaktoren beteiligt sind (Crotty, 2011; Ise, 2015; Mesquita Jr et al., 2016). Die frühe Phase der Differenzierung von T_{FH}-Zellen wird durch den Kontakt von CD4⁺ T-Zellen mit APC in der T-Zellzone sekundärer lymphatischer Organe eingeleitet (Stauss et al., 2016). Die CD4⁺ T-Zellen exprimieren daraufhin CXCR5 und Bcl6 und regulieren CCR7 herunter, wodurch sie in der Lage sind zur B-Zellzone zu wandern (Cannons et al., 2013; Fan et al., 2015). APC-abhängige Zytokine und Zytokine aus der Mikroumgebung wie IL-12, IL-23 und TGFβ (Mesquita Jr et al., 2016; Ueno, 2016; Vinuesa et al., 2016) aktivieren die Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT4 und induzieren eine verstärkte Expression von IL-21, ICOS, CXCR5 und Bcl6, welche durch ein Zusammenwirken von TGFβ mit IL-12 und IL-23 noch verstärkt wird (Schmitt et al., 2014b; Ueno, 2016; Vinuesa et al., 2016). In der zweiten Phase der T_{FH}-Zelldifferenzierung an der Grenze von T- und B-Zellen interagieren die frühen T_{FH}-Zellen mit Antigen-spezifischen B-Zellen, unter anderem über eine Verbindung von TCR und Antigen-MHCII-Komplex, ICOS und ICOS Ligand, CD40L und CD40 und fördern so ihre Differenzierung zu kurzlebigen, extrafollikulären Plasmablasten oder ihre Migration zum B-Zellfollikel (Fan et al., 2015; Stauss et al., 2016). Die dritte Phase findet im Keimzentrum statt, welches aus T-Zellen, B-Zellen, folliculären DC, Makrophagen und Stützgewebe besteht (Crotty, 2014). Dort differenzieren die frühen T_{FH}-Zellen vollständig aus, interagieren

anschließend über spezifische Effektormoleküle und T-Zell-intrinsische Signale mit B-Zellen und verhelfen ihnen so zur Affinitätsreifung, dem Klassenwechsel und zur Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen oder Antikörper-produzierenden Plasmazellen (Fan et al., 2015; Mesquita Jr et al., 2016).

Besonders charakteristisch für T_{FH}-Zellen ist die Expression des Zytokins IL-21, welches für die Bildung extrafollikulärer, Antikörper-produzierender Zellen, sowie für das Überleben und die Proliferation von B-Zellen im Keimzentrum verantwortlich und somit an einer passenden Antikörperantwort beteiligt ist (Cannons et al., 2013; Parodi, 2014). Dennoch können T_{FH}-Zellen auch Zytokine sezernieren, welche eher mit T_{H1}-, T_{H2}- oder T_{H17}-Zellen in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören IL-17, IFN γ , IL-4, IL-6 oder IL-10 (Cannons et al., 2013; Mesquita Jr et al., 2016; Parodi, 2014). Darüberhinaus exprimieren T_{FH}-Zellen nicht nur viele verschiedene Zytokine, sondern auch eine Vielzahl unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren wie Bcl6, *Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like* (BATF), c-maf, *Interferon regulatory factor 4* (IRF4) und STAT3, die ebenfalls entscheidend an ihrer Entwicklung und Funktion beteiligt sind (Liu et al., 2013a; Stauss et al., 2016).

Bcl6 ist der Haupt-Transkriptionsfaktor für T_{FH}-Zellen, fördert die Expression von CXCR5 und PD-1 und ist somit für ihre Entwicklung und die damit verbundene Keimzentrumsreaktion verantwortlich (Fan et al., 2015; Ise, 2015). Darüberhinaus fungiert Bcl6 als transkriptionales Repressormolekül (Ma et al., 2012a), indem es die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA3 und ROR γ t und somit die Differenzierung von T_{H1}-, T_{H2}- und T_{H17}-Zellen hemmen kann (Cannons et al., 2013; Fan et al., 2015; Liu et al., 2013a; Ma et al., 2012a). In Verbindung mit der Stimulation durch Zytokine, wird häufig eine Signaltransduktionskaskade über STATs aktiviert, welche ebenfalls eine wichtige Rolle bei der T_{FH}-Zellpolarisierung hat (Crotty, 2014). So konnte gezeigt werden, dass STAT1 abhängig von IL-6 und Typ I Interferonen in murinen T-Zellen die Expression von CXCR5 und Bcl6 reguliert (Ise, 2015). STAT3 ist an der Expression von IL-21 beteiligt und hemmt IL-2, um eine T_{H1}-Zelldifferenzierung zu unterdrücken (Liu et al., 2013a; Schmitt et al., 2014b; Ysebrant de Lendonck et al., 2013). STAT4 wird durch IL-12 aktiviert und fördert somit vor allem die Polarisierung humaner T_{FH}-Zellen (Schmitt et al., 2014b). Außerdem werden STAT3 und STAT4 aktiviert, was vor allem im Zusammenhang mit IL-12 und IL-23 die Ausbildung von humanen T_{FH}-Zellen fördert (Schmitt et al., 2014b; Vinuesa et al., 2016). STAT5, welches durch IL-2 aktiviert wird, stimuliert die Expression von Blimp-1 und hemmt damit die T_{FH}-Zellpolarisierung durch eine direkte Hemmung von Bcl6 (Cannons et al., 2013; Ise, 2015; Liu et al., 2013a; Ma et al., 2012a).

Das zelluläre Homolog zum viralen V-maf Gen (c-maf) ist stark exprimiert in T_{FH}-Zellen und induziert ICOS-abhängig die Produktion von IL-4 und IL-21 in CD4⁺ T-Zellen (Cannons et al., 2013; Liu et al., 2013a). Zusammen mit Bcl6 stimuliert c-maf außerdem die Expression von CXCR5, ICOS und PD-1 (Ise, 2015; Ma et al., 2012a). BATF und IRF4 sind ebenfalls an der T_{FH}-Zelldifferenzierung beteiligt, indem sie direkt die Expression von Bcl6 und c-maf regulieren (Cannons et al., 2013; Ise, 2015; Liu et al., 2013a). Auch Ascl2 (*Achaete-scute complex homolog 2*) ist stark exprimiert in T_{FH}-Zellen. Ascl2 induziert spezifisch die Expression von CXCR5, fördert die Migration von T-Zellen zum B-Zellfollikel und hemmt gleichzeitig die Expression von Genen für T_H1- und T_H17-Zellen (Ise, 2015; Vinuesa et al., 2016).

Zu den Transkriptionsfaktoren, welche eine T_{FH}-Zelldifferenzierung hemmen, gehören Blimp-1, FOXO1 (*Forkhead box protein O1*), KLF2 (*Krüppel-like Factor 2*) und FoxP1 (*Forkhead box protein P1*) (Vinuesa et al., 2016). FOXO1 hemmt direkt die Expression von Bcl6, FoxP1 hemmt die Expression von ICOS und IL-21 nach der Aktivierung des TCR, Blimp-1 wirkt Bcl6 entgegen und verhindert somit die Ausbildung von T_{FH}-Zellen und KLF2 fördert die Expression von Molekülen (z.B. CCR7), welche eine Migration hin zur T-Zellzone und weg vom B-Zellfollikel begünstigen und verhindert so eine Ausdifferenzierung von T_{FH}-Zellen (Choi et al., 2013; Lee et al., 2015; Vinuesa et al., 2016; Wang et al., 2014; Weber et al., 2015).

4.3.2 Funktion und Bedeutung von folliculären T-Helferzellen

Follikuläre T-Helferzellen sind eine Untergruppe spezialisierter CD4⁺ T-Zellen, welche in der Lage sind, im Keimzentrum eine Differenzierung von Antigen-spezifischen B-Zellen in Gedächtnis-B-Zellen oder Immunglobulin (Ig)-sezernierende Plasmazellen zu induzieren (Ma und Deenick, 2014; Tangye et al., 2013). Im Keimzentrum zirkulieren B-Zellen in zwei unterschiedlichen Regionen, der hellen und dunklen Zone (Crotty, 2014; Ise, 2015). In der hellen Zone des Keimzentrums binden B-Zellen ein Antigen und präsentieren den Antigen-MHC II-Komplex T_{FH}-Zellen, welche dann über bestimmte Signale das Überleben und die Proliferation von B-Zellen im Keimzentrum sichern (Crotty, 2014). Erhalten B-Zellen diese Signale, wandern sie in die dunkle Zone des Keimzentrums, in der sie proliferieren und Mutationen in ihre Antikörpergene einfügen (somatische Hypemutation), was ihnen ermöglicht, eine Vielzahl verschiedener und hochaffiner Antikörper zu produzieren (Crotty, 2014). Diese mutierten B-Zellen wandern anschließend zurück in die helle Zone, wo T_{FH}-Zellen die B-Zellen mit der höchsten Antigen-Affinität auswählen und diese erneut

prolifrieren und mutieren (Crotty, 2014). Auf diese Art und Weise entstehen mit der Hilfe von T_{FH} -Zellen hochaffine Antikörper, wodurch sie eine zentrale Rolle bei der Entwicklung humoraler Immunantworten zum Schutz gegen Pathogene spielen (Crotty, 2014; Ise, 2015; Leipe und Chang, 2015). Aufgrund dieser Eigenschaft sind T_{FH} -Zellen vor allem als Grundlage für die Entwicklung neuer Impfstrategien von Bedeutung, da die meisten Impfstoffe auf langlebigen, hochaffinen, T-Zell-abhängigen Antikörperantworten beruhen (Leddon et al., 2015; Linterman und Hill, 2016; Pratama und Vinuesa, 2014; Tangye et al., 2013). So konnte in Studien bereits gezeigt werden, dass T_{FH} -Zellen eine Differenzierung Influenza-spezifischer B-Zellen ICOS- und IL-21-abhängig förderten und so einen wichtigen Bestandteil für die Entwicklung neuartiger Impfstrategien gegen Influenza-Infektionen darstellen (Spensieri et al., 2013). Oft ist die Wirkung von Impfstoffen bei älteren, im Vergleich zu jüngeren Menschen aber abgeschwächt. Herati *et al.* konnten zeigen, dass gestörte Immunantworten durch zirkulierende T_{FH} -Zellen zu schwächeren Impfantworten bei älteren, im Vergleich zu jüngeren Menschen führten. Dabei war die Funktion der zirkulierenden T_{FH} -Zellen, B-Zell-Hilfe zu leisten, bei älteren Menschen eingeschränkt und eine Influenza-Impfung führte nur geringfügig zur Aktivierung von T_{FH} -Zellen und somit zu reduzierten Antikörperantworten (Herati et al., 2014). Auch die Anzahl an T_{FH} -Zellen soll eine Rolle bei Influenza-Impfungen spielen, da sie mit der Zahl an B-Zellen im Keimzentrum bzw. mit der Zahl an Plasmablasten im Blut korreliert (Crotty, 2014; Linterman und Hill, 2016). Dadurch könnte die Vermehrung von T_{FH} -Zellen eine vielversprechende Methode sein, um Impfantworten zu verbessern (Linterman und Hill, 2016; Tangye et al., 2013). Impfantworten durch eine veränderte Ausbildung und/oder Funktion von T_{FH} -Zellen zu verbessern, scheint also eine vielversprechende Strategie bei der Entwicklung neuartiger Impfstoffe zu sein (Linterman und Hill, 2016). Im Gegensatz zu den mittlerweile detaillierten Daten zur transkriptionellen Regulation von T_{FH} -Zellen, sowie deren Interaktion mit B-Zellen, ist relativ wenig über die initialen Signale bekannt, die zur Instruktion der T_{FH} -Zellpolarisierung durch klassische APC in der ersten Phase der T_{FH} -Zelldifferenzierung führen. Ein genaues Verständnis dieser frühen Signale wäre jedoch essentiell um gezielt T_{FH} -gerichtete Impfstoffe bzw. Impfadjuvantien zu entwickeln (Hale und Ahmed, 2015) (Linterman und Hill, 2016). Diese frühen Signale wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

T_{FH} -Zellen spielen aber nicht nur eine entscheidende Rolle bei der humoralen Immunität gegen Infektionen, sondern tragen auch entscheidend zu Autoimmunkrankheiten bei (Park et al., 2014; Tsai und Yu, 2014). Störungen in der Regulation von T_{FH} -Zellen wie zum Beispiel

eine Über- oder Unterexpression von ICOS oder IL-21 und damit verbunden auch Störungen in der Bildung und Funktion des Keimzentrums tragen zur Ausbildung von autoimmunen Erkrankungen und Immundefekten bei (Ding et al., 2013; Gómez-Martín et al., 2011; King et al., 2008). So wurde T_{FH}-Zellen in mehreren Studien zum Beispiel eine Rolle bei der Entwicklung von SLE (*Systemic lupus erythematosus*) zugesprochen (Gómez-Martín et al., 2011; Jacquemin et al., 2015; Le Coz et al., 2013; Park et al., 2014). Le Coz *et al.* brachten eine vermehrte Anzahl zirkulierender T_{FH}-Zellen in Patienten mit aktiver SLE mit der Ausbildung der Autoimmunerkrankung in Verbindung (Le Coz et al., 2013), während Park *et al.* eine Funktionsstörung von T_{FH}-Zellen mit anschließender anormaler Bildung des Keimzentrums und daraus resultierender massiver Produktion von Autoantikörpern dafür verantwortlich machen (Park et al., 2014). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass OX40 Ligand eine Rolle bei der verstärkten Aktivität von T_{FH}-Zellen und somit bei der Entwicklung von SLE spielt (Jacquemin et al., 2015). Darüber hinaus haben mehrere Forschungsgruppen zirkulierende T_{FH}-Zellen als potentiellen Biomarker für weitere Autoimmunerkrankungen wie dem Sjögren Syndrom (SS) (Tangye et al., 2013), der Rheumatoiden Arthritis (RA) (Park et al., 2014; Tangye et al., 2013), Multiple Sklerose (MS) (Fan et al., 2015), den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Chron, Diabetes mellitus Typ 1 oder der autoimmune Hepatitis beschrieben (Fan et al., 2015; Mesquita Jr et al., 2016; Park et al., 2014; Tangye et al., 2013; Ueno et al., 2015).

Aufgrund der vielseitigen Rolle von T_{FH}-Zellen in zahlreichen Krankheitsbildern und vor Allem ihrer zentralen Bedeutung für die Entwicklung neuer, effektiverer Impfstoffe, bedarf es eines exakten Verständnisses der T_{FH}-Zellbiologie, um T_{FH}-Zellen und ihre Rezeptoren, Zytokine, Chemokine und biochemischen Signalwege für die Entwicklung neuer Therapeutika und für Impfstrategien zum Schutz vor Infektionen zu nutzen (Mesquita Jr et al., 2016; Parodi, 2014; Tangye et al., 2013).

4.4 Zielsetzung

Die Motivation für dieses Promotionsvorhaben lag in der Aufklärung grundlegender Mechanismen der antibakteriellen T-Zell-Immunität als Voraussetzung für die Entwicklung neuartiger Impfstrategien gegen bakterielle Infektionen. Neben grundlagenwissenschaftlichen Einblicken in das Zusammenspiel von Mikroorganismen und dem menschlichen Immunsystem, sollten Erkenntnisse gewonnen werden, die zur Entwicklung besserer Impfadjuvantien beitragen können. Basierend auf der Beobachtung, dass viele

Lebendimpfstoffe den eigentlich moderneren Totimpfstoffen überlegen sind, wäre es wünschenswert Impfungen bzw. Impfadjuvantien zu entwickeln, die idealerweise langlebige und schützende Immunantworten auslösen, so wie es viele Lebendimpfungen oder durchgemachte Infektionen tun. Lebende und somit potentiell gefährliche Mikroorganismen enthalten *viability-associated (vita)*-PAMPs wie bakterielle RNA. Antigen-präsentierende Zellen können durch die Detektion von *vita*-PAMPs lebende, infektiöse Bakterien von toten unterscheiden. Sie exprimieren Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), mit denen sie bakterielle RNA erkennen und binden und so das Immunsystem zu einer stärkeren Immunantwort stimulieren. Auf dieser Grundlage sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss die Erkennung von bakterieller Vitalität, bzw. *vita*-PAMPs durch humane APC auf nachfolgende adaptive Immunantworten, speziell auf die Polarisierung von T-Helferzellen hat. T_{FH}-Zellen sind in diesem Zusammenhang besonders interessant, da sie B-Zell-Hilfe leisten und somit an der Ausbildung von Keimzentren, am Immunglobulin-Klassenwechsel und an der Affinitätsreifung beteiligt sind. Daher könnten neue Erkenntnisse über die Differenzierung und Aufrechterhaltung von T_{FH}-Zellantworten die Grundlage für die Entwicklung neuer Impfstrategien darstellen.

In der ersten Phase des Projektes wurde zunächst bestätigt, was in anderen Projekten der Arbeitsgruppe untersucht wurde: die Detektion von bakterieller Vitalität durch APC beeinflusst deren Aktivierung in sehr selektiver Weise. Dies wurde z.B. anhand der Sekretion von Zytokinen durch klassische humane Monozyten als Antwort auf lebende und tote *E. coli* bestimmt. Anschließend sollte in verschiedenen Ansätzen untersucht werden, wie die Detektion von bakterieller Vitalität durch APC nachfolgende T-Helferzellantworten (T_{H1}, T_{H17}, T_{FH}) beeinflusst. Im dritten Teil sollten APC-abhängige Faktoren identifiziert werden, welche Vitalitäts- (*vita*-PAMP)-abhängig gebildet wurden und so potentiell differentielle T-Helferzellantworten regulierten. Im vierten Teil sollte die Rolle des putativen *vita*-PAMP Rezeptors für die T_{FH}-Zelldifferenzierung durch Gene Silencing (RNAi) untersucht werden. Ziel der Arbeit war es also den Einfluss der Immundetektion bakterieller Signale (*vita*-PAMPs) auf humane T-Zellantworten zu untersuchen, sowie neue Signale für eine präferentielle T_{FH}-Zelldifferenzierung zu identifizieren.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Substanzen/Lösungen/Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Brefeldin-A	eBioscience, San Diego, CA, USA
CL075 (5 mg)	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Cytofix/Cytoperm Fixation Solution	BD Biosciences, Heidelberg
dH ₂ O	Merck Millipore, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Escherichia coli</i> K12, strain DH5 α	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ethylenediaminetetraacetic acid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
GlutaMAX™ Supplement (L-Glutamin)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HEPES Buffer (1 M)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich, Steinheim
Human Serum, Normal	Merck Millipore, Darmstadt
Human TruStain FcX™	BioLegend, San Diego, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Monensin	BioLegend, San Diego, USA
MYD88 Silencer siRNA (1 nmol)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Non essential amino acids	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pancoll	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Perm/Wash Buffer	BD Biosciences, Heidelberg
Phorbol-12-myristate-13-acetate	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Poly-L-arginin (10 mg)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserum Albumin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
RPMI 1640	GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RLT Lysis Buffer (200 ml)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Silencer Select Negative Control (5 nmol)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
ssRNA-Cholesterin (100 μ M)	Kooperation Institut für Immunologie, Philipps-Universität Marburg
Staphylokokken-Enterotoxin-B	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thymidin	Sigma-Aldrich, Steinheim

TLR8 Silencer siRNA (1 nmol)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trimethoprim	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
X-VIVO 15 Medium, serumfrei	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz

5.1.2 Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
CFSE Färbemedium (CFSE/RH)	RPMI1640 1% Hapes
EasySep/FACS Puffer	PBS 2% FCS 1 mM EDTA
Einfriermedium	FCS 10% DMSO
Luria-Bertani (LB) Medium, pH 7	1000 ml dH ₂ O 10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Yeast Extrakt 10 g NaCl (für Festmedium: + 15 g Agar)
MACS Puffer	PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA
MagniSort Puffer	PBS 3% FCS 10 mM EDTA
Monozyten / B-Zell Medium	RPMI 1640 10% FCS (Hitze inaktiviert, gefiltert) 1% NEAA 1% L-Glutamin 1% Hapes
RPMI-EDTA Waschlösung	RPMI 1640 5% FCS 2 mM EDTA

T-Zell Medium	RPMI1640 10% humanes Serum (Hitze inaktiviert) 1% NEAA 1% L-Glutamin 1% Hepes 1% Penicillin/Streptomycin
---------------	---

5.1.3 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Cell Trace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
CD19 Microbeads human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit	STEMCELL Technologies Inc, Vancouver, BC, Canada
Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience, San Diego, CA, USA
Human IFN- γ ELISA MAX™ Standard	BioLegend, San Diego, USA
Human IgG A ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, San Diego, CA, USA
Human IgG M ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, San Diego, CA, USA
Human IgG total ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, San Diego, CA, USA
Human IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, San Diego, CA, USA
Human IL-17 ELISA MAX™ Deluxe	BioLegend, San Diego, USA
Human IL-21 ELISA MAX™ Deluxe	BioLegend, San Diego, USA
Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, San Diego, CA, USA
Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, San Diego, CA, USA
LEGEND MAX™ Human IL-12/23 (p40) ELISA Kit	BioLegend, San Diego, USA
MagniSort™ Human CD4 Naïve T cell Enrichment Kit	eBioscience, San Diego, CA, USA
MagniSort™ Human CD4 T cell Enrichment Kit	eBioscience, San Diego, CA, USA
Quanti Gene Plex 2.0 Evaluation Kit	eBioscience, San Diego, CA, USA

5.1.4 FACS-Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
anti-human Bcl6 (K112-91), PE konjugiert	BD Biosciences, Heidelberg
anti-human CD14 (61D3), APC konjugiert	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-human CD16 (eBioCB16), FITC konjugiert	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-human CD185 (CXCR5) (J252D4), PE konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD19 (HIB19), APC konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD197 (CCR7) (G043H7), Alexa Fluor 488® konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD20 (2H7), PerCP konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD278 (ICOS) (C398.4A), APC konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD279 (PD-1) (EH12.2H7), APC/Cy7 bzw. PE/Cy7 konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD3 (UCHT1), Alexa Fluor® 488	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD38 (HB-7), PE-Cy7 konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD4 (OKT4), Pacific Blue konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD40 (5C3), Alexa Fluor 488® konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD45RA (HI100), PerCP/Cy5.5 konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD80 (2D10), PerCP/Cy5.5 konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD86 (IT2.2), PE/Cy7 konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human HLA-DR (L243), APC konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human ICOSL (2D3), PE konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human IFN γ (4S.B3), PE/Cy7 konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human IgD (IA6-2), Alexa Fluor 488® konjugiert	BioLegend, San Diego, USA

anti-human IgM (MHM-88), APC-Cy7 konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human IL-17 (BL168), PE konjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human IL-21 (eBio3A3-N2), eFluor660 konjugiert	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-human OX40L (11C3.1), Biotin	BioLegend, San Diego, USA
Streptavidin, APC/Cy7 konjugiert	BioLegend, San Diego, USA

5.1.5 Stimulierende und neutralisierende Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
anti-human CD28 (CD28.2), unkonjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD3 (UCHT1), unkonjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human IFNAR1 (polyklonal), unkonjugiert	Abcam, Cambridge, UK
anti-human IFN β (76703), unkonjugiert	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
anti-human IL-1 β (H1b-27), unkonjugiert	BioLegend, San Diego, USA
anti-human IL-12 (B-T21), unkonjugiert	eBioscience, San Diego, CA, USA
anti-human IL-27 (polyklonal), unkonjugiert	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
anti-human IL-6 (6708), unkonjugiert	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
anti-human TNF α (Mab11), unkonjugiert	BioLegend, San Diego, USA

5.1.6 Zytokine

Bezeichnung	Hersteller
humanes rekombinantes IFN β	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
humanes rekombinantes IL-1 β	BioLegend, San Diego, USA
humanes rekombinantes IL-12 (p70)	BioLegend, San Diego, USA
humanes rekombinantes IL-27	BioLegend, San Diego, USA
humanes rekombinantes IL-6	BioLegend, San Diego, USA
humanes rekombinantes TGF β	BioLegend, San Diego, USA
humanes rekombinantes TNF α	BioLegend, San Diego, USA

5.1.7 Kunststoffartikel und sonstige Materialien

Allgemein in Laboren vorhandene und für diese Arbeit verwendete Materialien wie Automatikpipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc. entsprechen den gängigen Standards und werden hier nicht extra aufgeführt. Verwendete Zellkulturflaschen, -platten und -schalen verschiedenster Ausführungen wurden alle bei Falcon® bezogen. Verwendete spezielle Materialien sind zusätzlich aufgeführt.

Bezeichnung	Hersteller
Corning® 96 Well Clear Flat Bottom	Corning, NY, USA
Kryoröhrchen 2 ml	CARL ROTH GmbH + CO. KG, Karlsruhe
Falcon® Round-Bottom Tubes, Polystyrene	VWR International GmbH, Darmstadt
Nalgene® Einfrierhilfebox "Mr.Frosty"	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Nunc™ MicroWell™ 96-Well Optical-Bottom Plates with Polymer Base	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

5.1.8 Geräte

Die in Laboren standardmäßig eingesetzten Geräte wie Reinraumwerkbänke, Kühlgeräte, Inkubatoren, Zentrifugen, Wasserbäder, Eismaschine usw. werden in dieser Arbeit nicht extra aufgeführt. Sie entsprechen den gängigen Standards und werden regelmäßig gewartet.

Bezeichnung	Hersteller
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Bio Plex® 200 Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Durchflusszytometer BD FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg
FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader	Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA
Inverses Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Nanodrop 2000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research Inc., St. Bruno, Quebec, Canada
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Unitwist 400	Uniequip, Planegg
VorTemp™ 56 Schüttel-Inkubator	Labnet International Inc., NJ, USA
Vortexer (VV3)	VWR International GmbH, Dresden

5.2 Methoden

5.2.1 *Präparation lebendiger und toter Thymidin-auxotropher Escherichia coli*

Escherichia coli K12 des Stammes DH5 α wurden kommerziell erworben (Invitrogen / Life Technologies). Diese wurden auf Luria-Bertani (LB) Agar-Platten, welchen 50 $\mu\text{g/ml}$ Trimethoprim (Trim) und 500 $\mu\text{g/ml}$ Thymidin (Thy) zugesetzt wurde, ausgestrichen. Um die Auxotrophie der *E.coli* zu bestätigen, wurden einzelne Kolonien natürlich vorkommender Thymidin-auxotropher (ThyA⁻) *E.coli* von den Agar-Platten selektiert, in LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. ThyA⁻ *E.coli* wuchsen ausschließlich in Anwesenheit von Thymidin und waren resistent gegen Trimethoprim. Von den ThyA⁻ *E.coli* wurden Aliquots hergestellt und diese bei -80°C bis zur Wiederverwendung aufbewahrt.

Für die Tötung durch Hitze wurde die Übernacht-Kultur der ThyA⁻ *E.coli* mit PBS zur log-Phase (OD₆₀₀ = 0,6) herunter verdünnt und im Wasserbad bei 60°C für 90 min inaktiviert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die durch Hitze getöteten EC mit 30 % Glycerin versetzt, aliquotiert und bis zur Wiederverwendung bei -80°C gelagert.

5.2.2 *Isolierung von humanen peripheren mononuklearen Zellen*

Mononukleare Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus humanen Blutspende-Rückständen, sogenannten Buffy coats, isoliert. Aus dem Leukozytenkonzentrat (Buffy coat) lassen sich mit Hilfe eines Dichtegradienten (z.B. Histopaque-1077, Pancoll) PBMCs (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen und Thrombozyten) durch eine isopyknische Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen trennen. Bei dem Gradienten handelt es sich um ein hydrophiles Kolloid mit einer Dichte von 1,077 g/ml. Durch die Dichte der Lösung aggregieren die im Blut enthaltenen Erythrozyten während der Zentrifugation, wodurch diese und auch tote Zellen den Gradienten passieren und sedimentieren. Auch die Granulozyten sinken während der Zentrifugation auf den Boden des Reaktionsgefäßes ab, da ihre Dichte größer als die des Gradienten ist. Monozyten und andere mononukleare Zellen (Lymphozyten, Thrombozyten) hingegen haben eine geringere Dichte und sammeln sich in einer Interphase zwischen Pancoll-Gradient und Plasmaüberstand an. Das Leukozytenkonzentrat wurde 1:1 mit einem RPMI-EDTA Waschpuffer verdünnt. In Falcon Röhrchen wurde der Gradient Pancoll vorgelegt und mit dem Buffy Coat/Waschpuffer-Gemisch vorsichtig überschichtet. Anschließend erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation. Die entstandene Interphase mit den

enthaltenen PBMCs wurde entnommen und zum Waschen in ein neues Falcon Röhrchen überführt. Die PBMCs wurden repetitiv bei niedriger g -Zahl gewaschen, um kontaminierende Thrombozyten vollständig von den PBMC zu trennen. Aus den PBMCs wurden anschließend gewünschte Zellen für weiterführende Experimente separiert.

5.2.3 Immunomagnetische Negativselektion humaner Monozyten

Die Separation humaner Monozyten erfolgte mit Hilfe des EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit (Stemcell™ Technologies). Dabei werden unerwünschte Zellen zur Entfernung mit tetrameren Antikörper-Komplexen markiert, welche CD2, CD3, CD16, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123, Glykophorin A und Dextran-beschichtete magnetische Partikel erkennen. Der Cocktail enthält zusätzlich einen Antikörper gegen den humanen Fc-Rezeptor, um eine unspezifische Bindung von Monozyten zu verhindern. Die Zielzellen werden mit einem EasySep™ Magneten ohne den Gebrauch von Säulen getrennt und können eluiert werden. Die Zellseparation humaner Monozyten erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Um die Reinheit der separierten Monozyten zu überprüfen, wurde eine Messung am Durchflusszytometer (FACS) durchgeführt. Dafür wurde eine Zellprobe entnommen und für die Messung am FACS vorbereitet. Die Zellen wurden mit FACS Puffer gewaschen, und anschließend mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörpermix (CD14-APC und CD16-FITC) gefärbt. Nach erneutem Waschen in FACS Puffer konnten die Proben am Durchflusszytometer gemessen werden. Die Reinheit sollte bei $> 90\%$ isolierter CD14⁺CD16⁻ Monozyten liegen.

5.2.4 Immunomagnetische Negativselektion humaner CD4⁺ T-Zellen

Näive CD4⁺ T-Zellen wurden mit Hilfe des MagniSort® Human CD4 Naïve T cell Enrichment Kit (eBioscience) isoliert. Unerwünschte Zellen werden dabei mit einem Mix aus biotinylierten Antikörpern gegen CD8, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD45RO und CD56 gefärbt und bleiben durch Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel in einem magnetischen Feld zurück. Die naiven CD4⁺ T-Zellen bleiben dabei unberührt und werden so mittels negativer Selektion in Lösung eluiert. Die Isolation erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Durch Färbung mit CD45RA-PerCP/Cy5.5 und CCR7-AF488 wurde der Reinheitsgrad der isolierten naiven CD4⁺ T-Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die Reinheit sollte bei $> 90\%$ isolierter CD4⁺ T-Zellen liegen.

