

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin  
und dem  
Deutschen Rheuma-Forschungszentrum

DISSERTATION

**Funktionelle Korrelate folliculärer T-Helferzellen in der Lunge von  
Sarkoidose-Patienten und in einem murinen Atemwegs-  
Inflamationsmodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa Jasmin Müller

aus Greven

Datum der Promotion: 03.12.2021

Meinen Eltern und Geschwistern

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abkürzungen .....	iv
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	vi
Abstract .....	vii
Zusammenfassung.....	viii
1 Einleitung.....	1
1.1    TFH-Zellen und die Keimzentrumsreaktion .....	2
1.2    T- und B-Zell-Kooperation in chronisch entzündetem Gewebe .....	5
1.3    Sarkoidose .....	6
1.4    Stand der Wissenschaft und Zielsetzung dieser Arbeit.....	8
2 Material und Methoden .....	9
2.1    Geräte und Softwareprogramme .....	9
2.2    Tierexperimentelle Methoden .....	9
2.2.1    Mäuse .....	9
2.2.2    Adoptiver Transfer.....	10
2.2.3    Immunisierung der Tiere .....	10
2.2.4    ICOS-L Blockade.....	10
2.3    Zellbiologische Methoden .....	11
2.3.1    Isolierung muriner Zellen .....	11
2.3.2    Zellzählung.....	12
2.4    Durchflusszytometrie .....	12
2.4.1    Darstellung von Zelloberflächenproteinen.....	13
2.4.2    Darstellung von zytoplasmatischen Molekülen .....	14
2.4.3    Darstellung von intranukleären Molekülen.....	14
2.4.4    Analyse der durchflusszytometrischen Daten.....	15
2.5    Zellsortierung .....	15
2.5.1    Magnetische Zellsortierung (MACS).....	15
2.5.2    Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS).....	16
2.6    Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA).....	16
2.7    Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	18
2.8    Statistische Analyse .....	19

2.9	Ethikvotum .....	19
3	Ergebnisse .....	20
3.1	Charakterisierung von TFH-Zellen in murinem Lungengewebe.....	20
3.1.1	Mausmodell zur Untersuchung antigenspezifischer T- und B-Zellen im Lymphknoten und entzündeten Lungengewebe .....	20
3.1.2	Effektor-T-Zellen im Lungengewebe und den Atemwegen exprimieren keine klassischen TFH-Zell-Marker .....	21
3.1.3	T-Zellen mit niedriger KLF2-Expression aus der Lunge zeigen einen TFH-ähnlichen, gewebständigen Phänotyp .....	23
3.1.4	IL-21-produzierende T-Zellen aus Lungengewebe zeigen einen TFH-ähnlichen Phänotyp .....	25
3.1.5	IL-21 <sup>+</sup> T-Zellen aus Lungengewebe zeigen einen aktivierten, gewebständigen Phänotyp .....	27
3.1.6	Hauptkomponentenanalyse bestätigt den TFH-ähnlichen Phänotyp der IL-21 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge.....	28
3.1.7	TFH-ähnliche Zellen in der Lunge sind unabhängig von ICOS-Kostimulation .....	31
3.2	Charakterisierung von Korrelaten follikulärer T-Helferzellen in bronchoalveolärer Lavage bei Sarkoidose-Patienten .....	33
3.2.1	BAL T-Zellen zeigen keinen klassischen TFH-Phänotyp.....	34
3.2.2	In den Atemwegen findet sich eine IL-21-produzierende PD-1 <sup>+</sup> T-Zell-Population .....	36
3.2.3	T-Zellen in den Atemwegen zeigen erhöhte Expression des TFH-Zell-Markers CD40L .....	37
3.2.4	BAL T-Zellen haben einen gewebständigen Phänotyp .....	38
3.2.5	IL-21-Produktion in BAL T-Zellen korreliert mit IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion.....	40
3.2.6	Gedächtnis-T-Helferzellen sind in der Lage B-Zell-Hilfe zu leisten.....	42
3.2.7	PBMC von Sarkoidose-Patienten exprimieren mehr CD40L, PD-1 und CXCR3 im Vergleich zu gesunden Probanden.....	43
3.3	Charakterisierung von B-Zellen in bronchoalveolärer Lavage bei Sarkoidose-Patienten.....	44
3.3.1	In der BAL finden sich klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen, aber keine Keimzentrums-B-Zellen.....	45
3.3.2	BAL B-Zellen zeigen Charakteristika von chronisch-aktivierten, gewebständigen B-Zellen .....	47
3.3.3	Erhöhte Immunglobulin-Konzentrationen in bronchoalveolärer Lavage von Sarkoidose-Patienten .....	49
4	Diskussion.....	51
4.1	TFH-ähnliche Zellen aus murinem Lungengewebe und humaner BAL im Vergleich .....	51
4.1.1	Fehlende Expression von Bcl-6 und CXCR5 auf T-Zellen im entzündeten Lungengewebe .....	52

---

4.1.2	PD-1 als TFH-Zell-Marker und potentieller therapeutischer Angriffspunkt im entzündeten Lungengewebe.....	54
4.1.3	TFH-Signaturzytokin IL-21 im entzündeten Gewebe und als potentieller therapeutischer Ansatzpunkt.....	56
4.1.4	Die Rolle von ICOS als TFH-Marker im Lungengewebe.....	57
4.1.5	CD40L als TFH-Zell-Marker und potentieller therapeutischer Angriffspunkt im entzündeten Lungengewebe.....	59
4.2	B-Zellen aus humaner BAL und murinem Lungengewebe im Vergleich.....	60
4.3	Limitationen.....	62
4.4	Relevanz und Perspektiven.....	63
	Literaturverzeichnis.....	66
	Eidesstattliche Versicherung.....	80
	Lebenslauf.....	81
	Publikationsliste.....	82
	Danksagung.....	83

## Abkürzungen

BAL	bronchoalveoläre Lavage
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6</i> ; B-Zell Lymphom 6
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSA	bovines Serumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD40L	CD40-Ligand
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Cish	<i>cytokine-inducible SH2-containing protein</i> ; Zytokin-induzierbares SH-2-beinhaltendes Protein
CVID	variables Immundefektsyndrom
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
D <sub>LCO</sub>	Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenstoffmonoxid
DM	Diabetes mellitus
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
DZ	dendritische Zelle
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i> , Europäisches Institut für Bioinformatik
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
ELS	<i>ectopic lymphoid structures</i> ; ektopisch lymphatische Strukturen
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FcRL4	<i>Fc-Receptor-like 4</i> ; Fc-Rezeptor ähnliches Protein 4
FCS	fetales Kälberserum
FDZ	follikulär dendritische Zelle
FEV <sub>1</sub>	<i>Forced expiratory volume in 1 second</i> ; Einsekundenkapazität
FSC	<i>forward scatter</i>
geoMFI	<i>geometric mean fluorescence intensity</i> ; geometrisches Mittel der Fluoreszenzintensität
GFP	<i>green fluorescent protein</i> ; grün fluoreszierendes Protein
GP	Glykoprotein
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> ; humanes Leukozyten Antigen
iBALT	<i>inducible bronchus-associated lymphoid tissue</i> , Induzierbares Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe
ICOS	<i>inducible T cell costimulator</i> ; induzierbarer T-Zell Kostimulator
ICOS-L	<i>inducible T cell costimulator ligand</i> ; Ligand des induzierbarer T-Zell Kostimulator
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILD	<i>interstitial lung disease</i> ; interstitielle Lungenerkrankung
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JAK	Januskinase

---

KLF2	<i>krüppel-like factor 2</i>
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic-activated cell separation</i> ; Magnetische Zellsortierung
MS	Multiple Sklerose
MTX	Methotrexat
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NIP	iodiertes Nitrophenol
NP	Nitrophenol
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> ; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-Azetat
PNA	<i>peanut agglutinin</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i> ; P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PZ	Plasmazelle
RA	Rheumatoide Arthritis
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
SAP	<i>SLAM associated protein</i> , SLAM assoziiertes Protein
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SEM	<i>standard error of mean</i> , Standardfehler
SLAM	<i>signaling lymphocytic molecule</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SLO	sekundär lymphatisches Organ
SM	Smarta
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling proteins</i> ; Suppressor von Zytokin Signalproteinen
SPF	spezifisch pathogenfrei
SSC	<i>sideward scatter</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i> ; Signalgeber und Aktivator der Transkription
TFH	<i>T-follicular helper cell</i> , Follikuläre T-Helferzelle
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$
Th	T-Helferzelle
Thy-1.1	Thymozyten Antigen 1 Isoform 1
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
VC	<i>vital capacity</i> ; Vitalkapazität

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> T- und B-Zell-Interaktion in sekundär lymphatischen Organen und im entzündeten Gewebe .....	4
<b>Abbildung 2</b> Schematische Übersicht Atemwegs-Inflamationsmodell .....	20
<b>Abbildung 3</b> Es finden sich Keimzentrums-B-Zellen, aber keine klassischen TFH-Zellen im entzündeten Lungengewebe. ....	22
<b>Abbildung 4</b> KLF2 <sup>-</sup> T-Zellen zeigen einen TFH-ähnlichen Phänotyp.....	24
<b>Abbildung 5</b> TFH-Zell-Marker werden in IL-21 <sup>+</sup> und IL-21 <sup>-</sup> Zellen differentiell exprimiert .....	26
<b>Abbildung 6</b> IL-21 <sup>+</sup> T-Zellen aus der Lunge sind aktiviert und gewebständig .....	28
<b>Abbildung 7</b> TFH-Zellen aus dem Lymphknoten und TFH-ähnliche Zellen aus der Lunge zeigen ähnliche Gen-Expressionsmuster.....	30
<b>Abbildung 8</b> TFH-ähnliche Zellen in der Lunge sind von ICOS unabhängig .....	32
<b>Abbildung 9</b> Analyse von CD45RO <sup>+</sup> FoxP3 <sup>-</sup> T-Zellen aus BAL, Tonsille und PBMC .....	34
<b>Abbildung 10</b> BAL T-Zellen zeigen keinen klassischen TFH-Phänotyp .....	35
<b>Abbildung 11</b> PD-1 <sup>+</sup> T-Zellen in den Atemwegen produzieren IL-21 .....	36
<b>Abbildung 12</b> T-Zellen der Atemwegen zeigen eine erhöhte Expression des TFH-Zell-Marker CD40L .....	38
<b>Abbildung 13</b> BAL T-Zellen zeigen einen aktivierten, gewebständigen Phänotyp.....	39
<b>Abbildung 14</b> Unter den BAL T-Zellen finden sich IFN- $\gamma$ -IL-21-Doppelproduzenten und IL-2-IL-21-Doppelproduzenten .....	41
<b>Abbildung 15</b> Gedächtnis-T-Helferzellen aus der BAL sind in der Lage B-Zell-Hilfe zu leisten.....	42
<b>Abbildung 16</b> Zirkulierende T-Helferzellen von Sarkoidose Patienten exprimieren mehr CD40L, PD-1 und CXCR3 als gesunde Probanden .....	43
<b>Abbildung 17</b> Analyse von CD19 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> B-Zellen aus BAL, Tonsille und PBMC.....	45
<b>Abbildung 18</b> In der BAL sind die Anteile von naiven B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen vergleichbar mit der Tonsille, BAL B-Zellen zeigen aber keinen Keimzentrums-Phänotyp .....	46
<b>Abbildung 19</b> BAL B-Zellen zeigen einen chronisch-aktivierten, gewebständigen Phänotyp.....	48
<b>Abbildung 20</b> Erhöhte Immunglobulin-Konzentrationen in BAL von Sarkoidose-Patienten.....	50
<b>Tabelle 1</b> Liste der verwendeten Geräte und Softwareprogramme.....	9
<b>Tabelle 2</b> Liste verwendeter monoklonaler Antikörper.....	13
<b>Tabelle 3</b> Liste der ELISA-Antikörper und -Standards. ....	17
<b>Tabelle 4</b> Übersicht über die Studienpopulation .....	18

## Abstract

Follicular helper T cells (TFH), a subpopulation of helper T cells, orchestrate the differentiation of B cells into memory B cells as well as long-lived, high-affinity, antibody-producing plasma cells during the germinal center reaction in secondary lymphoid organs. Therefore, TFH cells are essential for a fast and effective humoral immune reaction and their key role in the adaptive immune response makes them an ideal target in conditions with exaggerated B cell responses like autoimmune diseases.

Germinal center reactions do not only take place in secondary lymphoid organs but can be observed in ectopic lymphoid structures (ELS) in inflamed tissue as well. Since the development of ELS requires a strong stimulus they rarely occur in autoimmune diseases. However, unstructured lymphocytic infiltrates with T, B and plasma cells are detected quite frequently in autoimmunity. Therefore, the question arises whether T cells provide B cell help in these unstructured infiltrates and act as follicular helper-like T cells. In recent studies, a TFH-like cell population providing B cell help in inflamed tissues has been described.

The objective of this study was a further phenotypic characterization of TFH-like cells and their B helper potential using flow cytometry of T cells in lung tissue in a murine airway-inflammation-model and bronchoalveolar lavage (BAL) of sarcoidosis patients.

The data show that classical CXCR5<sup>+</sup> Bcl-6<sup>+</sup> TFH cells were neither detectable in human BAL samples nor in murine lung tissue. However, CD4<sup>+</sup> T cells producing IL-21 and expressing high levels of PD-1 were observed. Expression of CD40L and the ability to stimulate immunoglobulin production in coculture with B cells demonstrated the B cell helper potential of human BAL T cells. IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells from murine lung resembled classical TFH cells from the lymphnode in terms of their transcriptional profile. In comparison to classical TFH cells, TFH-like cells in lung tissue seemed to develop and function independently of the costimulatory molecule ICOS. Furthermore, it was shown that TFH-like cells from the lung expressed homing receptors such as CXCR3, CCR2 and CCR5 which are likely to facilitate the immigration into inflamed tissue.

This study indicates that IL-21-producing PD-1<sup>+</sup> helper T cells in the inflamed airway and lung display a TFH-like phenotype and thereby broaden the spectrum of T cells with B cell helper potential. The shared expression of PD-1, IL-21 and CD40L on classical TFH as well as TFH-like cells makes these molecules potential targets against pro-inflammatory T cells in SLO as well as inflamed tissues.

## Zusammenfassung

Follikuläre T-Helferzellen stellen eine Subpopulation von T-Helferzellen dar, die im Rahmen der Keimzentrumsreaktion die Differenzierung von B-Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen sowie langlebigen, hochaffinen, antikörperproduzierenden Plasmazellen in sekundär lymphatischen Organen steuert. Somit sind TFH-Zellen unverzichtbar für eine effektive, schnelle humorale Immunantwort und ihre Schlüsselrolle in der adaptiven Immunantwort macht sie zu einem idealen Target bei überschießenden B-Zell-Immunantworten, wie beispielsweise in Autoimmunerkrankungen.

Keimzentrumsreaktionen finden nicht nur in sekundär lymphatischen Organen statt, sondern lassen sich auch in ektopisch lymphatischen Strukturen im entzündeten Gewebe nachweisen. Da zur Entstehung von ELS starke Stimuli benötigt werden, finden sie sich nur selten bei Autoimmunerkrankungen. Hier lassen sich jedoch häufig unstrukturierte lymphatische Infiltrate mit T-, B- und Plasmazellen (PZ) nachweisen. Daraus ergibt sich die Frage, ob T-Zellen in diesen unstrukturierten Infiltraten B-Zell-Hilfe leisten und ob sie als TFH-ähnliche Zellen agieren. In aktuellen Studien wurden bereits TFH-ähnliche Zellpopulation im entzündeten Gewebe beschrieben.

Mit Hilfe eines Atemwegs-Inflamationsmodells in der Maus und bronchoalveolärer Lavage von Sarkoidose-Patienten wurden lungeninfiltrierende T-Helferzellen durchflusszytometrisch auf die Expression von TFH-Zell-Markern und ihr B-Zell-Helfer-Potential hin untersucht.

Weder in der humanen BAL, noch im murinen Lungengewebe konnten klassische CXCR5<sup>+</sup> Bcl-6<sup>+</sup> TFH-Zellen nachgewiesen werden. Jedoch fand sich eine klar definierbare Population IL-21-produzierender PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dass diese Zellen B-Zell-Hilfe leisten können, zeigte zum einen die Expression von CD40L, zum anderen die Induktion der Immunglobulinproduktion in Kokultur von T-Helferzellen aus der BAL mit B-Zellen. IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Lunge und klassische TFH-Zellen aus dem Lymphknoten im Atemwegs-Inflamationsmodell ähnelten sich außerdem stark in ihrem transkriptionellen Profil. Im Vergleich zu klassischen TFH-Zellen konnte gezeigt werden, dass TFH-ähnliche Zellen in der Lunge von dem Kostimulator ICOS unabhängig zu sein scheinen. Des Weiteren exprimierten TFH-ähnliche Zellen aus der Lunge die Migrationsmarker CXCR3, CCR2 und CCR5, um in das entzündete Gewebe einwandern zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass IL-21-produzierende PD-1<sup>+</sup> T-Helferzellen in den entzündeten Atemwegen einen TFH-ähnlichen Phänotyp besitzen und das Spektrum der B-Zell-helfenden T-Zellen erweitern. Die gleichzeitige Expression von PD-1, IL-21 und CD40L auf klassischen TFH-Zellen und TFH-ähnlichen Zellen macht diese Moleküle zu idealen Targets gegen proinflammatorische T-Zellen in SLO und entzündetem Gewebe.

## 1 Einleitung

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich vornehmlich durch zwei Eigenschaften aus. Zum einen verfügt es über eine nahezu unendlich große Zahl an Antigenrezeptoren, die den Körper vor unbekanntem oder mutierten Pathogenen schützen können. Zum anderen kann das adaptive Immunsystem ein immunologisches Gedächtnis ausbilden und somit bei einem erneuten Kontakt mit einem Krankheitserreger schnell, stark und präzise reagieren <sup>1</sup>.

Die wesentlichen Funktionen der adaptiven Immunantwort werden durch T- und B-Lymphozyten, die einen Antigen-spezifischen Rezeptor, den T- beziehungsweise B-Zell-Rezeptor (TZR, BZR) exprimieren, übernommen. Diese Rezeptoren entstehen durch zufällige somatische Rekombination ihrer Erbinformation. Durch positive und negative Selektion im Thymus beziehungsweise im Knochenmark überleben nur die Zellen, die einen gut funktionierenden Rezeptor vorweisen können, aber keine Autoantigene erkennen <sup>2,3</sup>.

B-Zellen durchlaufen in den sekundär lymphatischen Organen (SLO) während der Keimzentrumsreaktion eine weitere Veränderung ihres Rezeptors. Während dieses Prozesses proliferieren die B-Zellen und durchlaufen den Prozess der somatischen Hypermutation, um schließlich zu Gedächtnis-B-Zellen oder hochaffinen, langlebigen Plasmazellen (PZ) zu reifen, welche ihren BZR in Form löslicher Immunglobuline (Ig) sezernieren. Im Anschluss an die somatische Hypermutation werden die B-Zellen selektiert, die das Antigen mit der höchsten Affinität binden, gleichzeitig aber nicht autoreaktiv sind. Diese Selektion ist nur mit Hilfe der passenden T-Zelle möglich, die das selbe Antigen wie die B-Zelle erkennt <sup>4</sup>.

Bevor die Lymphozyten auf ihr zugehöriges Antigen treffen, werden sie als naive Lymphozyten bezeichnet, danach als Effektor- oder Gedächtnislymphozyten. Die T-Effektorzellen lassen sich in drei wesentliche Subpopulationen teilen. Zytotoxische T-Zellen induzieren den programmierten Zelltod in von intrazellulären Pathogenen befallenen oder entarteten Zellen und lassen sich anhand der Expression von CD8 erkennen. T-Helferzellen (Th) dirigieren durch Zytokinproduktion andere Immunzellen der angeborenen und adaptiven Abwehr und exprimieren CD4. Regulatorische T-Zellen (Treg) schützen das Gewebe durch Unterbinden einer überschießenden Immunantwort. Analog zu den T-Helferzellen exprimieren Treg CD4 und zusätzlich FoxP3 (*Forkhead-Box-Protein P3*), durch welches sie sich identifizieren lassen <sup>1</sup>.

Durch das Zusammenspiel von T- und B-Zellen kann eine hoch spezifische, schnell reagierende humorale und zelluläre Immunantwort gegen ein Pathogen gewährleistet werden.

## 1.1 TFH-Zellen und die Keimzentrumsreaktion

T-Helferzellen lassen sich in verschiedene Subgruppen mit unterschiedlichen Aufgaben unterteilen. Dazu zählen als wichtigste Vertreter: Th1, Th2, Th17, folliculäre T-Helferzellen (TFH) und regulatorische T-Zellen. Durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren (T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t, BCL-6 und FoxP3) und der Sekretion ihrer charakteristischen Zytokine Interferon (IFN)- $\gamma$ , Interleukin (IL)-4/IL-5, IL-17, IL-21 und IL-10/transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) lassen sie sich voneinander unterscheiden. Unabhängig davon, ob an einer Immunantwort vor allem Th1-, Th2- oder Th17-Zellen beteiligt sind, entstehen folliculäre T-Helferzellen, die B-Zellen bei der Differenzierung in hochaffine, antikörperproduzierende Plasmazellen unterstützen. TFH-Zellen induzieren und regulieren die somatische Hypermutation, die Selektion der hochaffinen B-Zellen und den Isotypwechsel<sup>5</sup>. Zu erkennen sind TFH-Zellen anhand der Expression der Moleküle *programmed cell death protein 1* (PD-1) und CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5 (CXCR5) und aufgrund ihrer Lokalisation in den B-Zell-Follikeln. Die Erstbeschreibung dieser Zellen erfolgte im Jahr 2000 von Breitfeld und Kollegen sowie Schaerli und Kollegen<sup>6,7</sup>.

Ein zentraler Aspekt der adaptiven Immunantwort ist die Keimzentrumsreaktion mit der Interaktion von T- und B-Zellen. Diese findet zeitlich und örtlich strukturiert in sekundär lymphatischen Organen (SLO), zu denen die Milz, die Tonsillen oder die Lymphknoten zählen, statt. Die SLO bestehen aus zwei Kompartimenten: Der T-Zell-Zone, in der sich die T-Zellen aufhalten, und den B-Zell-Follikeln, auch primäre Lymphfollikel genannt, in denen die B-Zellen zu finden sind. Diese Zonen entwickeln sich aufgrund verschiedener Chemokin-Expressionsmuster. In der T-Zell-Zone sezernieren Stromazellen und dendritische Zellen (DZ) CCL19 und CCL21<sup>4</sup>. Die T-Zellen exprimieren den passenden Rezeptor CCR7. Im B-Zell-Follikel wird CXCL13, der Ligand für den Rezeptor CXCR5, der sich unter anderem auf B-Zellen befindet, von folliculär dendritischen Zellen (FDZ) produziert<sup>8</sup>.

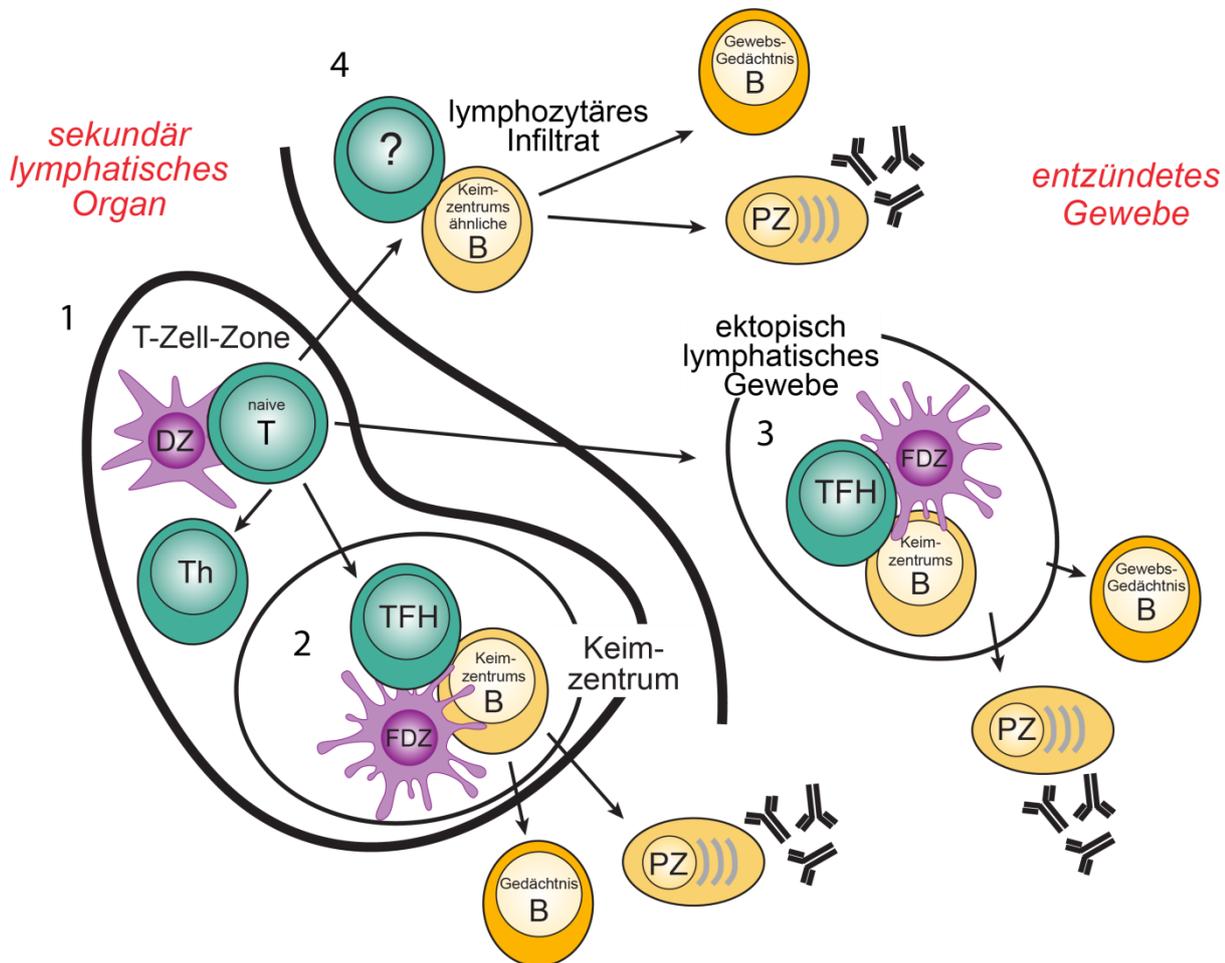
DZ, die periphere Antigene aufgenommen und prozessiert haben, wandern in die T-Zell-Zone und präsentieren Epitope des Antigens an naive T-Helferzellen, die bei Kontakt mit dem passenden Antigen aktiviert werden. Die T-Helferzellen differenzieren daraufhin in verschiedene Subtypen, unter anderem beginnen einige von ihnen den Rezeptor CXCR5 zu exprimieren und in Richtung B-Zell-Follikel zu wandern<sup>6,9</sup>. Analog zu den DZ in der T-Zell-Zone fungieren FDZ als antigen-präsentierende Zellen in den B-Zell-Follikeln. Erkennt eine B-Zelle das präsentierte Antigen, internalisiert und prozessiert sie dieses. Durch Expression des Chemokinrezeptors CCR7 wandert die B-Zelle an die Grenze zwischen T-Zell-Zone und B-Zell-Follikel, wo sie auf die CXCR5 exprimierende T-Helferzelle trifft. Sobald die T-Helferzelle das von den B-Zellen präsentierte Epitop erkennt, führt dies zur Expression von CD40-Ligand (CD40L) und Interaktion mit CD40 auf der B-Zelle, wodurch die B-Zelle Überlebenssignale erhält. Zudem beginnen die T-Zellen mit der Freisetzung des Zytokins

IL-21, um die Differenzierung und Proliferation der B-Zellen zu steigern. Neben CD40L und CD40 kommunizieren B- und T-Zellen über den induzierbaren T-Zell Kostimulator (ICOS) auf T-Zellen und dessen Liganden (ICOS-L) auf B-Zellen. Diese beiden Kommunikationswege sind auch für die Differenzierung der T-Helferzelle in eine folliculäre T-Helferzelle von Bedeutung<sup>4</sup>. Bedingt durch die Produktion von IL-6 durch B-Zellen und DZ sowie IL-21 durch T-Helferzellen, wird der Transkriptionsfaktor STAT3 in Th-Zellen aktiviert, welcher wiederum den Mastertranskriptionsfaktor *B-cell lymphoma 6* (Bcl-6), dessen Expression charakteristisch für TFH-Zellen ist, induziert<sup>10-12</sup>. Über *signaling lymphocytic molecule* (SLAM) und *SLAM associated protein* (SAP) wird gleichzeitig der Kontakt zwischen T- und B-Zelle stabilisiert. Das Zusammentreffen von T- und B-Zellen an der Grenze zwischen T-Zell-Zone und B-Zell-Follikel führt zur Differenzierung von einigen B-Zellen in extrafollikuläre Plasmablasten, die bereits in der frühen Phase der Immunantwort beginnen, Antikörper mit einer moderaten Affinität zu produzieren<sup>13,14</sup>.

Zusammen mit den TFH-Zellen wandern einige B-Zellen tiefer in den B-Zell-Follikel, um Keimzentren, auch als sekundäre Lymphfollikel bezeichnet, zu bilden, die zu rund 90 % aus Keimzentrums-B-Zellen und zu 10 % aus TFH-Zellen bestehen. Sie stellen ein hoch strukturiertes Mikromilieu dar, in dem die Affinitätsreifung, Selektion und Proliferation der Keimzentrums-B-Zellen stattfindet. Histologisch und funktionell können die Keimzentren in zwei Bereiche unterteilt werden: Zuerst befinden sich die Keimzentrums-B-Zellen als Zentroblasten in der dunklen Zone, in der sie proliferieren und die somatische Hypermutation durchlaufen. Die somatische Hypermutation dient der Diversifizierung des BZR. Hierbei entstehen zufällige Punktmutationen in dem Gen des Rezeptors, wodurch dieser an Affinität gewinnen oder verlieren kann. B-Zellen durchlaufen mehrere Runden Zellteilung und somatischer Hypermutation, bevor sie in die helle Zone zurückkehren, wo sie Antigene von den FDZ aufnehmen<sup>15</sup>. Nur B-Zellen mit höchst affinen BZR erhalten Überlebenssignale von TFH-Zellen während der sogenannten Affinitätsreifung in Form von CD40L und IL-21<sup>16</sup>. Auch der Isotypwechsel der B-Zellen wird über die Interaktion von CD40-CD40L koordiniert. Der Isotypwechsel ermöglicht es verschiedene Klassen von Antikörpern zu produzieren, die sich in ihren Effektorfunktionen unterscheiden<sup>4</sup>. Durch ein noch unbekanntes Signal verlassen die B-Zellen das Keimzentrum als langlebige, hochaffine Plasmazellen (PZ) oder als Gedächtnis-B-Zellen<sup>15</sup>.

TFH-Zellen sind essentiell für eine schnelle, effektive humorale Immunantwort. Eine vermehrte oder verminderte Anzahl beziehungsweise Funktion von TFH-Zellen ist deshalb mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Viele Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), Primäre Biliäre Zirrhose, Autoimmunthyreoiditis, Myasthenia gravis,

Rheumatoide Arthritis (RA) oder das Sjögren-Syndrom gehen mit einer erhöhten Frequenz an TFH-Zellen einher<sup>17-22</sup>. Vinuesa und Kollegen zeigten im Mausmodell, dass eine überdurchschnittliche



**Abbildung 1 T- und B-Zell-Interaktion in sekundär lymphatischen Organen und im entzündeten Gewebe.** (1) In sekundär lymphatischen Organen (SLO) präsentieren dendritische Zellen (DZ) in der T-Zell-Zone prozessiertes Antigen an naive T-Lymphozyten. Diese differenzieren in verschiedene Subgruppen von T-Helferzellen (Th), unter anderem folliculäre T-Helferzellen (TFH). (2) TFH-Zellen wandern ins Keimzentrum und koordinieren somatische Hypermutation, Affinitätsreifung und Isotypwechsel der Keimzentrum-B-Zellen. Resultat der Keimzentrumreaktion ist die Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen (PZ). (3) Auch in entzündetem Gewebe kann ektopisch lymphatisches Gewebe (ELS) mit Keimzentren entstehen. Hier findet die Keimzentrumreaktion analog zum Keimzentrum in SLOs statt. (4) Ist der inflammatorische Stimulus nicht stark genug, bilden sich keine ELS sondern unstrukturierte lymphozytäre Infiltrate. Auch hier sind Keimzentrum-ähnliche B-Zellen, PZs und gewebespezifische Gedächtnis-B-Zellen zu finden. Wie die TFH-ähnliche Zelle, die in diesen Infiltraten B-Zell-Hilfe leistet, identifiziert werden kann, ist momentan Gegenstand der Forschung.

Anzahl von TFH-Zellen und Keimzentren nicht nur eine Folge, sondern auch ein Auslöser von Autoimmunität sein kann<sup>23</sup>. Dass unter Steroidtherapie die TFH-Zellzahl zusammen mit den Autoantikörpertitern in SLE Patienten sinken ist ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Autoimmunität und TFH-Zellen<sup>24</sup>. Verschiedene primäre Immundefizienzen stehen dagegen mit einer verminderten Anzahl und einem Funktionsverlust von TFH-Zellen in Zusammenhang<sup>25</sup>. Viele Patienten, die an einem variablen Immundefektsyndrom (CVID) leiden,

zeigen beispielsweise eine stark dezimierte Population an TFH-Zellen. Zudem führen Mutationen in TFH-Zell-relevanten Genen wie SAP, CD40L, ICOS oder STAT2 zu Krankheitsbildern wie X-chromosomalem lymphoproliferativen Syndrom, Hyper-IgM- oder Hyper-IgE-Syndrom<sup>25-27</sup>.

## 1.2 T- und B-Zell-Kooperation in chronisch entzündetem Gewebe

Sowohl in der protektiven, als auch in der pathologischen Immunantwort können T- und B-Zellen auch außerhalb der SLOs miteinander interagieren. In chronisch entzündetem Gewebe finden sich häufig lymphozytäre Aggregate, in welchen T-B-Zell-Kooperation stattfindet<sup>28</sup>. Diese Infiltrate variieren in Größe und Organisation von kleinen, lose beieinander liegenden Lymphozyten bis hin zu organisierten ektopisch lymphatischen Strukturen (ELS)<sup>28,29</sup>. Ektopisch lymphatische Strukturen, auch tertiäre lymphatische Organe genannt, zeigen eine Kompartimentierung analog zur T-Zell-Zone und B-Zell-Follikeln in SLOs. Außerdem zeichnen sie sich durch die Anwesenheit von FDZ und hochendothelialen Venolen aus, die den T- und B-Lymphozyten den Eintritt ins Gewebe erleichtern<sup>30</sup>. Analog zu den SLO wird die Organisation und Struktur der ELS durch Chemokine, unter anderem CXCL12, CXCL13, CCL19 und CCL21, gewährleistet<sup>31,32</sup>. In einigen dieser ELS entwickeln sich Keimzentren mit klassischen TFH-Zellen, die CXCR5, Bcl-6, PD-1 und ICOS exprimieren. Analog zu ELS in sekundär lymphatischen Organen findet hier somatische Hypermutation, Isotypwechsel und Differenzierung zu Plasmazellen statt<sup>30,33-35</sup>. Da ektopisch lymphatische Strukturen sich bei ausreichend starkem inflammatorischem Reiz neu bilden und nach Abklingen der Entzündung wieder auflösen, bezeichnet man den Prozess der Entstehung auch als lymphoide Neogenese<sup>28,36</sup>. Die Zellen aus ektopisch lymphatischen Strukturen sind zudem auch in der Lage ein immunologisches Gedächtnis auszubilden<sup>37</sup>. Ektopisch lymphatische Strukturen, die sich in der Lunge bilden, werden auch als induzierbares Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe (iBALT) bezeichnet und zeigen die typische Kompartimentierung in T-Zell-Zone und B-Zell-Follikel, CXCL13-Expression und die Anwesenheit von Keimzentrums-B-Zellen<sup>38</sup>. Ektopisch lymphatische Strukturen bilden sich bei Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Tumorerkrankungen und Transplantatabstoßung<sup>39-43</sup>. Durch die Bildung von ELS als Antwort auf Infektionen kann eine bessere Koordination der Immunantwort gewährleistet werden und in Tumorerkrankungen, wie kolorektalem Karzinom oder Brustkrebs, ist die Entstehung von ektopisch lymphatischen Strukturen mit einer besseren Prognose assoziiert<sup>40,42,44</sup>. In Autoimmunerkrankungen wie RA, MS, Sjögren-Syndrom, SLE oder Hashimoto-Thyreoiditis konnten teilweise ebenfalls ELS nachgewiesen werden<sup>17,45-48</sup>.

Für die Entwicklung von ELS braucht es jedoch einen starken Stimulus, wie beispielsweise eine Virusinfektion<sup>49</sup>. Daher ist das Auftreten von ELS in Autoimmunerkrankungen, mit Ausnahme von

Hashimoto-Thyreoiditis, eher selten der Fall <sup>29,50-52</sup>. In Autoimmunerkrankungen finden sich eher unorganisierte, lymphozytäre Infiltrate, ohne FDZ, klassische Bcl-6<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> TFH-Zellen oder Keimzentren. Dennoch lassen sich Hinweise auf lokal stattfindende somatische Hypermutation und klonal verwandte BZR in den Infiltraten finden <sup>53</sup>. Es wird vermutet, dass diese unstrukturierten Infiltrate womöglich die Entstehung autoreaktiver Zellen fördern. Da die Anzahl der T-Zellen in den Infiltraten nicht so stark limitiert ist wie in klassischen Keimzentren, fehlt der Selektionsreiz für die höchste Affinität zum Antigen und autoreaktive B-Zellen erhalten häufiger Überlebenssignale <sup>54</sup>.

### 1.3 Sarkoidose

Sarkoidose ist eine Multisystemerkrankung, die durch die Entstehung nicht-verkäsender Granulome gekennzeichnet ist <sup>55</sup>. Die pulmonale Sarkoidose ist mit über 90 % die häufigste Manifestation dieser Erkrankung, sie kann jedoch auch zahlreiche andere Organe befallen <sup>56</sup>. Die Bezeichnung Sarkoidose geht zurück auf Caesar Boeck, der 1899 kutane Granulome in Sarkoidose-Patienten histologisch untersuchte und sie als multiple, benigne Hautsarkome beschrieb <sup>57</sup>. Die Erstbeschreibung der Erkrankung erfolgte jedoch bereits 20 Jahre zuvor durch Jonathan Hutchinson <sup>58</sup>. Die Erkrankung manifestiert sich meist zwischen dem 20. und dem 49. Lebensjahr und betrifft Frauen etwas häufiger als Männer <sup>56</sup>. Die weltweite Inzidenz der Sarkoidose variiert stark, mit der höchsten Erkrankungswahrscheinlichkeit in den nordeuropäischen Ländern. Dies ist vermutlich durch regionale Unterschiede in Untersuchungsmethoden, Umweltexposition und genetischen Faktoren bedingt <sup>59</sup>. Die Ätiologie der Erkrankung ist weiterhin unklar; es wird davon ausgegangen, dass ein bislang unbekannter Trigger in genetisch prädisponierten Personen eine entzündliche Reaktion auslöst <sup>60</sup>. Als Trigger werden sowohl infektiöse Antigene, wie beispielsweise *Propionibacterium acnes* und *Mycobacterium tuberculosis*, als auch Umweltantigene untersucht <sup>61</sup>. Da Sarkoidose besonders häufig die Lunge, Augen und Haut befällt, beschäftigt sich die Forschung vor allen Dingen mit aerogenen Antigenen, unter anderem Insektiziden oder Schimmelpilzen <sup>62</sup>. Außerdem tritt Sarkoidose gehäuft bei Beschäftigten in der Metallverarbeitung, der Landwirtschaft, der Feuerwehr oder bei der Arbeit mit Baustoffen auf <sup>63-65</sup>. Da bei einer Person mit betroffenen Familienmitgliedern die Erkrankungswahrscheinlichkeit steigt, liegt die Vermutung nahe, dass eine genetische Komponente zur Pathogenese beiträgt <sup>66</sup>. Zudem prädisponieren die beiden humanes Leukozyten Antigen (HLA) Klasse II Antigene HLA-DRB1 und HLA-DQB1 für Sarkoidose <sup>67,68</sup>. Zusammengenommen ist Sarkoidose vermutlich das Endprodukt der Immunantwort auf ubiquitär vorkommende Trigger in genetisch prädisponierten Personen.

Histologisch ist die Erkrankung durch das Vorkommen von nicht-verkäsenden Granulomen gekennzeichnet <sup>60</sup>. Granulome sind kompakte, zentral organisierte Immunzellen, die in ähnlicher

Form auch bei CVID und bei Morbus Crohn zu finden sind. Die initiale Entzündung ist durch die Einwanderung von T-Helferzellen gekennzeichnet<sup>69</sup>. Die T-Zellen werden durch die Präsentation eines noch unbekanntes Antigens von Makrophagen aktiviert und akkumulieren. Die T-Zell-Makrophagen-Aggregate beginnen Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-2 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zu produzieren<sup>70</sup>. Es wird angenommen, dass IFN- $\gamma$  und IL-2 eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen, da in Patienten unter IFN- $\alpha$  Therapie, die zur vermehrten Ausschüttung dieser Zytokine führt, gehäuft Granulombildung beobachtet wird. Durch Fusion der Makrophagen als Antwort auf die Zytokinstimulation entstehen Epitheloidzellen und mehrkernige Riesenzellen, die schließlich Granulome bilden. T-Helferzellen und B-Zellen sitzen in lymphozytären Infiltraten zwischen den Granulomen<sup>71</sup>. In Granulomen und Infiltraten finden sich vor allem Th1, Th17 und Tregs. In den meisten Fällen lösen sich die Granulome ohne weitere Konsequenzen wieder auf. Jedoch entwickelt sich in 20 – 25 % der Fälle eine Fibrose<sup>70</sup>.

Da viele Sarkoidose-Patienten keine Symptome zeigen, wird die Erkrankung häufig als Zufallsbefund im Röntgen-Thorax diagnostiziert. Bei pulmonaler Sarkoidose kann es nichtsdestotrotz zu Dyspnoe, Husten und thorakalen Schmerzen kommen. Neben der Lungenbeteiligung kann die Erkrankung auch als Uveitis anterior am Auge oder als Erythema nodosum, Lupus pernio oder Narbensarkoidose an der Haut auftreten. Seltener sind Gehirn, Herz, Leber, Milz oder der Bewegungsapparat betroffen. Das Löfgren-Syndrom stellt einen hochakuten Verlauf der Sarkoidose dar, der mit der Symptomtrias bilaterale Lymphadenopathie, Erythema nodosum und Polyarthritiden einhergeht. Die Diagnose Sarkoidose kann bei typischer Klinik in Zusammenschau mit Radiologie und Histologie, bei gleichzeitigem Fehlen einer Infektion gestellt werden. Die Lungenbeteiligung wird anhand des Röntgen-Thorax in 4 Stadien eingeteilt: Stadium 1 bei alleiniger bilateraler Lymphadenopathie, Stadium 2 bei bilateraler Lymphadenopathie mit retikulonodulären Infiltraten, Stadium 3 bei alleinigen Lungeninfiltraten und Stadium 4 bei Lungenfibrose<sup>55</sup>. In der Lungenfunktionsuntersuchung kann Sarkoidose mit reduzierter forcierter Vitalkapazität und reduzierter Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) obstruktive und restriktive Veränderungen zeigen<sup>56</sup>. Da die Lunge bei annähernd allen Sarkoidose-Patienten befallen ist, stellt die Bronchoskopie einen einfachen Zugangsweg für Biopsie und bronchoalveoläre Lavage (BAL) dar. Zusätzlich wird der CD4/CD8 Quotient für die Diagnosestellung herangezogen. Dieser Quotient stellt das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zu zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der BAL dar. Ein erhöhter CD4/CD8 Quotient von >3,5 ist ein starkes Indiz für eine Lungensarkoidose<sup>60</sup>.

Ein Großteil der Sarkoidose-Patienten benötigt keine Therapie. Sollte jedoch eine Indikation zur Therapie gestellt werden, beispielsweise bei extrapulmonaler Sarkoidose oder Einschränkung der Lungenfunktion, gelten Glukokortikoide als Therapie der ersten Wahl. Die Glukokortikoidtherapie

kann bei Kontraindikationen oder bei Fortbestehen der Symptome um zytotoxische Medikamente wie Methotrexat (MTX) oder Azathioprin erweitert werden. Mittlerweile sind auch Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper zur Therapie von Sarkoidose zugelassen<sup>60</sup>. In der Hälfte der Fälle remittiert die Erkrankung nach einigen Jahren, in der anderen Hälfte der Fälle chronifiziert sie.

### **1.4 Stand der Wissenschaft und Zielsetzung dieser Arbeit**

TFH-Zellen nehmen seit über zehn Jahren einen bedeutenden Platz in der Forschung ein und wurden bereits ausführlich charakterisiert. Viele Studien beschäftigen sich mit TFH-Zellen in sekundär lymphatischen Organen und haben unterschiedliche Moleküle identifiziert, die der Entwicklung, der Funktion oder der Beschreibung dieser Zellen dienen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass diese Zellen nicht nur in SLO eine Rolle spielen, sondern auch im entzündeten Gewebe in ektopisch lymphatischen Strukturen unter anderem im Synovium von RA-Patienten<sup>17,54,72-74</sup>. Diese Korrelate folliculärer T-Helferzellen sind allerdings noch nicht hinreichend untersucht und zeigen erhebliche Unterschiede im Vergleich zu klassischen TFH-Zellen. Von einem klinischen Standpunkt aus betrachtet, bieten diese TFH-ähnlichen Zellen ein interessantes Target für neue Therapieansätze, da sie für die Entstehung von autoreaktiven Plasmazellen im Gewebe verantwortlich sein könnten. So könnten Moleküle, die bei der Migration von TFH-ähnlichen Zellen ins entzündete Gewebe beteiligt sind, attraktive Angriffspunkte neuer Therapien bieten. Gleichmaßen sollten kostimulatorische Rezeptoren oder Zytokine, die zur Interaktion mit B-Zellen von Bedeutung sind, untersucht werden.