Die Isolation totaler CD4⁺ T-Zellen erfolgte mit Hilfe des MagniSort™ Human CD4 T cell Enrichment Kit (eBioscience), welches CD4⁺ T-Zellen mittels negativer Selektion von den restlichen Zellen separiert. Dabei werden unerwünschte Zellen mit einem Mix aus biotinylierten Antikörpern markiert (CD8, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123, CD235a, $\gamma\delta$ TCR) und mit Streptavidin-beschichteten magnetischen Partikeln in einem magnetischen Feld depletiert. Die Zielzellen bleiben dabei unberührt und können in Lösung eluiert werden. Die Isolation erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Um die Reinheit der separierten CD4⁺ T-Zellen zu überprüfen, wurde eine Zellprobe mit einem Fluoreszenzmarkierten Antikörpermix (CD4-PacBlue und CD3-AF488) gefärbt und die Proben am Durchflusszytometer gemessen. Die Reinheit sollte bei > 95 % isolierter CD4⁺ T-Zellen liegen.

5.2.5 Immunomagnetische Negativselektion humaner naiver B-Zellen

Humane naive B-Zellen wurden mittels MACS® Separation (Miltenyi Biotec) isoliert. Dabei wurden unerwünschte Zellen (T-Zellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten, Blutplättchen und Erythrozyten, sowie nicht-naive B-Zellen) mit einem biotinylierten Antikörper-Mix gegen CD2, CD14, CD16, CD27, CD36, CD43 und Glycophorin A gefärbt und anschließend mit magnetischen anti-Biotin Mikropartikeln beladen. Die Zellsuspension wurde auf eine MACS® Säule geladen, welche in einem magnetischen Feld platziert wurde. Unerwünschte Zellen blieben durch die magnetische Markierung in der MACS-Säule zurück, während die naiven B-Zellen von den restlichen Zellen depletiert wurden. Die magnetische Separation humaner naiver B-Zellen erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die Reinheit sollte bei > 90 % isolierter naiver B-Zellen liegen.

5.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Konzentration der Ziel-Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je nach Größe des Pellets wurde die Zellsuspension verdünnt, anschließend 1:1 mit Trypanblau versetzt, um beim Zählen tote (= Trypanblau positive) Zellen auszuschließen, und in die Zählkammer pipettiert. Mindestens zwei der vier Großquadrate der Zählkammer wurden ausgezählt und daraus ein Mittelwert (MW) gebildet. Die Bestimmung der Zellzahl/ml erfolgte nach folgender Formel: Zellzahl/ml = MW x 10⁴ x Verdünnungsfaktor.

5.2.7 CFSE Färbung humaner CD4⁺ T-Zellen zur Bestimmung der Proliferationsrate

CD4⁺ T-Zellen wurden mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) gefärbt, um später per Durchflusszytometrie deren Proliferationsverhalten zu verfolgen. Aufgrund des mit den Zellteilungen durch Dilution abnehmenden Fluoreszenzsignals kann am Durchflusszytometer der Anteil der sich teilenden Zellen und idealerweise die Anzahl der Zellteilungen der CFSE-gefärbten Zellen bestimmt werden. Das CFSE-Färbemedium (CFSE/RH) wurde im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt und anschließend die zu färbenden Zellen darin gewaschen. CFSE wurde in einer Konzentration von 1 µM in CFSE/RH gelöst, das Pellet darin resuspendiert und die Zellen anschließend für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt, da direktes Licht die Fluoreszenz des Farbstoffes mindern könnte. Nach der Inkubationszeit wurden die gefärbten Zellen zweimal in kaltem RPMI-EDTA Waschpuffer gewaschen und danach in T-Zell Medium aufgenommen.

5.2.8 Stimulation humaner Monozyten mit ThyA⁻ *E. coli*

Replikations-defiziente ThyA⁻ *E. coli* wurden 1:100 in LB-Medium, versetzt mit 50 µg/ml Trimethoprim und 500 µg/ml Thymidin (LB + Thy/Trim), inokuliert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Für den Infektionsversuch wurde die Übernachtskultur am Versuchstag erneut in LB + Thy/Trim auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und die ThyA⁻ *E. coli* anschließend bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase (log-Phase, OD₆₀₀ = 0,65 - 0,85) kultiviert. Nach Erreichen der log-Phase folgten drei Waschschrte in Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), um Thymidin und Salze des LB-Mediums zu entfernen, bevor die ThyA⁻ EC zur Zellkultur zugegeben wurden. Auch die Hitze-getöteten *E. coli* wurden vor ihrem Einsatz dreimal in PBS gewaschen. Die isolierten CD14⁺ Monozyten wurden mit einer Konzentration von 1*10⁶ Zellen/ml in einer 12-Well Platte ausgesät, anschließend mit lebenden bzw. Hitze-getöteten *E. coli* bei einer MOI von 10 (d.h. 10 Bakterien pro Zelle) infiziert und für 18 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Desweiteren wurden unbehandelte Monozyten als Kontrolle mitgeführt. Eine Stunde nach der Infektion der Monozyten wurden die Bakterien durch Zugabe von Antibiotika (Penicillin / Streptomycin) abgetötet.

5.2.9 Co-Kultur humaner naiver CD4⁺ T-Zellen mit stimulierten humanen autologen Monozyten

Ob die Erkennung bakterieller Vitalität durch Monozyten nachfolgende T-Helfer-Zellantworten beeinflusst, wurde durch folgenden Versuchsablauf untersucht (**Abb. 1**).

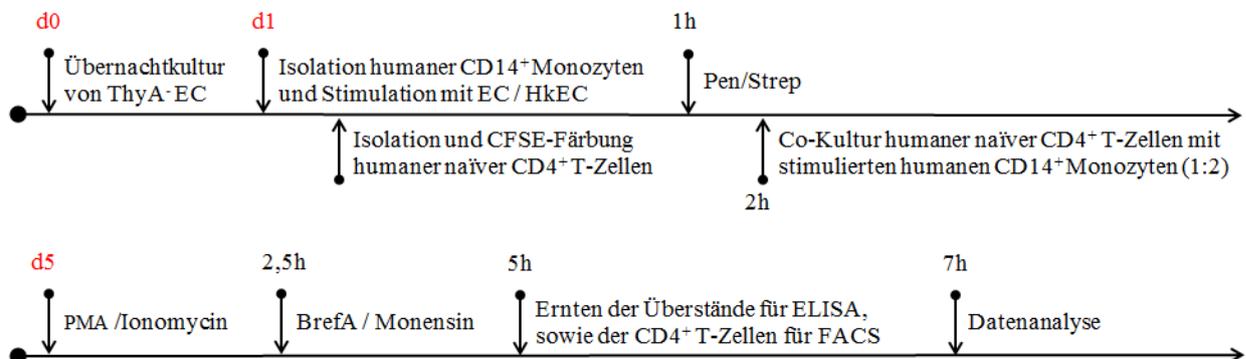


Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Co-Kultur mit autologen Monozyten und naiven CD4⁺ T-Zellen

Zwei Stunden nach der Infektion der Monozyten wurden autologe naive CD4⁺ T-Zellen mit den EC / HKEC-stimulierten Monozyten unter Zugabe von 1 µg/ml Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB) in einem Verhältnis von 1:2 und einer Konzentration von 3·10⁵ Zellen/ml für fünf Tage bei 37°C, 5 % CO₂ co-kultiviert. Zur Charakterisierung der CD4⁺ T-Zellpolarisierung wurden am Tag 5 der Kultur die Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

5.2.10 Zellkultur humaner CD4⁺ T-Zellen mit konditionierten Monozyten-Überständen

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob für die Regulierung der T-Helfer-Zellantworten allein APC-abhängige lösliche Faktoren (wie z.B. Zytokine) eine Rolle spielen oder ob ein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig ist (**Abb. 2**). Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Versuchsablauf (**Abb. 1**) wurden hier keine autologen Monozyten, sondern Überstände stimulierter Monozyten (= konditionierte Überstände mit darin enthaltenen APC-abhängigen Faktoren, wie z.B. Zytokine) zur Kultur mit den CD4⁺ T-Zellen eingesetzt.

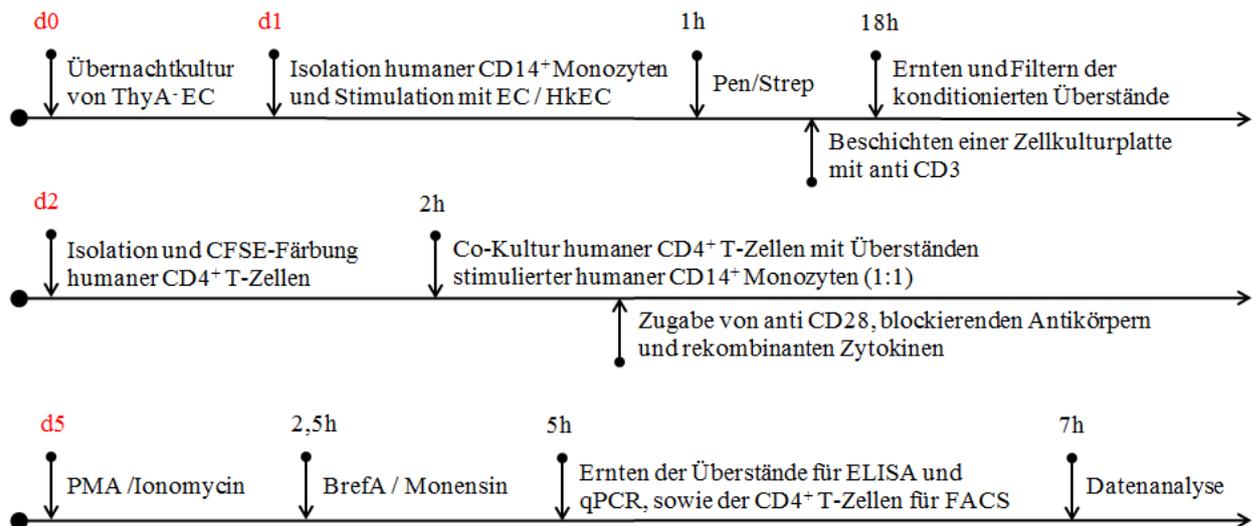


Abb. 2: Schematische Darstellung der *in vitro* Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen mit konditionierten Monozyten-Überständen

Um eine einheitliche Aktivierung aller T-Zell-Bedingungen zu gewährleisten, erfolgte eine polyklonale Stimulierung der Zellen mittels Antikörpern gegen CD3 und CD28 (anti-CD3 / anti-CD28). Dabei wurde eine 96-Well Platte vor dem Versuchstag mit anti-CD3 (Klon: UCHT) in einer Konzentration von 4 µg/ml über Nacht beschichtet und vor Zugabe der T-Zellen wieder entfernt. Anti-CD28 wurde am Versuchstag in einer Konzentration von 1 µg/ml hinzu gegeben. Die CD4⁺ T-Zellen wurden in frischem T-Zell Medium mit den konditionierten Monozyten-Überständen im Verhältnis 1:1 und einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml für fünf Tage bei 37°C, 5 % CO₂ kultiviert. Es wurden zusätzlich mehrere Kontrollbedingungen mitgeführt.

In weiterführenden Versuchen sollten APC-abhängige Faktoren identifiziert werden, welche die differentielle T-Helferzell-Polarisierung regulieren. Dafür wurden die Versuchsabläufe aus **Abb. 2** verwendet und zusätzliche Bedingungen mit blockierenden Antikörpern gegen relevante Zytokine eingesetzt. Zu den CD4⁺ T-Zellen wurden anti IL-1β-, anti IL-6-, anti IL-12-, anti TNFα- oder anti IFNβ-Antikörper jeweils in einer Konzentration von 10 µg/ml und anti IL-27- und anti IFNAR1-Antikörper jeweils in einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben. Parallel wurden Kontroll-Monozytenüberstände mit den entsprechenden rekombinanten Zytokinen komplementiert. Diese wurden alle in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt, mit Ausnahme von rekombinantem IL-12, welches in einer Konzentration von 100 pg/ml zu den T-Zellen zugegeben wurde. Auch in diesem Versuchsteil wurde die CD4 T-Zellpolarisierung per FACS analysiert.

Desweiteren wurde untersucht wie T-Helferzellantworten durch TLR8-Aktivierung in Monozyten beeinflusst werden. Hierfür wurden durch einen Doktoranden der AG Sander

(Matteo Ugolini, M. Sc.) humane Monozyten für 48 Stunden mit siRNA gegen TLR8 behandelt und anschließend mit EC, HkEC oder nur Medium stimuliert. Die Monozyten-Überstände wurden nach Übernachtskultur geerntet, gefiltert und analog zu **Abb. 2** für 5 Tage mit CD4⁺ T-Zellen kultiviert. Als Negativkontrolle wurde siRNA mit einer „nonsense/scrambled“ Sequenz (SCRM) mitgeführt und als Positivkontrolle wurde der synthetische TLR8-Agonist CL075 eingesetzt. Außerdem wurden Monozyten mit weiteren TLR-Liganden wie dem zugelassenen Impfstoff-Adjuvanz *Monophosphoryl lipid A* (MPLA) und CpG-DNA stimuliert.

Zusätzlich wurden in weiteren Versuchen humane Monozyten mit Poly-L-Arginin (pLa)-gekoppelter bakterieller RNA transfiziert und für 18 Stunden zusätzlich mit HkEC oder Medium stimuliert. Monozytenüberstände wurden geerntet, gefiltert und anschließend mit CD4⁺ T-Zellen kultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellkulturüberstände zur Analyse mittels ELISA gesammelt, sowie die Zellen zur FACS-Analyse geerntet.

5.2.11 Sequentielle Co-Kultur humaner CD4⁺ T-Zellen mit stimulierten humanen autologen Monozyten und B-Zellen

Um den zweistufigen Prozess der T_{FH}-Zelldifferenzierung nachzuahmen und die Funktionalität der *in vitro* generierten T_{FH}-Zellen zu testen, wurde ein sequentielles Co-Kultursystem humaner naiver CD4⁺ T-Zellen mit stimulierten humanen autologen Monozyten und B-Zellen angewandt (**Abb. 3**).

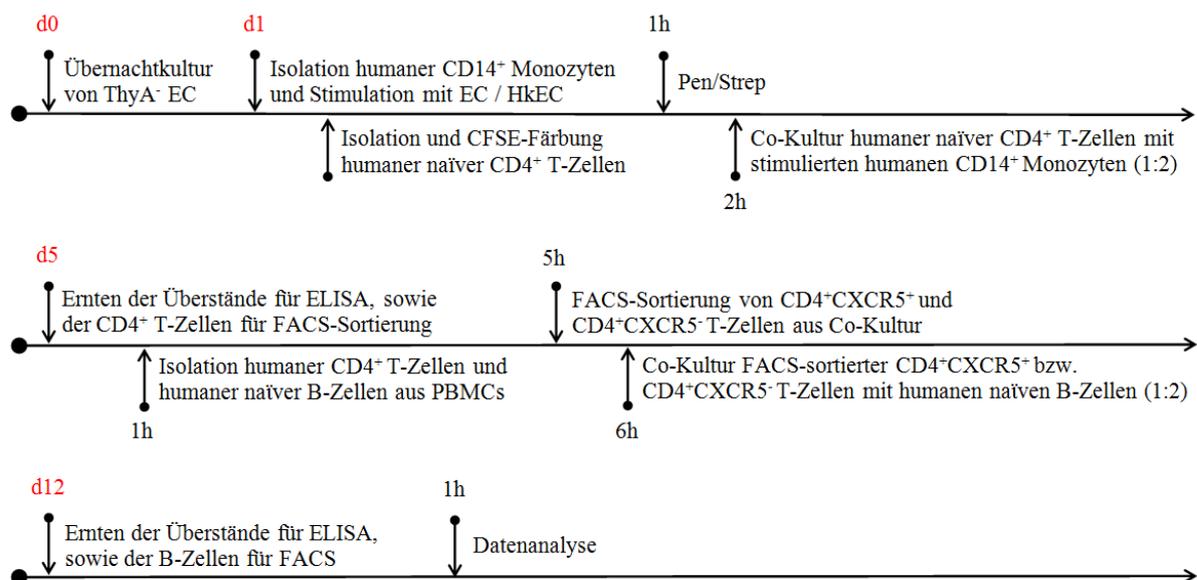


Abb. 3: Schematische Darstellung sequentiellen Co-Kultur humaner naiver CD4⁺ T-Zellen mit stimulierten humanen autologen Monozyten und B-Zellen

In diesem Zellkultur-System wurden zunächst naive CD4⁺ T-Zellen durch EC-stimulierte Monozyten aktiviert. Dafür wurden naive CD4⁺ T-Zellen mit stimulierten Monozyten unter Zugabe von 1 µg/ml SEB in einem Verhältnis von 1:2 und einer Konzentration von 3*10⁵ Zellen/ml für fünf Tage bei 37°C, 5 % CO₂ co-kultiviert. An Tag 5 der Kultur wurden CD4⁺CXCR5⁺ und CD4⁺CXCR5⁻ T-Zellen aus der Co-Kultur mittels FACS-Sortierung separiert. Die sortierten Zellen wurden anschließend mit frisch aus PBMC isolierten naiven B-Zellen in einem Verhältnis von 1:2 und einer Konzentration von 3*10⁵ Zellen/ml unter serumfreien Bedingungen und unter erneuter Zugabe von 1 µg/ml SEB für weitere sieben Tage bei 37°C, 5 % CO₂ co-kultiviert. Nach insgesamt 12 Tagen Co-Kultur wurden die Zellkulturüberstände zur Analyse mittels ELISA gesammelt, sowie die B-Zellen zur FACS-Analyse geerntet.

5.2.12 Oberflächenfärbung für die Durchflusszytometrie

Die Aktivierung der Monozyten wurde nach 18 Stunden in Kultur durch eine Färbung mehrerer Oberflächenmarker und anschließender Messung am Durchflusszytometer überprüft. Dazu wurden die Monozyten geerntet, in FACS-Puffer gewaschen und mit einem Antikörpermix gegen MHCII (HLA-DR), CD80, CD40 (alle 1:200), ICOS Ligand (1:100) und OX40 Ligand (1:500) im Dunkeln bei 4°C für 30 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und zur Analyse in FACS-Puffer aufgenommen.

Um den Phänotyp der im Überstand-System generierten CD4⁺ T-Zellen zu bestimmen, erfolgte am Tag 5 der Kultur eine Oberflächenfärbung zur durchflusszytometrischen Analyse der Zellen. Dazu wurden die CD4⁺ T-Zellen in FACS-Puffer gewaschen und mit einem Antikörpermix gegen die Oberflächenmarker CD4 (1:100), PD-1 (1:250) ICOS und CXCR5 (1:500) im Dunkeln bei 37°C für 60 Minuten auf einem Schüttler gefärbt. Anschließend wurden die gefärbten Zellen erneut gewaschen und zur Messung in einem entsprechenden Volumen FACS-Puffer aufgenommen.

B-Zellen wurden mit folgenden Markern gefärbt: CD19 (1:200), MHC-II (1:400), CD86 (1:400) und ICOSL (1:50). Die Generierung von Plasmablasten wurde durch Färbung mit CD20 und CD38 (jeweils 1:200) und die Anzahl an Immunglobulin Klassen-gewechselten Zellen durch Markierung mit anti-IgD und anti-IgM (jeweils 1:50) Antikörpern bestimmt. Die Oberflächenfärbung aller Marker erfolgte im Dunkeln bei 4°C für 20 Minuten. Anschließend wurden die gefärbten Zellen erneut gewaschen und zur Messung in einem entsprechenden Volumen FACS-Puffer aufgenommen.

5.2.13 Intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie

Um intrazelluläre Zytokine anzufärben, wurden die CD4⁺ T-Zellen an Tag 5 zunächst für fünf Stunden mit 50 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin restimuliert. In den letzten 2,5 Stunden wurde die Sekretion der Zytokine durch Zugabe von Brefeldin A und Monensin geblockt. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen und nach Protokoll des Herstellers (BD Biosciences) fixiert und permeabilisiert (Cytofix/Cytoperm fixation solution und Perm/Wash Buffer). Danach wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die Zytokine IFN γ , IL-17 und IL-21 gefärbt, welche alle in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt wurden. Der Antikörper-Mix wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Zellen anschließend zweimal in Perm/Wash Buffer gewaschen bevor sie zur Analyse in FACS Puffer aufgenommen wurden.

Zur Färbung des Transkriptionsfaktors Bcl6 wurden die Zellen mit dem Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) nach Angaben des Herstellers fixiert und permeabilisiert. Der Antikörper gegen Bcl6 wurde in einer Konzentration von 1:50 eingesetzt und im Dunkeln für 60 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen zweimal in Permeabilisierungspuffer gewaschen bevor sie zur Analyse in FACS Puffer aufgenommen wurden.

5.2.14 Analyse durchflusszytometrischer Daten

Die durchflusszytometrische Messung der Zellen erfolgte am FACS CANTO II mit dem Programm FACS Diva und eine Sortierung von Zellen erfolgte am FACS Aria II im Flow Cytometry Lab des Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité - Universitätsmedizin Berlin. Die Datenanalyse erfolgte mit FlowJo (Treestar, San Carlos, CA). Die gemessenen Zellen wurden als Contour Plot dargestellt, in dem der prozentuale Anteil der Zellpopulation (bezogen auf die Elternpopulation) angegeben wird.

5.2.15 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Zytokinmessungen erfolgten mittels eines Enzym-gekoppelten Adsorptionstests (ELISA) zur Detektion von IL-1 β , IL-6, TNF α , IgM, IgA, IgG (eBioscience), IL-12, IL-17A, IL-21 und IFN γ (Biolegend) jeweils nach Protokoll des Herstellers. Die Messung der Proben erfolgte bei 450 nm.

5.2.16 *Quanti Gene Multiplex Assay*

Um die relative Expression verschiedener Gene nachzuweisen, wurde ein Quanti Gene 10-plex assay (Affymetrix Inc.) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Mit dem Quanti Gene Plex Assay können RNA-Transkripte direkt in Zell-Lysaten und Gewebe-Homogenaten gemessen werden. Die Detektion erfolgt mit Hilfe von Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE), das spezifisch an biotinylierte Sonden bindet. Gemessen werden die Proben mit einem speziellen Durchflusszytometer mit zwei Lasern, bei dem der erste Laser den gebundenen Analyten und der zweite Laser die Stärke des SAPE-Signals detektiert. Das gemessene Fluoreszenzsignal des SAPE ist proportional zu der Menge an mRNA-Transkripten. Alle verwendeten Reagenzien, Puffer und Medien wurden von Affymetrix Inc. bereitgestellt und die nachzuweisenden Gene in einem Proben-Set kundenspezifisch zusammengestellt (Plex Set 12724, human) (**Tab. 1**).

Tab. 1: Gene im verwendeten Proben-Set des Quanti Gene 10-plex Assays

Gen	Sequenzlänge	Probenset-Region	Partikelnummer
ASCL2	1864	1363-1823	29
BCL6	3575	1216-1713	54
FOXO1	5738	2438-3019	48
GATA3	3067	717-1195	20
IL21	617	16-414	28
MAF	2656	1946-2615	25
RORC	3084	182-542	46
TBX21	2589	654-1183	44
Referenzgen	Sequenzlänge	Probenset-Region	Partikelnummer
ACTB	1852	1164-1762	19
HPRT1	1435	102-646	34

Um die RNA freizusetzen und zu stabilisieren, wurden die CD4⁺ T-Zellen mit einem Volumen von 500 Zellen/ μ l in Lysepuffer mit Proteinase K für 30 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Hybridisierungs-Lösung vorbereitet (**Tab. 2**) und zusammen mit unverdünntem Lysat in die Hybridisierungsplatte pipettiert.

Tab. 2: Reagenzien zur Herstellung der Hybridisierungs-Lösung

Reagenz	µl/Well
Nuklease-freies Wasser	5,2
Lysepuffer	6,6
Blocking-Reagenz	2
Proteinase K	0,2
Capture Beads	1
Proben-Set	5
Total	20

Als Kontrolle wurden RNA in den Konzentrationen 250 ng, 62.5 ng und 15.36 ng, sowie Blanks mitgeführt. Die mit Hitze-beständiger Folie abgedeckte Platte wurde über Nacht im Schüttel-Inkubator zur Hybridisierung der Proben inkubiert. Am Folgetag wurde die Hybridisierungslösung mit den enthaltenen Proben in eine Separationsplatte zum Waschen überführt. Alle Waschschritte wurden mit Hilfe einer magnetischen Platte, auf die die Separationsplatte eingespannt wurde, durchgeführt. Zur Amplifizierung wurden die Proben dann mit verschiedenen Lösungen (Pre Amplifier, Amplifier, biotinylierte Sonde und SAPE) inkubiert. Zwischen jeder Inkubation erfolgten zwei Waschschritte. Die Messung der Proben erfolgte am Bio-Plex® 200 Analysegerät (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) des Deutschen Rheuma-Forschungs-Zentrum (DRFZ), Berlin.

5.2.17 Statistische Analysen

Die Darstellung der Daten in Diagrammen und die statistischen Analysen wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erstellt. Die Daten wurden mit einem One-way Anova ohne Gausverteilung auf Signifikanz getestet. Statistische Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen wurden mit einem Two-way Anova analysiert. Die p-Werte sind in allen Abbildungen dargestellt. Ein p-Wert < 0,05 wird mit * gekennzeichnet, p < 0,005 mit **, p < 0,0005 mit *** und p < 0,0001 mit ****.

6 Ergebnisse

6.1 Einfluss der Detektion von bakterieller Vitalität durch APC auf nachfolgende T-Helferzellantworten

In Vorarbeiten und in anderen Projekten der Arbeitsgruppe Sander konnte gezeigt werden, dass humane Monozyten bakterielle Vitalität erkennen und die Detektion lebender, nicht aber Hitze-getöteter *E. coli* zu einer veränderten Zytokinantwort führt (**Abb. 20**). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollte nun untersucht werden, welche Rolle diese Diskriminierung für nachfolgende adaptive Immunantworten spielt. Um den Einfluss der Erkennung von lebenden Bakterien auf CD4⁺ T-Helferzellantworten zu untersuchen, wurden zunächst humane CD4⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung aus PBMCs separiert und deren Reinheit durch eine Messung am Durchflusszytometer bestimmt (**Abb. 4**). Die FACS-Analyse zeigte, dass 91,5 % der Lymphozyten-Zellen nach der magnetischen Zellsortierung CD45RA/CCR7-doppelpositiv waren (**Abb. 4 A**). Der Anteil der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen war nach der Aufreinigung etwa bei 97 % (**Abb. 4 B**).

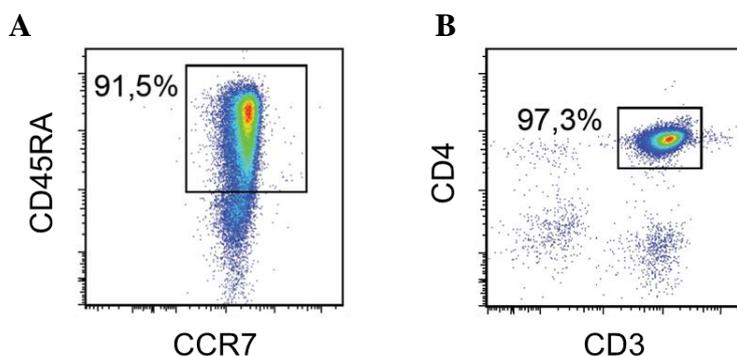


Abb. 4: Reinheitsgrad naiver CD4⁺ T-Zellen nach Isolation aus humanen PBMCs (A) Durch Färbung mit CD45RA-PerCP/Cy5.5 und CCR7-AF488 wurde der Reinheitsgrad der isolierten naiven CD4⁺ T-Zellen bestimmt. (B) Die Reinheit totaler CD4⁺ T-Zellen wurde durch Markierung mit CD4-PacBlue und CD3-AF488 bestimmt.

Die isolierten CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1:2 mit unbehandelten bzw. durch EC und HkEC stimulierten humanen autologen Monozyten in Anwesenheit des Superantigens SEB für fünf Tage co-kultiviert. Zuvor wurden die T-Zellen mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) gefärbt, um deren Proliferationsverhalten mittels Durchflusszytometrie zu verfolgen (**Abb. 5**).

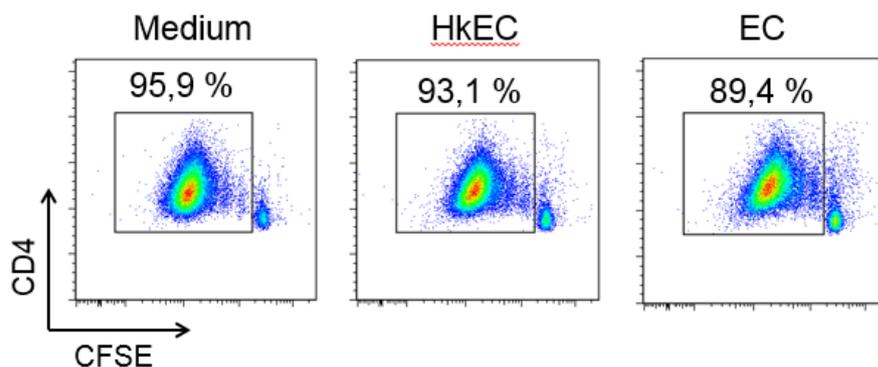


Abb. 5: Proliferationsverhalten naiver CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit stimulierten autologen Monozyten
Humane Monozyten wurden mit EC und HkEC behandelt oder blieben unbehandelt (Medium) und wurden anschließend mit naiven CD4⁺ T-Zellen unter Zugabe von 1 µg/ml SEB für 5 Tage co-kultiviert. Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde durch CFSE-Färbung am Durchflusszytometer ermittelt.

In einem weiteren Versuchs-System wurden im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Versuchsablauf keine autologen Monozyten, sondern Überstände von mit EC bzw. HkEC stimulierten Monozyten (= konditionierte Überstände) zur Kultur mit den CD4⁺ T-Zellen eingesetzt. Um eine konstante Aktivierung der T-Zellen in allen Versuchsbedingungen zu erreichen, wurden hier die CD4 T-Zellen polyklonal mit CD3- und CD28-Antikörpern stimuliert. Die CD4⁺ T-Zell-Proliferation wurde wie zuvor mittels Messung der CFSE-Dilution bestimmt (**Abb. 6**). In beiden Versuchs-Systemen konnte eine konstante Proliferationsrate von 85-95 % in allen Bedingungen erreicht werden, d.h. alle Zellen wurden vergleichbar aktiviert (**Abb. 5 und Abb. 6 A**). Dabei befand sich meist am Tag der Messung ein Großteil der Zellen mindestens in der vierten Generation. Diese Daten waren in mehreren Folgeversuchen reproduzierbar (**Abb. 6 B**).