Diese Arbeit soll einen Einblick in die Kooperation zwischen T- und B-Zellen im entzündeten Lungengewebe und den Atemwegen geben, mit besonderem Fokus auf die T-Zellen, welche bei der B-Zell-Aktivierung und Differenzierung im Gewebe eine Rolle spielen. Diese werden im Folgenden als TFH-ähnliche Zellen bezeichnet.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, lungeninfiltrierende T-Zellen zu charakterisieren und einen Phänotyp mit B-Zell-Helfer-Potential zu definieren. Es soll ein Vergleich zwischen TFH-ähnlichen Zellen aus der Lunge und klassischen TFH-Zellen aus lymphatischem Gewebe gezogen werden. Außerdem dient diese Arbeit der Beschreibung TFH-ähnlicher Zellen in den Atemwegen am Beispiel von Sarkoidose und dem Vergleich mit TFH-ähnlichen Zellen aus der murinen Lunge.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Softwareprogramme

Gerät/Zubehör	Software	Hersteller
Durchflusszytometer: LSR Fortessa	BD FACSDiva	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Aria™ II CellSorter	BD FACSDiva	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
InfluxCell Sorter	BD FACSSoftware	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Mikrotiterplatten-Waschgerät: 96 Plate Washer™ (ELISA)		Tecan Austria GmbH, Grödig/Salzburg, Österreich
Mikrotiterplatten-Lesegerät: Tecan Spark 20M	Magellan 7.1	Tecan Austria GmbH, Grödig/Salzburg, Österreich
gentleMACS™ Dissociator		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Zellzählgerät: EasyCyte capillary flow cytometer	GuavaViaCount® Assay	Guava Technologies, Hayward, CA, USA

**Tabelle 1** Liste der verwendeten Geräte und Softwareprogramme. Gelistet sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, zugehörige Software, sowie Herstellerangaben.

### 2.2 Tierexperimentelle Methoden

#### 2.2.1 Mäuse

Um Antigen-spezifische T-Zellen in Experimenten mit adoptivem Transfer *in vivo* nachverfolgen zu können, wurden LCMV-Glykoprotein(GP)<sub>61-80</sub>-spezifische T-Zell-Rezeptor-transgene Smarta (SM) Mäuse <sup>75</sup> mit B6PL Mäusen (Jackson Laboratories) gekreuzt. Dies führte zur Einkreuzung des kongenen Markers CD90.1 (Thymozyten Antigen 1 Isoform 1,Thy-1.1). *Krüppel-like Factor 2* (KLF2)-Expression wurde mit Hilfe von Smarta x KLF2-GFP Reporter-mäusen <sup>76</sup> analysiert. SmartaCreER<sup>T2</sup>IL-21-FP635 Reporter-mäuse <sup>77</sup> wurden zur Evaluation der IL-21-Produktion verwendet. Für Experimente mit zusätzlichem B-Zell-Kotransfer wurden B1-8i Mäuse mit B-Zell-Rezeptor knock-in für das Hapten Nitrophenol (NP) <sup>78</sup> mit kappa-Leichtketten knock-out Mäusen <sup>79</sup> und Ly-5.1 Mäusen (Jackson Laboratories), die den kongenen Marker CD45.1 exprimieren, gekreuzt. Alle Donortiere wurden für mindestens zehn Generationen auf C57BL/6NCrI Mäuse rückgekreuzt und unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen in der Tieranlage des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) gezüchtet. Als Rezipienten wurden C57BL/6NCrI Mäuse verwendet. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere im Alter von 8 bis 16 Wochen in Experimenten eingesetzt. Alle Tierexperimente wurden in der Tierhaltungsanlage des Robert Koch-Instituts (RKI) und gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes mit Genehmigung der zuständigen Regierungsbehörde (LAGeSo, Berlin) durchgeführt.

### 2.2.2 Adoptiver Transfer

Das adoptive Transfersystem ermöglicht es Antigen-spezifische T- und B-Zellen während einer Inflammation der Lunge und Atemwege zu analysieren. Dazu wurden  $2,5 \times 10^5$  naive  $CD4^+$ T-Zellen aus den Milzen von Smarta Mäusen und  $1 \times 10^6$  NP-spezifische folliculäre B-Zellen aus B1-8i Mäusen isoliert und mittels intravenöser (i.v.) Injektion in C57BL/6 Mäuse transferiert. Als T-Zell-Donoren wurden sowohl Smarta IL-21- als auch KLF2-Reportermäuse verwendet. Bei diesen Reportermäusen wurde entweder das Gen *Il21* beziehungsweise *klf2* so verändert, dass bei der Translation die Fluoreszenzproteine FP635 oder grün fluoreszierendes Protein (GFP) zusätzlich zum synthetisierten Protein gebildet werden. Diese Fluoreszenzproteine können dann beispielsweise im Durchflusszytometer mittels Laser angeregt werden und über die Intensität die Expression von IL-21 und KLF2 gemessen werden.

Um die Anzahl der zu transferierenden antigenspezifischen Zellen zu berechnen, wurde in einem ersten Schritt die Gesamtzellzahl (siehe 2.3.2) bestimmt und anschließend die Frequenz der TZR-transgenen  $CD4^+$   $V\alpha 2$ -TZR<sup>+</sup>  $V\beta 8$ -TZR<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup> T-Zellen und der B220<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup> CD23<sup>+</sup> NP-spezifischen BZR<sup>+</sup> CD45.1<sup>+</sup> folliculären B-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### 2.2.3 Immunisierung der Tiere

Die Immunisierung der Mäuse zur Induktion der Atemwegsinflammation wurde in allen Transferexperimenten in Injektionsnarkose durchgeführt. Die Narkose wurde gewichtsadaptiert durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 75 mg Ketamin und 4 mg Xylazin pro kg Körpergewicht in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) eingeleitet.

Die Immunisierung erfolgte durch intranasale (i.n.) Applikation von 20  $\mu$ g SM-NIP-Konjugat in PBS. Hierbei handelt es sich um ein Modellantigen, bei dem SM-Peptid (LCMV GP1<sub>61-80</sub>) zusammen mit iodierten Nitrophenol an Maus-Serumalbumin als nicht immunogenes Trägerprotein gekoppelt ist<sup>54</sup>. Das SM Peptid wird von dem T-Zell-Rezeptor der Smarta-Mäuse erkannt. Iodiertes Nitrophenol (NIP) wurde anstelle von NP verwendet, da es mit einer vielfach höheren Affinität von dem B-Zell-Rezeptor der B1-8i-Mäuse erkannt wird. Als Adjuvanz dienten 5  $\mu$ g Lipopolysaccharid (LPS, Sigma-Aldrich). Die Mäuse wurden insgesamt vier Mal immunisiert, jeweils an Tag 0, 1, 10 und 13 nach dem adoptivem Transfer (Tag des adoptiven Transfers wird als Tag -1 gezählt).

### 2.2.4 ICOS-L Blockade

Die Experimente zur Blockade des Kostimulators ICOS-L wurden im unter 2.2.2 und 2.2.3 beschriebenen Atemwegs-Inflamationsmodell durchgeführt. Für die Blockade wurde der Antikörper MIL-5377<sup>80</sup> verwendet, für die dazugehörige Kontrolle 1D10, ein Ratten-IgG2a-Isotyp<sup>80</sup>.

Von Blockadeantikörper und Isotypkontrolle wurden sowohl 100 µg i.n. sowie die doppelte Dosis i.p. verabreicht. Die Blockade erfolgte an den Tagen 8, 10 und 13 nach adoptivem Transfer unter Verwendung von T-Zellen aus IL-21-Reportermausen mit durchflusszytometrischer Analyse an Tag 14 beziehungsweise Zellsortierung Tag 15.

## **2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.3.1 Isolierung muriner Zellen**

#### ***2.3.1.1 Isolierung muriner Zellen aus der Lunge***

Nach Betäubung der Maus mit 75 mg Ketamin und 75 mg Xylazin pro kg Körpergewicht, Eröffnung des Thorax und Durchtrennung der Vena cava caudalis wurde der rechte Herzventrikel mit einer Flügelkanüle punktiert. Anschließend wurde die Lunge vom rechten Ventrikel aus mit 10 bis 15 ml PBS perfundiert, sodass die Erythrozyten aus der Lunge gespült wurden und die Lunge eine weiße Farbe annahm. Die Lunge wurde mitsamt Trachea, Thymus und mediastinalem Lymphknoten entnommen und im Anschluss unter dem Binokular mit Pinzetten von Trachea und Lymphknoten befreit, zerzupft und mit 500 µg/ml Kollagenase D (Roche) und 33 µg/ml DNase I (Roche) in 3 ml RPMI 1640 + 0,5% Bovines Serumalbumin (BSA) Medium in gentleMACS C Tubes (Miltenyi) transferiert. Unter Verwendung des GentleMACS™ Dissociators mit Programm m\_lung\_01\_01 wurde die Lunge zerkleinert. Es folgte ein Gewebeverdauer für 30 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad, wobei die Kollagenase nach 25 min mit 60 µl 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) inhibiert wurde. Anschließend schloss sich eine weitere Zerkleinerung mittels GentleMACS™ Dissociators und dem Programm m\_lung\_02\_01 an. Nach Zentrifugation bei 380 x g und 4 °C für 8 min wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Nylonsieb gegeben und die erhaltenen Zellen gezählt werden (siehe 2.3.3).

#### ***2.3.1.2 Isolierung muriner Zellen aus den Lymphknoten***

Nachdem die Lunge mit Trachea und mediastinalem Lymphknoten wie unter 2.3.1.1 beschrieben entnommen war, wurde der mediastinale Lymphknoten unter dem Binokular an der Gabelung der Trachea in linken und rechten Hauptbronchus aufgesucht und mit Pinzetten vorsichtig freigelegt, von der Trachea getrennt und von Fett und Thymus befreit. Der Lymphknoten wurde anschließend mit Pinzetten zerzupft, nacheinander durch ein 70 µm und ein 50 µm Nylonsieb in RPMI 1640 + 10 % fetales Kälberserum (FCS) Medium mit 24,75 µg/ml DNase I filtriert und die erhaltenen Zellen gezählt (siehe 2.3.3).

### **2.3.1.3 Isolierung muriner Zellen aus der Milz**

Die Entnahme der Milz sowie die Aufarbeitung der Zellen aus der Milz erfolgten zur Isolation von Zellen zum adoptiven Transfer. Zur Entnahme der Milz wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet, die Milz am Hilus abgetrennt und von Fettgewebe befreit. Anschließend wurde die Milz in drei bis vier Teile geschnitten und durch ein 212 µm Metallsieb filtriert. Die dadurch erhaltene Zellsuspension wurde durch ein 70 µm Nylonsieb gegeben und für 8 min bei 380 x g und 20 °C zentrifugiert. Damit sich die in der Milz enthaltenen Erythrozyten nicht störend auf die durchflusszytometrische Analyse auswirken, wurden sie durch Resuspension in 4 ml ACK-Lysepuffer für 40 s lysiert und die Lyse dann durch Verdünnung mit PBS abgestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen gezählt (siehe 2.3.3), zentrifugiert und je nach weiterer Verwendung in RPMI 1640 +10 % FCS, MACS-PBS (PBS + 0,5 % BSA) oder FACS-PBS (PBS + 0,5% BSA + 0,1% NaN<sub>3</sub>) aufgenommen.

### **2.3.1.4 Gewinnung von BAL**

Die bronchoalveoläre Lavage wurde stets nach der Perfusion und vor Entnahme der Lunge durchgeführt. Zunächst wurde die extrathorakale Trachea freipräpariert, hierzu mussten Speicheldrüsen und Muskulatur entfernt werden. Anschließend wurde die Trachea mit einer schmalen Inzision eröffnet. Durch die Inzision wurde eine Nadel, die für Tierfütterung gedacht ist und durch ihre vorne breiter werdende Spitze die Trachea nach oral gut verschließt, etwa 5 mm in die Trachea eingeführt. Die Bronchien wurden zwei Mal mit 800 µl PBS gespült und die erhaltene Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Um eine ausreichende Zellzahl für eine durchflusszytometrische Analyse zu erhalten, wurden die BAL aller Tiere einer Gruppe vereinigt. Im Anschluss wurden die Zellen gezählt, zentrifugiert und in FACS-PBS aufgenommen.

### **2.3.2 Zellzählung**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Kapillar-Durchflusszytometer GuavaEasyCyte und die GuavaViaCount® Assay Software verwendet. Nach Verdünnung der Zellen in ViaCount Lösung wurde die Anzahl der kernhaltigen, lebenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

## **2.4 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Proteine auf Einzelzellebene, durch das Färben bestimmter Proteine auf der Zelloberfläche, intrazellulär und intranukleär mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper. Es wurden Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten, Lunge, BAL, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), Tonsille oder Milz

verwendet. Die mit Fluorochromen markierten Zellen wurden an einem LSR II Fortessa (BD) Zytometer gemäß aktuellen Leitlinien<sup>81</sup> analysiert.

	Spezifität	Klon	Spezifität	Klon
<b>Murine Antikörper</b>	Bcl-6	K112-91	CD69	H1.2F3
	CD3	145-2C11	CD90.1 (Thy-1.1)	OX-7
	CD4	RM4-5; YTS 191.1	CD162 (PSGL-1)	2PH1
	CD8a	53-6.7	CD275 (ICOS-L)	MIL-5733
	CD19	1D3; 6D5	CD278 (ICOS)	MIC-2043; MIC-280
	CD21	7G6	CXCR3	CXCR3-173
	CD23	B3B4	CXCR5	L138D7
	CD43	11B11	Keimzentrums-B-Zellen	GL7 und PNA
	CD44	IM7.8.1	NP-spezifischer BZR	Ac146
	CD45.1	A20	PD-1	J43; 29F.1A12
	CD45.2	104	Vα2-TZR	B20.1
	CD45R (B220)	RA3-6B2	Vβ8-TZR	F23.1
	CD62L	Mel-14		
	<b>Humane Antikörper</b>	Bcl-6	K112-91	CD275 (ICOS-L)
CCR6		G034E3	CD278 (ICOS)	F44
CD3		HIT3a; OKT3	CXCR3	G025H7
CD4		91d6	CXCR5	J252D4
CD14		63d3	FcRL4	413D12
CD16		B73.1	FoxP3	259D
CD19		BU12, SJ25C1	IFN-γ	4S.B3
CD20		LT20	IgD	IA6-2
CD21		Bu32	IL-2	MQ1-17H12
CD27		0323;M-T271	IL-4	MP4-25D2
CD38		OKT10	IL-17	BL168
CD45R0		UCHL1	IL-21	3A3-N2
CD45RA		4G11	Ki-67	Ki-67
CD69		FN50	PD-1	EH12.2H7
CD154 (CD40L)		24-31		

**Tabelle 2 Liste verwendeter monoklonaler Antikörper.** Die Antikörper wurden entweder von BioLegend, eBioscience oder BD käuflich erworben oder aus Hybridomüberständen aufgereinigt und anschließend unter Verwendung von Standard-Protokollen an Fluorochrome gekoppelt. Die Antikörper waren an Biotin, FITC, PE, PE/Dazzle594<sup>TM</sup>, PerCP, PE-Cy7, Alexa Fluor 647, Cy5, Alexa Fluor 700, APC, APC-Cy7, Pacific Blue, Brilliant Violet 421<sup>TM</sup>, Pacific Orange, VioGreen, Brilliant Violet 650<sup>TM</sup>, Brilliant Violet 711<sup>TM</sup> und Brilliant Violet 785<sup>TM</sup> gekoppelt.

#### 2.4.1 Darstellung von Zelloberflächenproteinen

Die Einzelzellsuspensionen wurden in einer Konzentration von rund  $6 \times 10^8$  Zellen/ml für die Färbung eingesetzt. Vor der Färbung wurden unspezifische Bindungsstellen bei murinen Zellen mit 100 µg/ml 2.4G2 (anti-CD16/32) und bei humanen Zellen mit Kiovig<sup>TM</sup> (humane Immunglobuline, Kiovig) für 5 min auf Eis blockiert. Für die Oberflächenfärbungen wurden verschiedene Kombinationen monoklonaler Antikörper verwendet, die entweder direkt Fluorochrom-gekoppelt oder mit Biotin haptensiert waren (Tabelle 2). Diese wurden für 20 bzw. 45 min auf Eis inkubiert.

Biotinylierte Antikörper wurden in einem zweiten Schritt mit PE-Cy7 konjugiertem Streptavidin nachgewiesen (Färbung für 5 min auf Eis). Nachdem nicht gebundene Antikörper mit FACS-PBS und Zentrifugation bei 400 x g und 4 °C für 5 min heruntergewaschen waren, wurden die Zellen in FACS-PBS aufgenommen. Kurz vor der Messung wurde zur Färbung der toten Zellen 0,3 µM 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Merck) zugegeben.

### 2.4.2 Darstellung von zytoplasmatischen Molekülen

Zur Färbung zytoplasmatischer Moleküle, wie Zytokinen, wurden die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert. Zur Beurteilung der Fähigkeit der Zellen zur Zytokinproduktion wurden die Zellen vor der Fixierung stimuliert. Dazu wurden die Zellen in RPMI-complete (RPMI1640-Medium mit 10 % FCS, Pyruvat, Penicillin, Streptomycin, β-Mercaptoethanol und nicht essentiellen Aminosäuren) resuspendiert und mit Phorbol-12-myristat-13-Azetat (PMA, Sigma-Aldrich, 10 ng/ml bei murinen Zellen und 20 ng/ml bei humanen Zellen) und Ionomycin (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die letzten 3 Stunden Inkubation wurde Brefeldin A (5 µg/ml, Sigma-Aldrich) zugesetzt, um eine Sekretion der Zytokine ins Zellmedium zu unterbinden.

Die Oberflächenproteine wurden wie in 2.4.1 beschrieben gefärbt. Tote Zellen wurden mittels 84 nM Alexa Fluor 700 Succimidylester oder 1,34 µM Pacific Orange Succimidylester (Invitrogen) markiert. Zur Färbung von Zytokinen wurden die Zellen mit 2 %-iger Paraformaldehydlösung für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und durch Waschen in 0,5 %-igem Saponin-Puffer (Sigma-Aldrich) permeabilisiert. Ähnlich zur der Oberflächenfärbung wurden anschließend unspezifische Bindungsstellen mit einer Kombination aus 2.4G2 und 50 µg/ml Ratten Ig (Nordic) bei murinen Zellen oder Kiovig (humane Immunglobuline) bei humanen Zellen blockiert. Anschließend erfolgte die Färbung analog zur Oberflächenfärbung für 30 min bei Raumtemperatur. Für die Messung wurden die Zellen nach anschließenden Waschschritten in FACS-PBS resuspendiert.

### 2.4.3 Darstellung von intranukleären Molekülen

Analog zur Färbung von zytoplasmatischen Molekülen, wurden die Zellen zur intranukleären Färbung von Transkriptionsfaktoren zunächst fixiert und permeabilisiert. Zunächst wurden die Oberflächenproteine wie in 2.4.1 beschrieben gefärbt, die Identifizierung der toten Zellen wurde wie in 2.4.2 beschrieben durchgeführt. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgte nach Angaben des FoxP3 Fixierungs- und Permeabilisierungspuffersets von eBioscience. Die Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurde analog zu 2.4.2 durchgeführt. Anschließend erfolgte die Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern analog zur Oberflächenfärbung für 30 min auf Eis. Für die Messung wurden die Zellen nach anschließenden Waschschritten in FACS-PBS resuspendiert.

## 2.4.4 Analyse der durchflusszytometrischen Daten

Zur Auswertung der durchflusszytometrisch erhaltenen Daten wurde die Auswertungssoftware FlowJo 9.6 (Tree Star) für Macintosh verwendet. Lebende Zellen wurden durch die Charakteristika von *forward scatter* (FSC) und *sideward scatter* (SSC) und durch Ausschluss von DAPI- oder Succimidyl-Ester-positiven und somit toten Zellen identifiziert. Dubletten wurden anhand ihres disproportionalen Verhältnisses von Fläche und Höhe der Scattersignale ausgeschlossen. In murinen Experimenten wurden B220<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup> Zellen als transgene T-Zellen definiert und CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD45.2<sup>-</sup> CD45.1<sup>+</sup> Zellen als transgene B-Zellen. In humanen Experimenten wurden CD19<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> als aktivierte T-Helferzellen definiert, mit Ausnahme der Zytokin-Färbungen, in welcher die FoxP3<sup>+</sup> Zellen nicht ausgeschlossen wurden. CD3<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> Zellen wurden als B-Zellen definiert. Die durchflusszytometrischen Daten wurden als Konturdiagramm oder Histogramm dargestellt; die Zahlen in den Diagrammen repräsentieren die Frequenz der umrahmten Population in Bezug zu der Population aus der die gezeigten Daten stammen. Zur Darstellung der murinen Daten wurden die Daten aller Tiere einer experimentellen Gruppe konkateniert, es werden also Sequenzen des gleichen Datentyps aneinandergehängt und können dann, wie in dieser Arbeit, in einer übersichtlichen Grafik dargestellt werden. Diese Grafiken repräsentieren somit die durchschnittlichen Werte der Gruppe. Zur Darstellung der humanen Daten wurde jeweils eine repräsentative Probe ausgewählt. Die Säulendiagramme zeigen entweder die Frequenz der Zellen, die einen bestimmten Marker oder eine Markerkombination exprimieren, oder das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität (geoMFI). Je höher die Fluoreszenzintensität, desto mehr Moleküle wurden von einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper erkannt.

## 2.5 Zellsortierung

### 2.5.1 Magnetisch-aktivierte Zellsortierung (MACS)

Für die durchflusszytometrische Zellsortierung wurde zunächst eine magnetische Voranreicherung vorgenommen, da eine höhere Frequenz von transgenen T-Zellen die Qualität der anschließenden fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) verbessert. Die magnetische Zellsortierung wurde nur an Lymphknoten-Zellen durchgeführt, da die Lungenzellen die verwendeten Säulen verstopften. Die Zellen wurden positiv selektiert: die Zielzellen, Thy-1.1<sup>+</sup> transgene T-Zellen wurden über Antikörper, welche an magnetische Partikel (*Beads*) gebunden waren, markiert und über eine magnetisierbare Säule gegeben. Somit wurden die Zielzellen in der Säule festgehalten, während die übrigen Zellen durch die Säule liefen. Hierzu wurden die Zellen in MACS-PBS, Fc-Block und Anti-Thy-1.1-Beads (Miltenyi Biotec) mit einer Endkonzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml resuspendiert und unter regelmäßigem Schwenken bei 4 °C für 20 min inkubiert. Nach

einem Zentrifugationsschritt, um nichtgebundene Beads zu entfernen, und Filtration durch ein 50 µm Nylonsieb wurden die markierten Zellen auf die magnetisierte Säule (Miltenyi) gegeben. Durch mehrmaliges Waschen der Säule mit MACS-PBS wurden die Thy-1.1<sup>-</sup> Zellen herausgewaschen. Nach Entfernung der Säule vom Magneten wurde die Thy-1.1<sup>+</sup> Zellen mit MACS-PBS aus der Säule gespült und in einem separaten Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Im Anschluss wurden Reinheitskontrollen am Durchflusszytometer durchgeführt.