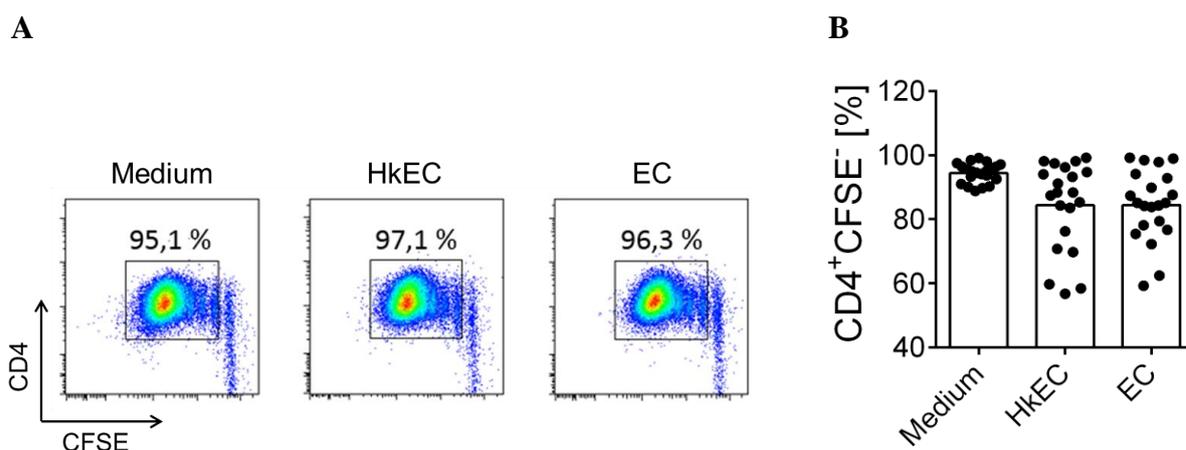


Abb. 6: Proliferationsverhalten von CD4⁺ T-Zellen nach polyklonaler Aktivierung
CD4⁺ T-Zellen wurden polyklonal mit anti CD3/CD28 aktiviert, mit CFSE gefärbt und mit konditionierten Monozyten-Überständen für 5 Tage kultiviert. Anschließend wurde am Durchflusszytometer die Proliferation der Zellen ermittelt.

Ausgehend von der Grundvoraussetzung der einheitlichen Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen, wurde nach fünf Tagen Zellkultur die CD4⁺ T-Zellpolarisierung mittels intrazellulärer Zytokinfärbung in der Durchflusszytometrie untersucht (repräsentative FACS-Plots, **Abb. 7** bis **Abb. 10**).

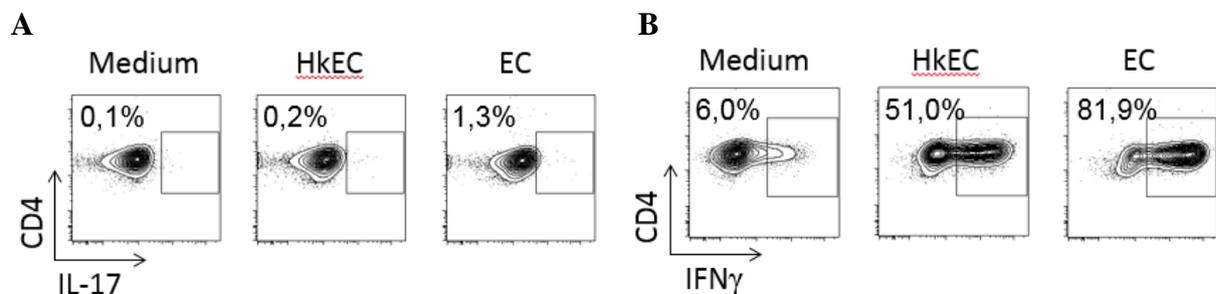


Abb. 7: Mit *E. coli* stimulierte Monozyten führen zu einer TH1-Polarisierung von naiven CD4⁺ T-Zellen Humane Monozyten wurden mit lebenden (EC) oder Hitze-getöteten (HkEC) *E.coli* stimuliert bzw. blieben unbehandelt (Medium) und anschließend mit humanen naiven CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von SEB co-kultiviert. Am Tag 5 wurde mittels FACS die Expression von IL-17 (A) und IFNγ (B) bestimmt.

Sowohl im Co-Kultursystem (**Abb. 7**) als auch nach polyklonaler Stimulation in Anwesenheit von unterschiedlich konditionierten Monozyten-Überständen (**Abb. 8**) zeigten CD4⁺ T-Zellen folgende Polarisierung: in Anwesenheit unbehandelter Monozyten („Medium“) produzierten CD4⁺ T-Zellen kein IL-17, während Monozyten, die mit toten und lebenden *E. coli* stimuliert wurden zu einer minimalen TH17-Differenzierung führten (**Abb. 7 A, Abb. 8 A**). Es zeigte sich hingegen eine deutliche Produktion von IFNγ als Antwort auf lebende (EC) im Vergleich zur Kontrollbedingung, die nur zu einer leichten IFNγ-Produktion führte (**Abb. 7 B, Abb. 8 B**).

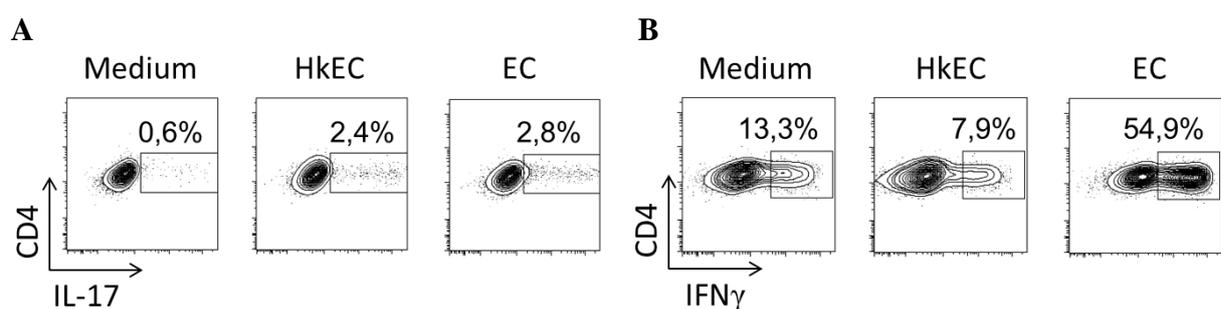


Abb. 8: Mit *E. coli* stimulierte Monozyten führen zu einer TH1-Polarisierung in CD4⁺ T-Zellen Humane Monozyten wurden mit lebenden (EC) oder Hitze-getöteten (HkEC) *E.coli* für 18h stimuliert bzw. blieben unbehandelt (Medium) und anschließend die konditionierten Überstände mit polyklonal aktivierten humanen CD4⁺ T-Zellen kultiviert. Am Tag 5 wurde mittels FACS die Expression von IL-17 (A) und IFNγ (B) bestimmt.

Dieses CD4⁺ T-Zellpolarisierungsmuster konnte sowohl im Co-Kultursystem mit stimulierten Monozyten und naiven CD4⁺ T-Zellen (**Abb. 7**), als auch in der Zellkultur von konditionierten Monozyten-Überständen und CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden (**Abb. 8**). Weiterhin zeigte sich, dass die Erkennung von lebenden Bakterien durch Monozyten zu einer

deutlichen Koexpression von IL-21 und dem Transkriptionsfaktor Bcl6, als Indikator für eine T_{FH} -Zellpolarisierung, führte (Abb. 9 A, Abb. 10 A).

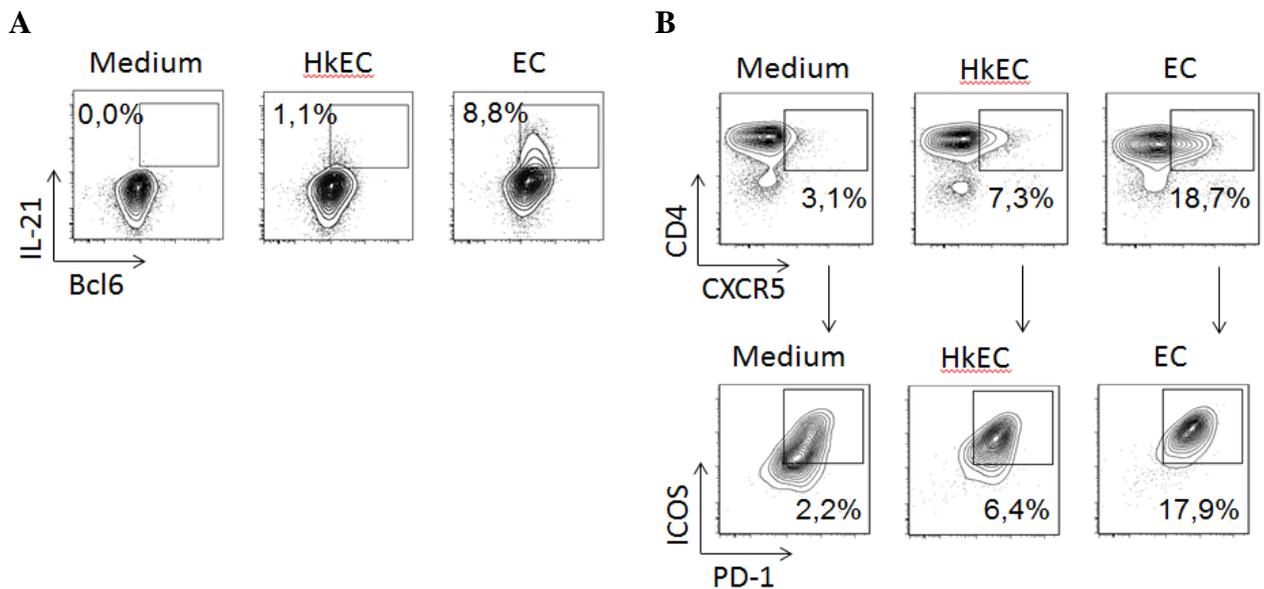


Abb. 9: Die Detektion lebender *E. coli* durch humane Monozyten führt zur T_{FH} -Zellpolarisierung in naiven $CD4^+$ T-Zellen Humane Monozyten wurden mit lebenden (EC) oder Hitze-getöteten (HkEC) *E.coli* stimuliert bzw. blieben unbehandelt (Medium) und anschließend mit humanen naiven $CD4^+$ T-Zellen in Anwesenheit von SEB co-kultiviert. Am Tag 5 wurde mittels FACS die Koexpression von IL-21/Bcl6 (A), sowie der Oberflächenmoleküle CXCR5/ICOS/PD-1 (B) bestimmt.

In beiden Zellkultur-Systemen ko-exprimierten ausschließlich $CD4^+$ T-Zellen, welche durch lebende EC stimuliert wurden, IL-21 und den T_{FH} -Transkriptionsfaktor Bcl6. Jedoch war dieser Phänotyp wesentlich stärker ausgeprägt in $CD4^+$ T-Zellen, welche durch konditionierte Monzyten-Überstände stimuliert wurden (Abb. 10 A und Abb. 12).

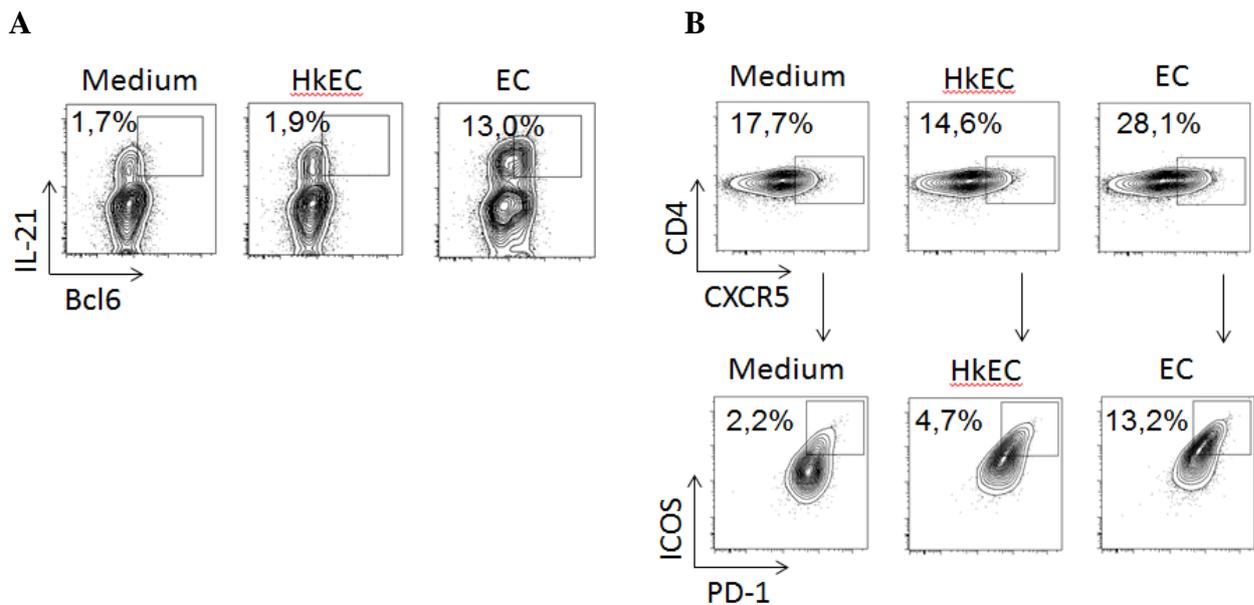


Abb. 10: Die Detektion lebender *E. coli* durch humane Monozyten führt zur T_{FH}-Zellpolarisierung in CD4⁺ T-Zellen Humane Monozyten wurden mit lebenden (EC) oder Hitze-getöteten (HkEC) *E.coli* für 18h stimuliert bzw. blieben unbehandelt (Medium) und anschließend die konditionierten Überstände mit polyklonal aktivierten humanen CD4⁺ T-Zellen kultiviert. Am Tag 5 wurde mittels FACS die Koexpression von IL-21/Bcl6 (A), sowie der Oberflächenmoleküle CXCR5/ICOS/PD-1 (B) bestimmt.

Follikuläre T-Helferzellen sind weiterhin durch die Expression der Oberflächen-Rezeptoren CXCR5, ICOS und PD-1 charakterisiert. Die FACS-Messung dieser Oberflächenmarker zeigte auch hier eine deutliche Anreicherung an T_{FH}-Zellen nach Stimulation mit EC im Vergleich zu HkEC oder Medium (**Abb. 9 B**, **Abb. 10 B**). Sowohl im Co-Kultur-, als auch im Überstand-System waren CD4⁺CXCR5⁺ T-Zellen nach Stimulation durch EC erhöht, und die Zahl an CD4⁺ T-Zellen, welche CXCR5, ICOS und PD-1 ko-exprimierten ebenfalls deutlich höher im Vergleich zur Kontrollbedingung oder HkEC-Stimulation.

Die in **Abb. 7** bis **Abb. 10** gezeigten Ergebnisse wurden in mehreren Folgeversuchen bestätigt und die Ergebnisse quantifiziert und statistisch analysiert (**Abb. 11** und **Abb. 12**). Es zeigte sich wiederholt und signifikant, dass die Phagozytose von lebenden, nicht aber von toten Bakterien durch humane APC, einen starken Einfluss auf die Polarisierung humaner CD4⁺ T-Zellantworten hatte.

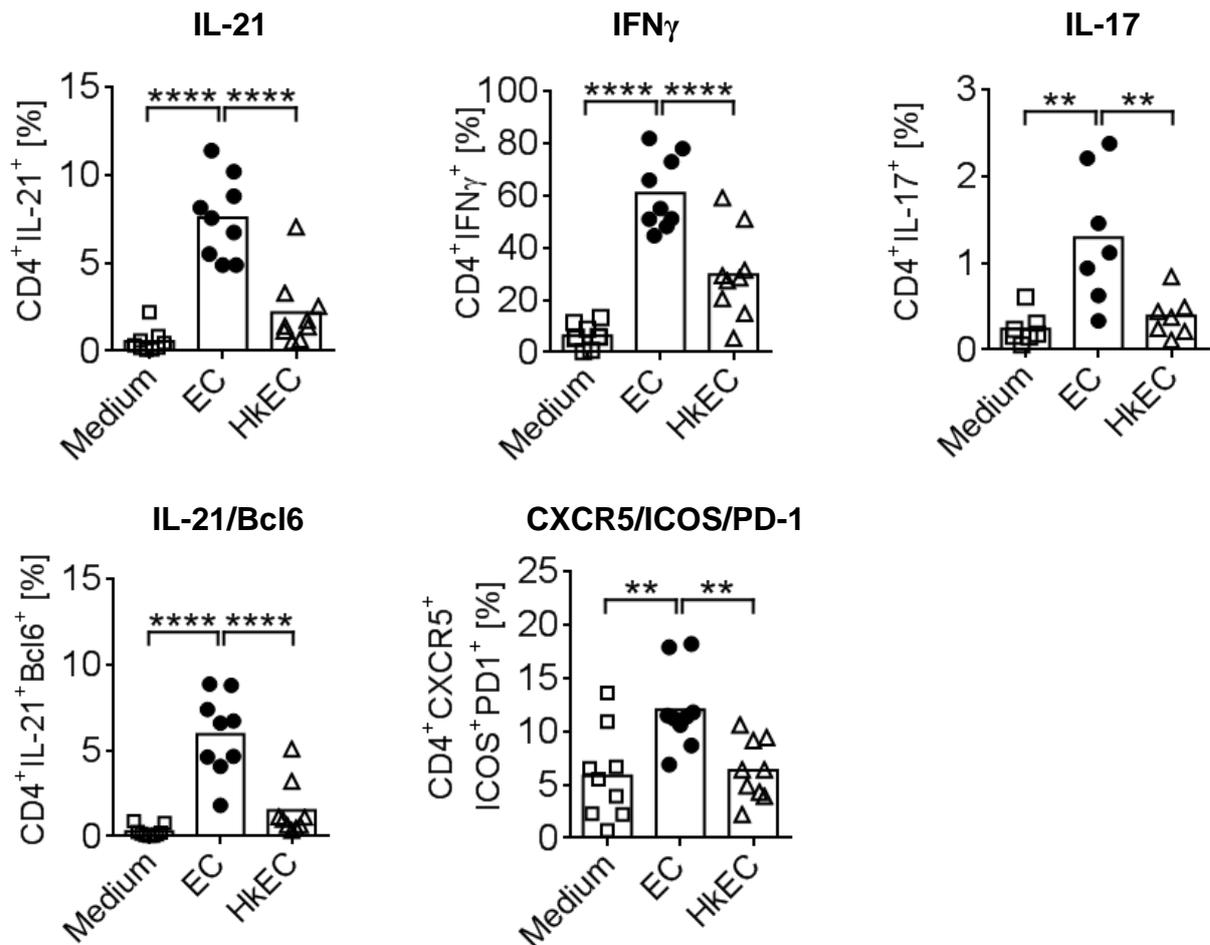


Abb. 11: Die Erkennung bakterieller Vitalität durch humane Monozyten führt zu einer T_H1- und T_{FH}-Differenzierung in humanen CD4⁺ T-Zellen Humane naive CD4⁺ T-Zellen in Co-Kultur mit EC-stimulierten Monozyten und in Anwesenheit von SEB zeigten eine signifikant höhere Expression von IL-21, IFN γ , IL-21/Bcl6 und CXCR5/ICOS/PD-1. Jeder Punkt zeigt ein unabhängiges Experiment an Zellen eines unabhängigen Spenders. (n= 9, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001).

Die Daten in **Abb. 11** zeigen, dass selektiv lebende, aber nicht tote Bakterien in Monozyten Signale induzierten, welche präferentiell zur Differenzierung von T_H1 und T_{FH} Zellen führten. So waren die Expression von IL-21 und IFN γ , sowie die Koexpression von IL-21/Bcl6 und CXCR5/ICOS/PD-1 in CD4⁺ T-Zellen, die mit EC-stimulierten Monozyten co-kultiviert wurden, deutlich erhöht im Vergleich zur Kontroll- und HkEC-Bedingung. Dies wurde ebenfalls in einem Zellkultur-System gezeigt, bei dem kein direkter Zellkontakt zwischen T-Zellen und APC besteht, sondern die co-stimulatorischen Signale über anti-CD28-Antikörper gegeben sind (**Abb. 12**). Monozyten, welche zuvor durch lebende EC stimuliert wurden, induzierten Signale, welche präferentiell zu einer T_H1- und T_{FH}-Zellpolarisierung führten. Die Expression von IL-17 hingegen unterschied sich nur im Co-Kultursystem, nicht aber im Überstandssystem zwischen den EC- und HkEC-Bedingungen (**Abb. 11** und **Abb. 12**), jedoch war in beiden Systemen nur eine geringgradige T_H17-Differenzierung zu messen.

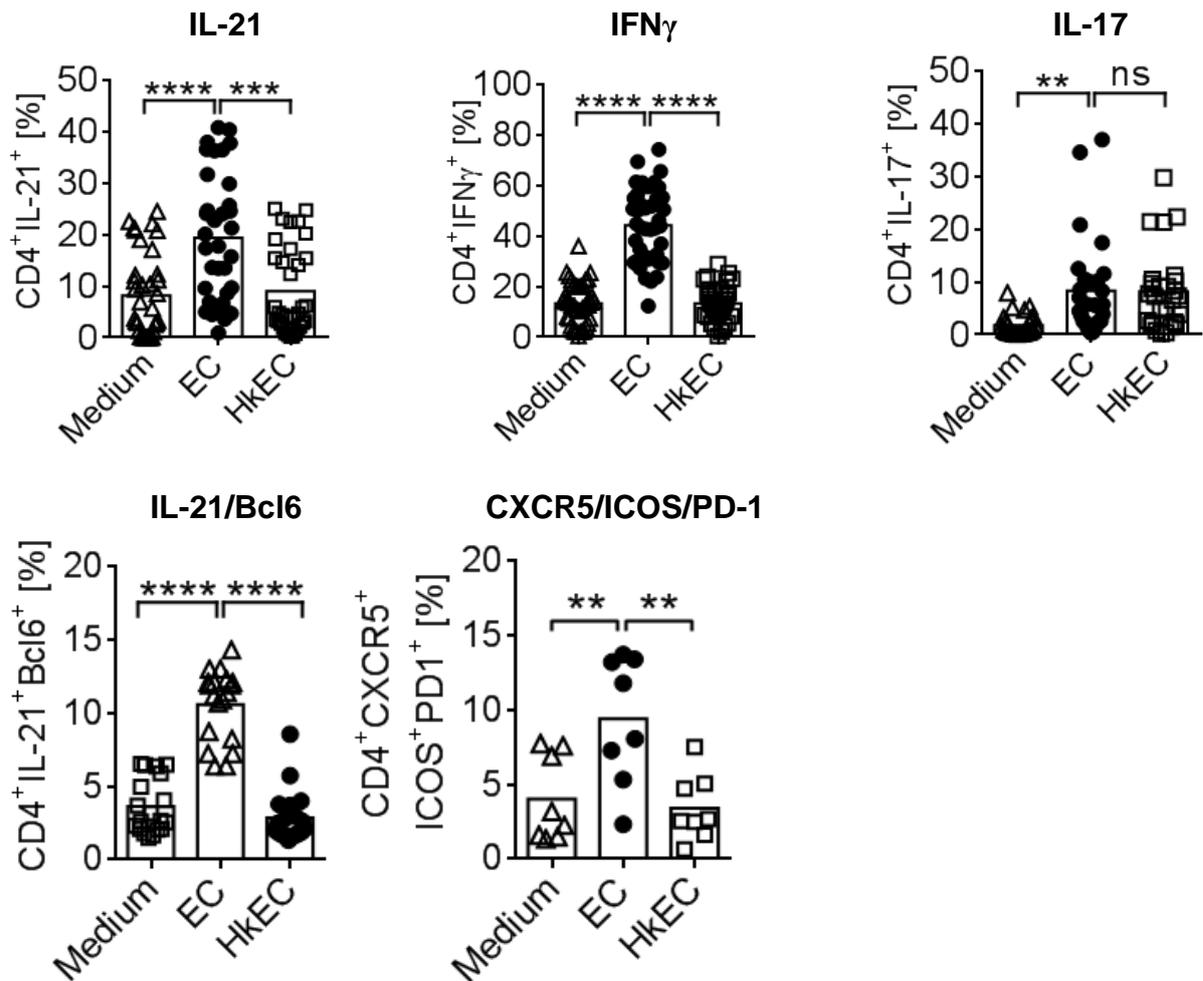


Abb. 12: Die Erkennung bakterieller Vitalität durch humane Monozyten führt zu einer T_H1- und T_{FH}-Differenzierung in humanen CD4⁺ T-Zellen Mit anti CD3 / anti CD28 polyklonal aktivierte CD4⁺ T-Zellen zeigten nach 5-tägiger Stimulation durch konditionierte Monozyten-Überstände eine signifikant höhere Expression von T_H1- und T_{FH}-Zellmarkern als Antwort auf lebende, nicht aber auf Hitze-getötete *E. coli*. Jeder Punkt zeigt ein unabhängiges Experiment an Zellen eines unabhängigen Spenders. (IL21: n = 35, IFN γ : n = 41, IL-17: n = 28, IL-21/Bcl6: n = 19, CXCR5/ICOS/PD-1: n = 8, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001).

Die durchflusszytometrischen Daten zur Zytokinproduktion aus **Abb. 7** bis **Abb. 12** konnten ferner mittels ELISA bestätigt und weiter quantifiziert werden (**Abb. 13**). Dafür wurden nach 5 Tagen die Überstände der T-Zellkultur entnommen und die darin freigesetzten T-Zell-Zytokine gemessen.

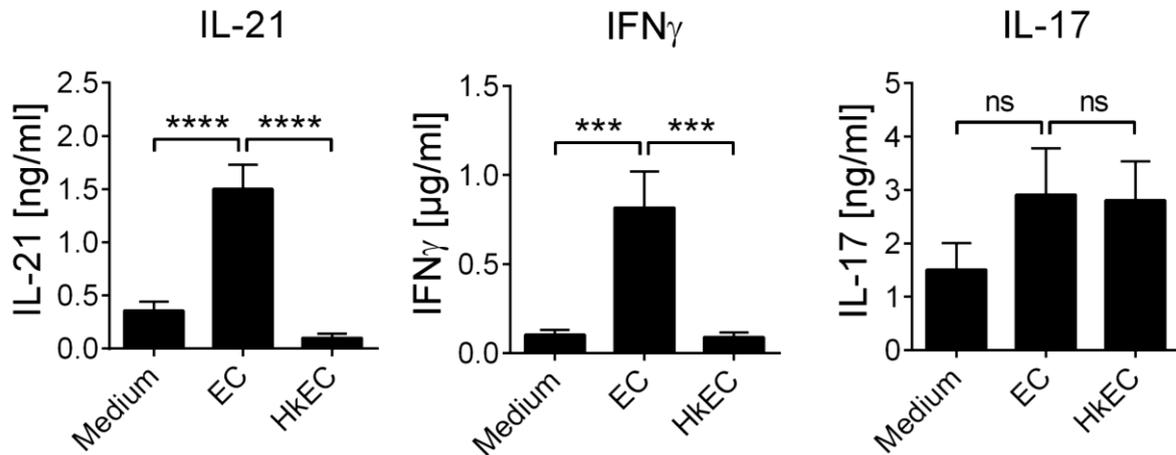


Abb. 13: CD4⁺ T-Zellen sezernieren vermehrt IL-21 und IFN γ als Antwort auf lebende, nicht aber tote *E. coli* CD4⁺ T-Zellen wurden für fünf Tage mit konditionierten Monozyten-Überständen kultiviert. Anschließend wurden die Zellkultur-Überstände entnommen und darin enthaltene Zytokine mittels ELISA gemessen. Gezeigt sind jeweils unabhängige Experimente an Zellen eines unabhängigen Spenders. (IL21 und IFN γ : n = 14, IL-17: n = 11, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001).

Die ELISA-Messung der sezernierten Zytokine zeigte, dass die Erkennung lebender EC in APC nachfolgende T-Helferzellantworten deutlich in Richtung T_{H1}/T_{FH} beeinflusst. CD4⁺ T-Zellen, welche über die Erkennung lebender *E. coli* durch APC spezifische Signale erhielten, sezernierten signifikant höhere Mengen an IL-21 und IFN γ . Die Sekretion von IL-17 hingegen wurde durch beide Stimuli gleichermaßen schwach ausgelöst (**Abb. 13**).

Ein ähnliches CD4⁺ T-Zell-Polarisierungsprofil wie durch EC konnte auch als Antwort auf eine andere bakterielle Spezies, gram-positive, apathogene *Bacillus subtilis* beobachtet werden (**Abb. 14**). Humane Monozyten wurden anstelle von gram-negativen EC mit avirulenten gram-positiven *Bacillus subtilis* stimuliert und anschließend CD4⁺ T-Zellen mit den so konditionierten Monozyten-Überständen für fünf Tage kultiviert. Die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen wurde analog zu den EC-Versuchen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (IL-17, IL-21 und IFN γ) in der Durchflusszytometrie untersucht (**Abb. 14**). Auch hier führte die Erkennung lebender, nicht aber toter Bakterien zu einer T_{H1}- und T_{FH}-Zellpolarisierung. Eine Produktion von IL-17 in CD4⁺ T-Zellen hingegen konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, dass die Antwort auf bakterielle Vitalität konserviert und unabhängig von Spezies-spezifischen Eigenschaften ist.

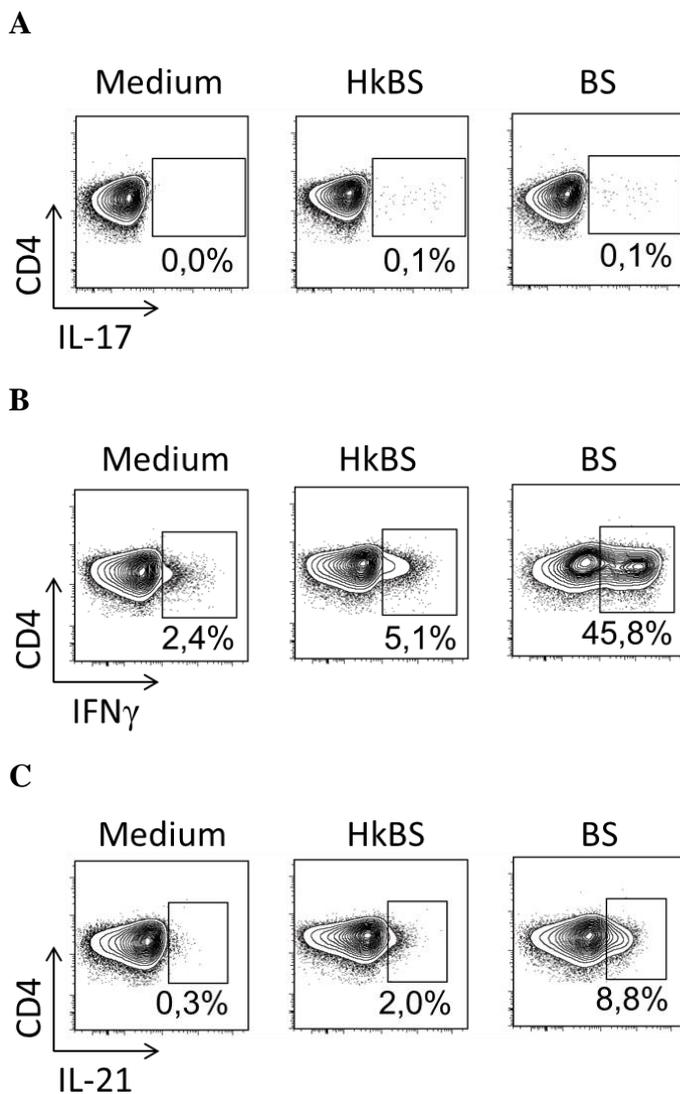


Abb. 14: CD4⁺ T-Zell-Polarisierung nach Stimulation mit *Bacillus subtilis* konditionierten Monozyten-Überständen Humane Monozyten wurden mit Kontroll-Medium, lebenden (BS) oder Hitze-getöteten (HkBS) *Bacillus subtilis* für 18h stimuliert und anschließend die konditionierten Überstände mit polyklonal aktivierten humanen CD4⁺ T-Zellen kultiviert. Am Tag 5 wurde mittels FACS die Expression von (A) IL-17, (B) IFN γ und (C) IL-21 bestimmt.