### 2.5.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Um Zellpopulationen anhand der Expression von Molekülen zu sortieren, wurden sie analog zur Durchflusszytometrie mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und mit Hilfe eines Durchfluss-Sortierers in verschiedene Fraktionen sortiert. Hierbei wurden die aktuellen Leitlinien zur Durchflusszytometrie<sup>81</sup> beachtet.

Verwendet wurden Zellen in Einzelzellsuspensionen (siehe 2.3.1.) aus Lymphknoten, Lunge und Milz, welche an Tag 15 nach adoptivem Transfer entnommen und isoliert wurden. Die Zellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben auf der Zelloberfläche gefärbt. Für die Sortierung wurde eine Zelldichte von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml in MACS-PBS eingesetzt. Im Falle der Lymphknotenzellen wurde eine vorherige Anreicherung von Thy-1.1<sup>+</sup> transgenen T-Zellen durch MACS (siehe 2.5.1) durchgeführt. Die Sortierung erfolgte am BD FACSAria<sup>TM</sup> Cell Sorter (BD Biosciences) oder am Influx Sorter (BD Biosciences). Aus Lymphknoten- und Lungenzellen wurden B220<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup> TFH- bzw. TFH-ähnliche-Zellen und B220<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup> PD-1<sup>-</sup> IL-21<sup>-</sup> nicht-TFH- bzw. nicht-TFH-ähnliche-Zellen sortiert. Um NP-spezifische naive B-Zellen zu gewinnen, wurden CD4<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD43<sup>-</sup> Zellen aus Milzzellen von B1-8i Mäusen sortiert. Als Kontrollgruppe dienten CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> naive T-Zellen aus Milzzellen von Smarta Mäusen.

Nach Sortierung wurden die Zellen zentrifugiert, in Trizol (Ambion) aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C für spätere RNA-Aufbereitung und Transkriptomanalyse gelagert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte gemäß den Angaben des miRNeasyMicro Kits von Qiagen.

### 2.6 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)

Die Methode des enzymgekoppelten Immunabsorptionstests (ELISA) wurde verwendet, um Zytokine und Immunglobuline im Überstand von humaner BAL sowie im Überstand der T-B-Kokulturen nachzuweisen. Zunächst wurde die Platte mit einem Antikörper beschichtet, der gegen das nachzuweisende Zytokin oder Immunglobulin gerichtet war (Tabelle 3) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für den nachfolgenden und alle weiteren Waschschrte zur Entfernung von ungebundenen Reagenzien wurde das Platten-Waschgerät 96 Plate Washer<sup>TM</sup> (Tecan), sowie ein

Waschpuffer aus PBS und 0,05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) mit einem pH-Wert von 7,3 verwendet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Platte mit 1 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die BAL-Proben und Standards aufgetragen wurden. Je nach nachzuweisendem Molekül erfolgte eine Inkubation für zwei Stunden bei 37 °C (IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) oder bei Raumtemperatur (IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ). Zum Nachweis von IL-6 wurde der Detektions-Antikörper direkt mit Probe und Standard auf die Platte aufgetragen. Bei allen anderen Proben erfolgte die Detektion mit dem Sekundärantikörper im Anschluss für zwei Stunden (IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 und TNF- $\alpha$ ) oder eine Stunde (IL-2 und IFN- $\gamma$ ) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Platte für 30 min bei Raumtemperatur mit Streptavidin-Peroxidase (Dianova) inkubiert, damit anschließend die Umsetzung des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid (TMB, Seramun Diagnostica) und der damit verbundene Farbumschlag erfolgen konnte. Das Abstoppen der Farbreaktion erfolgte mit 0,25 M Schwefelsäure. Die photometrische Messung der Platte bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm erfolgte am Tecan Spark 20M Plattenlesegerät. Für die Auswertung der Daten wurde die Software Magellan 7.1 und Microsoft Excel verwendet. Die ELISA zum Nachweis von IgA (Invitrogen), CXCL13 (R & D Systems), CXCL10 und IL-21 (BioLegend) erfolgten gemäß den Herstellerangaben.

	<b>Beschichtungsantikörper</b> (Name/Klon, Hersteller)	<b>Standard</b> (Name/Klon, Hersteller)	<b>Detektionsantikörper</b> (Name/Klon, Hersteller)
<b>IgM</b>	Ziege-anti-humanes IgM, Jackson	humanes Serum, AG Immunologische Abwehrmechanismen, RKI (Prof. Kroczek)	Ziege-anti-humanes Ig-Bio, TAGO Immunologicals
<b>IgG</b>	HP6017, Hybridom	humanes IgG, Sigma	
<b>IgG1</b>	HP6001, Hybridom	humanes Serum, AG	
<b>IgG2</b>	HP6014, Hybridom	Immunologische	
<b>IgG3</b>	HP6050, Hybridom	Abwehrmechanismen,	
<b>IgG4</b>	HP6025, Hybridom	RKI (Prof. Kroczek)	
<b>IgA</b>	gereinigtes anti-humanes IgA, Invitrogen	rekombinante IgA Kontrolle, invitrogen	anti-humanes IgA HRP, invitrogen
<b>IL-21</b>	Beschichtungsantikörper IL-21, BioLegend	humaner IL-21 Standard, BioLegend	Detektionsantikörper IL-21, BioLegend
<b>CXCL10</b>	Beschichtungsantikörper CXCL10, BioLegend	humaner CXCL10 Standard, BioLegend	Detektionsantikörper CXCL10, BioLegend
<b>CXCL13</b>	Beschichtungsantikörper CXCL13, R&D Systems	humaner CXCL13 Standard, R&D Systems	Detektionsantikörper CXCL13, R&D Systems

**Tabelle 3 Liste der ELISA Antikörper und Standards.** Die Tabelle listet alle in dieser Arbeit verwendeten Standards, Primär- und Sekundärantikörper auf. Antikörper wurden von den angegebenen Firmen käuflich erworben oder aus eigenen Hybridomüberständen aufgereinigt.

## 2.7 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die untersuchten BAL-Proben stammen aus der Pulmologie der Charité am Campus Virchow-Klinikum in Kooperation mit Prof. Dr. Leif Erik Sander und Sarah Volkers. Im Zeitraum zwischen Februar 2017 und Oktober 2018 wurden Proben von insgesamt 16 Patienten mit Lungensarkoidose gesammelt (Tabelle 4). Zwei Patienten waren zum Zeitpunkt der BAL bereits unter Glukokortikoid-Therapie. Die Diagnose einer Sarkoidose wurde anhand typischer klinischer Befunde und kompatibler radiologischer und histologischen Funde gestellt, im Einklang mit dem *Statement on Sarcoidosis* der *American Thoracic Society*<sup>55</sup>. Außerdem wurden 7 Kontrollen eingeschlossen, welche keine Hinweise auf eine infektiöse oder entzündliche Lungenerkrankung, insbesondere keine lymphozytäre Alveolitis, aufwiesen. In dieser Gruppe befinden sich vier Patienten mit idiopathischem Husten, zwei Patienten, die eine Bronchoskopie zum Ausschluss einer pulmonalen Tuberkulose erhielten und ein Patient mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom. Über die weitere Untersuchung der Proben wurden die eingeschlossenen Patienten aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die BAL wurden unter Verwendung eines flexiblen fiberoptischen Bronchoskops der Marken Olympus oder Fuji gewonnen. Dazu wurde ein Lungensubsegment (bei Fehlen lokaler Befunde in der Bildgebung, standardmäßig im Mittellappen oder der Lingula) in Wedge-Position mit 150 ml körperwarmer 0,9 %-iger NaCl-Lösung (7 mal 20 ml und 1 mal 10 ml) gespült. Die Proben wurden durch ein 70 µm Sieb gefiltert, bei 400 x g zentrifugiert und der zellfreie Überstand abgenommen. Dieser Überstand wurde bei -70 °C gelagert. Die Zellen wurden direkt im Anschluss an die Entnahme stimuliert und gefärbt.

	<b>Sarkoidose</b>	<b>Kontrollen</b>
<b>Patienten</b>	16	7
<b>Geschlecht</b> (männlich/weiblich)	12/4	5/2
<b>Durchschnittliches Alter</b> (in Jahren)	48,0	58,1
<b>Radiologisches Staging</b> (0/I/II/III/IV/unbekannt)	0/5/4/2/1/4	N/A
<b>Raucher</b> (Raucher/Ex-Raucher/Nicht-Raucher/unbekannt)	3/4/5/4	1/3/2/1
<b>CD4/CD8 Quotient</b> (Mittelwert)	5,21 (Norm: 1,1 – 3,5)	3,76 (Norm: 1,1 – 3,5)
<b>Lymphozytäre Alveolitis</b> (%; Mittelwert)	30,86 (Norm ≤ 12)	≤ 12 (Norm ≤ 12)

**Tabelle 4 Übersicht über die Studienpopulation.** Die Tabelle gibt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten BAL Proben. N/A = nicht anwendbar

## 2.8 Statistische Analyse

Die Statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der GraphPadPrism 5 Software. Die Differenz zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Als statistisch signifikant galten  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Korrelationen in Zytokin-Koexpressionen wurden mit Hilfe des Tests für  $\phi$ -Korrelationskoeffizienten berechnet, indem der Wert für die beobachtete Zytokin-Koexpression in Prozent mit dem erwarteten Wert für zufällige Koexpression verglichen wurde<sup>82</sup>. Werte von  $\phi \leq -0,1$  oder  $\geq 0,1$  wurden als statistisch signifikant betrachtet. Zur Darstellung der Transkriptom-Daten wurde eine Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*) durchgeführt. Die Hauptkomponentenanalyse ist ein Verfahren der multivarianten Statistik, welches hilft große Datensätze zu vereinfachen und darzustellen.

## 2.9 Ethikvotum

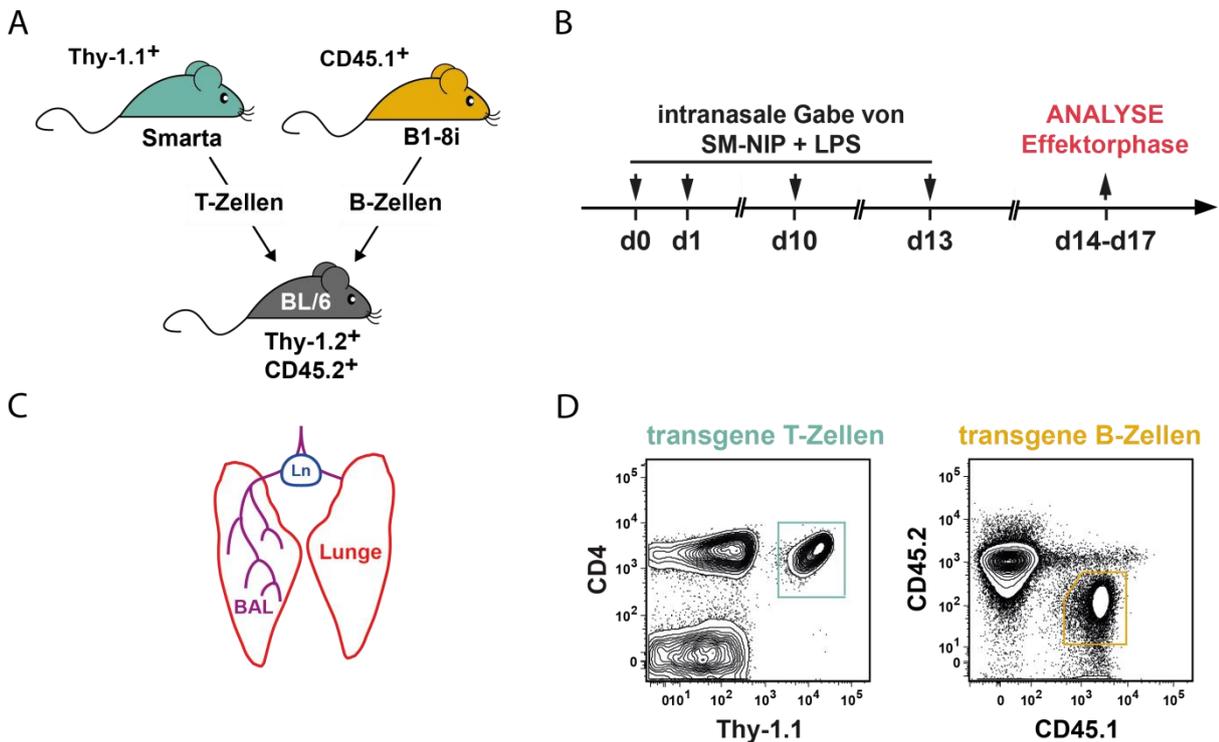
Für die Untersuchung der Patientenproben liegt ein Ethikvotum (EA2\_086\_16) der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin vom 26.5.2016 vor. Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte gemäß den Vorgaben durch die „Satzung der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung von TFH-Zellen in murinem Lungengewebe

#### 3.1.1 Mausmodell zur Untersuchung antigenspezifischer T- und B-Zellen im Lymphknoten und entzündeten Lungengewebe

Die Analyse von T- und B-Zellen, sowie ihrer Interaktion wird durch die niedrige Frequenz von Antigen-spezifischen T- und B-Zellen und die damit verbundenen Probleme der eindeutigen Identifizierung im entzündeten Lungengewebe von Wildtyp-Mäusen erschwert. Mit Hilfe eines adoptiven Transfers von Smarta-spezifischen, transgenen T-Zellen und NP-spezifischen, transgenen B-Zellen in Wildtyp-Rezipienten-Mäuse konnte die Entwicklung einer bedeutend größeren Population Antigen-spezifischer Zellen induziert werden, die dennoch in ihrer Aktivierung und Expansion der physiologischen Immunantwort glichen<sup>83</sup>. Im Anschluss an den adoptiven Transfer wurden die Mäuse mehrfach mit SM-NIP-Konjugat und LPS als Adjuvanz intranasal immunisiert (Abbildung 2A und B). Zur vereinfachten Darstellung des in TFH-Zellen supprimierten Transkriptionsfaktors KLF2 und des TFH-Signatur-Zytokins IL-21 wurden entsprechende



**Abbildung 2** Schematische Übersicht Atemwegs-Inflamationsmodell (A)  $2,5 \times 10^5$  LCMV GP61-80-spezifische T-Zellen aus Smarta Mäusen und  $1 \times 10^6$  NP-spezifische folliculäre B-Zellen aus B1-8i Mäusen werden in C57BL/6 Mäuse transferiert. (B) Intranasale Gabe von SM-NIP und LPS an Tag 0, 1, 10 und 13 induziert die Atemwegsinfektion. Die Analyse der Infektion in (C) Lunge, BAL und mediastinalem Lymphknoten in der Effektorphase findet zwischen Tag 14 und 17 statt. (D) Durchflusszytometrisch werden transgene T- und B-Zellen mit Hilfe der kongenen Marker Thy-1.1 (T-Zellen) und CD45.1 (B-Zellen) identifiziert.

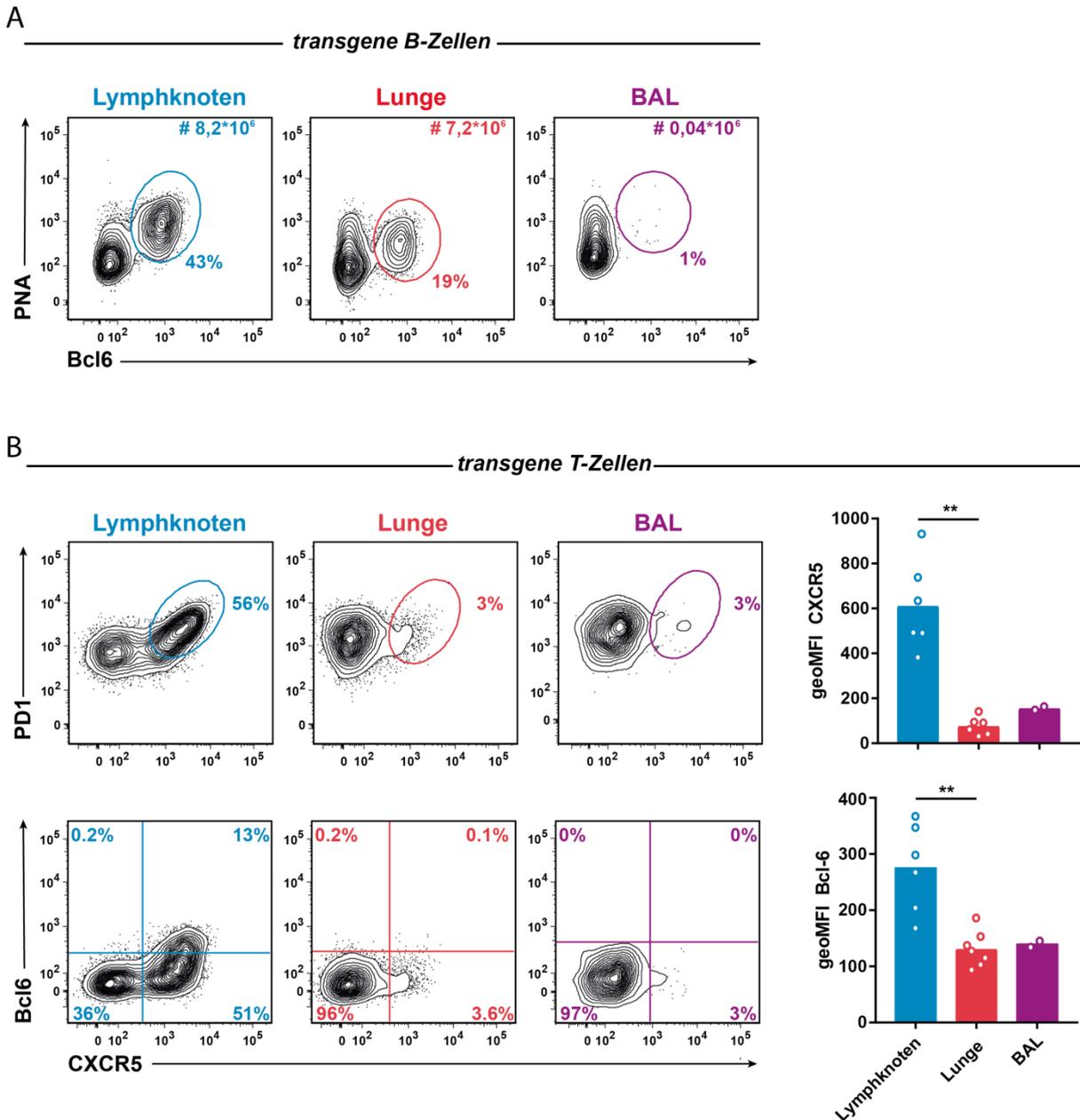
Reportermause als T-Zell Donoren verwendet. Während bei Restimulationsexperimenten die Zahl der Zytokin-produzierenden Zellen stets überschätzt wird, bot die Reportermaus die Möglichkeit, die tatsächlichen Frequenzen der *in vivo* IL-21-produzierenden Zellen zu bestimmen. Die Expression der kongenen Marker Thy-1.1 auf transgenen T-Zellen und CD45.1 auf transgenen B-Zellen ermöglichte die Identifikation der transgenen Zellen, sowie deren Analyse in der Lunge, als entzündetem nicht-lymphatischem Gewebe, und mediastinalem Lymphknoten, dem drainierenden lymphatischen Gewebe (Abbildungen 2C und D). Durch mehrfache Antigengabe entwickelten sich stabile T- und B-Zell-Populationen. Wie bereits frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, bilden sich in diesem Atemwegs-Inflammationmodell zu 96 % FDZ-negative Infiltrate, in denen sich T- und B-Zellen in engem Kontakt befinden<sup>54</sup>.

Während die transgenen T-Zellen an Tag 15 nach adoptivem Transfer die maximale Anzahl erreichten, zeigte die Anzahl der transgenen B-Zellen erst zwei Tage später ihren Höhepunkt. Diese Zeitabstände wurden als Analysezeitpunkte für die T- bzw. B-Zellen gewählt. Da die mRNA für das Zytokin IL-21 nur am Tag nach der letzten Antigengabe in der Lunge nachweisbar war, wurden T-Zell-Analysen unter Zuhilfenahme IL-21 Reportermaus bereits an Tag 14 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). In den nachfolgenden Abbildungen sind transgene T-Zellen als B220<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup> definiert und die transgenen B-Zellen als CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD45.2<sup>-</sup> CD45.1<sup>+</sup>.

Das Atemwegs-Inflammationsmodell bietet folglich die Möglichkeit, Antigen-spezifische T- und B-Zellen und deren Interaktion im entzündeten Atmungssystem und dem dazugehörigen lymphatischen Gewebe *in vivo* zu verfolgen.

### **3.1.2 Effektor-T-Zellen im Lungengewebe und den Atemwegen exprimieren keine klassischen TFH-Zell-Marker**

Um die Interaktion von T- und B-Zellen im Lungengewebe und den Atemwegen zu untersuchen, wurde zunächst nach Keimzentrums-B-Zellen gesucht, die das Produkt der Interaktion von folliculären T-Helferzellen und naiven B-Zellen sind und sich durch die Bindung von PNA (*peanut agglutinin*) und dem Transkriptionsfaktor Bcl-6 auszeichnen. Zum Nachweis von Keimzentrums-B-Zellen in der Lunge und den Atemwegen im Vergleich mit dem drainierenden Lymphknoten wurde der unter 3.1.1 beschriebene Versuchsaufbau verwendet. An Tag 17 wiesen 43 % der transgenen B-Zellen des mediastinalen Lymphknotens einen Keimzentrums-Phänotyp auf. In der Lunge war die Population der Keimzentrums-B-Zellen mit 19 % ungefähr halb so groß.



**Abbildung 3** Es finden sich Keimzenters-B-Zellen, aber keine klassischen TFH-Zellen im entzündeten Lungengewebe. (A und B) Thy1.1<sup>+</sup> Smarta T-Zellen aus KLF2-GFP-Reportermäusen und CD45.1<sup>+</sup> B1-8i B-Zellen wurden in C57BL/6 Mäuse transferiert und an Tag 0, 1, 10 und 13 mit SM-NIP und LPS i.n. immunisiert. Die B-Zellen wurden an Tag 17 analysiert, die T-Zellen an Tag 15. (A) Durchflusszytometrische Analyse der transferierten CD45.1<sup>+</sup> transgenen B-Zellen hinsichtlich eines PNA<sup>+</sup> Bcl-6<sup>+</sup> Keimzenters-Phänotyps. Die Konturdiagramme wurden aus den Daten dreier Tiere konkateniert. Die BAL wurde bereits vor der Färbung vereinigt (n = 3). Die Zahlen geben die Frequenz bzw. absolute Zellzahl der umrahmten Population an. (B) Durchflusszytometrische Analyse der transferierten transgenen T-Zellen hinsichtlich eines PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> bzw. Bcl-6<sup>+</sup> TFH-Phänotyps. Die Konturdiagramme wurden aus den Daten dreier Tiere konkateniert. Die BAL wurde bereits vor der Färbung vereinigt (n = 3). Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. Die Expression von CXCR5 und Bcl-6 auf transgenen T-Zellen ist als mittlere Fluoreszenzintensität (geoMFI) angegeben. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einem Tier, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von zweien. \*\* p < 0,01

Trotz der niedrigeren Frequenz von Keimzenters-B-Zellen in der Lunge war die absolute Zellzahl der Keimzenters-B-Zellen in Lymphknoten und Lunge mit 8,2 Mio bzw. 7,2 Mio Zellen in

beiden Organen vergleichbar. In der bronchoalveolären Lavage hingegen waren kaum (1 % bzw.  $4 \times 10^4$  Zellen) PNA<sup>+</sup> Bcl-6<sup>+</sup> transgene B-Zellen nachweisbar (Abbildung 3A).