Diese Versuche zeigten, dass die Phagozytose von lebenden, avirulenten und replikationsdefizienten Bakterien durch humane APC zu einer veränderten angeborenen Immunantwort und anschließend zu einer T_H1- und T_{FH}-Zelldifferenzierung, nicht aber zu einer verstärkten T_H17-Polarisierung führt (**Abb. 7** bis **Abb. 14**).

Um diese Daten zur T-Zell-Differenzierung weiter zu verifizieren, wurde in Folgeversuchen mittels eines Quanti Gene 10-plex Assay die relative Expression verschiedener T-Zell-relevanter Gene gemessen. Dafür wurde die Expression folgender Gene bestimmt: IL-21, welches von T_{FH}-Zellen gebildet wird; der Schlüssel-Transkriptionsfaktor von T_{FH}-Zellen Bcl6; der Transkriptionsfaktor c-maf, welcher T_{FH}-spezifische Gene stimuliert; sowie die Transkriptionsfaktoren von T_H1-Zellen (*T-box transcriptionfactor 21*, Tbet, auch TBX21),

T_{H2} -Zellen (*GATA binding protein 3*, GATA3) und T_{H17} -Zellen (*RAR-related orphan receptor C*, RORC, Proteinname ROR γ t) (Abb. 15). Für diese Messung wurden polyklonal aktivierte $CD4^+$ T-Zellen mit konditionierten Monozyten-Überständen in einem Verhältnis von 1:1 für ein, drei bzw. fünf Tage kultiviert. Es wurde Kontroll-RNA in drei verschiedenen Konzentrationen mitgeführt. Von den gemessenen Fluoreszenzintensitäten (FI) wurde der Hintergrund abgezogen und gegen das *housekeeping*-Gen *Hypoxanthine-phosphoribosyltransferase 1* (HPRT1) normalisiert.

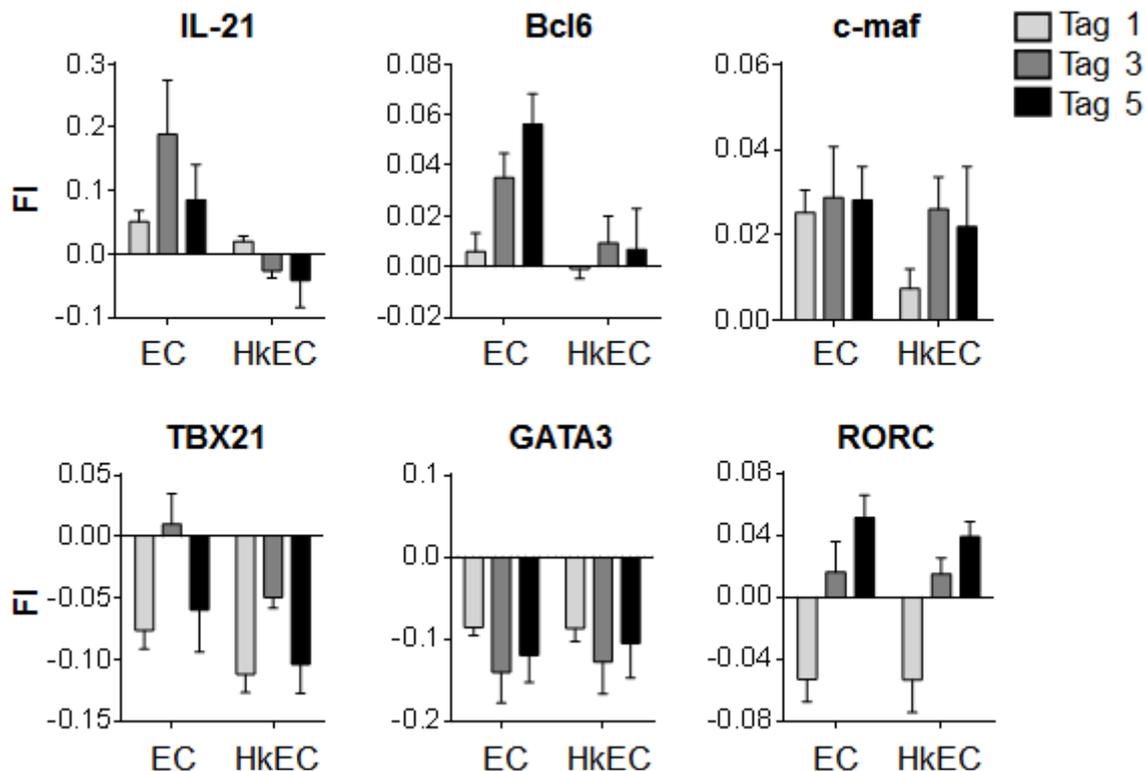


Abb. 15: Genexpressionsanalyse in polyklonal aktivierten $CD4^+$ T-Zellen Nach 1, 3 und 5 Tagen Kultur von polyklonal aktivierten $CD4^+$ T-Zellen mit konditionierten Monozyten-Überständen wurde die relative mRNA-Expression der gezeigten Gene quantifiziert. Für die Normalisierung wurde das *housekeeping*-Gen HPRT1 verwendet. Für jedes Gen ist die Fluoreszenzintensität (FI) nach Abzug des Hintergrundsignals und der Kontrolle (= Kontroll-Monozyten-Überstände) dargestellt. Gezeigt sind gemittelte Werte von fünf unabhängigen Experimenten an Zellen unabhängiger Spender ($n = 5$).

Abb. 15 zeigt, dass die in EC-Monozytenüberständen differenzierten $CD4^+$ T-Zellen ein T_{FH} -typisches Genexpressionsprofil aufweisen. Die T_{FH} -spezifischen Gene IL-21 und Bcl6 wurden als Antwort auf lebende, nicht aber auf tote *E. coli* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hochreguliert. C-maf und der Transkriptionsfaktor für T_{H17} -Zellen ROR γ t (RORC) wurden nach Stimulation durch sowohl lebende als auch tote Bakterien vermehrt exprimiert im Vergleich zur Kontrollbedingung. Die Transkriptionsfaktoren von T_{H1} -Zellen TBX21 (T-bet) und T_{H2} -Zellen GATA3 hingegen waren im Vergleich zu $CD4^+$ T-Zellen, welche mit unbehandelten Monozyten-Überständen kultiviert wurden, herunter reguliert.

Diese unter **6.1** gezeigten Daten belegen insgesamt, dass die Detektion von bakterieller Vitalität durch APC zu einer veränderten T-Helferzellendifferenzierung mit verstärkter T_{FH} -Zellendifferenzierung führt.

6.2 Nachweis der Funktionalität *in vitro* generierter folliculärer T-Helferzellen

Die Differenzierung von T_{FH} -Zellen ist ein mehrstufiger Prozess, der sowohl die Interaktion von T-Zellen mit klassischen APC, wie auch mit B-Zellen beinhaltet. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Prozess durch ein sequentielles Co-Kultursystem humaner naiver $CD4^+$ T-Zellen mit stimulierten humanen autologen Monozyten und naiven B-Zellen simuliert. Dadurch konnte sowohl die Stabilität des T_{FH} -Phänotyps, als auch die Funktionalität der *in vitro* generierten T_{FH} -Zellen untersucht werden. Um die ersten zwei Phasen der T_{FH} -Zellendifferenzierung zu imitieren, wurden naive $CD4^+$ T-Zellen mit EC-stimulierten Monozyten co-kultiviert und nach fünf Tagen von der Kultur separiert, um anschließend für weitere sieben Tage mit naiven B-Zellen co-kultiviert zu werden. Nach fünf und insgesamt 12 Tagen wurden die T-Zellen durchflusszytometrisch auf ihren Phänotyp untersucht (**Abb. 16**).

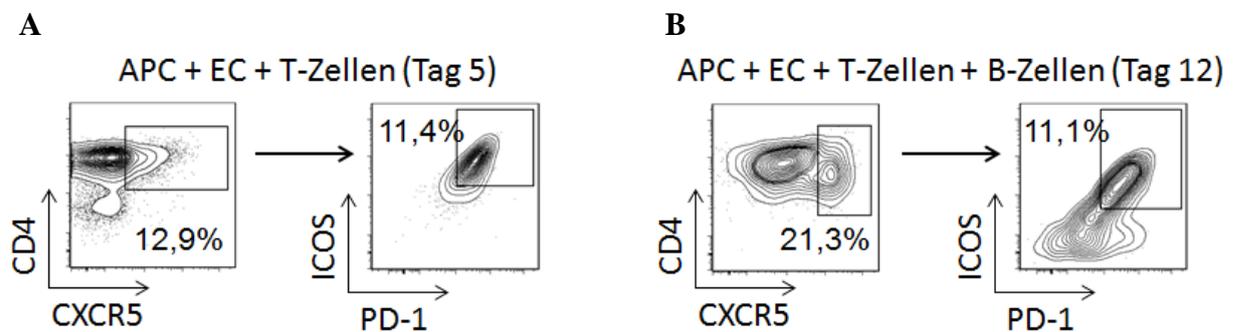


Abb. 16: Stabilisation des T_{FH} -Zellphänotyps durch B-Zellkontakt. (A) Humane Monozyten wurden mit lebenden (EC) *E.coli* stimuliert und anschließend mit humanen naiven $CD4^+$ T-Zellen in Anwesenheit von SEB co-kultiviert. (B) Am Tag 5 wurden $CD4^+CXCR5^+$ T-Zellen aus der Co-Kultur in **Abb. 16 A** mittels FACS-Sortierung separiert und anschließend mit humanen naiven B-Zellen in Anwesenheit von SEB co-kultiviert. Mittels FACS wurde jeweils am Tag 5 und 12 die Expression der T_{FH} -Zellmarker CXCR5, ICOS und PD-1 bestimmt.

Abb. 16 zeigt, dass der T_{FH} -Zellphänotyp in der sequentiellen Co-Kultur über einen Zeitraum von 12 Tagen erhalten bleibt, damit also sehr stabil ist. An Tag 5 der Co-Kultur mit EC-stimulierten Monozyten und naiven $CD4^+$ T-Zellen co-exprimierten 11,4 % der Zellen CXCR5, ICOS und PD-1 (**Abb. 16 A**). Bei weiterer Co-Kultur von $CD4^+CXCR5^+$ T-Zellen (mittels FACS-Sort aus der Monozyten-Co-Kultur (**Abb. 16 A**) separiert) mit autologen naiven B-Zellen stabilisierte sich der T_{FH} -Zellphänotyp (**Abb. 16 B**).

Um die Funktionalität der *de novo* generierten T_{FH} -Zellen zu testen, wurden sie mit naiven B-Zellen co-kultiviert und anschließend die Aktivierung (Abb. 17) und Differenzierung (Abb. 18) der B-Zellen mittels FACS analysiert. Neben $CD4^+CXCR5^+$ T-Zellen aus der Co-Kultur wurden zum Vergleich $CD4^+CXCR5^-$ T-Zellen als Kontrolle zur Co-Kultur mit B-Zellen eingesetzt.

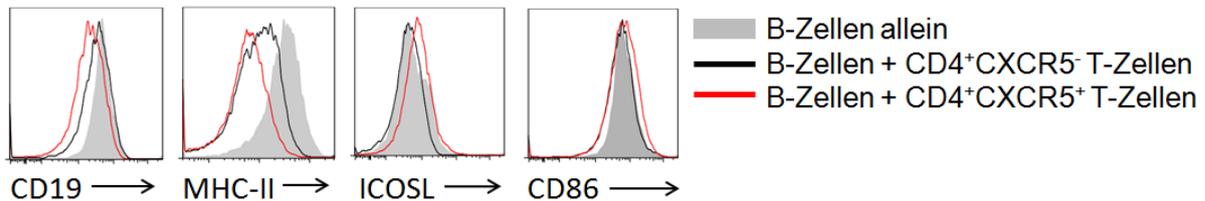


Abb. 17: *In vitro* generierte T_{FH} -Zellen aktivieren autologe B-Zellen In einem sequentiellen Co-Kultursystem wurden humane Monozyten mit lebenden (EC) *E.coli* stimuliert und anschließend mit humanen naiven $CD4^+$ T-Zellen in Anwesenheit von SEB co-kultiviert. Am Tag 5 wurden $CD4^+CXCR5^+$ T-Zellen und $CD4^+CXCR5^-$ T-Zellen aus der Co-Kultur mittels FACS-Sortierung separiert und anschließend mit humanen naiven B-Zellen in Anwesenheit von SEB co-kultiviert. Mittels FACS wurde am Tag 12 (Tag 7 der B:T Co-Kultur) die Expression der Aktivierungsmarker CD19, MHC-II, ICOSL und CD86 bestimmt.

Die durchflusszytometrische Analyse von B-Zell-Aktivierungsmarkern zeigte, dass als Antwort auf lebende Bakterien *in vitro* generierte T_{FH} -Zellen in der Lage waren, effiziente B-Zellhilfe zu leisten, da diese einen deutlich aktivierten Phänotyp ($CD19^{lo}$ $MHC-II^{lo}$, $CD86^{hi}$, $ICOSL^{hi}$) zeigten im Vergleich zu B-Zellen, welche ohne T_{FH} -Zellen co-kultiviert wurden (Abb. 17). $CD4^+CXCR5^-$ T-Zellen aus der Co-Kultur, welche mit naiven B-Zellen co-kultiviert wurden, waren im Vergleich zu $CD4^+CXCR5^+$ T-Zellen weniger stark aktiviert. Durch die Interaktion von B-Zellen und T_{FH} -Zellen im Keimzentrum kommt es zur Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmablasten bzw. Antikörper-produzierenden Plasmazellen, sowie zum Immunglobulin Klassenwechsel. Daher wurde in B-Zellen, welche mit *in vitro* generierten T_{FH} -Zellen co-kultiviert wurden, die Expression von Differenzierungsmarkern und Immunglobulinen analysiert (Abb. 18).

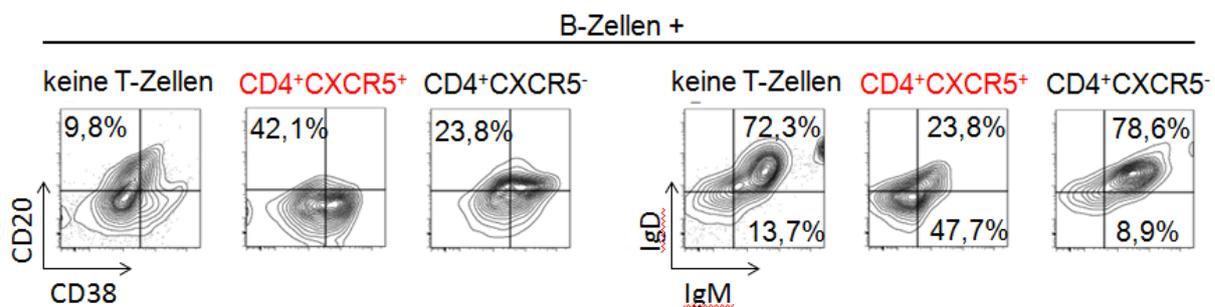


Abb. 18: *In vitro* generierte T_{FH} -Zellen führen zur Generierung von Plasmablasten und Immunglobulin Klassenwechsel APC, T-Zellen und B-Zellen wurden wie in Abb. 17 sequentiell co-kultiviert. Nach 12 Tagen wurden Plasmablastdifferenzierung (links) und Ig-Klassenwechsel (rechts) gemessen.

In der Co-Kultur mit *in vitro* generierten T_{FH}-Zellen zeigte sich eine deutliche Differenzierung von CD20⁻CD38⁺⁺ Plasmablasten, sowie ein hoher Anteil an Immunglobulin Klassen-gewechselten Zellen (IgM⁻IgD⁻) im Vergleich zu B-Zellen, welche ohne T-Zellen co-kultiviert wurden (**Abb. 18**). In Co-Kultur mit *in vitro* generierten CD4⁺CXCR5⁻ T-Zellen konnten vergleichsweise nur wenige Plasmablasten generiert werden und kein Ig-Klassenwechsel erreicht werden. B-Zellen hingegen, welche ohne T-Zellen kultiviert wurden, zeigten keine Differenzierung in Plasmablasten (**Abb. 18**). Zusammenfassend zeigen die Daten aus **Abb. 16** bis **Abb. 18**, dass eine Erkennung bakterieller Vitalität durch humane APC zu einer stabilen Differenzierung von funktionalen T_{FH}-Zellen führt, welche in der Lage sind, B-Zellen zur Differenzierung und dem Immunglobulin Klassenwechsel zu verhelfen.

6.3 Einfluss der Detektion von bakterieller Vitalität auf APC-Aktivierung

Die unter **6.1** gezeigten veränderten T-Zellantworten, sind auf unterschiedliche APC-abhängige Signale zurückzuführen. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, wie sich die Erkennung von lebenden Bakterien / *vita*-PAMPs auf die APC-Aktivierung auswirkt. Eine detaillierte Analyse der molekularen Mechanismen der Detektion von lebenden Bakterien in humanen APC wurde in einem anderen Projekt der AG Sander untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden humane Monozyten aus PBMCs gesunder Spender isoliert und deren Antworten auf lebende und tote Bakterien verglichen. Zunächst wurde die Reinheit der Monozyten nach Isolation überprüft. Die FACS-Analyse zeigte, dass durch die magnetische Zellsortierung weitestgehend klassische Monozyten (CD14⁺CD16⁻) separiert werden konnten (**Abb. 19**). Nach der magnetischen Zellsortierung war die Reinheit der CD14⁺CD16⁻ Monozyten in der Regel > 90 % (**Abb. 19 B**).

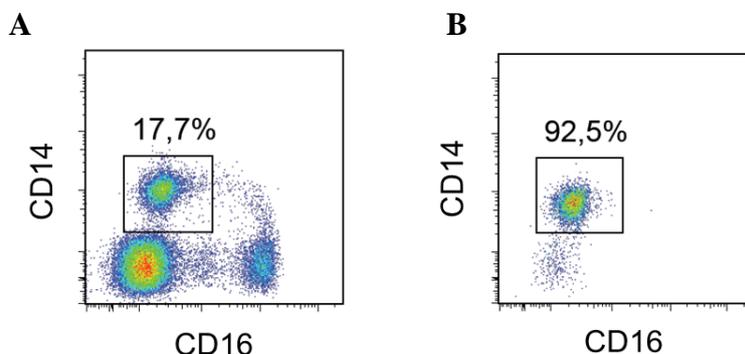


Abb. 19: Reinheitsgrad isolierter CD14⁺CD16⁻ Monozyten aus humanen PBMCs Durch Färbung mit CD14-APC und CD16-FITC wurde der Anteil an Monozyten vor und nach der Separation ermittelt (A) PBMCs vor Separation der Monozyten. (B) Reinheitsgrad der isolierten CD14⁺ Monozyten nach Isolierung aus humanen PBMCs.

Die immunomagnetisch sortierten humanen Monozyten wurden mit lebenden, avirulenten, Thymidin-auxotrophen (*ThyA*⁻, replikationsdefizient) EC oder HkEC stimuliert. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrollbedingung (Medium) mitgeführt. Nach 18 Stunden in Kultur wurden die so konditionierten Monozyten-Überstände entnommen, gefiltert und Zytokine (IL-1 β , TNF α , IL-12 (p40) und IL-6) mittels ELISA gemessen (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. **Abb. 20**).

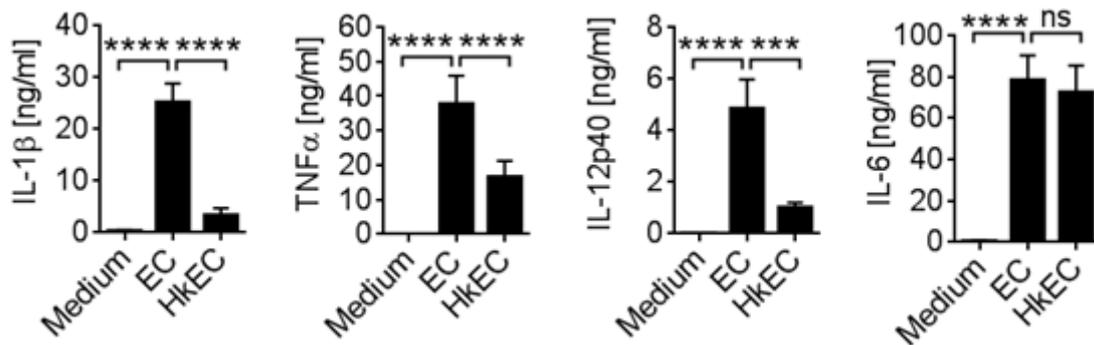


Abb. 20: Die Detektion bakterieller Vitalität durch humane Monozyten führt zur Ausbildung eines spezifischen Zytokinprofils Klassische humane CD14⁺CD16⁻ Monozyten wurden mittels immunomagnetischer Separation aus humanen PBMCs isoliert, mit lebenden (EC) und toten *E. coli* (HkEC) für 18 Stunden stimuliert und anschließend die in den Überständen abgegebenen Zytokine mittels ELISA gemessen. Jeder Punkt zeigt ein unabhängiges Experiment an Zellen eines unabhängigen Spenders. (IL-1 β , IL-6: n = 12, TNF α : n = 11, IL-12: n = 10, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001).

Es konnte gezeigt werden, dass die Detektion lebender und toter *E. coli* durch klassische humane Monozyten zu signifikant unterschiedlichen Zytokinprofilen führte. Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-12 und TNF α wurden nahezu ausschließlich als Antwort auf lebende, nicht aber Hitze-getötete *E. coli* sezerniert. IL-6 hingegen wurde unabhängig von bakterieller Vitalität produziert. Dies zeigt, dass klassische humane Monozyten in der Lage sind, lebende von toten Bakterien zu unterscheiden und dass diese Detektion bakterieller Vitalität die Produktion proinflammatorischer Zytokine beeinflusst.

Zusätzlich zum Nachweis „Vitalitäts-abhängig“ gebildeter Zytokine, wurde die Expression verschiedener Aktivierungs- / Maturationsmarker (MCH-II, CD40, CD80, ICOSL, OX40L) auf der Oberfläche humaner Monozyten mittels Durchflusszytometrie analysiert (**Abb. 21**). Nach 18 Stunden in Kultur wurden die unbehandelten bzw. mit lebenden und toten EC stimulierten Monozyten entnommen und die Zellen mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörpermix gefärbt. **Abb. 21** zeigt Histogramme eines repräsentativen Beispielversuchs.

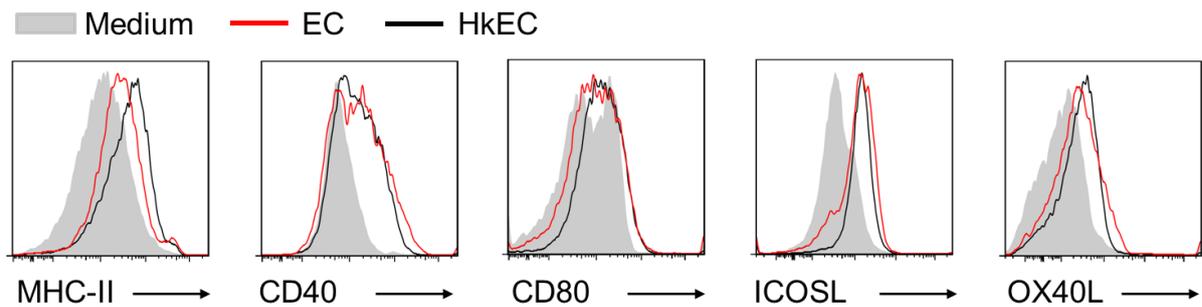


Abb. 21: Die Detektion lebender und toter *E. coli* führt zur verstärkten Expression von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche humaner Monozyten. Klassische humane CD14⁺CD16⁻ Monozyten wurden mit lebenden und toten *E. coli* für 18 Stunden stimuliert und die Oberflächenexpression verschiedener Aktivitätsmarker mittels FACS gemessen.

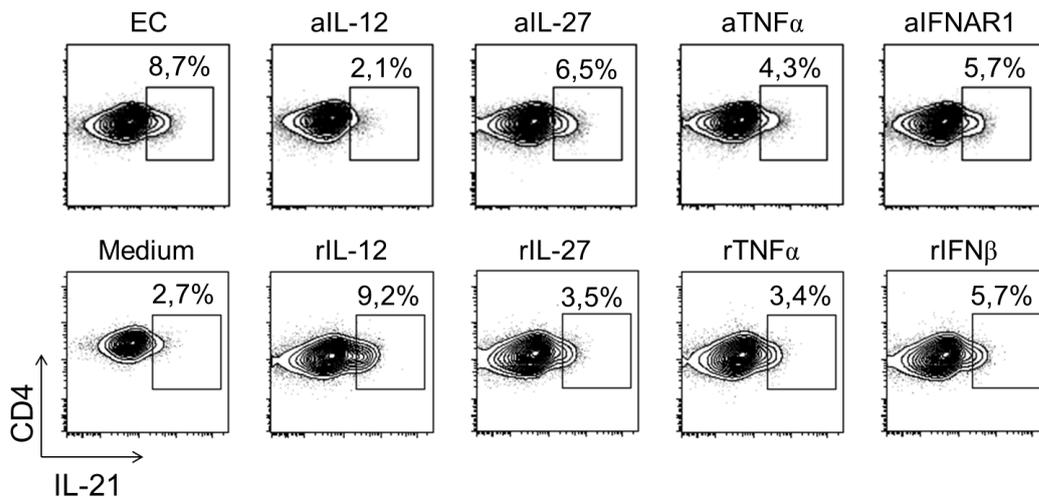
Die Detektion lebender bzw. toter Bakterien führte zu sehr deutlichen Unterschieden in der Sekretion proinflammatorischer Zytokine (**Abb. 20**). Im Gegensatz dazu induzierten beide Stimuli eine vergleichbar verstärkte Expression der Aktivitätsmarker MHC-II, CD40, CD80, ICOSL und OX40L im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Medium).

Die in **Abb. 20** und **Abb. 21** zusammengefassten Daten zeigen, dass die Detektion lebender, sowie toter Bakterien gleichermaßen zur Aktivierung von humanen Monozyten führte. Die Ergebnisse deuteten somit auf eine wichtige Rolle für unterschiedlich gebildete Zytokine hin.

6.4 Identifizierung APC-abhängiger Faktoren, welche die präferentielle T-Helferzellpolarisierung regulieren

Das angeborene Immunsystem ist entscheidend an der Auslösung und der Polarisierung einer adaptiven Immunantwort beteiligt, beispielsweise durch kostimulatorische Moleküle und Zytokine, welche von APC exprimiert werden (Iwasaki and Medzhitov, 2015). In den Experimenten des ersten Teils der Arbeit wurde die Antwort von Monozyten auf lebende und tote *E. coli* verglichen (**6.3**) und deren Einfluss auf nachfolgende T-Helferzellantworten untersucht (**6.1**). In Folgeversuchen sollten daraufhin APC-abhängige Signale identifiziert werden, welche nach Erkennung von bakterieller Vitalität bevorzugt zu einer T_H1/T_{FH}-Polarisierung führen. Dafür wurde der Versuchsaufbau aus **Abb. 2** durch zusätzliche Bedingungen ergänzt. Um die Rolle von Zytokinen zu untersuchen, die von Monozyten nach Stimulation mit Bakterien freigesetzt werden, wurden blockierende Antikörper gegen potentiell relevante Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-27, TNF α , und IFN β bzw. IFNAR1), oder die entsprechenden rekombinanten Zytokine eingesetzt.

A



B

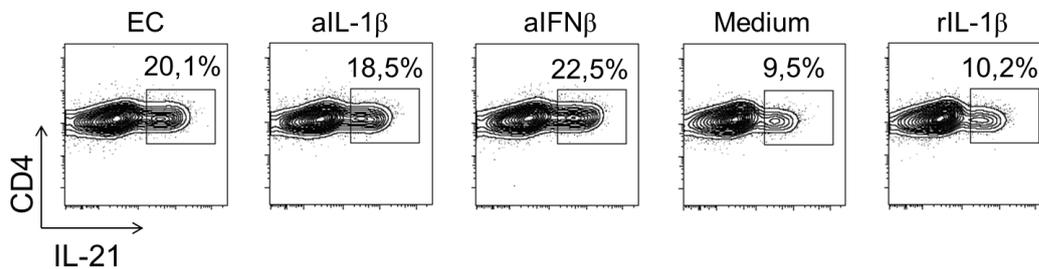
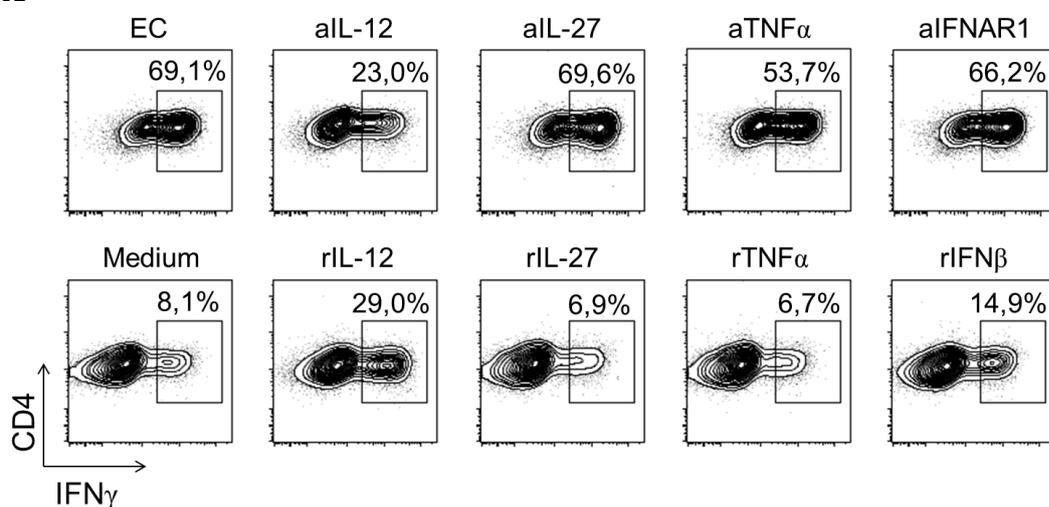


Abb. 22: Einfluss blockierender Antikörper und rekombinanter Zytokine auf die IL-21 Produktion in polyklonal aktivierten CD4⁺ T-Zellen. Polyklonal aktivierte humane CD4⁺ T-Zellen wurden mit konditionierten Monozyten-Überständen in Anwesenheit von blockierenden Antikörpern gegen IL-1 β , IL-12, IL-27, TNF α , IFN β und IFN α / β -Rezeptor (IFNAR1), oder einer Isotypkontrolle sowie den entsprechenden rekombinanten Zytokinen für 5 Tage kultiviert.