Da die Entwicklung von Keimzentrum-B-Zellen abhängig von der Anwesenheit von TFH-Zellen ist, wurden als nächstes die T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Im Lungen-drainierenden Lymphknoten zeigten 56 % der transgenen T-Zellen einen klassischen TFH-Phänotyp, der durch gleichzeitige Expression von PD-1 und CXCR5 definiert ist. Wie bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, fanden sich zwar PD-1<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge, jedoch fehlte eine CXCR5<sup>+</sup> Population<sup>54</sup>. In den Atemwegen zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch der Mastertranskriptionsfaktor der TFH-Zellen Bcl-6 lässt sich zwar im Lymphknoten gut nachweisen, im Lungengewebe und den Atemwegen exprimieren die transgenen T-Zellen hingegen kein Bcl-6 (Abbildung 3B).

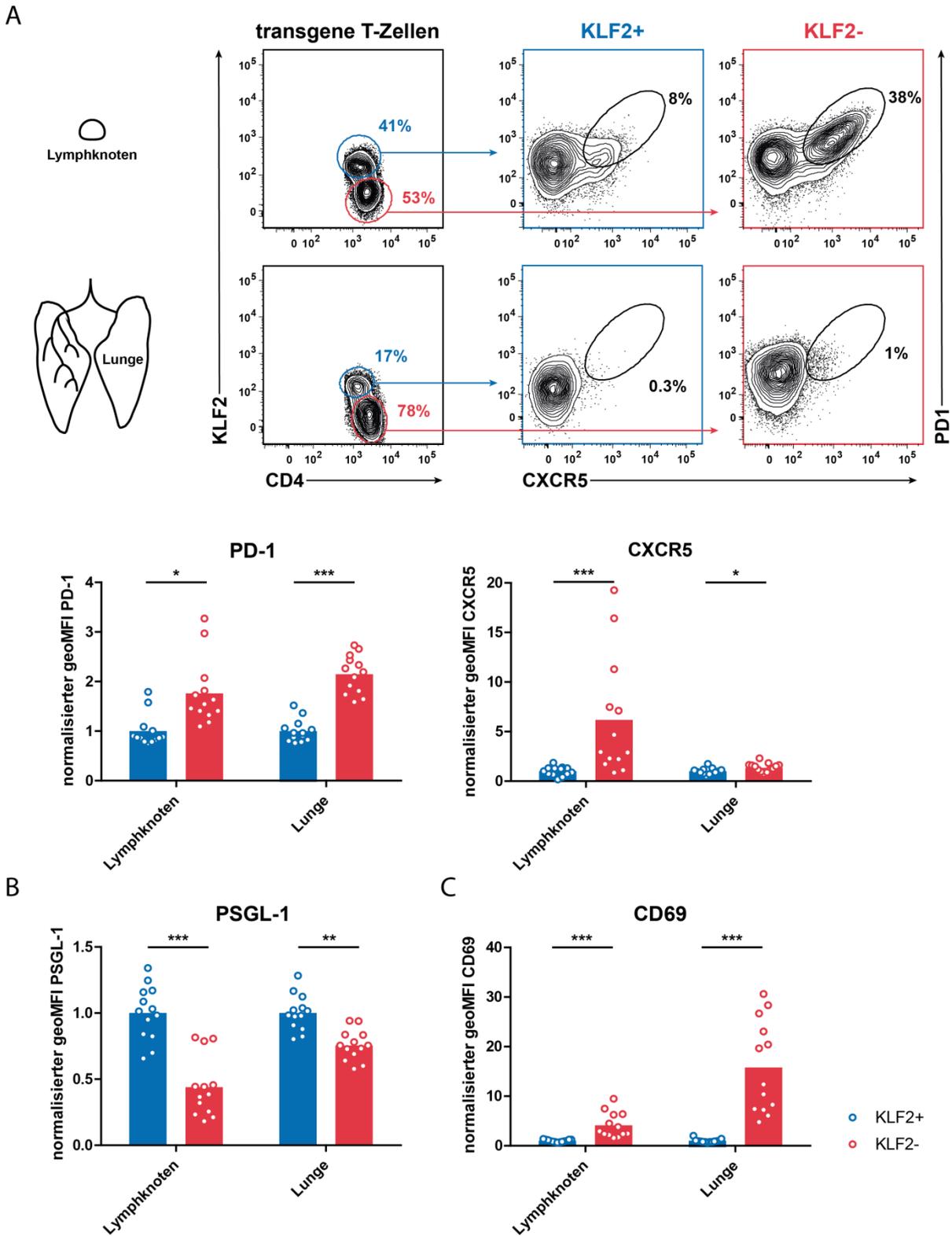
Zusammenfassend lassen sich TFH-Zellen in der Lunge und den Atemwegen nicht mit den klassischen TFH-Markern identifizieren. Es stellt sich daher die Frage, ob es andere Marker gibt, mit denen sich diese Zellen beschreiben lassen.

Die Ergebnisse aus der bronchoalveolären Lavage bei der Maus wurden in dieser Arbeit zugunsten der Übersichtlichkeit nicht weiter dargestellt. Bis auf die fehlenden Keimzentrums-B-Zellen fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Lungengewebe und BAL. Folglich lassen sich die für die Lunge gezeigten Ergebnisse auch auf die transgenen T-Zellen aus der BAL übertragen.

### **3.1.3 T-Zellen mit niedriger KLF2-Expression aus der Lunge zeigen einen TFH-ähnlichen, gewebständigen Phänotyp**

Vorherige Arbeiten unserer Gruppe belegen, dass die Herunterregulation des Transkriptionsfaktors KLF2 essentiell für den Erhalt eines TFH-Phänotyps im Lymphknoten ist<sup>84</sup>. Zudem wurde postuliert, dass KLF2 durch ICOS induziert wird, einem Effektormolekül in TFH-Zellen. Um zu untersuchen, ob KLF2 auch in der Lunge eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von TFH-Zellen spielt, wurde eine KLF2-Reportermaus als T-Zell-Donor verwendet.

Die bereits beschriebenen Beobachtungen ließen sich im Lungen-drainierenden Lymphknoten reproduzieren. Die KLF2<sup>-</sup> T-Zellen des Lymphknotens zeigten einen ausgeprägten PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> TFH-Phänotyp (38 %), die KLF2<sup>+</sup> Zellen dagegen exprimierten nur zu 8 % PD-1 und CXCR5. Anhand der Fluoreszenzintensität beider Marker auf KLF2-positiven und -negativen Zellen ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Populationen feststellen (Abbildung 4A). Die PD-1-Expression auf KLF2<sup>-</sup> T-Zellen war fast doppelt so hoch, die CXCR5-Expression sogar 6-mal so hoch wie die der KLF2<sup>+</sup> T-Zellen.



**Abbildung 4 KLF2<sup>-</sup> T-Zellen zeigen einen TFH-ähnlichen Phänotyp.** (A, B und C) Thy-1.1<sup>+</sup> Smarta T-Zellen aus KLF2-GFP-Reportermäusen und CD45.1<sup>+</sup> B1-8i B-Zellen wurden in C57BL/6 Mäuse transfertiert und an Tag 0, 1, 10 und 13 mit SM-NIP und LPS i.n. immunisiert. Die transgenen Zellen wurden an Tag 17 analysiert. (A) Durchflusszytometrische Analyse von KLF2<sup>+</sup> und KLF2<sup>-</sup> transgenen T-Zellen in Lunge und Lymphknoten. Die Konturdiagramme zeigen die Gating-Strategie auf KLF2<sup>+</sup> und KLF2<sup>-</sup> transgenen T-Zellen. Blau umrahmte Konturdiagramme stellen die TFH-Zell-Marker PD-1 und CXCR5 auf KLF2<sup>+</sup> T-Zellen dar. Rot umrahmte Konturdiagramme zeigen die TFH-Zell-Marker PD-1 und CXCR5 auf KLF2<sup>-</sup> T-Zellen. Die Konturdiagramme wurden aus den Daten von 6 Tieren konkateniert. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. Die Expression von CXCR5 und PD-1 auf KLF2<sup>+</sup> bzw. KLF2<sup>-</sup> transgenen T-Zellen ist als mittlere

Fluoreszenzintensität angegeben. (B) Vergleichende Darstellung der PSGL-1-Expression auf KLF2<sup>+</sup> und KLF2<sup>-</sup> transgenen T-Zellen in Lunge und Lymphknoten, gezeigt als mittlere Fluoreszenzintensität. (C) Vergleichende Darstellung der CD69-Expression auf KLF2<sup>+</sup> und KLF2<sup>-</sup> transgenen T-Zellen in Lunge und Lymphknoten, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einem Tier, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=6 und n=7. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

Auch im Lungengewebe fand sich eine ausgeprägte Zellpopulation mit niedriger KLF2-Expression. Analog zum Lymphknoten zeigten die KLF2<sup>-</sup> T-Zellen eine doppelt so hohe PD-1-Expression im Vergleich zu KLF2<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 4A). Da CXCR5 auf den Lungenzellen limitiert auswertbar ist (siehe 3.1.2), wurde zusätzlich P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), ein Homing-Rezeptor für die T-Zell Zone, welcher von KLF2 reguliert wird und von TFH-Zellen kaum exprimiert wird, untersucht<sup>85</sup>. Die Expression von PSGL-1 war sowohl in den KLF2<sup>-</sup> T-Zellen der Lunge als auch des Lymphknotens signifikant niedriger als in den KLF2<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 4B).

Die Fluoreszenzintensität des Aktivierungsmarkers CD69 hingegen war in den KLF2<sup>-</sup> transgenen T-Zellen signifikant höher als in den KLF2<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 4C). Da CD69 invers zu S1PR1 exprimiert wird, kann dieses Molekül als Marker für gewebständige Zellen betrachtet werden<sup>86</sup>.

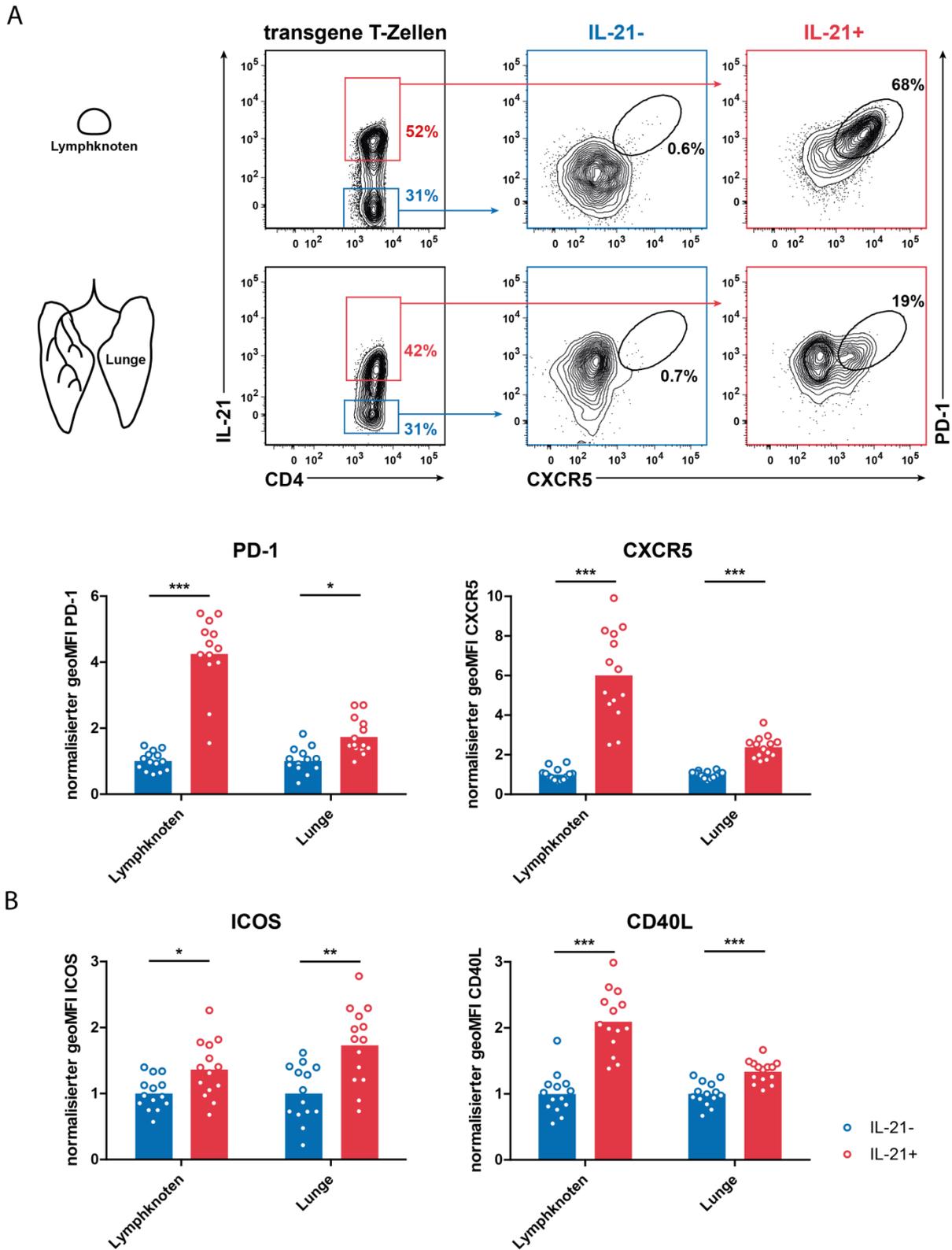
Diese Ergebnisse zeigen, dass T-Zellen, die den Transkriptionsfaktor KLF2 kaum exprimieren, sowohl im Lymphknoten, als auch in der Lunge einen aktivierten, gewebständigen, TFH-ähnlichen Phänotyp besitzen.

### 3.1.4 IL-21-produzierende T-Zellen aus Lungengewebe zeigen einen TFH-ähnlichen Phänotyp

IL-21 ist das charakteristische Zytokin für TFH-Zellen und spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von B-Zellen hin zu hochaffinen, langlebigen Plasmazellen<sup>87</sup>. Um IL-21-produzierende Zellen mit IL-21-negativen Zellen in Lunge und Lymphknoten vergleichen zu können, wurden die T-Zellen einer IL-21 Reportermaus transferiert.

Analog zu den KLF2<sup>-</sup> T-Zellen im Lymphknoten zeigten 68 % der IL-21<sup>+</sup> T-Zellen im Lymphknoten einen PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> TFH-Phänotyp, wohingegen nur 0,5 % IL-21<sup>-</sup> T-Zellen einen solchen Phänotyp aufwiesen. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den signifikanten Unterschieden der Fluoreszenzintensität von PD-1 und CXCR5 wieder, die in den IL-21<sup>+</sup> T-Zellen 4-fach beziehungsweise 6-fach höher war. Die IL-21-produzierenden T-Zellen in der Lunge zeigten ebenfalls eine doppelt so hohe Expression von PD-1 im Vergleich zu IL-21<sup>-</sup> T-Zellen (Abbildung 5A).

Um den TFH-ähnlichen Phänotyp der IL-21<sup>+</sup> T-Zellen weiter zu untersuchen, wurde zusätzlich der kostimulatorische TFH-Zell-Marker ICOS gefärbt, sowie CD40L, ein Molekül, welches bei der B-Zell-Hilfe durch T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt. Sowohl in der Lunge, als auch im Lymphknoten



**Abbildung 5 TFH-Zell-Marker werden in IL-21<sup>+</sup> und IL-21<sup>-</sup> Zellen differenziell exprimiert.** (A und B) Thy-1.1<sup>+</sup> Smarta T-Zellen aus IL-21-FP635 Reporter-mäusen und CD45.1<sup>+</sup> B1-8i B-Zellen wurden in C57BL/6 Mäuse transferiert und an Tag 0, 1, 10 und 13 mit SM-NIP und LPS i.n. immunisiert. Die transgenen Zellen wurden an Tag 14 analysiert. (A) Durchflusszytometrische Analyse von IL-21<sup>+</sup> und IL-21<sup>-</sup> transgenen T-Zellen in Lunge und Lymphknoten. Die Konturdiagramme zeigen die Gating-Strategie auf IL-21<sup>+</sup> und IL-21<sup>-</sup> transgenen T-Zellen. Blau umrahmte Konturdiagramme stellen die TFH-Zell-Marker PD-1 und CXCR5 auf IL-21<sup>-</sup> T-Zellen dar. Rot umrahmte Konturdiagramme zeigen die TFH-Zell-Marker PD-1 und CXCR5 auf IL-21<sup>+</sup> T-Zellen. Die Konturdiagramme wurden aus den Daten von 7 Tieren konkateniert. Die

Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. Die Expression von CXCR5 und PD-1 auf IL-21<sup>+</sup> bzw. IL-21<sup>-</sup> transgenen T-Zellen ist als mittlere Fluoreszenzintensität im Säulendiagramm angegeben. (B) Vergleichende Darstellung der ICOS- und CD40L-Expression auf IL-21<sup>+</sup> und IL-21<sup>-</sup> transgenen T-Zellen in Lunge und Lymphknoten, gezeigt als mittlere Fluoreszenzintensität. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einem Tier, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils n=7. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

zeigten sowohl ICOS als auch CD40L ein signifikant höheres Expressionslevel in den IL-21-produzierenden transgenen T-Zellen (Abbildung 5B).

Neben KLF2<sup>-</sup> Zellen besitzen folglich auch IL-21<sup>+</sup> Zellen aus Lunge und Lymphknoten einen TFH-ähnlichen Phänotyp.

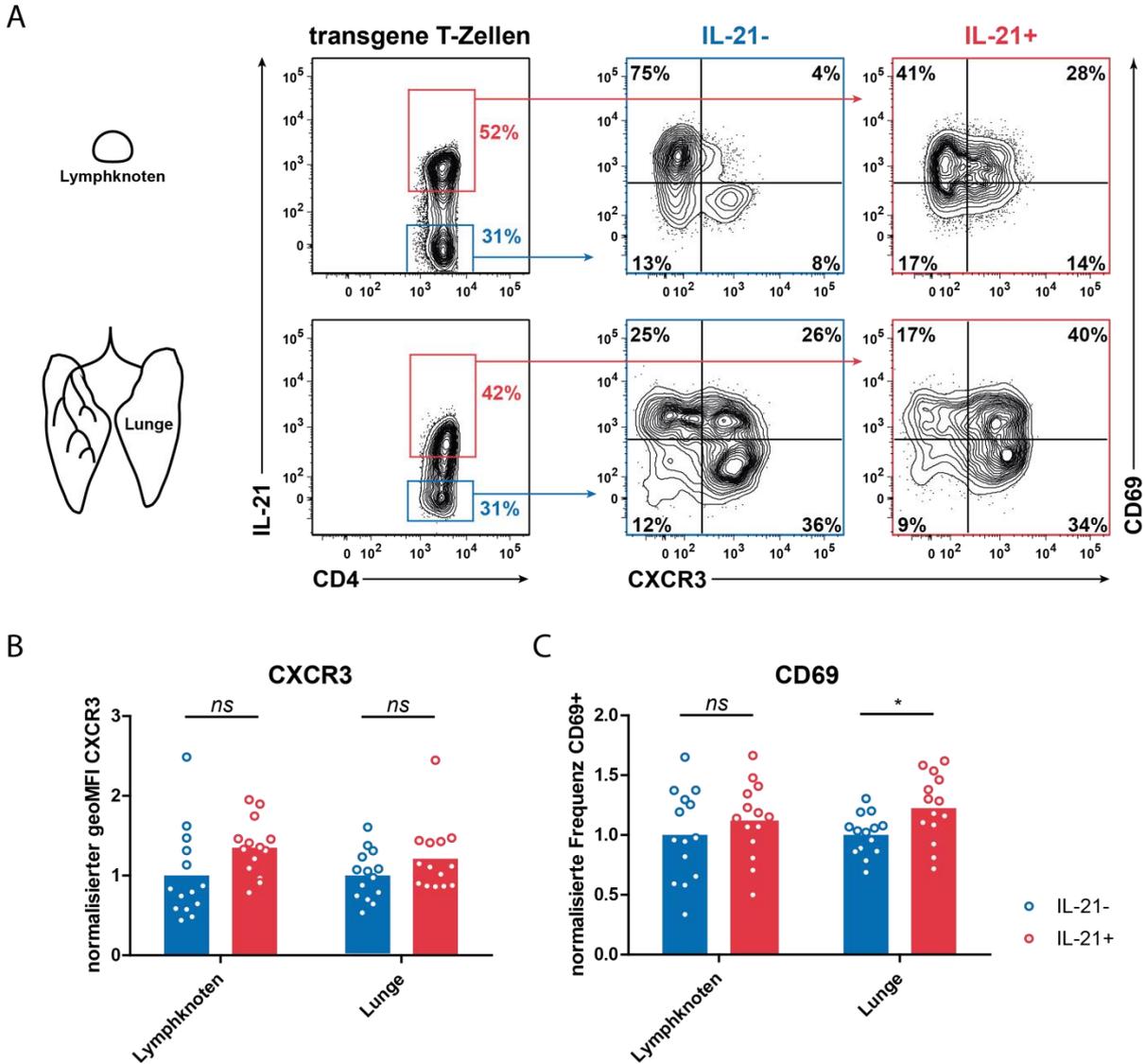
### 3.1.5 IL-21<sup>+</sup> T-Zellen aus Lungengewebe zeigen einen aktivierten, gewebständigen Phänotyp

Um die IL-21<sup>+</sup> T-Zellen im Lungengewebe detaillierter zu beschreiben, wurden die Aktivierungs- und Migrationsmarker CD69 und CXCR3 untersucht. Der Chemokinrezeptor CXCR3, der auf verschiedenen Immunzellen exprimiert wird, erkennt CXCL9, 10 und 11. Er steuert unter anderem die Migration von T-Zellen ins entzündete Lungengewebe<sup>88</sup>.

Im Lymphknoten und der Lunge konnten vergleichbare Fraktionen CD69<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Im Lymphknoten unterschieden sich die IL-21<sup>+</sup> und IL-21<sup>-</sup> T-Zellen nicht bezüglich ihrer CD69-Expression. Im Gegensatz dazu zeigen die IL-21-produzierenden T-Zellen der Lunge eine vermehrte Expression von CD69 im Vergleich zu IL-21<sup>-</sup> T-Zellen (Abbildung 6A und B). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei den IL-21-produzierenden T-Zellen der Lunge um gewebständige Zellen handeln könnte.

Im Vergleich zu CD69 unterschieden sich Lunge und Lymphknoten hinsichtlich der Expression des Migrationsmarkers CXCR3. CXCR3 wird unter inflammatorischen Bedingungen auf T- und B-Zellen exprimiert und rekrutiert die Zellen ins entzündete Gewebe. Auf T-Zellen der Lunge wird vermehrt CXCR3 exprimiert (Daten nicht gezeigt). Zwischen der IL-21<sup>+</sup> und IL-21<sup>-</sup> Population zeigt sich jedoch weder in Lunge noch im Lymphknoten ein signifikanter Unterschied (Abbildung 6A und C).

Ergänzend zu dem TFH-ähnlichen Phänotyp, den IL-21-produzierende T-Zellen aus dem Lungengewebe zeigen, handelt es sich bei diesen Zellen um gewebständige, aktivierte Zellen.



**Abbildung 6 IL-21<sup>+</sup> T-Zellen aus der Lunge sind aktiviert und gewebsständig.** Thy-1.1<sup>+</sup> Smarta T-Zellen aus IL-21-FP635 Reporter-mäusen und CD45.1<sup>+</sup> B1-8i B-Zellen wurden in C57BL/6 Mäuse transferiert und an Tag 0, 1, 10 und 13 mit SM-NIP und LPS i.n. immunisiert. Die transgenen Zellen wurden an Tag 14 analysiert. (A) Durchflusszytometrische Analyse von IL-21<sup>+</sup> und IL-21<sup>-</sup> transgenen T-Zellen in Lunge und Lymphknoten. Die Konturdiagramme zeigen die Gating-Strategie auf IL-21<sup>+</sup> und IL-21<sup>-</sup> transgenen T-Zellen. Blau umrahmte Konturdiagramme stellen die CXCR3- und CD69-Expression auf IL-21<sup>-</sup> T-Zellen dar. Rot umrahmte Konturdiagramme zeigen die die CXCR3- und CD69-Expression auf IL-21<sup>+</sup> T-Zellen. Die Konturdiagramme wurden aus den Daten von 7 Tieren konkateniert. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. (B und C) Vergleichende Darstellung der CXCR3- und CD69-Expression auf IL-21<sup>+</sup> und IL-21<sup>-</sup> transgenen T-Zellen in Lunge und Lymphknoten, gezeigt als mittlere Fluoreszenzintensität bzw. normalisierte Frequenzen im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einem Tier, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit n=3, n=7 und n=7. ns nicht signifikant; \* p < 0,05

### 3.1.6 Hauptkomponentenanalyse bestätigt den TFH-ähnlichen Phänotyp der IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge

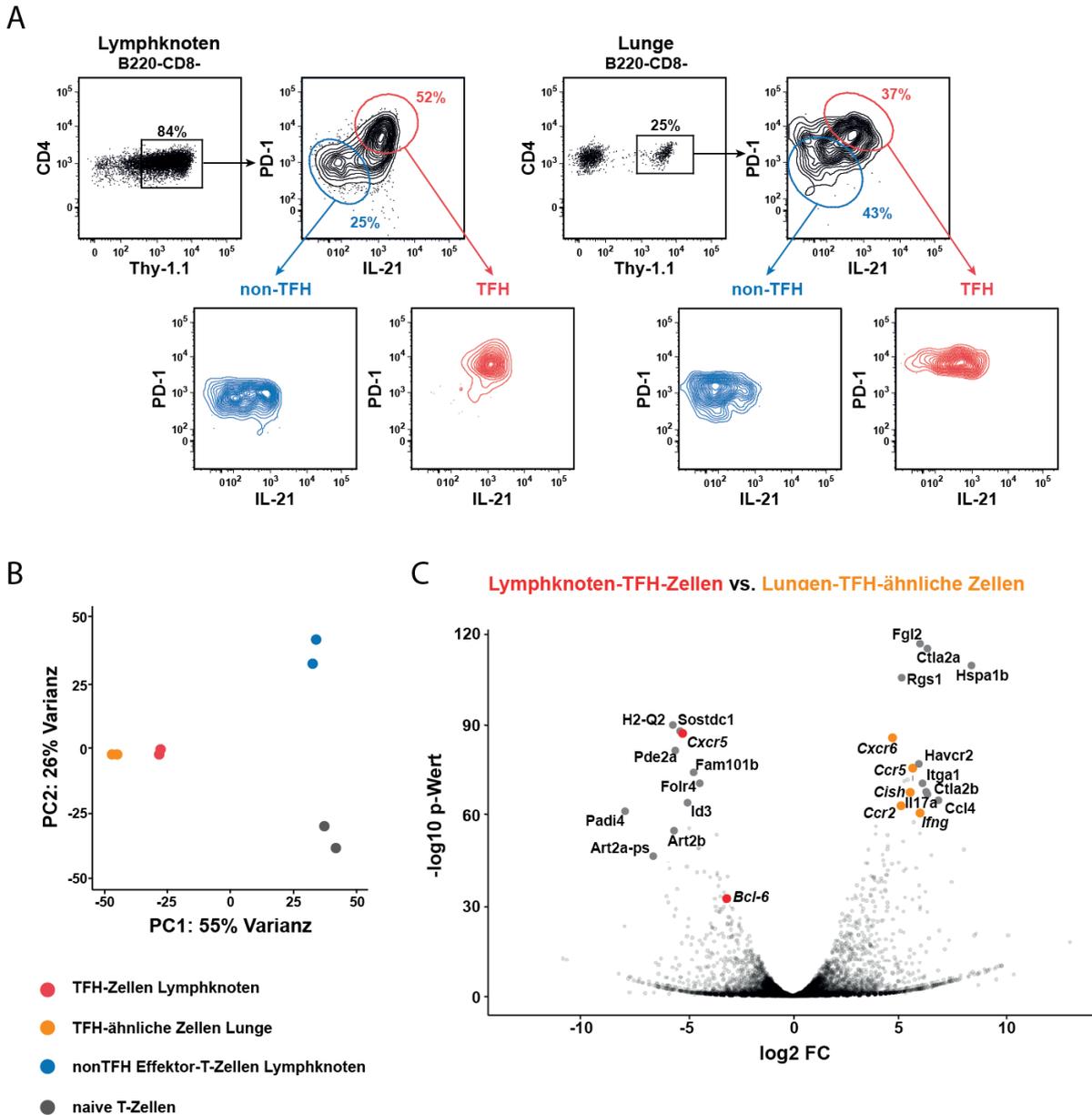
Ob sich die IL-21-produzierenden T-Zellen aus Lunge und Lymphknoten auf transkriptioneller Ebene ähneln und welche Moleküle unterschiedlich exprimiert werden, wurde mit Hilfe von *Next Generation Sequencing* (NGS) untersucht. NGS ermöglicht die parallele Sequenzierung mehrerer

Millionen RNA-Fragmente und damit deren Detektion und Quantifizierung<sup>89</sup>. Neben IL-21 wurde PD-1 als zweiter Marker verwendet, um einen TFH-ähnlichen Phänotyp zu beschreiben, da PD-1 ein bekannter TFH-Zell-Marker ist und, wie in 3.1.4 gezeigt werden konnte, mit IL-21 koexprimiert wird. Um genügend IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> T-Zellen aus Lunge und Lymphknoten für die Sequenzierung sortieren zu können, wurden an Tag 15 nach adoptivem Transfer die Zellen von mehreren Tieren isoliert, die Zellen vereinigt und je nach Expressionslevel der Marker IL-21 und PD-1 in TFH-ähnliche Zellen und nicht-TFH-Zellen sortiert (Abbildungen 7A). Aus diesen wurde RNA isoliert und eine Transkriptionsanalyse mittels NGS durchgeführt (Kooperation mit Mir-Farzin Mashreghi, DRFZ). Anschließend wurden die Daten mittels Hauptkomponentenanalyse (engl. *principle component analysis*) analysiert. Hier zeigte sich eine räumliche Ansammlung der IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Zellen aus der Lunge und dem Lymphknoten. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass sich die Gene in beiden Organen in ihrer Expression größtenteils ähnlich verhalten. Eine räumliche Differenz zeigte sich allerdings zu den IL-21<sup>-</sup> PD-1<sup>-</sup> T-Zellen aus dem Lymphknoten und naiven T-Zellen, sodass die TFH-ähnlichen Zellen aus Lunge und Lymphknoten ein eigenes transkriptionelles Muster aufwiesen (Abbildung 7B).

Dennoch unterscheiden sich die TFH-ähnlichen Zellen aus Lunge und Lymphknoten leicht, wie sich an der Differenz auf der Achse der Hauptkomponente 1 (PC1) erkennen lässt. Die zwischen Lunge und Lymphknoten differentiell exprimierten Gene umfassen unter anderem CXCR5 und Bcl-6, die, wie schon in 3.1.2 durchflusszytometrisch gezeigt wurde, auf der Oberfläche von Lungenzellen nicht exprimiert werden. Außerdem war Cish (*cytokine-inducible SH2-containing protein*), ein Protein aus der SOCS (*suppressor of cytokine signalling proteins*)-Familie, in den TFH-ähnlichen Zellen aus dem Lungengewebe stark exprimiert. Cish wird durch STAT5 (*signal transducers and activators of transcription*)-Aktivierung induziert und unterdrückt anschließend in einer negativen Feedback-Schleife den Januskinase (JAK)/STAT5-Signalweg<sup>90</sup>. STAT5 wiederum inhibiert die TFH-Differenzierung und Funktion über Suppression des Transkriptionsfaktors Bcl-6 (Abbildung 7C)<sup>91</sup>.

Da die T-Zellen aus der Lunge kein CXCR5 exprimierten, stellte sich die Frage, ob und welche anderen Chemokinrezeptoren sie auf ihrer Oberfläche exprimieren. Im Vergleich zu den TFH-Zellen aus dem Lymphknoten, wurden auf den TFH-ähnlichen Zellen der Lunge CCR2, CCR5 und CXCR6 vermehrt exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Zellen aus Lunge und Lymphknoten, mit Ausnahme weniger Gene, sehr ähnliche Expressionsmuster aufweisen.



**Abbildung 7** TFH-Zellen aus dem Lymphknoten und TFH-ähnliche Zellen aus der Lunge zeigen ähnliche Gen-Expressionsmuster Thy-1.1<sup>+</sup> Smarta T-Zellen aus IL-21-FP635 Reporter-mäusen und CD45.1<sup>+</sup> B1-8i B-Zellen wurden in C57BL/6 Mäuse transferiert und an Tag 0, 1, 10 und 13 mit SM-NIP und LPS i.n. immunisiert. Die transgenen Zellen wurden an Tag 15 sortiert. Thy-1.1<sup>+</sup> Zellen, die aus dem Lymphknoten isoliert wurden, wurden mittels MACS angereichert. (A) Repräsentative Konturdiagramme zeigen die Strategie der Zellsortierung. Sortiert wurden CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> TFH-ähnliche Zellen aus Lunge und Lymphknoten (rot) und CD4<sup>+</sup> Thy-1.1<sup>+</sup> IL-21<sup>-</sup> PD-1<sup>-</sup> nicht-TFH-ähnliche Zellen (blau) als Vergleichspopulation. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. Die RNA der sortierten Zellen wurde isoliert und mittels Next-Generation-Sequencing analysiert. (B) Das Punktdiagramm zeigt die Hauptkomponentenanalyse der sortierten Zellen. TFH-Zellen aus dem Lymphknoten sind in rot gezeigt, TFH-ähnliche Zellen aus der Lunge in orange, nicht-TFH-Zellen aus dem Lymphknoten in blau und naive T-Zellen in grau. Die Varianz jeder Hauptkomponente ist an den jeweiligen Achsen in Prozent angegeben. PC1: *principle component 1* Hauptkomponente 1; PC2: *principle component 2* Hauptkomponente 2. (C) Graph der in IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Zellen auf Lunge und Lymphknoten differentiell exprimierten Gene. Je weiter links im Graph ein Gen liegt, desto stärker war es im Lymphknoten exprimiert. Je weiter rechts im Graph ein Gen liegt, desto stärker war es in der Lunge exprimiert. Die Hauptkomponentenanalyse wurde in Kooperation mit Frederik Heinrich vom DRFZ durchgeführt.

### 3.1.7 TFH-ähnliche Zellen in der Lunge sind unabhängig von ICOS-Kostimulation

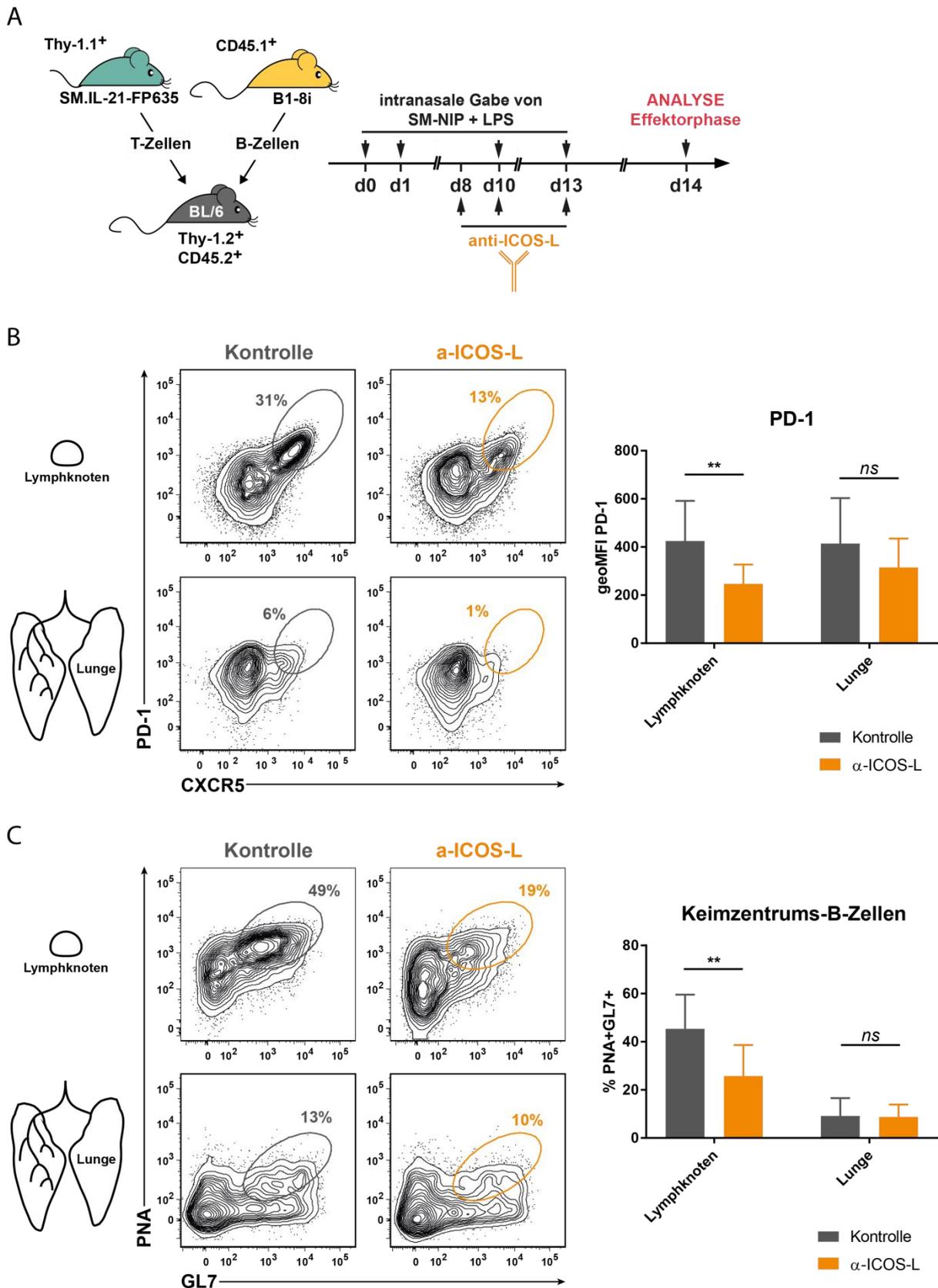
Nach Aktivierung wird auf T-Zellen ICOS, strukturell verwandt mit CD28, hochreguliert. Die Bindung von ICOS-Ligand initiiert ein positives, kostimulatorisches Signal, das zur Proliferation von T-Zellen, gesteigertem B-Zell-Helfer-Potential und Hochregulation der Zytokinproduktion führt<sup>92,93</sup>. Der Signalweg hat über die Suppression von KLF2 einen starken Einfluss auf den TFH-Phänotyp und die Lokalisation der Zellen.

Um den Einfluss von ICOS auf die T-Zellen der Lunge genauer untersuchen zu können wurde ICOS-L mit Hilfe eines Antikörpers blockiert und somit die Interaktion zwischen ICOS-L und ICOS unterbunden. In dem unter 3.1.1 beschriebenen Atemwegs-Entzündungsmodell wurden an den Tagen 8, 10 und 13 entweder der Blockade-Antikörper oder eine Ratten-IgG2a-Isotypkontrolle intranasal und intraperitoneal verabreicht (Abbildung 8A).

Im Lymphknoten zeigte sich unter der Blockade ein signifikanter Rückgang der TFH-Population, definiert durch gleichzeitige Expression von PD-1 und CXCR5, von 31 % der transgenen T-Zellen auf 13 % (Abbildung 8B). Auch die Fluoreszenzintensität von PD-1, welche anders als CXCR5 nicht direkt über ICOS und KLF2 reguliert wird, halbierte sich in der Blockadegruppe nahezu. Dieser Effekt ließ sich in der Lunge allerdings nicht nachweisen. Dort unterschied sich die Expression von PD-1 der blockierten Tiere nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Im Lymphknoten zeigte die Blockadegruppe eine signifikante Abnahme in der IL-21-Produktion von 44 % IL-21-Produzenten auf 22 %. Auch dies ließ sich in der Lunge nicht zeigen (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde der Effekt auf die Keimzentrums-B-Zellen untersucht, die abhängig von der Anwesenheit von TFH-Zellen sind. Im Lymphknoten zeigten unter der Blockade noch 19 % einen Keimzentrums-Phänotyp, der durch die gleichzeitige Bindung von PNA und dem Antikörper GL7 definiert ist (Abbildung 8C). Im Vergleich dazu waren in den Kontrolltieren 49 % der B-Zellen PNA<sup>+</sup> GL7<sup>+</sup>. Demgegenüber fanden sich in der Lunge sowohl in der Blockadegruppe (10 %) als auch in der Kontrollgruppe (13 %) vergleichbare Frequenzen an Keimzentrums-B-Zellen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass ICOS im Lymphknoten einen starken Effekt auf den TFH-Zell-Phänotyp und die Keimzentrumsreaktion ausübt, die T-Zellen und Keimzentrums-B-Zellen in der Lunge sich anscheinend unabhängig von ICOS entwickeln.



**Abbildung 8** TFH-ähnliche Zellen in der Lunge sind von ICOS unabhängig. (A) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. Thy-1.1<sup>+</sup> Smarta T-Zellen aus IL-21-FP635 Reporterermäusen und CD45.1<sup>+</sup> B1-8i B-Zellen wurden in C57BL/6 Mäuse transferiert und an Tag 0, 1, 10 und 13 mit SM-NIP und LPS i.n. immunisiert. Zusätzlich wurden die Tiere mit dem anti-ICOS-L-Antikörper MIL-5377 oder einem Ratten-IgG2a-Isotyp an Tag 8, 10 und 13 i.n. und i.p. behandelt. Die transgenen Zellen wurden an Tag 14 analysiert. (B) Durchflusszytometrische Analyse der transgenen T-Zellen auf einen

PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> TFH-Zell-Phänotyp. Die Konturdiagramme wurden aus den Daten von 7 Tieren konkateniert. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. Vergleichende Darstellung der PD-1-Expression in behandelten Tieren und Kontrolltieren, gezeigt als mittlere Fluoreszenzintensität im Säulendiagramm. (C) Durchflusszytometrische Analyse der transgenen B-Zellen auf einen Keimzentrums-Phänotyp (PNA<sup>+</sup> GL-7<sup>+</sup>). Die Konturdiagramme wurden aus den Daten von 7 Tieren konkateniert. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. Vergleichende Darstellung der Frequenz der Keimzentrums-B-Zellen in behandelten Tieren und Kontrolltieren, gezeigt als Frequenz im Säulendiagramm. Die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardfehler (SEM). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils n=7. ns nicht signifikant; \*\* p < 0,01

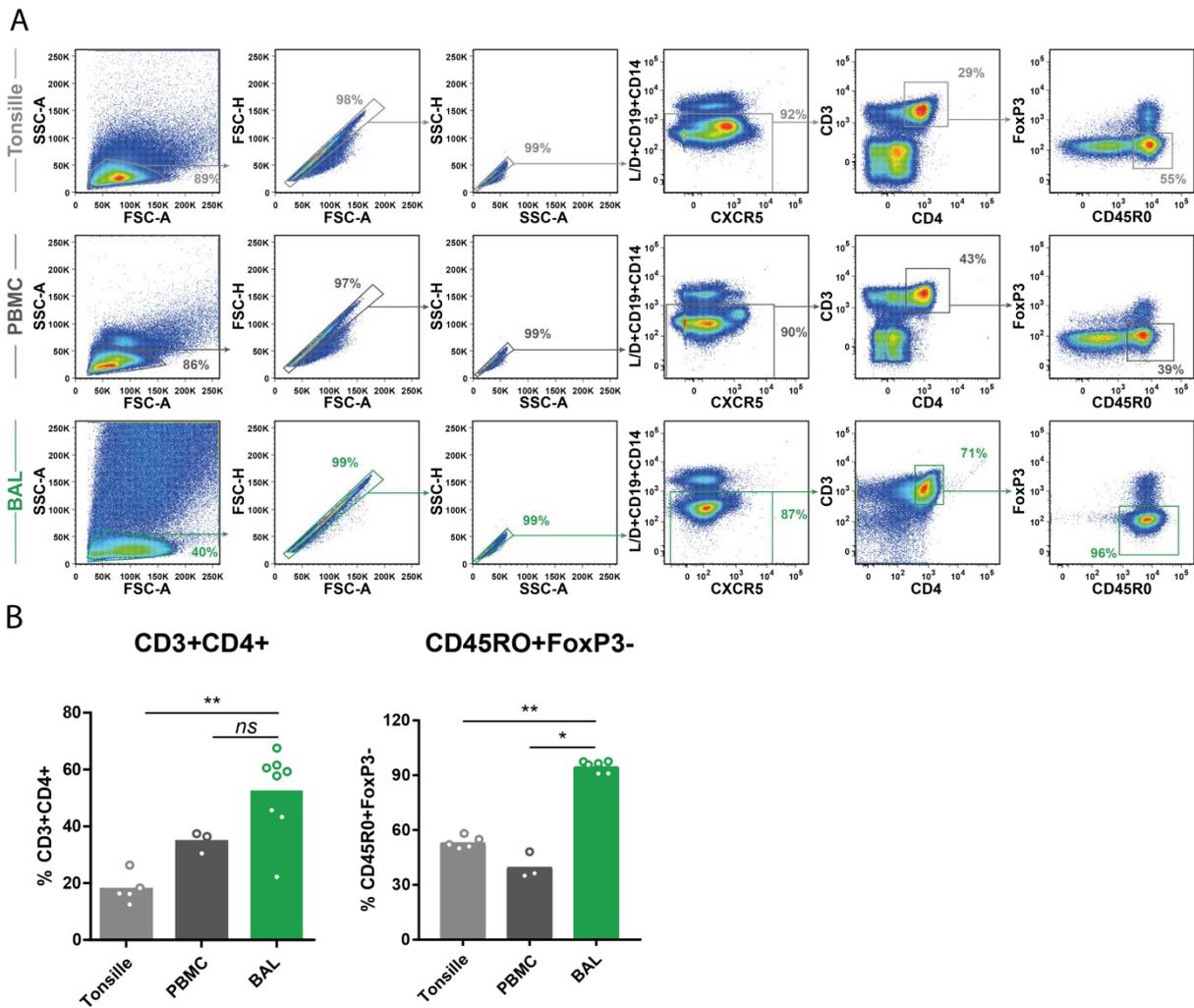
### 3.2 Charakterisierung von Korrelaten folliculärer T-Helferzellen in bronchoalveolärer Lavage bei Sarkoidose-Patienten

T-Zellen in bronchoalveolärer Lavage von Sarkoidose-Patienten sind bereits mehrfach untersucht worden. Allerdings bezieht sich ein Großteil dieser Forschung auf Th1, Th17 oder regulatorische T-Zellen (Tregs). TFH-Zellen sind in diesem Kontext bisher nicht erforscht. Es stellt sich die Frage, ob die IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Population, die im murinen Lungengewebe nachgewiesen werden konnte, sich auch in der Inflammation der humanen Atemwege wiederfinden lässt und welche weiteren Charakteristika von TFH-Zellen die T-Zellen widerspiegeln.