Die repräsentativen FACS-Plots in **Abb. 22** zeigen, dass eine Neutralisation von IL-12 in EC-aktivierten Monozyten-Überständen zu einer deutlichen Reduktion der IL-21 Produktion durch CD4⁺ T-Zellen um etwa 75 % führte. Neutralisierung von IL-27 und des IFN α / β -Rezeptors (IFNAR1) hatte keinen Einfluss auf die IL-21-Produktion. Eine Abnahme von IL-21⁺ T-Zellen um etwa 50 % wurde nach Blockierung von TNF α in EC-konditionierten Monozyten-Überständen beobachtet. Entsprechend dazu wurde untersucht, ob durch Zugabe der jeweiligen rekombinanten Zytokine zur Kontrollbedingung (Medium) die IL-21 Produktion in CD4⁺ T-Zellen stimuliert werden konnte. Durch Stimulation mit rekombinantem IL-12 konnte die IL-21 Produktion im Vergleich zur Kontrollbedingung (Medium) deutlich gesteigert werden, wohingegen rekombinantes IL-27, TNF α und IFN β zu keiner verstärkten IL-21 Freisetzung führten (**Abb. 22 A**). In weiteren Versuchen wurde zusätzlich noch einmal der Effekt von IL-1 β und IFN β auf CD4⁺ T-Zellantworten untersucht (**Abb. 22 B**). Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade oder Zugabe von IL-1 β und IFN β keinen Einfluss auf die IL-21 Expression durch CD4⁺ T-Zellen hatte.

Ähnliche Effekte hatten die blockierenden Antikörper bzw. rekombinanten Zytokine auch auf die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion durch CD4^+ T-Zellen (**Abb. 23**), welche ausschließlich durch IL-12 Neutralisation deutlich reduziert wurde. Anti- $\text{IFN}\beta$, anti- IFNAR1 und anti-IL-27 Antikörper hatten keinen Einfluss auf die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion, und durch Blockierung von IL-1 β und $\text{TNF}\alpha$ im durch EC konditionierten APC-Überstand wurde die Expression von $\text{IFN}\gamma$ in CD4^+ T-Zellen nur leicht reduziert (**Abb. 23**). Entsprechend sezernierten CD4^+ T-Zellen nach Stimulation in Anwesenheit von rekombinatem IL-12 etwa 3 mal mehr $\text{IFN}\gamma$. Rekombinantes $\text{IFN}\beta$ stimulierte die Freisetzung von $\text{IFN}\gamma$ durch CD4^+ T-Zellen allenfalls leicht, wohingegen IL-1 β , IL-27 und $\text{TNF}\alpha$ keine Rolle spielten (**Abb. 23**).

A



B

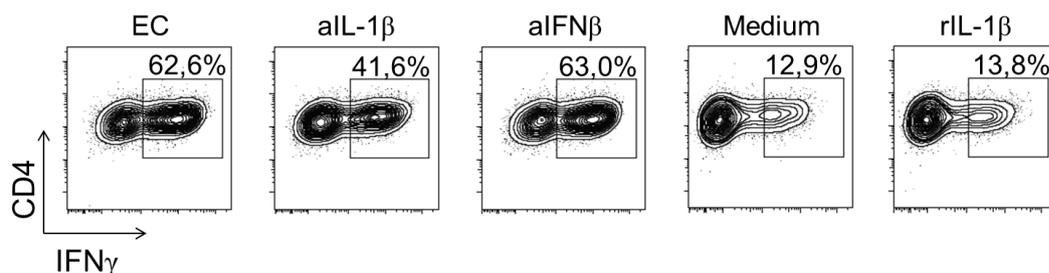


Abb. 23: Einfluss blockierender Antikörper und rekombinanter Zytokine auf die $\text{IFN}\gamma$ Produktion durch CD4^+ T-Zellen Polyklonal aktivierte humane CD4^+ T-Zellen wurden analog zu **Abb. 22** stimuliert. Mittels FACS wurde anschließend die Expression von $\text{IFN}\gamma$ gemessen.

Desweiteren wurde der Einfluss APC-abhängiger Signale auf die $\text{T}_{\text{H}}17$ -Polarisierung untersucht (**Abb. 24**). Es konnte gezeigt werden, dass die IL-17 Produktion durch CD4^+ T-Zellen weder durch Neutralisierung der getesteten Antikörper, noch durch Stimulation entsprechender rekombinanter Zytokine signifikant beeinflusst werden konnte. Dies deutet einmal mehr darauf hin, dass Vitalitäts-abhängig gebildete Signale in Monozyten keinen

Einfluss auf die T_H17 -Zellpolarisierung haben, aber IL-12 eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von T_H1 und T_{FH} -Zellen spielt.

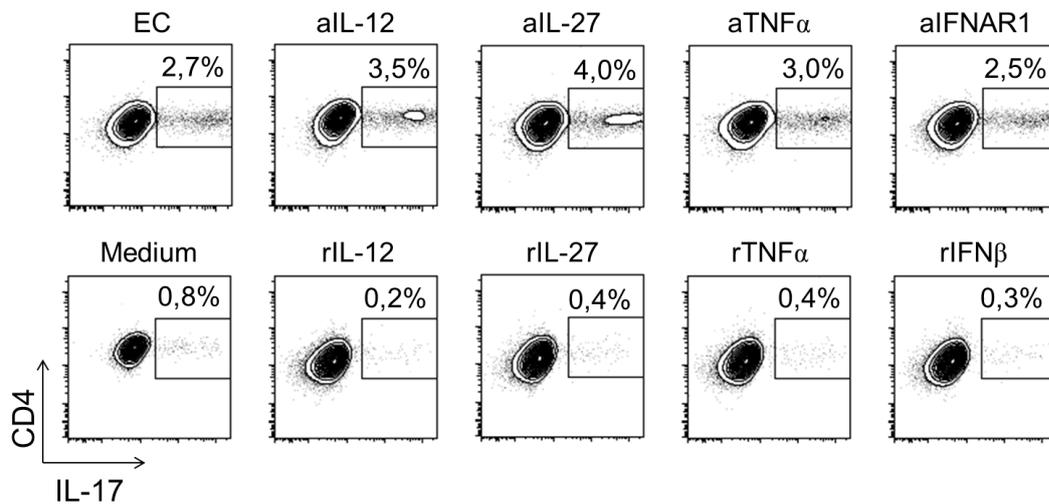


Abb. 24: Einfluss blockierender Antikörper und rekombinanter Zytokine auf die IL-17 Produktion durch $CD4^+$ T-Zellen Polyklonal aktivierte humane $CD4^+$ T-Zellen wurden analog zu **Abb. 22** behandelt. Mittels FACS wurde anschließend die Expression von IL-17 gemessen.

Um zu überprüfen, dass durch Monozyten Vitalitäts-abhängig gebildetes IL-12 eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von *bona fide* T_{FH} -Zellen spielt, wurde zusätzlich die Frequenz von $IL21^+Bcl6^+$ (T_{FH} -)Zellen (**Abb. 25**), sowie die Expression von T_{FH} -Zell-typischen Oberflächenmolekülen (**Abb. 26**) gemessen.

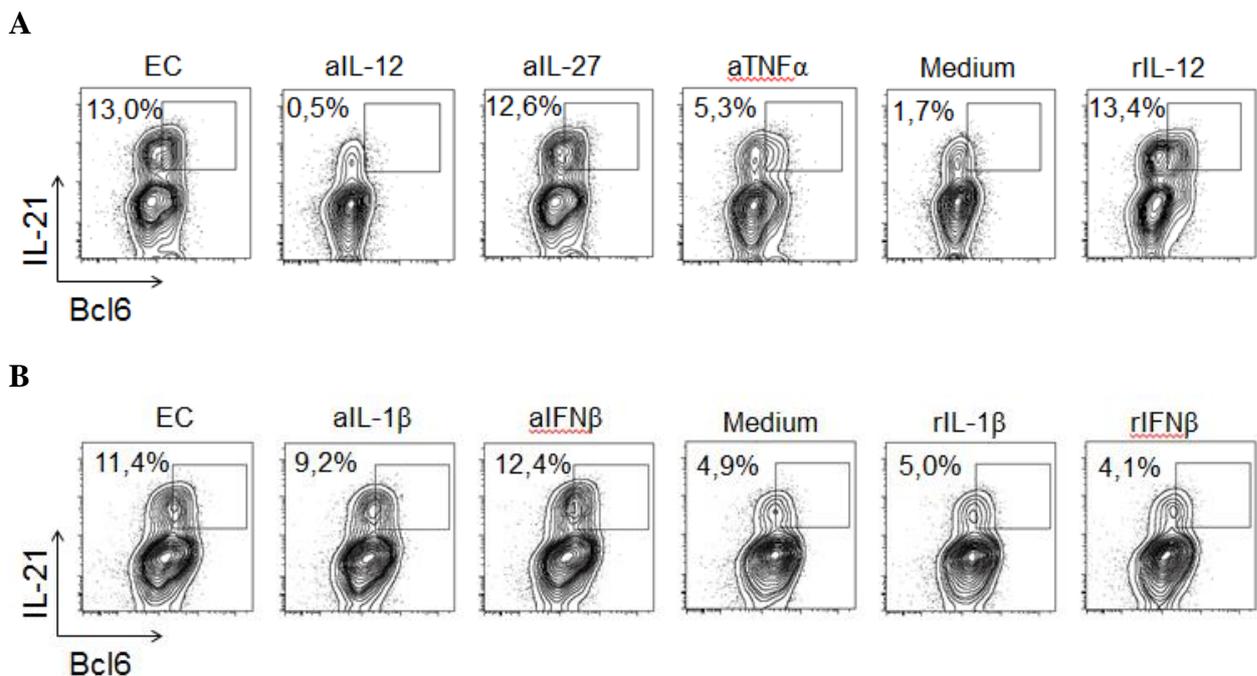


Abb. 25: IL-12 spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von T_{FH} -Zellen Polyklonal aktivierte humane $CD4^+$ T-Zellen wurden analog zu **Abb. 22** behandelt. Mittels FACS wurde die Expression von IL-21 und Bcl6 gemessen.

Abb. 25 zeigt, dass nach Neutralisierung von IL-12 nur noch 0,5 % von zuvor 13 % der CD4⁺ T-Zellen doppelpositiv für IL-21 und Bcl6 waren. Nach Zugabe von anti-IL-1 β - und anti-TNF α -Antikörpern war die Zahl an IL-21/Bcl6⁺ CD4 T-Zellen leicht reduziert, wohingegen IL-27- und IFN β -Neutralisation keine Rolle spielten. Durch Stimulation mit rIL-12 wurde ein deutlicher Anstieg der IL21/Bcl6⁺ CD4 T-Zellen im Vergleich zur Kontrollbedingung beobachtet. Im Gegensatz zu IL-12, konnte durch rekombinantes IL-1 β und IFN β kein Anstieg an IL-21⁺Bcl6⁺ CD4⁺ T-Zellen erreicht werden (**Abb. 25**)

Bei der Expression der für T_{FH}-Zellen typischen Oberflächenmoleküle CXCR5, ICOS und PD-1 wurden diese Ergebnisse bestätigt (**Abb. 26**). Eine Neutralisierung von IL-12 führte zu einer deutlichen Reduktion und die Zugabe eines anti-TNF α Antikörpers zu einer leichten Inhibierung CXCR5/ICOS/PD-1-positiver CD4⁺ T-Zellen. Eine Blockierung von IL-27 und IFNAR1 zeigte keinen Effekt auf die Differenzierung von T_{FH}-Zellen. Ausschließlich die Stimulation der CD4⁺ T-Zellen mit rekombinantem IL-12 führte zu einer vermehrten Expression der Oberflächenmoleküle (**Abb. 26**).

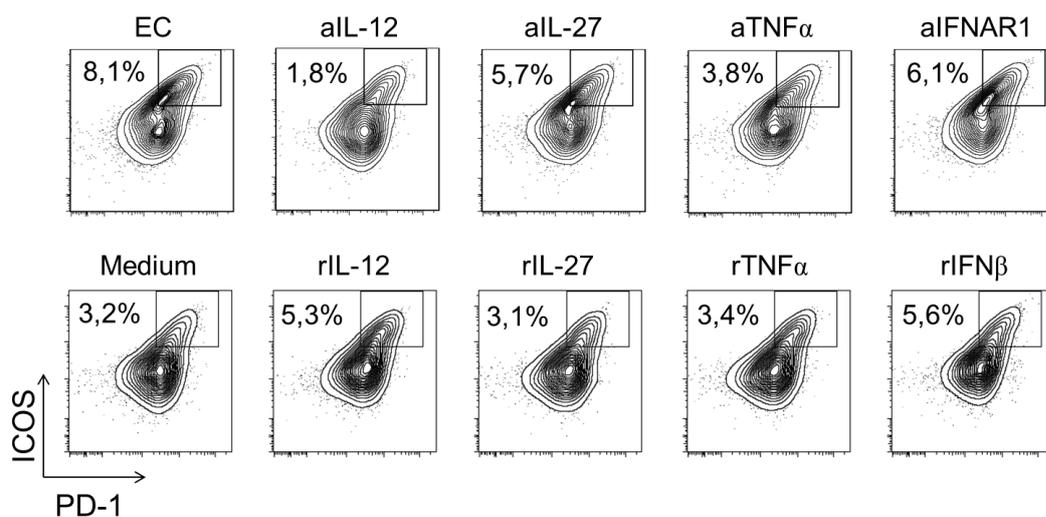


Abb. 26: IL-12 spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von T_{FH}-Zellen. Polyklonal aktivierte humane CD4⁺ T-Zellen wurden wie zuvor in **Abb. 22** behandelt. Mittels FACS wurde die Expression von CXCR5, ICOS und PD-1 (gezeigt sind CXCR5-positive T-Zellen) in Abhängigkeit APC-induzierter Signale bestimmt.

Die in den Beispiel-Plots dargestellten Daten (**Abb. 22** bis **Abb. 25**) waren robust reproduzierbar und es zeigten sich statistisch hoch-signifikante Unterschiede in den getesteten Bedingungen (**Abb. 27**, **Abb. 28**).

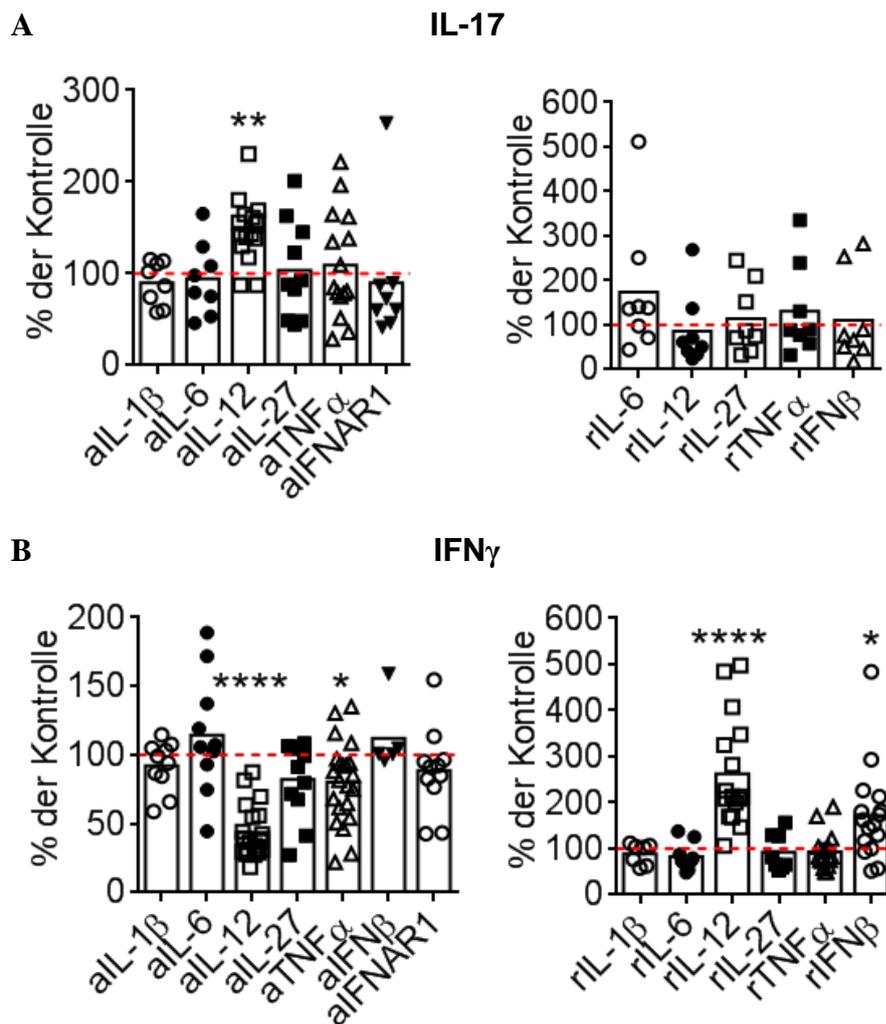
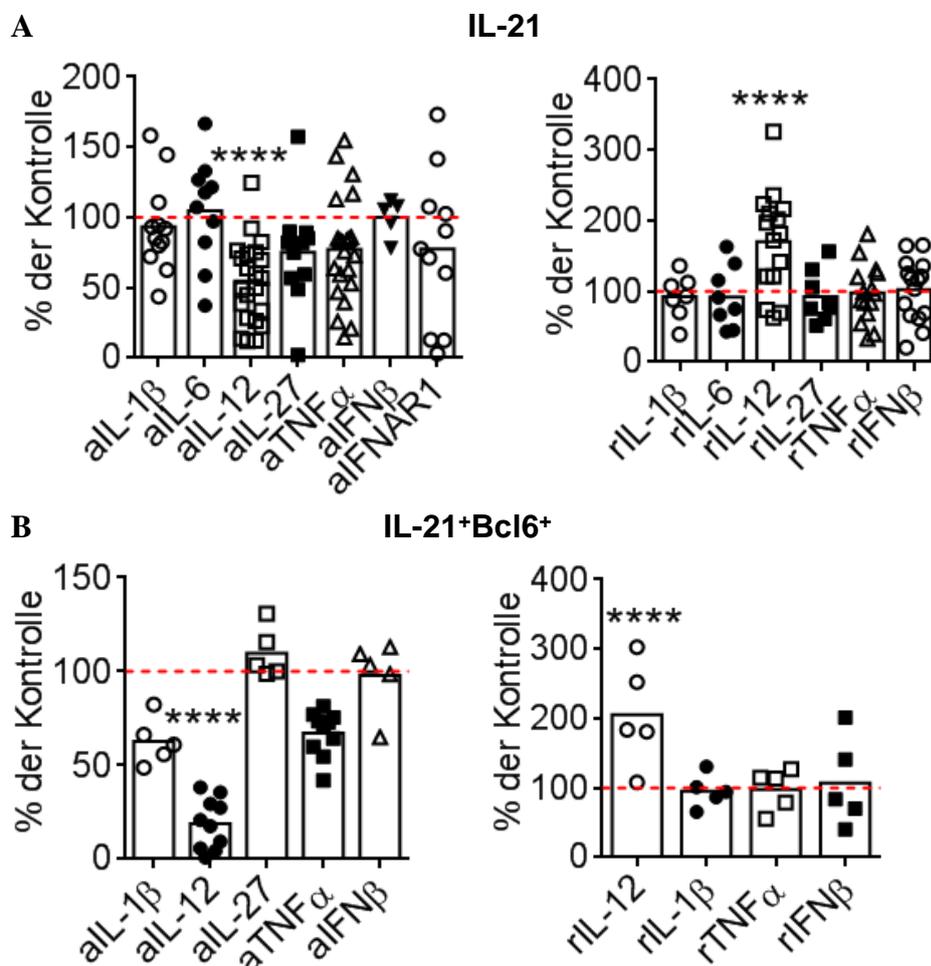


Abb. 27: Einfluss blockierender Antikörper und rekombinanter Zytokine auf die T_H17 - und T_H1 -Zell-Differenzierung Polyklonal aktivierte $CD4^+$ T-Zellen wurden für 5 Tage mit konditionierten Monozyten-Überständen und unter Zugabe von blockierenden Antikörpern gegen die angegebenen Zytokine und den entsprechenden rekombinanten Zytokinen kultiviert. Mittels FACS wurde die Produktion von IL-17 (A) und IFN γ (B) in $CD4^+$ T-Zellen gemessen und quantifiziert. Dargestellt sind prozentuale Veränderungen im Vergleich zur Kontrollbedingung, in der ein Isotyp-Antikörper bzw. Medium eingesetzt wurde (= rote gestrichelte Linie, 100 %). Jeder Punkt zeigt ein unabhängiges Experiment an Zellen eines unabhängigen Spenders. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

Abb. 27 zeigt, dass durch Monozyten Vitalitäts-abhängig gebildetes IL-12 wiederholt und signifikant die Differenzierung von T_H1 -Zellen, nicht aber von T_H17 -Zellen induziert. Die Produktion von IFN γ durch $CD4^+$ T-Zellen wurde durch Neutralisation von IL-12 signifikant reduziert, wohingegen eine Stimulation mit rekombinatem IL-12 zu einer deutlichen Induktion der IFN γ -Expression führte (**Abb. 27 B**). Dies belegt, dass rekombinantes IL-12 funktionell ist, da es auch in unserem experimentellen System die bekannte Funktion eines Signals für eine T_H1 -Zellpolarisierung zeigt. Passend zum bekannten reziproken Verhältnis von T_H1 und T_H17 -Differenzierung führt die Hemmung von IL-12 zu einer verstärkten Differenzierung von T_H17 -Zellen (**Abb. 27 A**). Eine Blockierung von TNF α führte ebenfalls zu einer signifikant reduzierten Produktion von IFN γ durch $CD4^+$ T-Zellen (**Abb. 27 B**),

wohingegen eine Neutralisierung von IL-6, IL-27 oder des IFN α/β -Rezeptors und auch eine Stimulierung mit entsprechenden Zytokinen in konditionierten Monozyten-Überständen keinen signifikanten Effekt auf die T_H17-Zell Polarisierung zeigten (**Abb. 27 B**). Die ohnehin geringfügige Differenzierung von T_H17-Zellen wurde weder durch Zugabe blockierender Antikörper (mit Ausnahme von anti IL-12), noch durch Stimulation mit rekombinanten Zytokinen signifikant beeinflusst (**Abb. 27 A**). Es ist zudem bekannt, dass eine *in vitro* Generierung von humanen T_H17-Zellen (im Vergleich zu murinen) durch rekombinante Zytokine nicht sehr effizient ist.

Auch die Ergebnisse zur T_{FH}-Zellpolarisierung durch *vita*-PAMPs / lebende Bakterien wurden quantifiziert (**Abb. 28**). Es zeigte sich deutlich, dass IL-12 eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von T_{FH}-Zellen spielt.



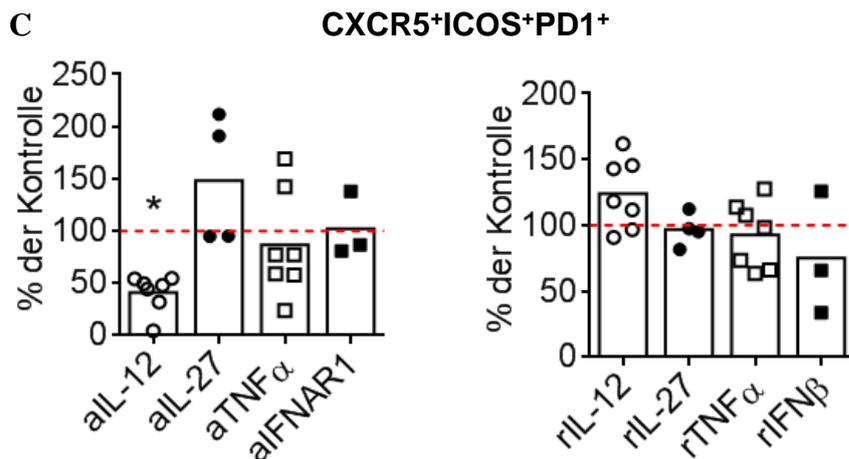


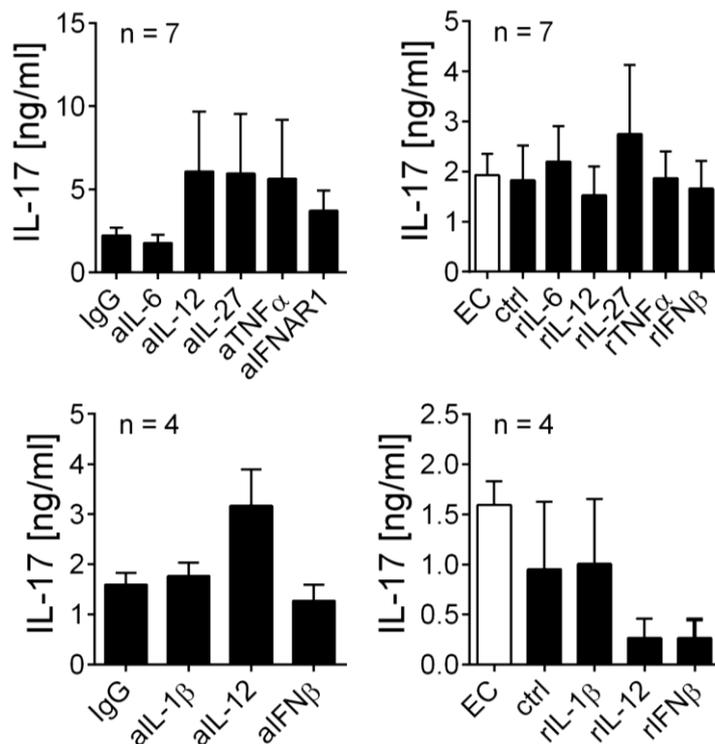
Abb. 28: IL-12 spielt eine entscheidende Rolle bei der T_{FH}-Differenzierung. Polyklonal aktivierte humane CD4⁺ T-Zellen wurden wie zuvor in **Abb. 27** behandelt. Mittels FACS wurde der Einfluss APC-abhängiger Signale auf die Expression von IL-21 (A) IL21/Bcl6 (B) und CXCR5/ICOS/PD-1 (C) in CD4⁺ T-Zellen gemessen und quantifiziert. Dargestellt sind prozentuale Veränderungen im Vergleich zur Kontrollbedingung, in der ein Isotyp-Antikörper bzw. Medium eingesetzt wurde (= rote gestrichelte Linie, 100 %). Jeder Punkt zeigt ein unabhängiges Experiment an Zellen eines unabhängigen Spenders. (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001).

Neutralisation von IL-12 führte zu einer signifikanten Reduktion der Expression von IL-21, Bcl6 und den für T_{FH}-Zellen charakteristischen Oberflächenmarkern CXCR5, ICOS und PD-1 im Vergleich zu einer Isotyp-Kontrollbedingung oder Medium (**Abb. 28 A, B, C**). Auch TNF α und IL-1 β könnten einen Einfluss auf die T_{FH}-Zellpolarisierung haben, da IL-21/Bcl6-doppelpositive CD4⁺ T-Zellen nach Blockierung von TNF α und IL-1 β reduziert waren, jedoch führte TNF α nicht zu einer Hemmung der Expression von CXCR5, ICOS und PD-1 (**Abb. 28 C**). Eine Stimulierung durch rekombinantes TNF α und IFN β induzierte indes keine vermehrte Bildung von T_{FH}-Zellen (**Abb. 28 A, B, C**). Aufgrund dieser eher widersprüchlichen Daten bleiben die Rollen von TNF α und IL-1 β bei der T_{FH}-Zelldifferenzierung in dieser Arbeit unklar. Eine Stimulation mit rekombinantem IL-12 hingegen führte zu einer signifikant höheren Produktion von IL-21 durch CD4⁺ T-Zellen und auch der Anteil an IL-21 und Bcl6 doppelproduzierenden Zellen war deutlich erhöht (**Abb. 28 A, B**), die Expression der Oberflächenmoleküle hingegen nur leicht und nicht signifikant (**Abb. 28 C**). Wie schon zuvor die T_{H1}-Zelldifferenzierung wurde auch die T_{FH}-Zell-Polarisierung nicht durch eine Neutralisierung von IL-6, IL-27 oder des IFN α/β -Rezeptors bzw. durch Stimulierung mit entsprechenden Zytokinen in konditionierten Monozyten-Überständen signifikant beeinflusst (**Abb. 28 A, B, C**).

Zusätzlich wurden die FACS-Daten (**Abb. 22 bis Abb. 28**) mit einer weiteren Nachweismethode bestätigt. Mittels ELISA wurde der Einfluss blockierender Antikörper bzw. rekombinanter Zytokine auf die T-Zellpolarisierung untersucht und quantifiziert. Dafür wurden aus den Überständen der Zellkultur darin freigesetzte Zytokine IL-17, IL-21 und IFN γ

gemessen (**Abb. 29**). Anhand der ELISA-Messung konnten die durch FACS-Analysen erhobenen Daten bestätigt werden. Es wurde erneut gezeigt, dass eine Neutralisierung von IL-12 in durch EC aktivierten Monozyten-Überständen zu einer signifikanten Hemmung der IFN γ - und IL-21 Produktion führte (**Abb. 29 B, C**), aber keinen Einfluss auf die Freisetzung von IL-17 (**Abb. 29 A**) durch CD4⁺ T-Zellen hatte. Durch eine Blockierung von IL-6 und TNF α wurden IFN γ - und IL-21 Level zwar reduziert, jedoch waren diese Unterschiede im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle nicht signifikant. IL-27 hatte, wie bereits durch die FACS-Analysen gezeigt, keinen Einfluss auf die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen. Nach Stimulation durch die entsprechenden rekombinanten Zytokine, war ausschließlich nach Zugabe von IL-12 ein Anstieg der IFN γ - und IL-21 Sekretion zu erkennen (**Abb. 29 B, C**).

A IL-17



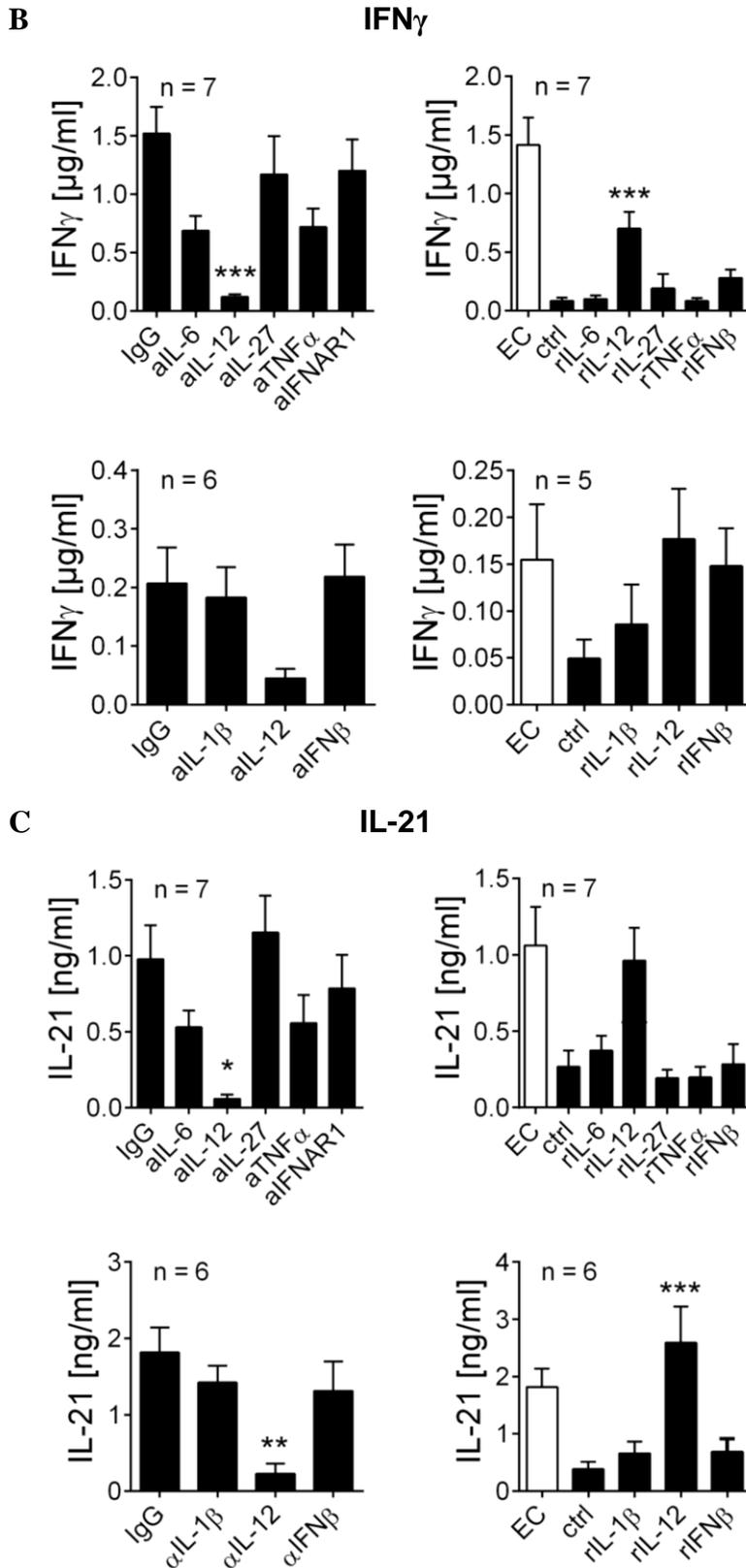


Abb. 29: ELISA-Messung der Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen unter Zugabe von blockierenden Antikörpern und rekombinanten Zytokinen. Nach 5 Tagen Kultur der CD4⁺ T-Zellen mit konditionierten Monozyten-Überständen wurden die Zellkultur-Überstände entnommen und darin enthaltene Zytokine mittels ELISA gemessen. Gezeigt sind jeweils unabhängige Experimente an Zellen eines unabhängigen Spenders. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

Zusammenfassend konnte in den unter **6.4** dargestellten Daten gezeigt werden, dass IL-12, welches selektiv als Antwort auf lebende *E. coli* durch humane Monozyten gebildet wurde, ein entscheidendes Immunsignal für die *vita*-PAMP-induzierte T_{FH}-Zelldifferenzierung darstellt. Dies konnte sowohl durch FACS-Analysen (**Abb. 22** bis **Abb. 28**), als auch ELISA-Messung von IL-21-Produktion (**Abb. 29**) gezeigt werden. Durch eine Neutralisierung von IL-12 in EC-aktivierten Monozyten-Überständen konnte eine Differenzierung zu T_{FH}-Zellen nahezu vollständig blockiert werden ohne die Proliferation der Zellen zu beeinträchtigen. Eine Neutralisierung von IL-6, IL-27, IFN β und IFNAR hingegen hatte keinen signifikanten Effekt und eine Blockierung von TNF α und IL-1 β hemmte die T_{FH}-Zelldifferenzierung nur teilweise. Durch Zugabe von rekombinantem IL-12 zu unbehandelten Monozyten-Überständen konnte der T_{FH}-Zellphänotyp wiederhergestellt werden. Dies konnte durch Stimulierung mit rekombinantem TNF α und IL-1 β nicht gezeigt werden, was auf eine untergeordnete Rolle beider Zytokine in der T_{FH}-Zellpolarisierung hinweist.

6.5 Rolle von Toll-like Rezeptor 8 in der Polarisierung der T-Helferzellantwort

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Zytokin IL-12 ein entscheidendes Signal für eine *vita*-PAMP induzierte T_{FH}-Zelldifferenzierung darstellt (**6.4**). In Folgeversuchen wurde nun der Einfluss von Immunrezeptoren in APC auf eine Vitalitäts-induzierte T_{FH}-Zelldifferenzierung untersucht. Da humane Monozyten nur geringe Mengen an Toll-like Rezeptor (TLR) TLR7 exprimieren, wurde das Hauptaugenmerk in diesem Versuch auf den Immunrezeptor TLR8 gelegt, von welchem bereits bekannt ist, dass er bakterielle RNA erkennt (Bergstrom et al., 2015; Eigenbrod et al., 2015). Mittels Gene Silencing (RNA-Interferenz, RNAi) wurde die Expression von TLR8 in humanen Monozyten gehemmt und die Zellen mit lebenden und toten *E. coli* stimuliert. Die RNAi-Versuche an Monozyten wurden durch einen anderen Doktoranden der AG Sander (Matteo Ugolini, M. Sc.) etabliert und durchgeführt. Anschließend wurden die Überstände geerntet und in der vorliegenden Arbeit mit CD4⁺ T-Zellen kultiviert und nach fünf Tagen die Koexpression von Bcl6 und IL-21 mittels FACS analysiert. **Abb. 30** zeigt repräsentative FACS-Plots eines Beispielversuchs.

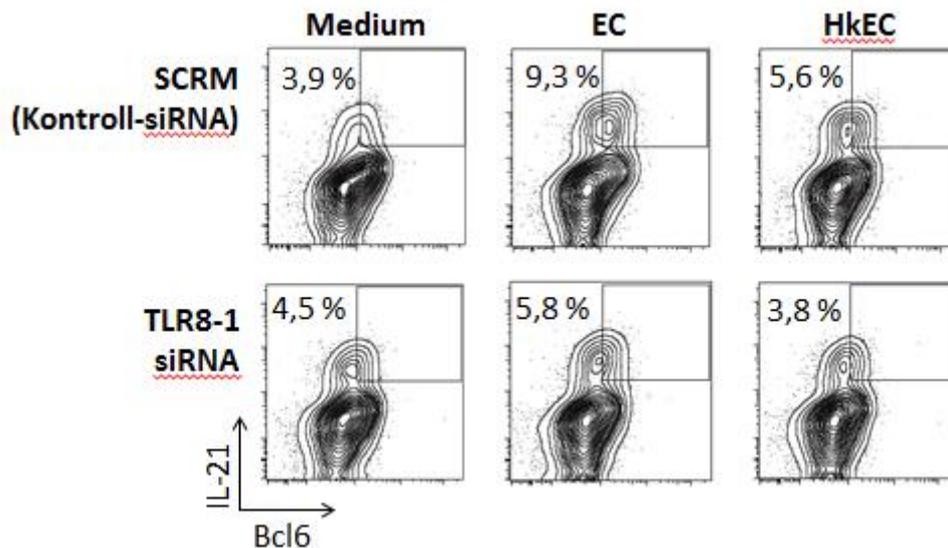


Abb. 30: Einfluss von TLR8 Gene Silencing (RNAi) in Monozyten auf die T_{FH}-Zelldifferenzierung. Humane Monozyten wurden mit siRNA gegen TLR8 oder Kontroll-siRNA (SCRM) behandelt und nach 48 Stunden mit EC oder HkEC stimuliert bzw. blieben unbehandelt (Medium). Anschließend wurden die Zellkulturüberstände mit CD4⁺ T-Zellen für 5 Tage kultiviert. Die IL21/Bcl6-Koexpression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die repräsentativen FACS-Plots in **Abb. 30** zeigen, dass die IL-21/Bcl6-Koexpression nach *knock-down* von TLR8 deutlich reduziert wurde (**Abb. 31**). Als Negativkontrolle wurde siRNA mit einer „nonsense / scrambled“ Sequenz (SCRM) mitgeführt. Sie interagiert mit vielen verschiedenen Signalwegen, sodass unspezifische Effekte auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Expression von TLR8 in Monozyten zu einer verminderten T_{FH}-Zelldifferenzierung als Antwort auf lebende *E. coli* führt. Diese Daten konnten in mehreren Versuchen reproduziert werden (**Abb. 31 A**). Zusätzlich wurde die Sekretion von IL-21 durch CD4⁺ T-Zellen in den Überstand mittels ELISA analysiert (**Abb. 31 B**). Auch hier führte eine Inhibition von TLR8 in Monozyten zu einer signifikant reduzierten IL-21 Freisetzung durch mit EC stimulierten CD4⁺ T-Zellen.

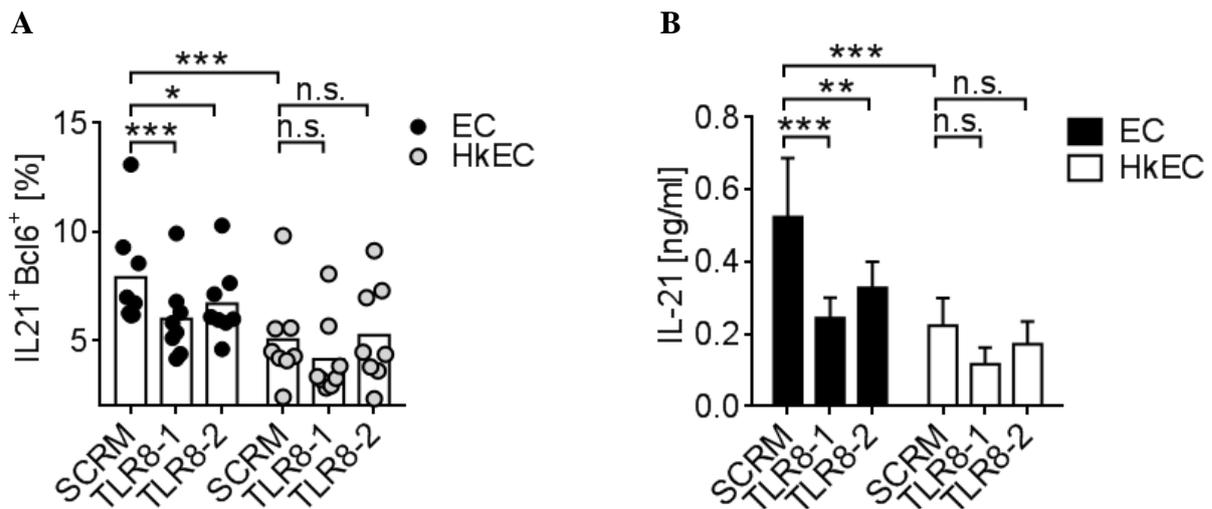


Abb. 31: Silencing (RNAi) von TLR8 in APC führt zu verminderter T_{FH}-Zelldifferenzierung. Humane Monozyten wurden mit zwei unterschiedlichen siRNAs gegen TLR8 oder Kontroll-siRNA (SCRM) behandelt und nach 48 Stunden mit EC oder HkEC stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände mit CD4⁺ T-Zellen für 5 Tage kultiviert. (A) IL21/Bcl6-Koexpression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. (B) Aus den Überständen wurde IL-21 mittels ELISA quantifiziert. Gezeigt sind jeweils unabhängige Experimente an Zellen eines unabhängigen Spenders. (FACS: n = 8, ELISA: n = 5, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001).

Insgesamt zeigen die Daten in 6.5, dass TLR8-Signalisierung für die Detektion bakterieller Vitalität mit anschließender Zytokinfreisetzung durch APC und die Regulierung nachfolgender T_{FH}-Zellantworten entscheidend ist.

6.6 Rolle von bakterieller RNA und selektiver TLR-Liganden auf T-Helferzellantworten

Lebende und somit potentiell gefährliche Mikroorganismen enthalten *vita*-PAMPs wie bakterielle RNA. Diese werden durch PRRs wie z.B. Toll-like Rezeptoren (TLRs), welche von Monozyten exprimiert werden, erkannt und stimulieren so eine stärkere Immunantwort. In der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bakterielle RNA in lebenden Bakterien durch TLR8 erkannt wird. Da es sich bei TLR8 um einen endosomalen Rezeptor handelt und untersucht werden sollte, ob RNA-Erkennung durch TLR8 eine Rolle für die T-Zell-Stimulation spielt, wurde Poly-L-Arginin (pLa) als Transfektionsreagenz verwendet, welches RNA spezifisch über den endosomalen Weg in das Zytosol transportiert und so eine Erkennung durch endosomale TLRs ermöglicht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine pLa-vermittelte Transfektion dazu führt, dass die RNA länger im Endosom verweilt (Ablasser et al., 2009). Für die Stimulationsversuche wurde totale bakterielle RNA aus ThyA⁻ *E. coli* isoliert und mit pLa komplexiert. Anschließend wurden humane Monozyten mit pLa allein oder pLa-gekoppelter RNA, sowie mit EC, HkEC oder Medium für 18 Stunden stimuliert.

Der Einfluss der pLa-vermittelten Transfektion auf die Aktivierung der Monozyten wurde durch eine Oberflächenfärbung verschiedener Aktivitätsmarker und anschließender FACS-Messung bestimmt (**Abb. 32**).

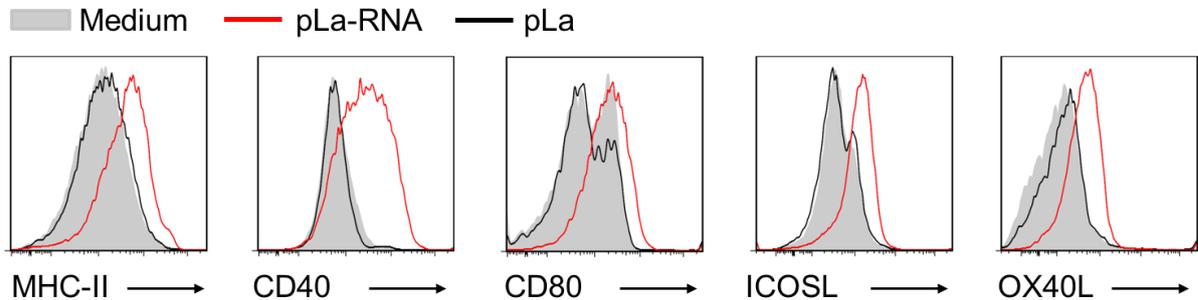


Abb. 32: Bakterielle RNA stimuliert humane Monozyten Totale bakterielle RNA aus ThyA⁻ *E. coli* wurde mit Poly-L-Arginin (pLa) gekoppelt. Anschließend wurden humane Monozyten mit dem Transfektionsreagenz allein oder pLa-gekoppelter RNA behandelt und mit lebenden und toten *E. coli* für 18 Stunden stimuliert. Die Oberflächenexpression verschiedener Aktivitätsmarker wurde mittels FACS bestimmt.

Die pLa-vermittelte RNA-Transfektion führte in humanen Monozyten zu einer vermehrten Expression von Aktivitätsmarker wie CD40, CD80 oder ICOSL im Vergleich zu unbehandelten Monozyten (**Abb. 32**). Zur Kontrolle wurden humane Monozyten nur mit Transfektionsreagenz behandelt, was aber allein keinen Einfluss auf die Expression der Aktivitätsmarker hatte. Diese Daten weisen darauf hin, dass humane Monozyten bakterielle RNA erkennen und aktiviert werden. Darauf aufbauend wurden in weiteren Versuchen die Zellkulturüberstände der mit RNA stimulierten Monozyten mit polyklonal aktivierten CD4⁺ T-Zellen kultiviert. Anschließend wurde die IL21/Bcl6-Koexpression mittels Durchflusszytometrie analysiert. **Abb. 33** zeigt repräsentative FACS-Plots. Es zeigte sich, dass die Stimulation humaner Monozyten mit bakterieller RNA zu einer konsekutiven T_{FH}-Zellpolarisierung der CD4⁺ T Zellen führte, vergleichbar mit der Stimulation durch lebende Bakterien. Vergleichbare Effekte wurden durch die Stimulation mit einem synthetischen TLR8-Liganden (CL075) erreicht. Dieser wurde als Positivkontrolle eingesetzt, da CL075 TLR8 in humanen Monozyten stimuliert, NF-κB aktiviert und die Produktion von TNFα und IL-12 anregt. Auch bei CD4⁺ T-Zellen, welche mit HkEC stimuliert wurden, stieg nach Behandlung der Monozyten mit pLa-RNA die Zahl der T_{FH}-Zellen.

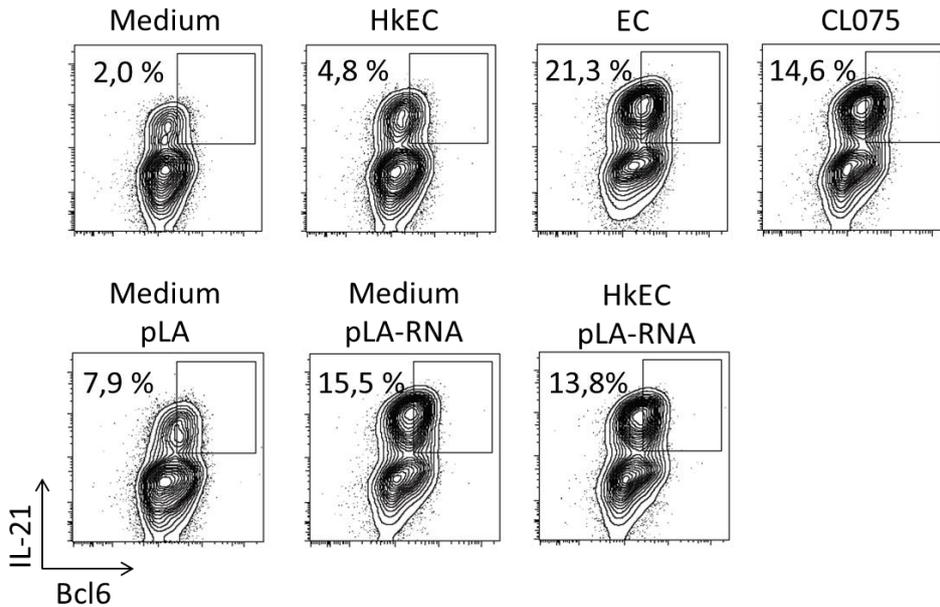


Abb. 33: Stimulation von Monozyten mittels pLa-induzierter Transfektion von bakterieller RNA führt zu verstärkter T_{FH} -Zelldifferenzierung Humane Monozyten wurden wie in **Abb. 32** stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände geerntet und mit polyklonal aktivierten $CD4^+$ T-Zellen für 5 Tage kultiviert. Die IL21/Bcl6-Koexpression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die in **Abb. 32** und **Abb. 33** gezeigten Daten weisen darauf hin, dass RNA-Erkennung in Antigen-präsentierenden Zellen einen starken Stimulus für eine T_{FH} -Zellpolarisierung darstellt. Diese Daten wurden in mehreren Versuchen reproduziert (**Abb. 34 A**).

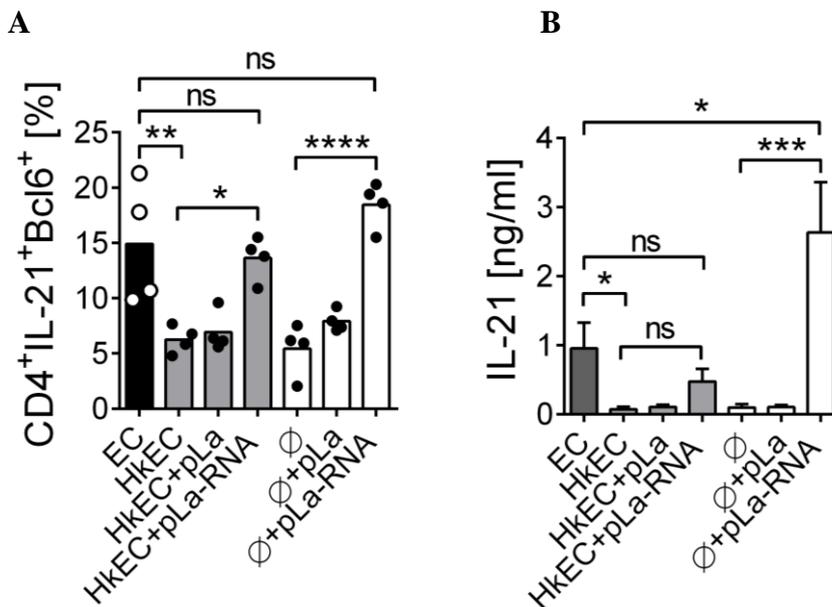


Abb. 34: Stimulation von Monozyten mittels pLa-induzierter Transfektion führt zu verstärkter Produktion von Bcl6 und IL-21 in $CD4^+$ T-Zellen. Humane Monozyten wurden wie in **Abb. 32** stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände geerntet und mit $CD4^+$ T-Zellen für 5 Tage kultiviert. (A) IL21/Bcl6-Koexpression in $CD4^+$ T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. (B) Aus den Zellkulturüberständen wurde IL-21 mittels ELISA gemessen. Gezeigt sind jeweils unabhängige Experimente an Zellen eines unabhängigen Spenders. (n = 4, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001).

Zusätzlich wurde die Sekretion von IL-21 durch CD4⁺ T-Zellen im Überstand mittels ELISA gemessen, welche ebenfalls eine gesteigerte T_{FH}-Zellpolarisierung anzeigte (**Abb. 34 B**). Es zeigte sich ein statistisch hoch-signifikanter Effekt der Erkennung bakterieller RNA durch Monozyten auf die anschließende T_{FH}-Zelldifferenzierung.

Zusammen weisen die Daten aus **6.5** und **6.6** darauf hin, dass humane Monozyten über die TLR8-abhängige Erkennung von bakterieller RNA T_{FH}-Zellantworten auslösen. Um zu untersuchen, ob eine Signalisierung über andere TLRs für die Detektion bakterieller Vitalität und anschließende Regulierung nachfolgender T_{FH}-Zellantworten ebenfalls eine Rolle spielt, wurden humane Monozyten mit weiteren TLR-Liganden, dem bereits als Impfadjuvanz zugelassenen TLR4-Agonist *Monophosphoryl lipid A* (MPLA) und CpG-DNA (TLR9-Agonist) stimuliert (**Abb. 35**).

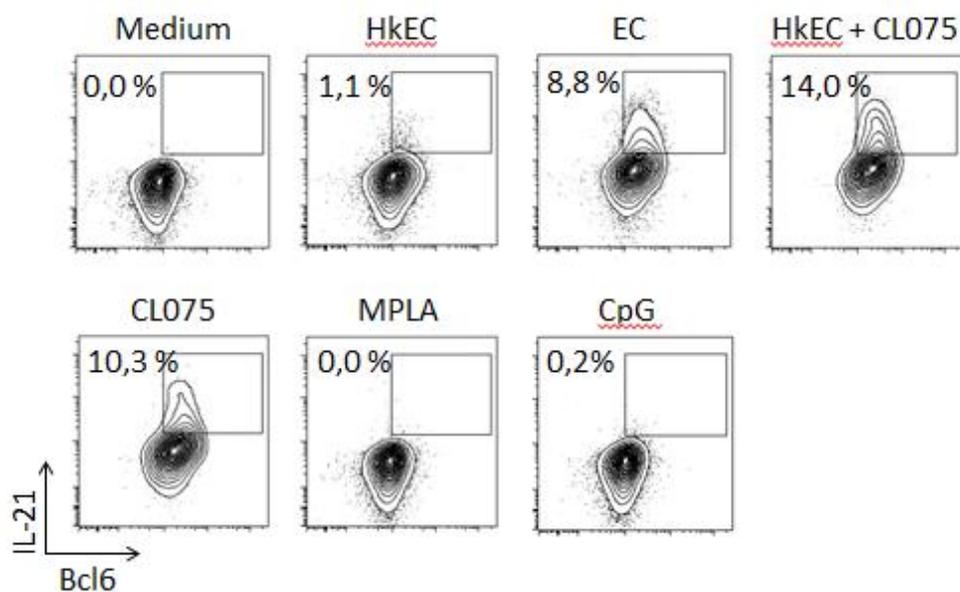


Abb. 35: TLR8-abhängige T_{FH}-Zellpolarisierung Humane Monozyten wurden mit CL075, *Monophosphoryl lipid A* (MPLA) oder CpG-DNA behandelt und mit lebenden und toten *E. coli* stimuliert und anschließend mit humanen naiven CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von SEB co-kultiviert. Am Tag 5 wurde mittels FACS die Koexpression von IL-21/Bcl6 bestimmt.

Abb. 35 zeigt, dass eine Stimulation von Monozyten mit dem synthetischen TLR8-Ligand CL075 im Vergleich zur unstimulierten, unbehandelten Kontrolle (Medium) zu einer deutlich stärkeren Co-Expression von IL-21 und Bcl6 in CD4⁺ T-Zellen führte, während andere TLR-Liganden wie MPLA und CpG-DNA keine erhöhte T_{FH}-Zellpolarisierung induzierten. CD4⁺ T-Zellen, welche mit HkEC-stimulierten Monozyten co-kultiviert wurden, exprimierten durch zusätzliche TLR8-Stimulation (HkEC + CL075) ebenfalls deutlich mehr Bcl6 und IL-21 im Vergleich zur HkEC-Kontrolle. Diese Daten wurden in mehreren Versuchsreihen reproduziert und statistisch ausgewertet (**Abb. 36**).

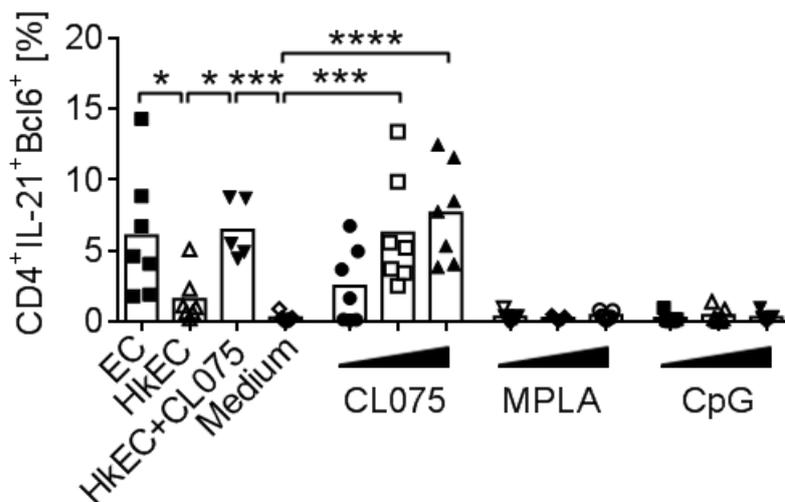


Abb. 36: Dosis-abhängige Stimulation humaner Monozyten mit TLR-Liganden und deren Einfluss auf die nachfolgende T_{FH}-Zellpolarisierung. Humane Monozyten wurden wie in **Abb. 35** co-kultiviert. Am Tag 5 wurde mittels FACS die Koexpression von IL-21/Bcl6 bestimmt. Gezeigt sind jeweils unabhängige Experimente an Zellen eines unabhängigen Spenders. (n = 7, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ****: p<0.0001).

Wie bereits in **Abb. 35** gezeigt, stimuliert der synthetische TLR8-Ligand CL075 nachfolgende T_{FH}-Zellantworten, welche Dosis-abhängig verstärkt werden (**Abb. 36**). Durch Stimulation mit dem TLR4-Liganden und zugelassenem Impfadjuvanz MPLA, sowie dem TLR9-Liganden CpG-DNA hingegen konnte auch mit Erhöhung der Konzentrationen keine T_{FH}-Zellpolarisierung erreicht werden. Diese Daten deuten zusammen mit den Ergebnissen aus **6.5** darauf hin, dass eine TLR8-Signalisierung, nicht aber die Signalisierung über TLR4 oder TLR9 entscheidend ist, dass TLR8 der erste bekannte *vita*-PAMP Rezeptor zur Erkennung bakterieller Vitalität in humanen APC ist und dass aktivierte humane Monozyten TLR8-abhängig T_{FH}-Zellantworten auslösen.

7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob humane Monozyten, als Antigen-präsentierende Zellen, in der Lage sind, bakterielle Vitalität zu erkennen und welchen Einfluss dies auf deren Aktivierung (6.3), sowie die Polarisierung anschließender T-Zellantworten hat (6.1). Dafür wurden humane CD14⁺CD16⁻ Monozyten mit einem avirulenten, replikationsdefizienten (ThyA⁻) Laborstamm von *E. coli* K12 (DH5 α) infiziert und die Antworten mit solchen auf Hitze-getötete Bakterien desselben Stammes, sowie einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass humane Monozyten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowohl durch lebende als auch Hitze-getötete *E. coli* stark stimuliert werden (Abb. 21). Diese Daten waren nicht überraschend und belegen, dass beide Stimuli (lebende und tote Bakterien) vom Immunsystem erkannt werden, da beide PAMPs enthalten, welche von PRRs auf Antigen-präsentierenden Zellen erkannt werden und so zu ihrer Aktivierung führen. Im Gegensatz dazu, zeigten sich zwischen beiden Stimuli jedoch deutliche Unterschiede in der Sekretion der entzündungsfördernden Zytokine IL-1 β , IL-12 und TNF α , welche nahezu ausschließlich als Antwort auf lebende, nicht aber auf tote *E. coli* in großen Mengen produziert wurden (Abb. 20). Diese Befunde deuten auf das Vorhandensein zusätzlicher Signale hin, z.B. sogenannter *vita*-PAMPs, welche nur in lebenden Bakterien vorkommen und deren Erkennung eine verstärkte proinflammatorische Immunantwort auslöst. So konnten Sander *et al.* bereits 2011 in ähnlichen Versuchen im Maussystem zeigen, dass lebende Bakterien von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und daraufhin robuste Immunantworten ausgelöst werden. In murinen APC lösten sowohl lebende als auch tote Bakterien eine starke Produktion von IL-12 und TNF α aus (Sander *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine differentielle Expression der beiden Zytokine durch humane Monozyten in Abhängigkeit von bakterieller Vitalität beobachtet, was zeigt, dass humane APC sehr präzise zwischen lebenden und toten Bakterien unterscheiden und mit einem angepassten Zytokinprofil antworten. Dass die Detektion von Bakterien durch APC zu einer Caspase-1-abhängigen Freisetzung von IL-1 β führt, ist bereits bekannt (De Saint-Vis *et al.*, 1998; Iwasaki und Medzhitov, 2015). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Sander *et al.*, die zeigen, dass murine APC signifikant höhere Mengen an IL-1 β als Antwort auf lebende Bakterien sezernieren (Sander *et al.*, 2011), konnte dies in der vorliegenden Arbeit auch für humane Monozyten gezeigt werden, während IL-6 unabhängig von bakterieller Vitalität gebildet wurde. Monozyten und DC fungieren als Antigen-präsentierende Zellen, exprimieren co-stimulatorische Moleküle und Zytokine und sind daher

entscheidend an der Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen beteiligt (Fillatreau, 2014; Goenka et al., 2011; Olliver et al., 2011; Schmitt et al., 2009). Im Zusammenhang mit den von Sander *et al.* veröffentlichten Daten konnte gezeigt werden, dass lebende Bakterien sowohl von murinen, als auch humanen Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und daraufhin robuste Immunantworten ausgelöst werden. Allerdings konnten dabei Unterschiede in der Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF α aufgezeigt werden. Sander *et al.* konnten bereits einige der Schlüsselantworten des angeborenen Immunsystems beschreiben und *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) als ein zentrales Signalmolekül für die Vermittlung *vita*-PAMP-abhängiger Immunantworten im murinen System identifizieren (Sander et al., 2011). Ob die unterschiedliche Sekretion von Zytokinen als Antwort auf lebende Bakterien auch unterschiedliche Immunantworten und molekulare Signalwege im humanen System auslöst, wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine Aufklärung korrespondierender Mechanismen im Menschen untersucht. Dies stellt eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer Impfstrategien dar, die z.B. *vita*-PAMPs oder verwandte Moleküle als Adjuvantien für humanmedizinische Impfstoffe verwenden.