Um die T-Zellen aus den Atemwegen mit klassischen TFH-Zellen vergleichen zu können, wurden zusätzlich T-Zellen und TFH-Zellen aus humaner Tonsille, als sekundär lymphatischem Referenzorgan, analysiert. Als Kontrolle dienten zirkulierende T-Helferzellen aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von gesunden Probanden.

Bezogen auf die Population im *Scatter* ließen sich fast 52 % der Zellen in den entzündeten Atemwegen als CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen identifizieren. Im Vergleich dazu zeigten nur 35 % der zirkulierenden und 18 % der tonsillären Zellen einen T-Helferzell-Phänotyp (Abbildung 9B). In der T-Helferzell-Population in der BAL exprimierten über 95 % CD45RO und kein FoxP3. In Tonsille und PBMC war die Frequenz mit 53 % beziehungsweise 40 % CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen deutlich geringer. Aufgrund dieser unterschiedlichen Frequenzen an Gedächtnis- bzw. aktivierten T-Zellen wurden, für eine bessere Vergleichbarkeit, in allen nachfolgenden Analysen nur noch die CD45RO-positiven Zellen betrachtet.

Die Frequenz FoxP3-positiver T-Zellen in der BAL war mit einer durchschnittlichen Frequenz von 4,5 % sehr gering. Dass die Population regulatorischer T-Zellen in der BAL von Sarkoidose-Patienten klein ist, zeigten bereits Skathivel und Kollegen<sup>88</sup>. Sie stellten in ihrer Studie auch einen Vergleich zu gesunden Probanden her, die im Durchschnitt höhere Frequenzen FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen zeigten.



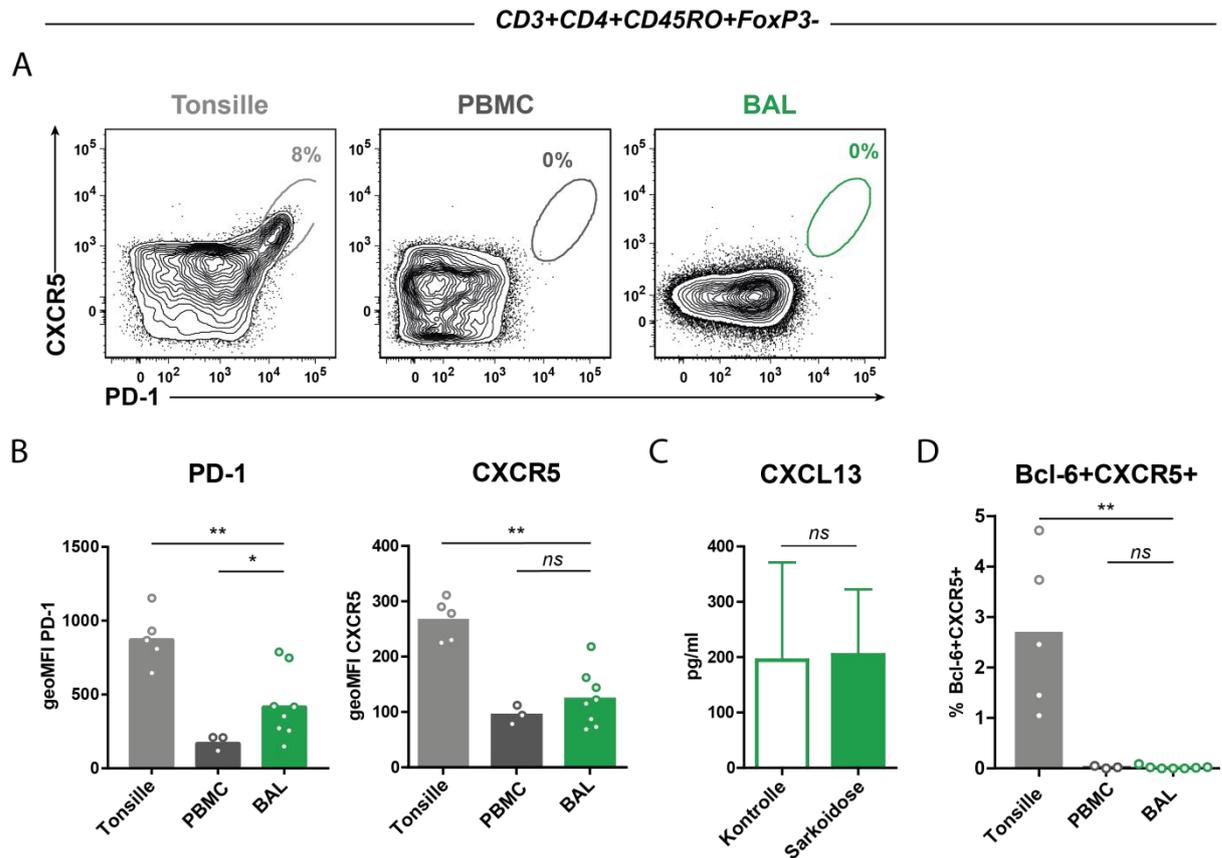
**Abbildung 9 Analyse von CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen aus BAL, Tonsille und PBMC.** (A) Zur Analyse von T-Zellen werden die Lymphozyten gemäß ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) von anderen Zellen und Zelltrümmern abgegrenzt. Dubletten werden anhand ihres disproportionalen Verhältnisses von Fläche und Höhe der Scattersignale ausgeschlossen. Mittels Lebend-Tot-Färbung (L/D) werden tote Zellen ausgegrenzt, mittels CD19 B-Zellen und CD14 Monozyten. Anschließend werden die T-Helferzellen durch Expression von CD3 und CD4 definiert. FoxP3<sup>+</sup> und CD45RO<sup>-</sup> Zellen werden ausgeschlossen. Sofern nicht anders erwähnt, beruhen alle folgenden durchflusszytometrischen Analysen auf den hier gezeigten CD19<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> Zellen. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. (B) Frequenzen der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> von allen im Scatter erfassten Zellen bzw. Frequenzen der CD45RO<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen von allen CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe; die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. ns nicht signifikant\* p < 0,05; \*\* p < 0,01;\*\*\* p < 0,001

### 3.2.1 BAL T-Zellen zeigen keinen klassischen TFH-Phänotyp

Analog zu murinen TFH-Zellen lassen sich klassische humane TFH-Zellen in sekundär lymphatischen Organen über die parallele Expression von PD-1 und CXCR5 definieren und zeigen eine Hochregulation des Mastertranskriptionsfaktors Bcl-6.

In der menschlichen Tonsille zeigten 9,3 % der Zellen einen TFH-Phänotyp. Weder in den entzündeten Atemwegen noch in den PBMC konnte eine CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Population nachgewiesen werden. Die tonsillären CD45RO<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen ließen sich nach der Expression von PD-1 in

drei Gruppen teilen: eine negative, eine intermediär positive und eine stark positive Population. Allein die stark positive Population koexprimierte CXCR5. In PBMC und BAL fanden sich nur eine PD-1<sup>-</sup> und eine PD-1<sup>+</sup> Population (Abbildung 10A). Bezogen auf die Fluoreszenzintensität von PD-1 exprimierten die T-Zellen aus den Atemwegen nur halb so viel PD-1 wie die tonsillären T-Zellen, jedoch ungefähr doppelt so viel im Vergleich zu zirkulierenden T-Zellen. Eine CXCR5-Expression fehlte sowohl in der BAL als auch in den PBMC (Abbildung 10B).



**Abbildung 10 BAL T-Zellen zeigen keinen klassischen TFH-Phänotyp.** (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen hinsichtlich eines PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> TFH-Phänotyps. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender. (B) Vergleichende Darstellung der Fluoreszenzintensität der Marker PD-1 und CXCR5 in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. (C) Vergleichende Darstellung der Konzentration des Zytokins CXCL13 im BAL-Überstand zwischen Sarkoidose-Patienten und Kontrollen im Säulendiagramm. Die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardfehler (SEM). (D) Vergleichende Darstellung der Frequenz der Bcl-6<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> auf CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzellen in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. ns nicht signifikant; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

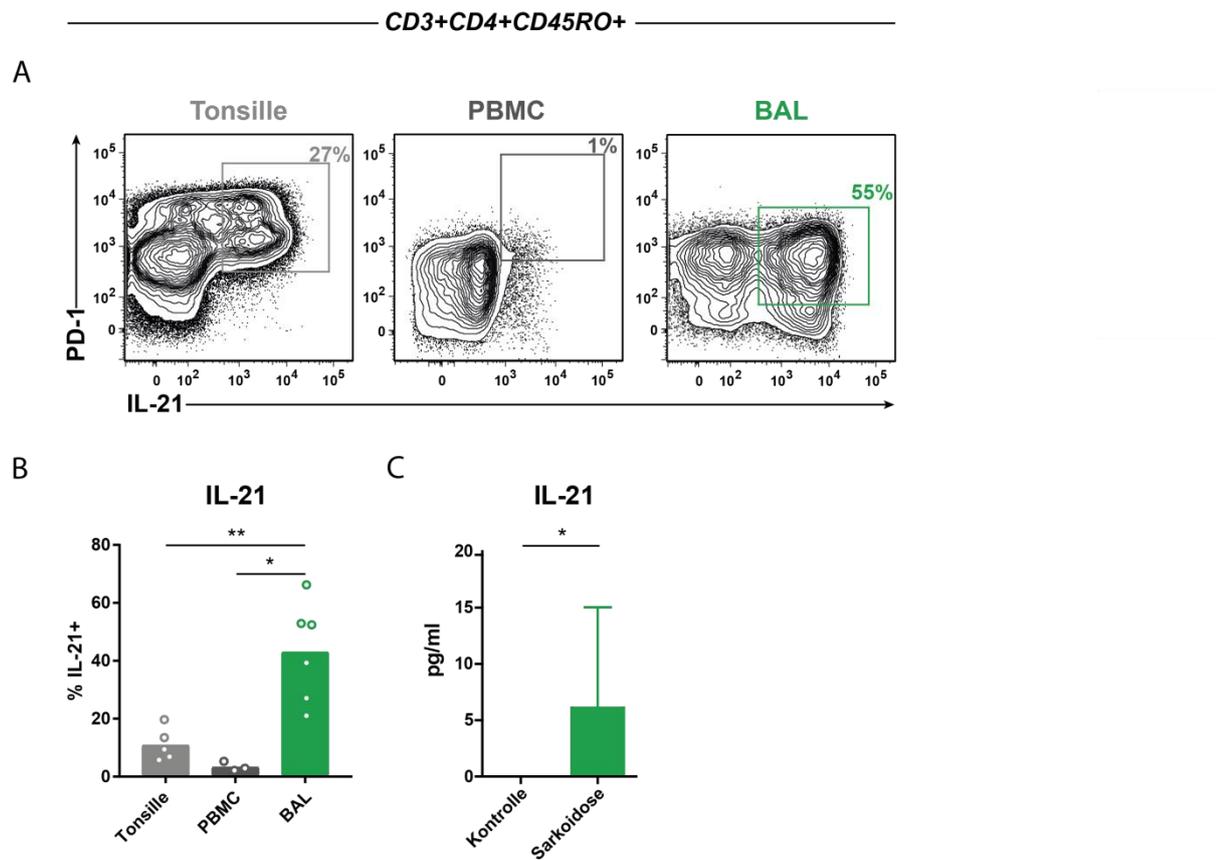
CXCL13, der Ligand für den Rezeptor CXCR5, wird in der B-Zell-Zone in SLO sezerniert, um B-Zellen und TFH-Zellen anzulocken. Zudem exprimieren humane TFH-Zellen CXCL13. Passend zu der fehlenden Expression von CXCR5 auf den T-Zellen fanden sich keine erhöhten CXCL13-Konzentrationen im Überstand der Sarkoidose-BAL (Abbildung 10C). Betrachtet man den Transkriptionsfaktor der TFH-Zellen, Bcl-6, so zeigte sich eine deutliche Bcl-6<sup>+</sup> Population in der

Tonsille, die gleichzeitig CXCR5 exprimierte. Sowohl in der BAL, als auch unter den zirkulierenden T-Zellen waren weder Bcl-6<sup>+</sup> T-Zellen noch eine Bcl-6<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> Population zu finden (Abbildung 10D).

In diesem Experiment ließ sich zeigen, dass sich in den Atemwegen keine klassischen TFH-Zellen finden lassen. Die T-Helferzellen exprimierten zwar PD-1, allerdings weder CXCR5 noch Bcl-6.

### 3.2.2 In den Atemwegen findet sich eine IL-21-produzierende PD-1<sup>+</sup> T-Zell-Population

Da sich keine klassischen TFH-Zellen in den Atemwegen finden ließen, wurde IL-21 als Signatur-Zytokin der TFH-Zellen untersucht. Die Produktion und Sekretion von IL-21 ist ein Hinweis auf stattfindende B-Zell-Hilfe, der Kernaufgabe der TFH-Zellen.



**Abbildung 11 PD-1<sup>+</sup> T-Zellen in den Atemwegen produzieren IL-21.** (A und B) Proben wurden nach 4 h Stimulation mit PMA und Ionomycin gefärbt. (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzellen hinsichtlich der IL-21-Produktion und PD-1-Expression. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender. (B) Vergleichende Darstellung der Frequenz der IL-21-produzierenden Population in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. (C) Vergleichende Darstellung der Konzentration des Zytokins IL-21 im BAL-Überstand zwischen Sarkoidose-Patienten und Kontrollen im Säulendiagramm. Die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel ± Standardfehler (SEM). Patienten n=16; Kontrollen n=7; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01

Nach Restimulation fanden sich hohe Frequenzen IL-21-produzierender T-Zellen in den entzündeten Atemwegen. In 43 % der CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzellen ließ sich IL-21 nachweisen, im Gegensatz dazu nur in 11 % der tonsillären und in 3,4 % der zirkulierenden T-Helferzellen

(Abbildung 11B). In der Tonsille waren alle IL-21-produzierenden T-Zellen zusätzlich PD-1<sup>+</sup>. Eine vergleichbare IL-21<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Population fand sich auch in der BAL wieder (Abbildung 11A).

Zusätzlich konnte in dem Überstand der BAL von Sarkoidose-Patienten eine signifikant erhöhte Konzentration von IL-21 festgestellt werden. Die IL-21-Konzentration in der Kontrollgruppe, Patienten ohne lymphozytäre Alveolitis oder Infektion der Atemwege, war dagegen unterhalb der Detektionsgrenze (Abbildung 11C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die T-Zellen in den entzündeten Atemwegen, im Vergleich zu klassischen TFH-Zellen aus sekundär lymphatischen Organen, eine deutlich erhöhte IL-21-Produktion zeigten und somit vermutlich in den Atemwegen B-Zell-Hilfe leisten können.

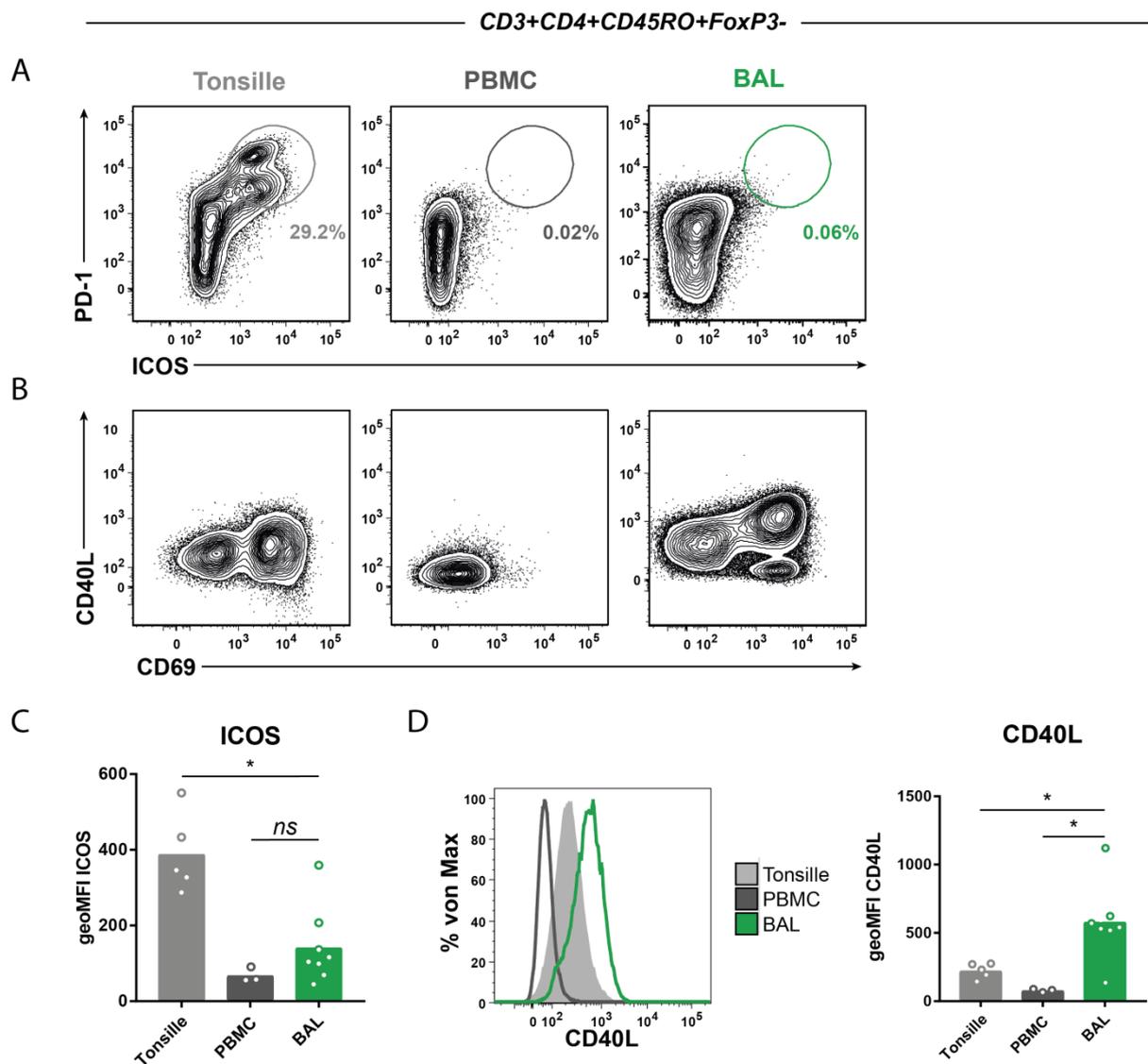
### **3.2.3 T-Zellen in den Atemwegen zeigen eine erhöhte Expression des TFH-Zell-Markers CD40L**

Neben IL-21 ist auch die Expression von CD40L ein Anhaltspunkt für das B-Zell-Helfer Potential von TFH-Zellen. Überexpression von CD40L auf T-Zellen führt in B-Zellen zu intensiver Aktivierung und Antikörperproduktion<sup>94</sup>. ICOS vermittelt wichtige kostimulatorische Signale in TFH-Zellen. Zusammen mit PD-1 sind CD40L und ICOS demnach wichtige Marker für TFH-Zellen.

Die CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen in der Tonsille zeigten eine deutliche PD-1<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> Population, die in den PBMC und den entzündeten Atemwegen nicht zu finden war (Abbildung 12A). Betrachtet man die ICOS-Expression isoliert, zeigte sich, dass die tonsillären T-Helferzellen die höchste ICOS-Expression aufwiesen. Die CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen in den Atemwegen exprimierten weniger als halb so viel ICOS, wie die tonsillären T-Zellen und in PBMC nur ein Sechstel so viel (Abbildung 12C). Allerdings zeigten vor allem die T-Zellen aus der BAL mit einer hohen PD-1-Expression tendenziell eine höhere ICOS-Expression. Diese Tendenz lässt sich bei den zirkulierenden T-Zellen nicht finden.

CD40L wurde in der Tonsille sowie in den entzündeten Atemwegen auf den CD69<sup>+</sup> T-Helferzellen gesteigert exprimiert (Abbildung 12B). Bezogen auf die Fluoreszenzintensität zeigten die T-Helferzellen aus der BAL eine mehr als doppelt so hohe Expression von CD40L als tonsilläre T-Zellen. Unter den zirkulierenden T-Helferzellen waren keine CD40L<sup>+</sup> Zellen nachweisbar (Abbildung 12D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen aus den entzündeten Atemwegen CD40L stärker exprimierten als ihr Pendant aus sekundär lymphatischen Organen. Die ICOS-Expression in der BAL war dagegen geringer als in der Tonsille, aber höher als im peripheren Blut.