Aufbauend auf den Erkenntnissen, dass klassische humane Monozyten bakterielle Vitalität erkennen und eine Erkennung lebender, nicht aber Hitze-getöteter *E. coli* zu einer stärkeren Immunantwort führt, wurde in weiteren Versuchen analysiert, wie dadurch nachfolgende T-Helferzellantworten beeinflusst werden (**6.1**). Dafür wurden humane CD4⁺ T-Zellen mit autologen humanen Monozyten oder konditionierten Monozyten-Überständen kultiviert. Die veränderte Zytokin-Expression durch humane Monozyten nach Stimulation mit lebenden Bakterien induzierte eine Produktion der T_H1- und T_{FH}-Zell-spezifischen Zytokine IFN γ und IL-21 in humanen CD4⁺ T-Zellen. Im Vergleich dazu konnte diese Antwort nicht nachgewiesen werden, wenn APC mit HkEC oder Medium allein stimuliert wurden (**Abb. 7** bis **Abb. 13**). Da avirulente, auxotrophe und damit replikationsdefiziente Bakterien als Stimulus verwendet wurden, sind die in den T-Zellen nachgewiesenen Antworten ausschließlich auf den Einfluss bakterieller Vitalität und nicht auf Virulenzfaktoren oder eine Vermehrung der Bakterien zurückzuführen (Sander et al., 2011). Unabhängig von bakterieller Vitalität war die Expression des T_H17-Zell-spezifischen Zytokins IL-17 und auch das Proliferationsvermögen der CD4⁺ T-Zellen in allen Bedingungen vergleichbar. Neben dem gram-negativen *E. coli* lösten auch andere bakterielle Spezies wie zum Beispiel das avirulente gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* nahezu identische adaptive Immunantworten aus (**Abb. 14**). Dies zeigt, dass die Antwort auf bakterielle Vitalität konserviert und unabhängig von Spezies-spezifischen Eigenschaften erfolgt. Da die Motivation dieser Promotion in der

Entwicklung neuartiger Impfstrategien gegen bakterielle Infektionen lag, wie zum Beispiel dem Einsatz von *vita*-PAMPs als Impfadjuvantien, war in diesem Zusammenhang vor allem interessant, ob die Detektion lebender *E. coli* durch humane Monozyten eine T_{FH}-Zellpolarisierung begünstigt (**Abb. 9 bis Abb. 12, Abb. 15**). In den letzten Jahren berichteten viele Studien über die Entwicklung und die regulatorische Funktion von T_{FH}-Zellen, welche im Keimzentrum eine Differenzierung von Antigen-spezifischen B-Zellen in Gedächtnis-B-Zellen oder Antikörper-sezernierende Plasmazellen induzieren (Breitfeld et al., 2000; Ma et al., 2012a; Schaerli et al., 2000; Vinuesa et al., 2016). Dennoch ist bis heute relativ wenig über die frühe Phase der T_{FH}-Zelldifferenzierung und ihre Regulierung durch APC-abhängige Immunsignale bekannt. Daher sind weitere Aufklärungen über biochemische Signalwege des angeborenen Immunsystems, welche zu einer Polarisierung humaner T_{FH}-Zellen führen, von großem Interesse für die Entwicklung neuer Impfadjuvantien (Mesquita Jr et al., 2016; Parodi, 2014; Tangye et al., 2013). Neben der Produktion des Zytokins IL-21 sind T_{FH}-Zellen vor allem durch die Expression der Oberflächenmoleküle CXCR5, ICOS und PD-1 (Cosmi et al., 2014; Crotty, 2011; Deenick und Ma, 2011; Ma et al., 2012; Schmitt und Ueno, 2015), sowie des Transkriptionsfaktors Bcl6 charakterisiert (Crotty, 2011; Ise, 2015; Schmitt und Ueno, 2015; Ueno et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Stimulation humaner Monozyten mit lebenden, nicht aber Hitze-getöteten *E. coli*, diese T_{FH}-Zell-spezifischen Oberflächenmarker in CD4⁺ T-Zellen hochreguliert (**Abb. 9 bis Abb. 12**) und der T_{FH}-Zell-relevante Transkriptionsfaktor Bcl6 verstärkt exprimiert wurde (**Abb. 9 bis Abb. 12, Abb. 15**). Damit konnte die Detektion bakterieller Vitalität (*vita*-PAMPs) als Stimulus des angeborenen Immunsystems identifiziert werden, welcher bevorzugt zu einer T_{FH}-Zell-polarisierung in humanen CD4⁺ T-Zellen führt und damit neue Einblicke in molekulare Mechanismen der frühen T_{FH}-Zellentwicklung liefert. Aufgrund der funktional vielseitigen Antikörperantworten in zahlreichen Infektionen wurde bisher angenommen, dass verschiedenste mikrobielle Signale eine T_{FH}-Zelldifferenzierung auslösen können (Crotty, 2014). Eine genaue Aufklärung zugrundeliegender Mechanismen der frühen T_{FH}-Zelldifferenzierung ist daher in den Fokus aktueller Studien gerückt. Kürzlich konnten Locci *et al.* zeigen, dass Aktivin A, welches zur TGFβ-Familie gehört und von Monozyten und Stromazellen gebildet wird, zusammen mit IL-12 eine Polarisierung humaner T_{FH}-Zellen induziert (Locci et al., 2016). Auch von TGFβ wurde bereits berichtet, dass es zusammen mit IL-12 und weiteren Zytokinen die initiale T_{FH}-Zelldifferenzierung im menschlichen System induziert (Liu et al., 2013b; Schmitt et al., 2014b). Aktivin A und TGFβ binden an unterschiedliche Rezeptoren, beide Zytokine aktivieren aber Signalwege über SMAD2 und

SMAD3 (Locci et al., 2016). Während Locci *et al.* und Liu *et al.* von einer SMAD3-abhängigen T_{FH}-Zelldifferenzierung berichten (Liu et al., 2013b; Locci et al., 2016), wurde in anderen Studien eine Abhängigkeit von STAT3 berichtet (Ma et al., 2012b; Ray et al., 2014; Schmitt et al., 2014b; Ysebrant de Lendonck et al., 2013). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass die Freisetzung und Aktivität von Activin A durch IL-1 β verstärkt wird (Abe et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Detektion lebender Bakterien durch humane Monozyten zu einer deutlich verstärkten Freisetzung von IL-1 β führte (**Abb. 20**) und zudem nachfolgend eine T_{FH}-Zelldifferenzierung induziert (**Abb. 9 bis Abb. 12, Abb. 15**). Ob ein verstärkender Regelkreis, z.B. aus IL-1 β und Activin A hier ebenfalls eine Rolle spielen könnte, wurde in der Arbeit nicht untersucht, ist aber denkbar. Nach Neutralisierung von IL-1 β konnte in der vorliegenden Arbeit nur eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der T_{FH}-Zellantworten gezeigt werden (**Abb. 28**). Zytokine, welche von APC in Abhängigkeit von lebenden Bakterien gebildet wurden, scheinen also einen direkten Einfluss auf die frühe Phase der T_{FH}-Zellentwicklung zu haben. Dies konnte in mehreren Versuchen reproduzierbar gezeigt werden, in denen polyklonal aktivierte CD4⁺ T-Zellen eine hohe Expression von IL-21, Bcl6, sowie der Oberflächenmoleküle CXCR5, ICOS und PD-1 aufwiesen, nachdem sie in Anwesenheit von durch EC-konditionierten Monozyten-Überständen in Kultur differenzierten (**Abb. 28**). Daraufhin wurde in nachfolgenden Versuchen untersucht, welche APC-abhängigen Zytokine für die T_{FH}-Zellpolarisierung nach Erkennung von bakterieller Vitalität verantwortlich sind. Dafür wurden humane CD4⁺ T-Zellen mit konditionierten Monozyten-Überständen kultiviert und durch blockierende Antikörper gegen potentiell relevante Zytokine und die entsprechenden rekombinanten Zytokine ergänzt (**6.4**). In diesem Zellkultursystem hatten die CD4⁺ T-Zellen keinen direkten Zellkontakt zu den Monozyten, sodass adaptive Immunantworten allein auf den Einfluss APC-abhängiger Signale als Antwort auf lebende Bakterien zurückzuführen waren. Zahlreiche Studien beschäftigten sich bereits mit dem Einfluss von Zytokinen und Zytokin-Kombinationen, welche eine Differenzierung muriner und humaner T_{FH}-Zellen induzieren. Es wurde gezeigt, dass IL-6 und IL-21 in Kombination eine optimale Polarisierung muriner T_{FH}-Zellen induzieren, welche B-Zellen zur Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen verhelfen (Eddahri et al., 2009; Eto et al., 2011; Nurieva et al., 2008). Auch IL-21 allein soll entscheidend an der Generation muriner T_{FH}-Zellen, sowie der Bildung des Keimzentrums beteiligt sein (Vogelzang et al., 2008). Ebenfalls Yoo *et al.* zeigten, dass IL-21 eine APC-vermittelte T_{FH}-Zelldifferenzierung in pulmonalen Virusinfektionen in der Maus fördert (Yoo und Braciale, 2014). Aber auch IL-27 und IL-4 sollen eine Generierung muriner T_{FH}-Zellen begünstigen (Batten et al., 2010;

Debock et al., 2013). Batten *et al.* zeigten, dass IL-27 zur verstärkten Expression von IL-21 und den T_{FH}-Zell-spezifischen Oberflächenmolekülen CXCR5, ICOS und PD-1 in der Maus führt und so die Funktion des Keimzentrums fördert (Batten et al., 2010). IL-4 hingegen soll an einer Entwicklung von speziell neonatalen T_{FH}-Zellen in Mäusen beteiligt sein, deren Generation sowie Plastizität fördern und somit eine wichtige Rolle bei der neonatalen humoralen Immunität spielen (Debock et al., 2013). Im humanen System hingegen wurde gezeigt, dass IL-6, IL-12, IL-21 und IL-23 zu einer Produktion von IL-21 in naiven CD4⁺ T-Zellen führten, jedoch induzierte nur IL-12 eine Expression von Bcl6, CXCR5 und ICOS in der frühen Phase der T_{FH}-Zelldifferenzierung (Ma et al., 2009). Weitere Studien berichten über die Fähigkeit von IL-12, humane IL-21-positive CD4⁺ T-Zellen zu generieren, welche eine Differenzierung von Plasmazellen und die Ig-Produktion fördern (Diehl et al., 2012; Yu et al., 2015). Schmitt *et al.* zeigten eine Funktion für IL-12 in der frühen T_{FH}-Zelldifferenzierung, welches über STAT4 die Entwicklung und Funktion humaner T_{FH}-Zellen *in vivo* reguliert (Schmitt et al., 2013). Aber auch IL-6 soll an der Differenzierung humaner T_{FH}-Zellen beteiligt sein (Chavele et al., 2015). Trotz all dieser Studien ist bisher nicht bekannt, welches Zytokin oder welche Kombination an Zytokinen für eine durch Infektion oder die Erkennung von *vita*-PAMPs induzierte T_{FH}-Zellpolarisierung verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Expression von Bcl6, CXCR5/ICOS/PD-1, sowie IL-21 durch CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation durch *E. coli* und in Abhängigkeit verschiedener Zytokine untersucht (6.4). Dabei konnte gezeigt werden, dass IL-12, welches selektiv als Antwort auf lebende *E. coli* durch humane Monozyten gebildet wurde, entscheidend an der Differenzierung humaner T_{FH}-Zellen beteiligt war. Durch eine Neutralisierung von IL-12 und teilweise auch TNF α und IL-1 β in EC-aktivierten Monozyten-Überständen wurde die Expression von Bcl6, IL-21, sowie CXCR5, ICOS und PD-1 signifikant reduziert ohne dabei die Proliferation der Zellen zu beeinträchtigen, während die Blockade von IL-6, IL-27, IFN β und IFNAR keinen nennenswerten Effekt hatte (Abb. 25, Abb. 28). Umgekehrt führte die Zugabe von rekombinantem IL-12 zu unbehandelten Monozyten-Überständen zur Reproduktion des T_{FH}-Zell-Phänotyps, was durch Stimulierung mit rekombinantem TNF α oder IL-1 β nicht gezeigt wurde, sodass diese Zytokine wohl nur eine untergeordnete Rolle bei der T_{FH}-Zellpolarisierung spielen. Damit konnte IL-12, welches von humanen Monozyten selektiv durch Stimulation mit lebenden Bakterien gebildet wurde, als ein entscheidendes Immunsignal für eine präferentielle frühe T_{FH}-Zelldifferenzierung identifiziert werden. Eine gezielte Aktivierung von Signalwegen des angeborenen Immunsystems, welche zu einer T_{FH}-Zellpolarisierung führen, ist von großer Bedeutung für die Entwicklung verbesserter

Impfstoffe. Dies könnte zum Beispiel durch den Einsatz von spezifischen Impfadjuvantien erfolgen, welche das angeborene Immunsystem aktivieren und adaptive Immunantworten stimulieren (Coffman et al., 2010; Linterman und Hill, 2016). Bisher gibt es nur wenige Adjuvantien, welche in zugelassenen Impfstoffen eingesetzt werden (Rappuoli et al., 2011). Neue, veränderte Adjuvantien zu entwickeln, welche eine T_{FH} -Zelldifferenzierung induzieren und so die Keimzentrumsreaktion und Antikörperproduktion fördern, ist daher ins Zentrum vieler Studien gerückt (Linterman und Hill, 2016). So wurde gezeigt, dass zum Beispiel das Squalen-Adjuvans MF59 APC-abhängig die Menge an B-Zellen im Keimzentrum, T_{FH} -Zellen und Antigen-spezifische DC nach Immunisierung von Mäusen erhöht und dadurch die Menge, Vielfalt und Affinität produzierter Antikörper gesteigert werden konnte (Mastelic Gavillet et al., 2015). Auch der Gebrauch von TLR8-Agonisten als wirksames Adjuvans wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um Impfantworten in der Maus und nicht-humanen Primaten zu verbessern (Beesu et al., 2015, 2015; Linterman and Hill, 2016). Nanopartikel, welche TLR4- und TLR7/8-Agonisten enthalten, konnten die Keimzentrumsreaktion verlängern, die Qualität der produzierten Antikörper verbessern, förderten die Bildung von Gedächtnis-B-Zellen in Mäusen und schützten somit vor einer erneuten Influenza-Infektion (Kasturi et al., 2011; Wille-Reece et al., 2005). Weitere Studien zeigten, dass eine Immunisierung ergänzt durch TLR9 Agonisten eine vermehrte Produktion von IL-6 in DC induzierte, was zu einer erhöhten Anzahl an T_{FH} -Zellen und B-Zellen im Keimzentrum und somit zu stärkeren Antikörperantworten führte (Chakarov und Fazilleau, 2014; Rookhuizen und DeFranco, 2014). Um diese Ergebnisse auf das humane System zu übertragen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von TLR8 in humanen Monozyten durch RNA-Interferenz deaktiviert und die Zellen mit lebenden und toten *E. coli* stimuliert. Anschließend wurden die Überstände der manipulierten Monozyten mit $CD4^+$ T-Zellen kultiviert, um zu analysieren, ob TLR8 einen Einfluss auf eine Vitalitäts-induzierte T_{FH} -Zelldifferenzierung hat (6.5). Desweiteren wurden humane Monozyten mit pLa-gekoppelter bakterieller RNA behandelt (6.6). Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulierung humaner Monozyten mit bakterieller RNA von EC $ThyA^-$ zu einer vermehrten Expression von Aktivierungsmarkern in APC (Abb. 32) und nachfolgend zu einer vermehrten T_{FH} -Zellpolarisierung führte (Abb. 33, Abb. 34). Diese Versuche zeigten, dass die Erkennung bakterieller RNA durch Zellen des angeborenen Immunsystems starke stimulatorische Signale zur Differenzierung von T_{FH} -Zellen liefert. Im Gegensatz dazu wurde durch Blockieren der TLR8 Expression in Monozyten deren Fähigkeit, eine T_{FH} -Zellpolarisierung und IL-21-Produktion als Antwort auf lebende Bakterien zu induzieren, reduziert (Abb. 30, Abb. 31). Durch diese Ergebnisse

konnte TLR8 als erster *vita*-PAMP Rezeptor zur Erkennung bakterieller Vitalität in humanen Monozyten identifiziert werden, der durch Regulierung von Zytokinantworten, vor allem der IL-12-Produktion in humanen APC nachfolgende T_{FH}-Zellantworten TLR8-abhängig beeinflusst.

Die Differenzierung von T_{FH}-Zellen ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der durch eine Interaktion von naiven CD4⁺ T-Zellen und APC eingeleitet wird (Crotty, 2014; Goenka et al., 2011; Ma et al., 2012a). Durch die Expression T_{FH}-Zell-spezifischer Gene (Hatzi et al., 2015), können CD4⁺ T-Zellen daraufhin zur B-Zell-Zone in sekundären lymphatischen Organen wandern (Crotty, 2014; Moser et al., 2002), wo durch die Interaktion mit B-Zellen der Phänotyp der T_{FH}-Zellen stabilisiert und die Keimzentrumsreaktion eingeleitet wird (Crotty, 2014; Ebert et al., 2004; Kerfoot et al., 2011; Vinuesa et al., 2016). Durch ein sequentielles Co-Kultursystem wurden in der vorliegenden Arbeit diese Phasen der T_{FH}-Zelldifferenzierung imitiert, indem naive CD4⁺ T-Zellen durch EC-stimulierte autologe Monozyten aktiviert, nach fünf Tagen CD4⁺CXCR5⁺ T-Zellen aus der Co-Kultur separiert und anschließend für weitere sieben Tage mit naiven B-Zellen co-kultiviert wurden. Über diesen Zeitraum blieb der Phänotyp der T_{FH}-Zellen stabil erhalten (**Abb. 16**). Dies weist darauf hin, dass es sich bei den *in vitro* generierten Zellen nicht um T_{FH}-ähnliche Effektor-Zellen handelt. Eine Studie zeigte, dass T_{FH}- und T_{H1}-Zellen in der ersten Phase der Differenzierung phänotypische Ähnlichkeiten aufzeigen und IL-12 über STAT4 einen instabilen IL-21- und Bcl6-exprimierenden T_{FH}/T_{H1}-Zelltyp induziert, welcher darüberhinaus IFN γ und T-bet exprimiert und somit ein Festigen des T_{FH}-Zellphänotyps einschränkt (Nakayama et al., 2011). Um die Funktionalität der *in vitro* generierten T_{FH}-Zellen nachzuweisen, wurden differenzierte CD4⁺CXCR5⁺ T-Zellen aus der Co-Kultur von naiven T-Zellen und EC-stimulierten Monozyten in einem FACS Aria II sortiert und mit naiven B-Zellen co-kultiviert. Die sortierten T_{FH}-Zellen, welche als Antwort auf lebende EC *in vitro* generiert wurden, führten zu einer Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen (**Abb. 17**, **Abb. 18**). Die Aktivierungsmarker CD86 und ICOSL wurden verstärkt exprimiert, während CD19 und MHC-II herunter reguliert waren, was bereits auf eine Differenzierung zu Plasmablasten hinweist (**Abb. 17**). Plasmablasten exprimieren zwar die B-Lymphozyten-Marker CD19 und MHC-II, jedoch sind diese im Vergleich zu gereiften B-Zellen herunter reguliert und gehen im Laufe der Plasmazell-Reifung auf der Oberfläche Antikörper-produzierender B-Zellen gänzlich verloren (Racine et al., 2011). Schließlich konnte die Generierung von CD20^{low}CD38^{hi} Plasmablasten durch FACS-Analysen bestätigt werden, die darüber hinaus zeigten, dass der Kontakt von B-Zellen und *in vitro* differenzierten T_{FH}-Zellen außerdem die

Zahl an Immunglobulin Klassen-gewechselten IgD-IgM-Zellen erhöhte (**Abb. 18**). Diese Effekte wurden auch durch eine Co-Kultur von B-Zellen und autologen zirkulierenden CD4⁺CXCR5⁺ T-Zellen, welche direkt aus humanem Blut FACS-sortiert wurden, induziert (Daten nicht gezeigt). Dies war zu erwarten, da diese Methode bereits in einer Studie angewandt wurde, in der gezeigt wurde, dass humane zirkulierende CD4⁺CXCR5⁺ T-Zellen durch Hilfe von IL-21 eine Differenzierung naïver B-Zellen zu Plasmablasten induzieren (Morita et al., 2011).

Alle für diese Arbeit relevanten Versuche wurden ausschließlich mit frisch aus humanem Blut isolierten Primärzellen durchgeführt. Diese sind weitestgehend durch ihre ursprünglichen organspezifischen Eigenschaften charakterisiert, wodurch das *in vivo*-Verhalten der Zellen wesentlich besser imitiert werden kann, als beispielsweise durch Verwendung etablierter und immortalisierter permanenter Zelllinien. Unter dieser Voraussetzung konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl Rezeptoren, als auch Signale (Zytokine) identifiziert werden, welche eine T_{FH}-Zellpolarisierung begünstigen, und somit potentiell eine Grundlage für die Entwicklung neuartiger Impfstrategien bzw. Adjuvantien darstellen, welche für die Verbesserung bereits existierender Impfstoffe gegen eine Vielzahl infektiöser Krankheiten dringend benötigt werden. Dennoch beruhen die Daten und Schlussfolgerungen dieser Arbeit ausschließlich auf *in vitro*-Versuchen, in denen nur polyklonale und keine Antigen-spezifischen Immunantworten analysiert wurden. Das heißt bei der ausgelösten Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen werden aufgrund der unterschiedlichen Epitope auf der Oberfläche des Antigens mehrere Lymphozytenzellen aktiviert und zur Proliferation, sowie zur Differenzierung in Antikörper-bildende B-Zellen oder Effektor-T-Zellen stimuliert (Janeway, 2001). Dadurch besteht keine exakte Immunspezifität, da es zu Kreuzreaktionen mit ähnlichen Antigen-Epitopen kommen kann. Diese immunologisch unspezifische Aktivierung von Immunzellen muss bei dem angewandten *in vitro*-Testsystem berücksichtigt werden. Da in der vorliegenden Arbeit keine *in vivo*-Versuche durchgeführt wurden, konnten infolgedessen auch keine echten Impfstoffe getestet werden. Alternativ wurden aber zugelassene Impfadjuvantien wie beispielsweise CpG oder MPLA zur Stimulation von APC und somit Beeinflussung der T-Helferzellantworten eingesetzt. Dennoch zeigen diese Limitationen der Arbeit, dass die gewonnenen Ergebnisse noch in entsprechenden *in vivo*-Testsystemen bestätigt werden müssen. Denkbar wäre z.B. ein geeignetes Tiermodell, an dem Impfungen mit Protein-Antigenen wie MPLA, CpG, R848 etc. bzw. EC und HkEC-exprimierenden Antigenen getestet werden könnten. Dabei ist die Maus als Tiermodell ungeeignet, da TLR8 in Mäusen nicht funktionell ist (Guiducci et al., 2013; Kugelberg, 2013)

und somit eine Vergleichbarkeit der *in vitro*-Daten nicht gegeben wäre. Außerdem könnten Probanden bzw. Personen mit einem TLR8-Polymorphismus geimpft und der Einfluss des genetischen Polymorphismus auf deren Immunreaktionen untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass Polymorphismen in TLRs die zelluläre Immunantwort und Zytokinproduktion *in vitro* beeinflussen (Misch und Hawn, 2008). Ein potentieller Zusammenhang zwischen TLR8-Polymorphismen und T_{FH}-Zellantworten könnte die bedeutende Rolle für TLR8 in Immunantworten bei Lebendimpfungen bestärken.

Lebendimpfstoffe, welche stark attenuierte, lebende Erreger enthalten, stellen die erste Generation von Impfstoffen dar und wurden erfolgreich zur Reduktion oder sogar Eradikation tödlicher Krankheiten eingesetzt (Detmer und Glenting, 2006). Sie bieten oft einen lebenslangen Schutz gegen erneute Infektionen und sind damit Totimpfstoffen, welche inaktivierte oder abgetötete Erreger enthalten, deutlich überlegen (Sridhar et al., 2015). Der erste Abwehrmechanismus eines Organismus ist die Erkennung eines eindringenden Pathogens durch das angeborene Immunsystem, welches dessen infektiöse Gefahr genau abschätzt, um angemessene Immunantworten einzuleiten (Blander und Sander, 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Detektion bakterieller Vitalität durch humane APC sowohl angeborene als auch adaptive Immunantworten beeinflusst und somit einen entscheidenden molekularen Mechanismus an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität darstellt. Damit könnte die Erkennung bakterieller Vitalität durch Zellen des angeborenen Immunsystems mit nachfolgender Aktivierung der adaptiven T-Zellimmunität ein wichtiger Ansatz für die Entwicklung neuartiger Lebendimpfstoffe sein. Bislang wurde davon ausgegangen, dass beliebige mikrobielle Signale eine T_{FH}-Zelldifferenzierung induzieren können (Crotty, 2014). Hier wurde gezeigt, dass die Erkennung bakterieller RNA, welche die Vitalität eines Mikroorganismus anzeigt (Sander et al., 2011) und die Erkennung von lebenden Bakterien durch APC bevorzugt zu einer Polarisierung humaner T_{FH}-Zellen führt (6.1 und 6.6). Dieser mikrobielle Stimulus, sowie die Antwort auf bakterielle Vitalität ist konserviert und unabhängig von Spezies-spezifischen Eigenschaften (Abb. 14). Dennoch ist bisher nicht bekannt, ob die Signalwege, welche zu einer T_{FH}-Zelldifferenzierung führen, zwischen Maus und Mensch variieren. Dass jedoch unterschiedliche Zytokine für die Entwicklung muriner und humaner T_{FH}-Zellen benötigt werden, wurde bereits vielfach beschrieben (Batten et al., 2010; Chavele et al., 2015; Crotty, 2014; Debock et al., 2013; Diehl et al., 2012; Eddahri et al., 2009; Eto et al., 2011; Ma et al., 2009; Nurieva et al., 2008; Schmitt et al., 2013; Vogelzang et al., 2008; Yoo und Braciale, 2014; Yu et al., 2015). Die Differenzierung humaner T_{FH}-Zellen als Antwort auf lebende

Bakterien wurde hauptsächlich durch IL-12 induziert, welches Vitalitäts-abhängig von Monozyten gebildet wurde (6.4), während in Mäusen APC-abhängig gebildetes IL-6, IL-27 und Typ I Interferone eine Rolle bei bakteriellen Infektionen spielen (Butler and Kulu, 2015; Nurieva et al., 2008; Suto et al., 2008). Schmitt *et al.* zeigten, dass IL-1 β in Kombination mit weiteren Zytokinen eine untergeordnete Rolle bei der Differenzierung humaner T_{FH}-Zellen spielt, allein aber nicht dazu in der Lage ist (Schmitt et al., 2014b). Letzteres konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (6.4), dennoch stimulierte die Erkennung bakterieller Vitalität eine vermehrte Produktion von IL-1 β in humanen Monozyten (Abb. 20). Im Gegensatz zu den Beobachtungen in der Maus, waren IL-6 IL-27 und IFN β nicht an der Differenzierung humaner T_{FH}-Zellen beteiligt (6.4). Somit konnte gezeigt werden, dass eine *vita*-PAMP induzierte Differenzierung humaner T_{FH}-Zellen im Vergleich zum murinen System durch unterschiedliche Zytokine ausgelöst wird. Viele Studien beschäftigten sich mit der Regulation von T_{FH}-Zellen auf transkriptioneller Ebene (Christie und Zhu, 2014; Liu et al., 2013a) und deren Interaktion mit B-Zellen (Breitfeld et al., 2000; Eddahri et al., 2009; Nutt und Tarlinton, 2011; Schaerli et al., 2000), aber nur wenige Studien untersuchten bisher, durch welche Signale des angeborenen Immunsystems eine T_{FH}-Zellpolarisierung stimuliert wird (Locci et al., 2016; Ma et al., 2009). Kürzlich wurde gezeigt, dass von Monozyten abstammende DC (Mo-DC) TLR9-abhängig T_{FH}-Zellantworten in Mäusen stimulieren können (Chakarov und Fazilleau, 2014). In der vorliegenden Arbeit induzierte eine Stimulation humaner Monozyten mit dem TLR8-Agonisten CL075 eine T_{FH}-Zelldifferenzierung, welche der durch Stimulation mit lebenden EC hervorgerufenen Reaktion ähnlich war (Abb. 33). Im Gegenteil dazu konnte eine Stimulaton mit dem TLR4-Agonisten MPLA oder dem TLR9-Agonisten CpG-DNA keine T_{FH}-Zelldifferenzierung induzieren (Abb. 35, Abb. 36). Desweiteren wurde in einer Studie gezeigt, dass eine Stimulation von Mo-DC durch Hitze getötete Bakterien ausreichte, um eine IL-12-Produktion mit nachfolgender T_{FH}-Zelldifferenzierung zu induzieren (Schmitt et al., 2009). Dies konnte für klassische humane CD14⁺CD16⁻ Monozyten sowie für primäre CD1c⁺ DC (Daten nicht gezeigt) nicht bestätigt werden, deren Stimulation durch HkEC keine IL-12-Produktion und T_{FH}-Zellpolarisierung auslöste (Abb. 20 und 6.1). Daher ist die Identifizierung des Immunrezeptors TLR8 als Regulator der IL-12-Produktion in humanen Monozyten und somit als Signalrezeptor für eine T_{FH}-Zelldifferenzierung möglicherweise von Bedeutung für die Entwicklung neuer Impfadjuvantien, welche spezifisch eine Polarisierung von T_{FH}-Zellen induzieren sollen. Diese Erkenntnisse könnten relevant für die Verbesserung bereits

existierender Lebendimpfstoffe gegen eine Vielzahl infektiöser und nicht-infektiöser Krankheiten sein.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Erkennung bakterieller Vitalität durch humane Monozyten bevorzugt zu einer Differenzierung humaner T_{FH}-Zellen führt und dass dies über APC-abhängige Signale, vor allem IL-12 erfolgt. Humane Monozyten können unabhängig von Virulenzfaktoren, sondern über eine TLR8-vermittelte Erkennung bakterieller RNA, lebende von toten Bakterien unterscheiden. Als Antwort auf die Erkennung lebender Bakterien, induzieren humane Monozyten über IL-12 die Differenzierung funktionaler IL-21-produzierender Bcl6⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD-1⁺ T_{FH}-Zellen, welche nachfolgende B-Zellantworten beeinflussen. Eine Aktivierung von TLR8 in humanen Monozyten durch Transfektion mit bakterieller RNA stimulierte eine T_{FH}-Zellpolarisierung, ein Blockieren der TLR8-Expression in humanen Monozyten hingegen hemmte die *vita*-PAMP-induzierte T_{FH}-Zelldifferenzierung. Somit konnte ein Signalweg des angeborenen Immunsystems identifiziert werden, welcher speziell die Differenzierung humaner T_{FH}-Zellen reguliert. *Vita*-PAMP Rezeptoren wie TLR8 könnten daher ein vielversprechendes Ziel von Adjuvantien darstellen, welche T_{FH}-Zellantworten auslösen und damit die Wirksamkeit moderner Impfstoffe verbessern.

8 Literaturverzeichnis

Abe, M., Shintani, Y., Eto, Y., Harada, K., Fujinaka, Y., Kosaka, M., and Matsumoto, T. (2001). Interleukin-1 β enhances and interferon- γ suppresses activin A actions by reciprocally regulating activin A and follistatin secretion from bone marrow. *Clin. Exp. Immunol.* *1*, 64–68.

Ablasser, A., Poeck, H., Anz, D., Berger, M., Schlee, M., Kim, S., Bourquin, C., Goutagny, N., Jiang, Z., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). Selection of Molecular Structure and Delivery of RNA Oligonucleotides to Activate TLR7 versus TLR8 and to Induce High Amounts of IL-12p70 in Primary Human Monocytes. *J. Immunol.* *182*, 6824–6833.

Adair, P., Kim, Y.C., Pratt, K.P., and Scott, D.W. (2016). Avidity of human T cell receptor engineered CD4 $^+$ T cells drives T-helper differentiation fate. *Cell. Immunol.* *299*, 30–41.

Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4 $^+$ T cells. *Nat. Immunol.* *3*, 549–557.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* *124*, 783–801.

Barnett, L.G., Simkins, H.M.A., Barnett, B.E., Korn, L.L., Johnson, A.L., Wherry, E.J., Wu, G.F., and Laufer, T.M. (2014). B Cell Antigen Presentation in the Initiation of Follicular Helper T Cell and Germinal Center Differentiation. *J. Immunol.* *192*, 3607–3617.

Batten, M., Ramamoorthi, N., Kljavin, N.M., Ma, C.S., Cox, J.H., Dengler, H.S., Danilenko, D.M., Caplazi, P., Wong, M., Fulcher, D.A., et al. (2010). IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* *207*, 2895–2906.

Beesu, M., Caruso, G., Salyer, A.C.D., Khetani, K.K., Sil, D., Weerasinghe, M., Tanji, H., Ohto, U., Shimizu, T., and David, S.A. (2015). Structure-Based Design of Human TLR8-Specific Agonists with Augmented Potency and Adjuvanticity. *J. Med. Chem.* *58*, 7833–7849.

- Bergstrom, B., Aune, M.H., Awuh, J.A., Kojen, J.F., Blix, K.J., Ryan, L., Flo, T.H., Mollnes, T.E., Espevik, T., and Stenvik, J. (2015). TLR8 Senses *Staphylococcus aureus* RNA in Human Primary Monocytes and Macrophages and Induces IFN- Production via a TAK1-IKK-IRF5 Signaling Pathway. *J. Immunol.* *195*, 1100–1111.
- Blander, J.M., and Sander, L.E. (2012). Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 215–225.
- Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Förster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* *11*, 1545–1551.
- Butler, N.S., and Kulu, D.I. (2015). The regulation of T follicular helper responses during infection. *Curr. Opin. Immunol.* *34*, 68–74.
- Cannons, J.L., Lu, K.T., and Schwartzberg, P.L. (2013). T follicular helper cell diversity and plasticity. *Trends Immunol.* *34*, 200–207.
- Chakarov, S., and Fazilleau, N. (2014). Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol. Med.* n/a-n/a.
- Chang, J.T., Wherry, E.J., and Goldrath, A.W. (2014). Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat. Immunol.* *15*, 1104–1115.
- Chavele, K.-M., Merry, E., and Ehrenstein, M.R. (2015). Cutting Edge: Circulating Plasmablasts Induce the Differentiation of Human T Follicular Helper Cells via IL-6 Production. *J. Immunol.* *194*, 2482–2485.
- Chevalier, N., Jarrossay, D., Ho, E., Avery, D.T., Ma, C.S., Yu, D., Sallusto, F., Tangye, S.G., and Mackay, C.R. (2011). CXCR5 Expressing Human Central Memory CD4 T Cells and Their Relevance for Humoral Immune Responses. *J. Immunol.* *186*, 5556–5568.
- Choi, Y.S., Yang, J.A., and Crotty, S. (2013). Dynamic regulation of Bcl6 in follicular helper CD4 T (Tfh) cells. *Curr. Opin. Immunol.* *25*, 366–372.
- Christie, D., and Zhu, J. (2014). Transcriptional Regulatory Networks for CD4 T Cell Differentiation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 125–172.

- Coffman, R.L., Sher, A., and Seder, R.A. (2010). Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity* 33, 492–503.
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F., and Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation: T Helper Cells Plasticity in Inflammation. *Cytometry A* 85, 36–42.
- Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (T_{FH}). *Annu. Rev. Immunol.* 29, 621–663.
- Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* 41, 529–542.
- De Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, C., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Ait-Yahia, S., Banchereau, J., Liu, Y.-J., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). The Cytokine Profile Expressed by Human Dendritic Cells Is Dependent on Cell Subtype and Mode of Activation. *J. Immunol.* 160, 1666–1676.
- Debock, I., Jaworski, K., Chadlaoui, H., Delbaue, S., Passon, N., Twyffels, L., Leo, O., and Flamand, V. (2013). Neonatal Follicular Th Cell Responses Are Impaired and Modulated by IL-4. *J. Immunol.* 191, 1231–1299.
- Deenick, E.K., and Ma, C.S. (2011). The regulation and role of T follicular helper cells in immunity: T follicular helper cells in immunity. *Immunology* 134, 361–367.
- Detmer, A., and Glenting, J. (2006). Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. *Microb Cell Fact* 5.
- Diehl, S.A., Schmidlin, H., Nagasawa, M., Blom, B., and Spits, H. (2012). IL-6 Triggers IL-21 production by human CD4⁺ T cells to drive STAT3-dependent plasma cell differentiation in B cells. *Immunol. Cell Biol.* 90, 802–811.
- Ding, Y., Li, J., Wu, Q., Yang, P., Luo, B., Xie, S., Druey, K.M., Zajac, A.J., Hsu, H.-C., and Mountz, J.D. (2013). IL-17RA Is Essential for Optimal Localization of Follicular Th Cells in the Germinal Center Light Zone To Promote Autoantibody-Producing B Cells. *J. Immunol.* 191, 1614–1624.
- Ebert, L.M., Horn, M.P., Lang, A.B., and Moser, B. (2004). B cells alter the phenotype and function of follicular-homing CXCR5⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 3562–3571.

- Eddahri, F., Denanglaire, S., Bureau, F., Spolski, R., Leonard, W.J., Leo, O., and Andris, F. (2009). Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities. *Blood* *113*, 2426–2433.
- Eigenbrod, T., Pelka, K., Latz, E., Kreikemeyer, B., and Dalpke, A.H. (2015). TLR8 Senses Bacterial RNA in Human Monocytes and Plays a Nonredundant Role for Recognition of *Streptococcus pyogenes*. *J. Immunol.* *195*, 1092–1099.
- Eto, D., Lao, C., DiToro, D., Barnett, B., Escobar, T.C., Kageyama, R., Yusuf, I., and Crotty, S. (2011). IL-21 and IL-6 Are Critical for Different Aspects of B Cell Immunity and Redundantly Induce Optimal Follicular Helper CD4 T Cell (Tfh) Differentiation. *PLoS ONE* *6*, e17739.
- Fan, X., Lin, C., Han, J., Jiang, X., Zhu, J., and Jin, T. (2015). Follicular Helper CD4⁺ T Cells in Human Neuroautoimmune Diseases and Their Animal Models. *Mediators Inflamm.* *2015*, 1–11.
- Fillatreau, S. (2014). Monocyte-derived dendritic cells identified as booster of T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol. Med.* *5*, 574–576.
- Ford, M.L., Adams, A.B., and Pearson, T.C. (2013). Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity. *Nat. Rev. Nephrol.* *10*, 14–24.
- Goenka, R., Barnett, L.G., Silver, J.S., O'Neill, P.J., Hunter, C.A., Cancro, M.P., and Laufer, T.M. (2011). Cutting Edge: Dendritic Cell-Restricted Antigen Presentation Initiates the Follicular Helper T Cell Program but Cannot Complete Ultimate Effector Differentiation. *J. Immunol.* 1091–1095.
- Gómez-Martín, D., Díaz-Zamudio, M., Romo-Tena, J., Ibarra-Sánchez, M.J., and Alcocer-Varela, J. (2011). Follicular helper T cells poise immune responses to the development of autoimmune pathology. *Autoimmun. Rev.* *10*, 325–330.
- Guiducci, C., Gong, M., Cepika, A.-M., Xu, Z., Tripodo, C., Bennett, L., Crain, C., Quartier, P., Cush, J.J., Pascual, V., et al. (2013). RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* *210*, 2903–2919.
- Hale, J.S., and Ahmed, R. (2015). Memory T Follicular Helper CD4 T Cells. *Front. Immunol.* *6*.

- Hatzi, K., Nance, J.P., Kroenke, M.A., Bothwell, M., Haddad, E.K., Melnick, A., and Crotty, S. (2015). BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* 212, 539–553.
- Havenith, S.H.C., Remmerswaal, E.B.M., Idu, M.M., van Donselaar-van der Pant, K.A.M.I., van der Bom, N., Bemelman, F.J., van Leeuwen, E.M.M., ten Berge, I.J.M., and van Lier, R.A.W. (2014). CXCR5+CD4+ follicular helper T cells accumulate in resting human lymph nodes and have superior B cell helper activity. *Int. Immunol.* 26, 183–192.
- Helbig, E.T., Opitz, B., and Sander, L.E. (2013). Adjuvant immunotherapies as a novel approach to bacterial infections. *Immunotherapy* 5, 365–381.
- Herati, R.S., Reuter, M.A., Dolfi, D.V., Mansfield, K.D., Aung, H., Badwan, O.Z., Kurupati, R.K., Kannan, S., Ertl, H., Schmader, K.E., et al. (2014). Circulating CXCR5+PD-1+ Response Predicts Influenza Vaccine Antibody Responses in Young Adults but not Elderly Adults. *J. Immunol.* 193, 3528–3537.
- Holdsworth, S.R., and Gan, P.-Y. (2015). Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 2243–2254.
- Hutloff, A., Dittrich, A.-M., Beier, K.C., and Anagnostopoulos, I. (1999). ICOS is an inducible T-cell costimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263–266.
- Ise, W. (2015). Development and function of follicular helper T cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1–6.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* 16, 343–353.
- Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E.S., Dumortier, H., et al. (2015). OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* 42, 1159–1170.
- Janeway, C.A. (2001). *Immunobiology: the immune system in health and disease* (New York, NY: Garland Publ. [u.a.]).

- Janeway, C.A., and Medzhitov, R. (2002). INNATE IMMUNE RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197–216.
- Kaplan, M.H., Hufford, M.M., and Olson, M.R. (2015). The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 295–307.
- Kashiwakuma, D., Suto, A., Hiramatsu, Y., Ikeda, K., Takatori, H., Suzuki, K., Kagami, S. -i., Hirose, K., Watanabe, N., Iwamoto, I., et al. (2010). B and T Lymphocyte Attenuator Suppresses IL-21 Production from Follicular Th Cells and Subsequent Humoral Immune Responses. *J. Immunol.* *185*, 2730–2736.
- Kasturi, S.P., Skountzou, I., Albrecht, R.A., Koutsonanos, D., Hua, T., Nakaya, H.I., Ravindran, R., Stewart, S., Alam, M., Kwissa, M., et al. (2011). Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* *470*, 543–547.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* *11*, 373–384.
- Keck, S., Schmalzer, M., Ganter, S., Wyss, L., Oberle, S., Huseby, E.S., Zehn, D., and King, C.G. (2014). Antigen affinity and antigen dose exert distinct influences on CD4 T-cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 14852–14857.
- Kerfoot, S.M., Yaari, G., Patel, J.R., Johnson, K.L., Gonzalez, D.G., Kleinstein, S.H., and Haberman, A.M. (2011). Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* *34*, 947–960.
- King, C., Tangye, S.G., and Mackay, C.R. (2008). T Follicular Helper (T_{FH}) Cells in Normal and Dysregulated Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 741–766.
- Kugelberg, E. (2013). Innate immunity: Making mice more human the TLR8 way. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 6–6.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.* *30*, 16–34.
- Lauvau, G. (2001). Priming of Memory But Not Effector CD8 T Cells by a Killed Bacterial Vaccine. *Science* *294*, 1735–1739.

- Le Coz, C., Joublin, A., Pasquali, J.-L., Korganow, A.-S., Dumortier, H., and Monneaux, F. (2013). Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients with an Active Disease. *PLoS ONE* 8, e75319.
- Leddon, S.A., Richards, K.A., Treanor, J.J., and Sant, A.J. (2015). Abundance and specificity of influenza reactive circulating memory follicular helper and non-follicular helper CD4 T cells in healthy adults. *Immunology* 146, 157–162.
- Lee, J.-Y., Skon, C.N., Lee, Y.J., Oh, S., Taylor, J.J., Malhotra, D., Jenkins, M.K., Rosenfeld, M.G., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2015). The Transcription Factor KLF2 Restrains CD4+ T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity* 42, 252–264.
- Leipe, J., and Chang, H.-D. (2015). Effektor-T-Zellen. *Z. Für Rheumatol.* 74, 14–19.
- Linterman, M.A., and Hill, D.L. (2016). Can follicular helper T cells be targeted to improve vaccine efficacy? F1000Research.
- Liu, X., Nurieva, R.I., and Dong, C. (2013a). Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. *Immunol. Rev.* 252, 139–145.
- Liu, Y., Yang, B., Zhou, M., Li, L., Zhou, H., Zhang, J., Chen, H., and Wu, C. (2009). Memory IL-22-producing CD4+ T cells specific for *Candida albicans* are present in humans. *Eur. J. Immunol.* 39, 1472–1479.
- Liu, Y., Yu, S., Li, Z., Ma, J., Zhang, Y., Wang, H., Yang, B., and Wu, C. (2013b). TGF- β Enhanced IL-21-Induced Differentiation of Human IL-21-Producing CD4+ T Cells via Smad3. *PLoS ONE* 8, e64612.
- Locci, M., Wu, J.E., Arumemi, F., Mikulski, Z., Dahlberg, C., Miller, A.T., and Crotty, S. (2016). Activin A programs the differentiation of human TFH cells. *Nat. Immunol.* 8, 976–984.
- Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 1–12.
- Ma, C.S., and Deenick, E.K. (2014). Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol. Cell Biol.* 92, 64–71.

- Ma, C.S., Suryani, S., Avery, D.T., Chan, A., Nanan, R., Santner-Nanan, B., Deenick, E.K., and Tangye, S.G. (2009). Early commitment of naïve human CD4⁺ T cells to the T follicular helper (TFH) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol. Cell Biol.* *87*, 590–600.
- Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., and Tangye, S.G. (2012a). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* *209*, 1241–1253.
- Ma, C.S., Avery, D.T., Chan, A., Batten, M., Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Arkwright, P.D., Kreins, A.Y., Averbuch, D., Engelhard, D., et al. (2012b). Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood* *119*, 3997–4008.
- Mahla, R.S. (2013). Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology. *Front. Immunol.* *4*.
- Mastelic Gavillet, B., Eberhardt, C.S., Auderset, F., Castellino, F., Seubert, A., Tregoning, J.S., Lambert, P.-H., de Gregorio, E., Del Giudice, G., and Siegrist, C.-A. (2015). MF59 Mediates Its B Cell Adjuvanticity by Promoting T Follicular Helper Cells and Thus Germinal Center Responses in Adult and Early Life. *J. Immunol.* *194*, 4836–4845.
- McDonald, P.W., Read, K.A., Baker, C.E., Anderson, A.E., Powell, M.D., Ballesteros-Tato, A., and Oestreich, K.J. (2016). IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. *Nat. Commun.* *7*, 10285.
- McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N., and McHeyzer-Williams, L. (2011). Molecular programming of B cell memory. *Nat. Rev. Immunol.*
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* *449*, 819–826.
- Mesquita Jr, D., Cruvinel, W.M., Resende, L.S., Mesquita, F.V., Silva, N.P., Câmara, N.O.S., and Andrade, L.E.C. (2016). Follicular helper T cell in immunity and autoimmunity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* *49*.
- Misch, E.A., and Hawn, T.R. (2008). Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin. Sci.* *114*, 347–360.

- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity* 34, 108–121.
- Moser, B., Schaerli, P., and Loetscher, P. (2002). CXCR5(+) T cells: follicular homing takes center stage in T-helper-cell responses. *Trends Immunol.* 23, 250–254.
- Moxon, E.R., Das, P., Greenwood, B., Heymann, D.L., Horton, R., Levine, O.S., Plotkin, S., and Nossal, G. (2011). A call to action for the new decade of vaccines. *The Lancet* 378, 298–302.
- Murphy, K.M., Travers, P., and Walport, M. (2009). Die angeborene Immunität. In *Janeway Immunologie*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 53–139.
- Nakayamada, S., Kanno, Y., Takahashi, H., Jankovic, D., Lu, K.T., Johnson, T.A., Sun, H., Vahedi, G., Hakim, O., Handon, R., et al. (2011). Early Th1 cell differentiation is marked by a Tfh cell-like transition. *Immunity* 35, 919–931.
- Nera, K.-P., Kyläniemi, M.K., and Lassila, O. (2015). Regulation of B Cell to Plasma Cell Transition within the Follicular B Cell Response. *Scand. J. Immunol.* 82, 225–234.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity* 29, 138–149.
- Nutt, S.L., and Tarlinton, D.M. (2011). Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat. Immunol.* 131, 472–477.
- Olliver, M., Hiew, J., Mellroth, P., Henriques-Normark, B., and Bergman, P. (2011). Human Monocytes Promote Th1 and Th17 Responses to *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 79, 4210–4217.
- Park, H.-J., Kim, D.-H., Lim, S.-H., Kim, W.-J., Youn, J., Choi, Y.-S., and Choi, J.-M. (2014). Insights into the Role of Follicular Helper T Cells in Autoimmunity. *Immune Netw.* 14, 21.

- Parodi, C. (2014). Follicular helper T lymphocytes in health and disease. *World J. Hematol.* *3*, 118.
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., and Kedl, R.M. (2013). T cell responses: naive to memory and everything in between. *AJP Adv. Physiol. Educ.* *37*, 273–283.
- Pratama, A., and Vinuesa, C.G. (2014). Control of TFH cell numbers: why and how? *Immunol. Cell Biol.* *92*, 40–48.
- Racine, R., McLaughlin, M., Jones, D.D., Wittmer, S.T., MacNamara, K.C., Woodland, D.L., and Winslow, G.M. (2011). IgM production by bone marrow plasmablasts contributes to long-term protection against intracellular bacterial infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 1011–1021.
- Rappuoli, R., Mandl, C.W., Black, S., and De Gregorio, E. (2011). Vaccines for the twenty-first century society. *Nat. Rev. Immunol.*
- Ray, J.P., Marshall, H.D., Laidlaw, B.J., Staron, M.M., Kaech, S.M., and Craft, J. (2014). Transcription Factor STAT3 and Type I Interferons Are Corepressive Insulators for Differentiation of Follicular Helper and T Helper 1 Cells. *Immunity* *40*, 367–377.
- Rookhuizen, D.C., and DeFranco, A.L. (2014). Toll-like receptor 9 signaling acts on multiple elements of the germinal center to enhance antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E3224–E3233.
- Rossi, M., and Young, J.W. (2005). Human Dendritic Cells: Potent Antigen-Presenting Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *J. Immunol.* *175*, 1373–1381.
- Sander, L.E. (2012). Improved vaccines through targeted manipulation of the body's immunological risk-assessment? *BioEssays* *34*, 876–884.
- Sander, L.E., Davis, M.J., Boekschoten, M.V., Amsen, D., Dascher, C.C., Ryffel, B., Swanson, J.A., Müller, M., and Blander, J.M. (2011). Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature* *474*, 385–389.
- Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* *11*, 1553–1562.

- Schmitt, N., and Ueno, H. (2015). Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* *34*, 130–136.
- Schmitt, N., Morita, R., Bourdery, L., Bentebibel, S.E., Zurawski, S.M., Banchereau, J., and Ueno, H. (2009). Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity* *31*, 158–169.
- Schmitt, N., Bustamante, J., Bourdery, L., Bentebibel, S.E., Boisson-Dupuis, S., Hamlin, F., Tran, M.V., Blankenship, D., Pascual, V., Savino, D.A., et al. (2013). IL-12 receptor 1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans. *Blood* *121*, 3375–3385.
- Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., and Ueno, H. (2014a). Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol.* *35*, 436–442.
- Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.-E., Munagala, I., Bourdery, L., Venuprasad, K., Banchereau, J., and Ueno, H. (2014b). The cytokine TGF- β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat. Immunol.* *15*, 856–865.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 591–619.
- Spensieri, F., Borgogni, E., Zedda, L., Bardelli, M., Buricchi, F., Volpini, G., Fragapane, E., Tavarini, S., Finco, O., Rappuoli, R., et al. (2013). Human circulating influenza-CD4+ ICOS1+IL-21+ T cells expand after vaccination, exert helper function, and predict antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 14330–14335.
- Sridhar, S., Brokstad, K.A., and Cox, R.J. (2015). Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines Basel* *3*, 373–389.
- Stauss, D., Brunner, C., Berberich-Siebelt, F., Hopken, U.E., Lipp, M., and Müller, G. (2016). The transcriptional coactivator *Bob1* promotes the development of follicular T helper cells via *Bcl6*. *EMBO J.* *35*, 881–898.
- Suto, A., Kashiwakuma, D., Kagami, S., Hirose, K., Watanabe, N., Yokote, K., Saito, Y., Nakayama, T., Grusby, M.J., Iwamoto, I., et al. (2008). Development and characterization of IL-21-producing CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* *205*, 1369–1379.
- Swain, S.L., McKinstry, K.K., and Strutt, T.M. (2012). Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses. *Nat. Rev. Immunol.*

- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Tangye, S.G., Deenick, E.K., Palendira, U., and Ma, C.S. (2012). T cell-B cell interactions in primary immunodeficiencies: T-B cell interactions in PIDs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1250, 1–13.
- Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly — TFH cells in human health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 412–426.
- Thomas, C.J., and Schroder, K. (2013). Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol.* 34, 317–328.
- Tsai, L.M., and Yu, D. (2014). Follicular helper T-cell memory: establishing new frontiers during antibody response. *Immunol. Cell Biol.* 92, 57–63.
- Ueno, H. (2016). Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. *J. Clin. Immunol.* 36, 34–39.
- Ueno, H., Banchereau, J., and Vinuesa, C.G. (2015). Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat. Immunol.* 16, 142–152.
- Vabret, N., and Blander, J.M. (2013). Sensing Microbial RNA in the Cytosol. *Front. Immunol.* 4.
- Vance, R.E., Isberg, R.R., and Portnoy, D.A. (2009). Patterns of Pathogenesis: Discrimination of Pathogenic and Nonpathogenic Microbes by the Innate Immune System. *Cell Host Microbe* 6, 10–21.
- Vanderleyden, I., Linterman, M.A., and Smith, K.G. (2014). Regulatory T cells and control of the germinal centre response. *Arthritis Res. Ther.* 16.
- Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Yu, D., and MacLennan, I.C.M. (2016). Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 335–368.
- Vogelzang, A., McGuire, H.M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C.R., and King, C. (2008). A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T Follicular Helper Cells. *Immunity* 29, 127–137.

- Wang, H., Geng, J., Wen, X., Bi, E., Kossenkov, A.V., Wolf, A.I., Tas, J., Choi, Y.S., Takata, H., Day, T.J., et al. (2014). The transcription factor Foxp1 is a critical negative regulator of the differentiation of follicular helper T cells. *Nat. Immunol.* *15*, 667–675.
- Weber, J.P., Fuhrmann, F., Feist, R.K., Lahmann, A., Al Baz, M.S., Gentz, L.-J., Vu Van, D., Mages, H.W., Haftmann, C., Riedel, R., et al. (2015). ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *J. Exp. Med.* *212*, 217–233.
- Wille-Reece, U., Flynn, B.J., Loré, K., Koup, R.M., Kedl, R.M., Mattapallil, J.J., Weiss, W.R., Roederer, M., and Seder, R.A. (2005). HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 15190–15194.
- Yoo, J.-K., and Braciale, T.J. (2014). IL-21 Promotes Late Activator APC-Mediated T Follicular Helper Cell Differentiation in Experimental Pulmonary Virus Infection. *PLoS ONE* *9*, e105872.
- Ysebrant de Lendonck, L., Eddahri, F., Delmarcelle, Y., Nguyen, M., Leo, O., Goriely, S., and Marchant, A. (2013). STAT3 Signaling Induces the Differentiation of Human ICOS+ CD4 T Cells Helping B lymphocytes. *PLoS ONE* *8*, e71029.
- Yu, S., Jia, L., Zhang, Y., Zhong, J., Yang, B., and Wu, C. (2015). IL-12 induced the generation of IL-21- and IFN- γ -co-expressing poly-functional CD4+ T cells from human naive CD4+ T cells. *Cell Cycle* *14*, 3362–3372.
- Zheng, S.G. (2013). Regulatory T cells Versus Th17: Differentiation of Th17 Versus Treg, Are They Mutually Exclusive? In *IL-17, IL-22 and Their Producing Cells: Role in Inflammation and Autoimmunity*, V. Quesniaux, B. Ryffel, and F. Padova, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 91–107.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations *. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 445–489.

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jenny Gerhard, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Regulation humaner T-Zell-Antworten durch Detektion bakterieller Vitalität in Antigen-präsentierenden Zellen* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

10 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Jenny Gerhard hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Recognition of microbial viability via TLR8 drives T_{FH} cell differentiation and vaccine responses. Ugolini M*, Gerhard J*, Burkert S*, Jensen KJ, Georg P, Ebner F, Volkers SM, Thada S, Dietert K, Bauer L, Schäfer A, Helbig ET, Opitz B, Kurth F, Sur S, Dittrich N, Gaddam S, Conrad ML, Benn CS, Blohm U, Gruber AD, Hutloff A, Hartmann S, Boekschoten MV, Müller M, Jungersen G, Schumann RR, Suttorp N, Sander LE (* gleichwertiger Beitrag), Nat Immunol. 2018 Apr;19(4):386-396.

Beitrag im Einzelnen: Anteilige Gestaltung der Arbeitshypothese und der experimentellen Methodik, eigenständige experimentelle Laborarbeit, eigenständige statistische Auswertung und Präsentation der Ergebnisse, gemeinsame Diskussion der Ergebnisse und Methodik, anteilige Gestaltung und Verfassung der Veröffentlichungsschrift

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

11 Publikationsliste

Recognition of microbial viability via TLR8 drives T_{FH} cell differentiation and vaccine responses. Ugolini M*, Gerhard J*, Burkert S*, Jensen KJ, Georg P, Ebner F, Volkers SM, Thada S, Dietert K, Bauer L, Schäfer A, Helbig ET, Opitz B, Kurth F, Sur S, Dittrich N, Gaddam S, Conrad ML, Benn CS, Blohm U, Gruber AD, Hutloff A, Hartmann S, Boekschoten MV, Müller M, Jungersen G, Schumann RR, Suttorp N, Sander LE (* gleichwertiger Beitrag), Nat Immunol. 2018 Apr;19(4):386-396.

Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation. Mossakowski AA, Pohlen J, Bremer D, Lindquist R, Millward JM, Bock M, Pollok K, Mothes R, Viohl L, Radbruch M, Gerhard J, Bellmann-Strobl J, Behrens J, Infante-Duarte C, Mähler A, Boschmann M, Rinnenthal JL, Füchtemeier M, Herz J, Pache FC, Bardua M, Priller J, Hauser AE, Paul F, Niesner R, Radbruch H. Acta Neuropathol. 2015 Dec;130(6):799-814

High-resolution intravital microscopy. Andresen V, Pollok K, Rinnenthal JL, Oehme L, Günther R, Spiecker H, Radbruch H, Gerhard J, Sporbert A, Cseresnyes Z, Hauser AE, Niesner R. PLoS One. 2012; 7(12):e50915

Enzyme Selective Flim in Microglia: Studying the Role of NADPH Oxidase in Chronic Neuroinflammation. Niesner R, Gerhard J, Mosakowski AA, Rinnenthal JL, Hauser AE, Pollok K, Radbruch H Biophysical Journal. 01/2012; 102(3):475a

12 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie (Direktor: Prof. Dr. N. Suttorp), Charité – Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt. Für diese Möglichkeit möchte ich meinen Dank all denjenigen aussprechen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Dabei möchte ich mich zuerst ganz herzlich bei Prof. Dr. Leif Sander bedanken, der meine Arbeit in seiner Forschungsgruppe ermöglicht hat. Ich danke ebenfalls meinen Kollegen, vor allem Elisa Helbig, Matteo Ugolini und Philipp Georg, die mir jederzeit mit professioneller und moralischer Unterstützung zur Seite standen. Allen weiteren Mitarbeitern des Forschungsinstituts danke ich für die nette Aufnahme in das Team und die angenehme Atmosphäre. Mein Dank gilt auch Dr. Désirée Kunkel für ihr Bemühen und die Geduld beim Erlernen der durchflusszytometrischen Analysen im BCRT Flow Cytometry Lab, Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien, Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir den Weg in meine berufliche Laufbahn geebnet haben. Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die mich bei meinem Vorhaben unterstützt, mich jederzeit zum Weitermachen ermutigt und mir mit ihrem Zuspruch und den vielen aufmunternden Worten stets das Gefühl gegeben haben, auf dem richtigen Weg zu sein.