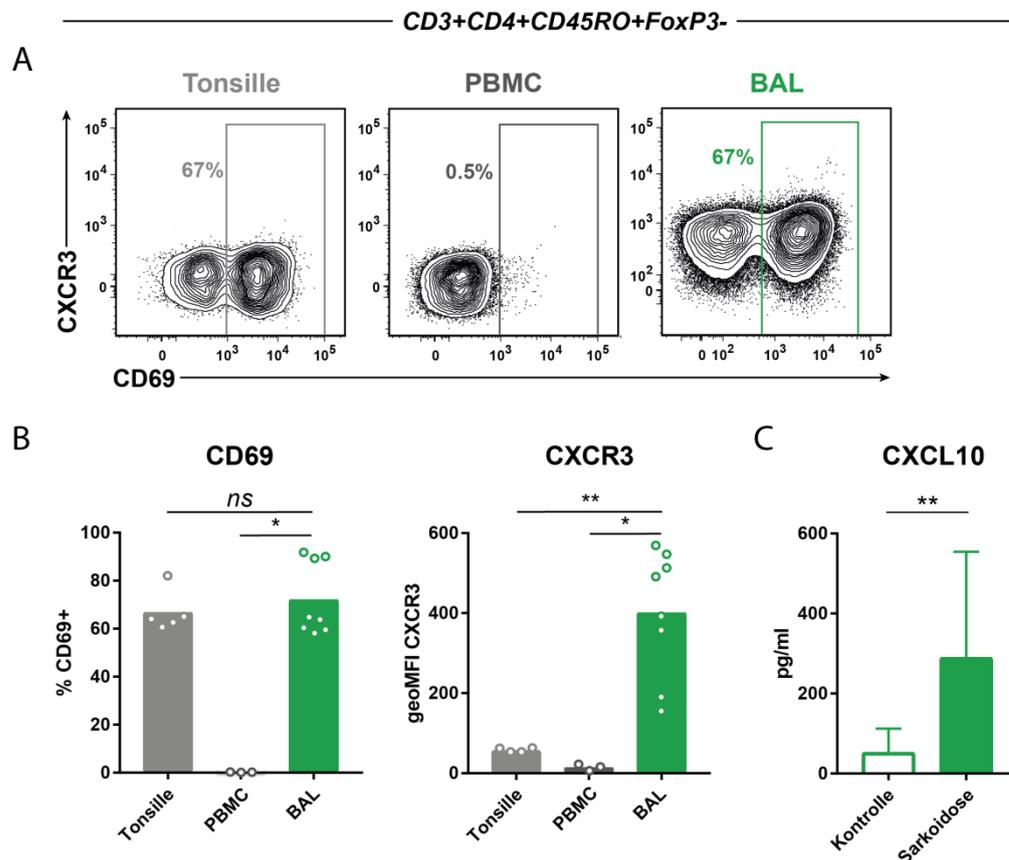


**Abbildung 12 T-Zellen der Atemwege zeigen eine erhöhte Expression des TFH-Zell-Markers CD40L.** (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen hinsichtlich der TFH-Zell-Marker PD-1 und ICOS. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender. (B) Durchflusszytometrische Analyse der CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen hinsichtlich der CD40L-Expression. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender. (C) Vergleichende Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität von ICOS in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. (D) Das Histogramm zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität von CD40L im Vergleich zwischen Tonsille, PBMC und BAL. Vergleichende Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD40L in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. ns nicht signifikant\* p < 0,05

### 3.2.4 BAL T-Zellen haben einen gewebsständigen Phänotyp

In einem nächsten Schritt sollten die CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen auf die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3, der bei der Migration in die entzündete Lunge eine signifikante Rolle spielt<sup>88</sup>, und CD69, das von gewebsständigen Zellen exprimiert wird, untersucht werden.

Die T-Helferzellen aus den entzündeten Atemwegen und der Tonsille unterschieden sich nicht bezüglich ihrer CD69-Expression. Mit einer Frequenz von 72 % beziehungsweise 67 % CD69<sup>+</sup> T-Helferzellen exprimierten sie signifikant mehr CD69 als die zirkulierenden CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen, auf denen keine CD69-Expression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 13A und B).



**Abbildung 13 BAL T-Zellen zeigen einen aktivierten, gewebsständigen Phänotyp.** (A) Durchflusszytometrische Analyse der CXCR3- und CD69-Expression auf CD45RO<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender. (B) Vergleichende Darstellung der Frequenz der CD69<sup>+</sup> Population und der mittleren Fluoreszenzintensität von CXCR3 in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. (C) Vergleichende Darstellung der Konzentration des Zytokins CXCL10 im BAL-Überstand zwischen Sarkoidose-Patienten und Kontrollen im Säulendiagramm. Die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardfehler (SEM). Patienten n=16; Kontrollen n=7; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01

CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Helferzellen aus Tonsille und PBMC zeigten nur ein niedriges Expressionslevel des Chemokinrezeptors CXCR3. In den entzündeten Atemwegen finden sich fast ausschließlich CXCR3<sup>+</sup> T-Helferzellen, wohingegen tonsilläre und zirkulierende T-Zellen weitestgehend CXCR3<sup>-</sup> sind (Abbildung 13A und B). CXCR3 ist der Rezeptor für das Zytokin CXCL10. CXCL10 wiederum wird durch IFN- $\gamma$  induziert und somit vermehrt in entzündetem Gewebe ausgeschüttet und lockt die CXCR3-exprimierenden Zellen an den Ort der Inflammation. Im Überstand der Sarkoidose-BAL konnten signifikant erhöhte CXCL10-Konzentrationen nachgewiesen werden. In Sarkoidose-

Patienten war die Konzentration mit 290 pg/ml mehr als fünfmal so hoch wie in der Vergleichsgruppe. Dies würde die hohe Frequenz der CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen in der BAL erklären.

Insgesamt zeigten die T-Helferzellen aus den entzündeten Atemwege Charakteristika gewebständiger Zellen mit einer großen Population an CD69<sup>+</sup> und CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen.

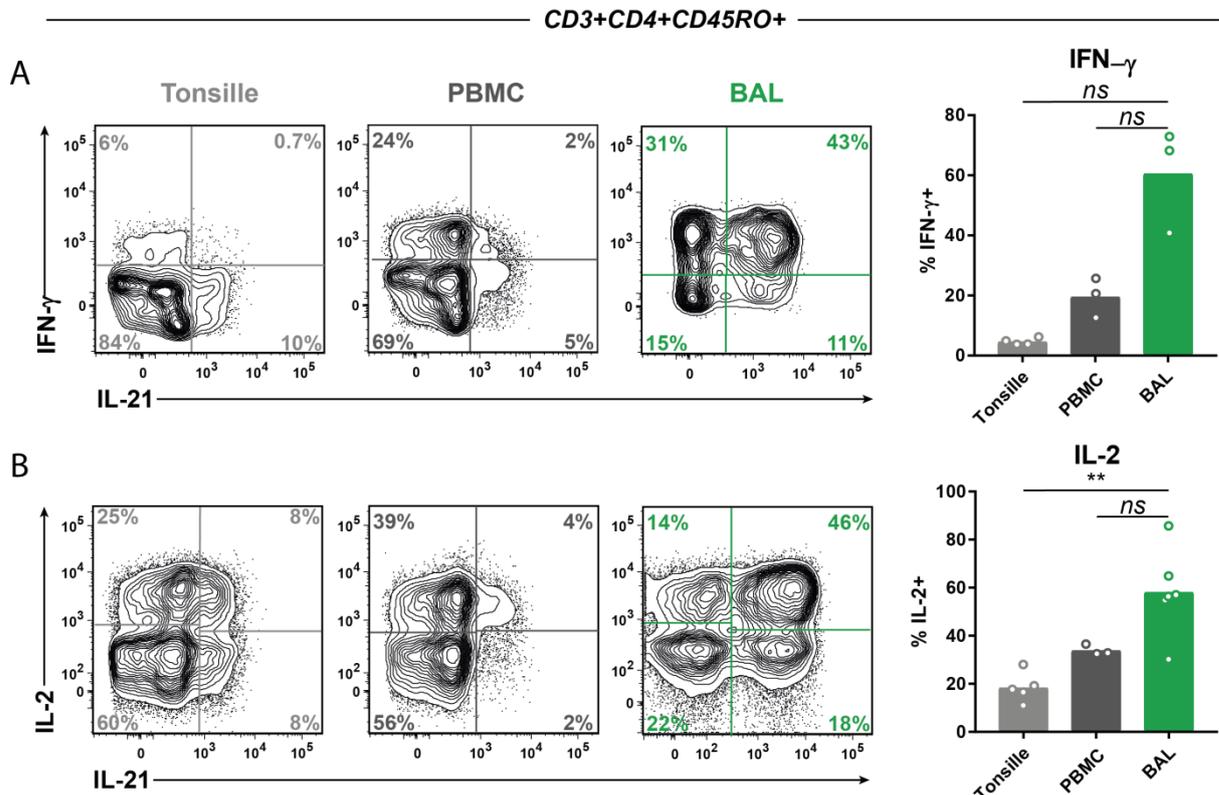
#### **3.2.5 IL-21-Produktion in BAL T-Zellen korreliert mit IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion**

In 3.2.2 wurde bereits gezeigt, dass die T-Helferzellen aus den entzündeten Atemwegen IL-21 produzieren. Neben IL-21, als charakteristisches Zytokin der TFH-Zellen, spielen auch noch andere Zytokine für diese T-Zell-Subpopulation beziehungsweise in der Pathophysiologie der Sarkoidose eine Rolle. In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, welche weiteren Zytokine von den IL-21-produzierenden Zellen gebildet werden.

Sarkoidose wird als Th1-vermittelte Erkrankung beschrieben, die mit erhöhter Produktion des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  einhergeht<sup>95</sup>. Im Einklang mit dieser Beobachtung produzierten 61 % der CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzellen der Atemwege nach Restimulation IFN- $\gamma$ . Im Vergleich dazu zeigten nur 4,7 % der tonsillären T-Helferzellen und 20 % der zirkulierenden T-Helferzellen einen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Phänotyp. In den entzündeten Atemwegen fand sich in der durchflusszytometrischen Analyse eine Population IFN- $\gamma$  und IL-21 doppelt-produzierenden T-Helferzellen (Abbildung 14A). Mit Hilfe des  $\phi$ -Korrelationskoeffizienten-Tests konnte gezeigt werden, dass die Expression von IFN- $\gamma$  und IL-21 in der BAL positiv korreliert war ( $\phi = 0,18$ ). Für die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Helferzellen aus der Tonsille konnte keine positive Korrelation nachgewiesen werden ( $\phi = 0,02$ ). In einer Studie von Robinson und Kollegen konnte zudem gezeigt werden, dass Patienten mit aktiver Sarkoidose mehr IFN- $\gamma$  freisetzen, als Patienten in einer inaktiven Krankheitsphase. Auch Patienten unter Kortikosteroid-Therapie, Therapie erster Wahl in Sarkoidose, zeigen eine verringerte IFN- $\gamma$ -Sekretion<sup>95</sup>.

T-Helferzellen aus BAL und Tonsille unterschieden sich ebenfalls in Bezug auf die Population der IL-2-produzierenden Zellen. IL-2 wird vor allem von T-Zellen produziert und wird auch als T-Zell-Proliferationsmarker bezeichnet. In der BAL war die Frequenz der IL-2<sup>+</sup> T-Helferzellen mit 58 % dreimal höher als im tonsillären Gewebe und doppelt so hoch wie in zirkulierenden T-Zellen. Analog zu den IFN- $\gamma$ - und IL-21-doppelt-produzierenden T-Helferzellen ließ sich in der BAL ebenfalls eine gleichzeitige Expression von IL-2 und IL-21 feststellen (Abbildungen 14B). Sowohl für die T-Helferzellen aus den entzündeten Atemwegen als auch der Tonsille war die Expression von IL-2 und IL-21 positiv korreliert ( $\phi = 0,28$  beziehungsweise  $\phi = 0,23$ ). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Funden vorangegangener Studien, die bereits die wichtige Rolle von IL-2 in der Pathogenese von Sarkoidose aufzeigen konnten<sup>96</sup>.

Da bei Sarkoidose neben einer Th1-Antwort auch eine Th17-Antwort beschrieben wurde, ist hier das charakteristische Zytokin der Th17 Zellen, IL-17A, bestimmt worden. Zudem trägt IL-17 über Neutrophilen-Rekrutierung zur Granulombildung bei Sarkoidose bei<sup>97</sup>. Allerdings ließ sich nur in 1,6 % der BAL T-Helferzellen die Produktion von IL-17A nachweisen. In der Tonsille waren 5,9 % der T-Helferzellen IL-17A<sup>+</sup>, unter den PBMC 0,5 % (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 14** Unter den BAL T-Zellen finden sich IFN- $\gamma$ -IL-21-Doppelproduzenten und IL-2-IL-21-Doppelproduzenten. Proben wurden nach 4 h Stimulation mit PMA und Ionomycin gefärbt. (A) Durchflusszytometrische Analyse der IFN- $\gamma$ - und IL-21-produzierenden CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzellen. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender. Vergleichende Darstellung der Frequenz der IFN- $\gamma$ -Produzenten in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. (B) Durchflusszytometrische Analyse der IL-2- und IL-21-produzierende CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzellen. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender. Vergleichende Darstellung der Frequenz der IL-2-Produzenten in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. ns nicht signifikant; \*\* p < 0,01

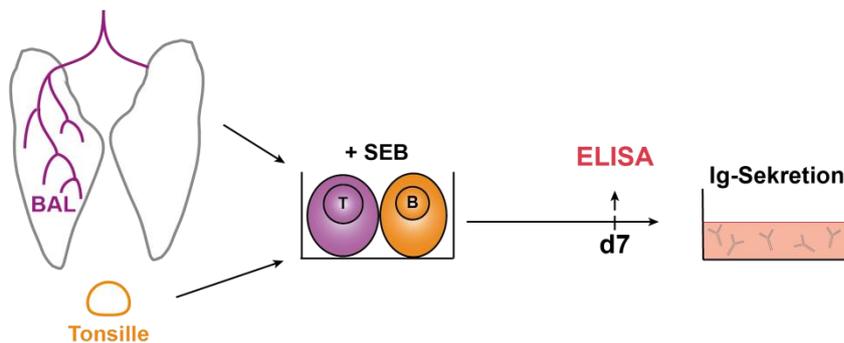
IL-4, welches neben IL-21 von TFH-Zellen produziert wird und den Klassenwechsel der B-Zellen steuert, wurde von nur 1,8 % der T-Helferzellen in der BAL produziert. In der Tonsille zeigten 2 % der CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzellen die Fähigkeit zur IL-4-Produktion, unter den PBMC dagegen 4,4 % (Daten nicht gezeigt).

Zusammen mit IL-21 sind IL-2 und IFN- $\gamma$  die am häufigsten gebildeten T-Zell-Zytokine in den entzündeten Atemwegen. Dabei produziert ein Großteil der T-Zellen IL-2 oder IFN- $\gamma$  zeitgleich mit IL-21.

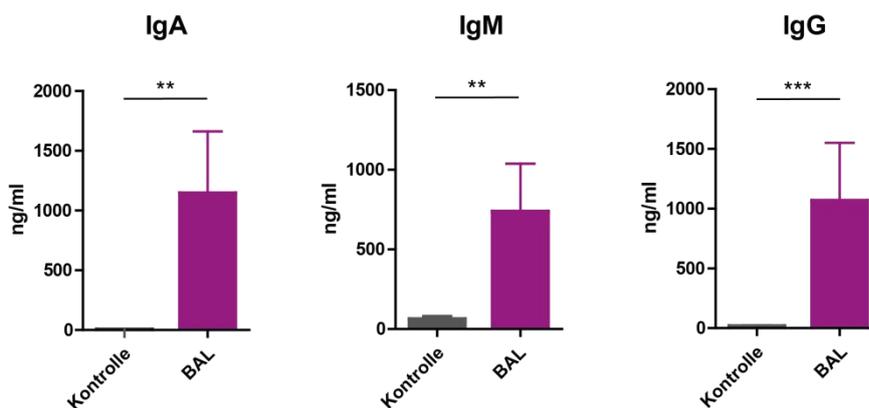
### 3.2.6 Gedächtnis-T-Helferzellen sind in der Lage B-Zell-Hilfe zu leisten

Um zu untersuchen, ob T-Helferzellen aus den Atemwegen das Potential besitzen, B-Zell-Hilfe zu leisten, wurden  $CD19^- CD4^+ CD45RA^-$  Gedächtnis-T-Helferzellen aus der BAL sortiert und in Präsenz von Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) mit Gedächtnis-B-Zellen aus tonsillärem Gewebe kokultiviert. Nach 7 Tagen wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA die Immunglobulin-Konzentration bestimmt. Als Kontrolle wurden Gedächtnis-B-Zellen mit SEB jedoch ohne T-Helferzellen kultiviert (Abbildung 15A).

A



B



**Abbildung 15 Gedächtnis-T-Helferzellen aus der BAL sind in der Lage B-Zell-Hilfe zu leisten.** (A) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. Aus der BAL wurden  $CD19^- CD4^+ CD45RA^-$  Gedächtnis-T-Helferzellen sortiert und 1:1 mit Gedächtnis-B-Zellen aus der Tonsille in Präsenz von 4 ng/ml SEB kokultiviert. Es wurde jeweils dieselbe Tonsille verwendet, die BAL stammte von unterschiedlichen Patienten. Der Überstand wurde nach 7 Tagen abgenommen und die Immunglobulin-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle wurden Gedächtnis-B-Zellen mit SEB stimuliert. (B) Säulendiagramme zeigen die Konzentration von IgA, IgM bzw. IgG im Kulturüberstand im Vergleich zur Kontrolle. Die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

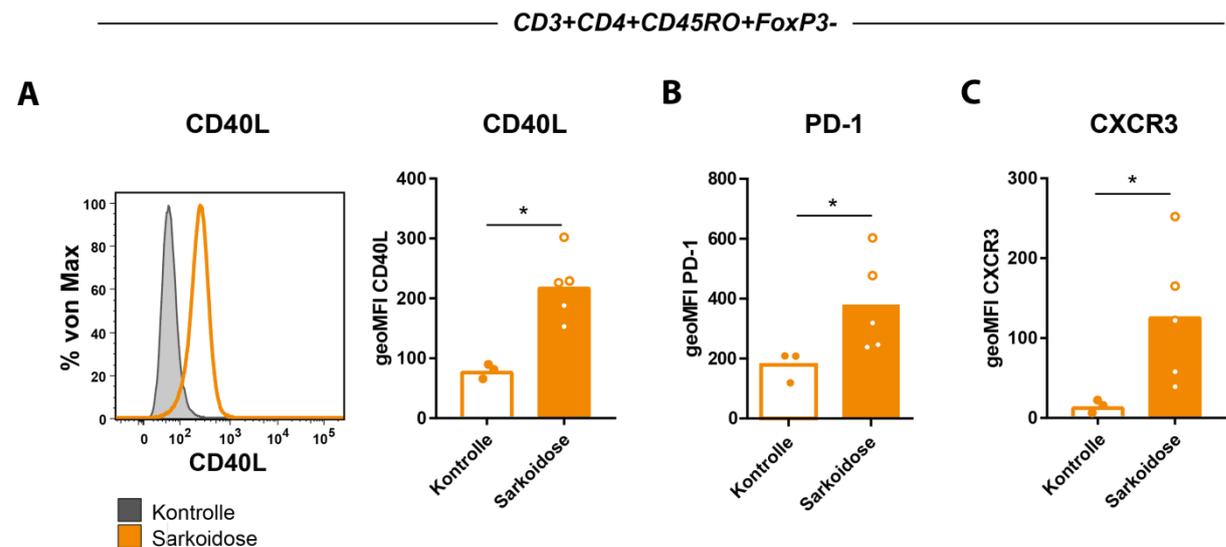
Nach 7 Tagen *in vitro* Kokultur ließen sich im Überstand von den sortierten BALs die Produktion des mukosalen Immunglobulins IgA nachweisen. Im Vergleich dazu waren die B-Zellen der Kontrollgruppe nicht in der Lage IgA zu produzieren. Auch die IgM- und IgG-Produktion konnten die Gedächtnis-T-Helferzellen in den Gedächtnis-B-Zellen induzieren (Abbildung 15B). Während IgM das erste Immunglobulin ist, welches im Laufe einer Immunantwort produziert wird, kann IgG erst nach dem Klassenwechsel gebildet werden. BAL #6 zeigte besonders hohe Immunglobulin-

Konzentrationen bei allen drei Subklassen. Dies korrelierte allerdings nicht mit einer besonders hohen Frequenz von IL-21<sup>+</sup> Zellen (Daten nicht gezeigt). Naive tonsilläre CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten nur eine sehr geringe Immunglobulinproduktion in B-Zellen stimulieren. Mit 20,1 ng/ml IgM und 1,5 ng/ml IgG liegen die naiven T-Zellen sehr deutlich unter den T-Zellen aus der BAL. Auch tonsilläre CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen wurden mit Gedächtnis-B-Zellen kokultiviert. Die Immunglobulin-Konzentrationen für IgM und IgG lagen hierbei mit 1788 ng/ml beziehungsweise 4591 ng/ml nochmals höher als in der Kokultur mit BAL CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass T-Helferzellen aus den entzündeten Atemwegen durch Interaktion mit B-Zellen *in vitro* Immunglobulin-Produktion induzieren und somit B-Zell-Hilfe leisten können.

### 3.2.7 PBMC von Sarkoidose-Patienten exprimieren mehr CD40L, PD-1 und CXCR3 im Vergleich zu gesunden Probanden

Neben der bronchoalveolären Lavage wurden auch PBMC von Sarkoidose-Patienten akquiriert. Diese wurden mit PBMC von gesunden Probanden verglichen.



**Abbildung 16** Zirkulierende T-Helferzellen von Sarkoidose-Patienten exprimieren mehr CD40L, PD-1 und CXCR3 im Vergleich zu gesunden Probanden. (A) Das Histogramm vergleicht die mittlere Fluoreszenzintensität von CD40L auf PBMC von Sarkoidose-Patienten mit gesunden Probanden. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender. (A-C) Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD40L, PD-1 und CXCR3 auf PBMC von Sarkoidose-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. \*  $p < 0,05$

Dabei zeigte sich eine mehr als doppelt so hohe Expression von CD40L auf den CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> T-Helferzellen der Sarkoidose-Patienten (Abbildung 16A). In Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) konnte bereits gezeigt werden, dass die zirkulierenden T-Zellen mehr CD40L exprimieren als in einer Vergleichsgruppe<sup>94</sup>. Analog zu den BAL CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Sarkoidose-Patienten kamen PD-1<sup>+</sup>

T-Zellen bei Sarkoidose-Patienten auch im Blut vermehrt vor (Abbildung 16B). Neben CD40L und PD-1 war auch die Fluoreszenzintensität von CXCR3 auf den T-Helferzellen von Sarkoidose-Patienten siebenmal höher als in der gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 16C).

Zirkulierende T-Helferzellen von Sarkoidose-Patienten zeigten demnach durch erhöhte CD40L-Expression einen aktivierten Phänotyp mit Potential zur B-Zell-Hilfe und durch erhöhte CXCR3-Expression die Bereitschaft ins entzündete Gewebe einzuwandern. Außerdem ließ sich eine vermehrte Expression des TFH-Markers PD-1 nachweisen.

### **3.3 Charakterisierung von B-Zellen in bronchoalveolärer Lavage bei Sarkoidose-Patienten**

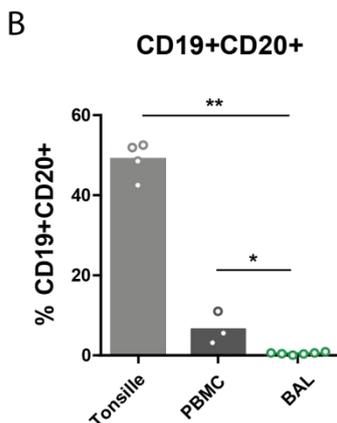
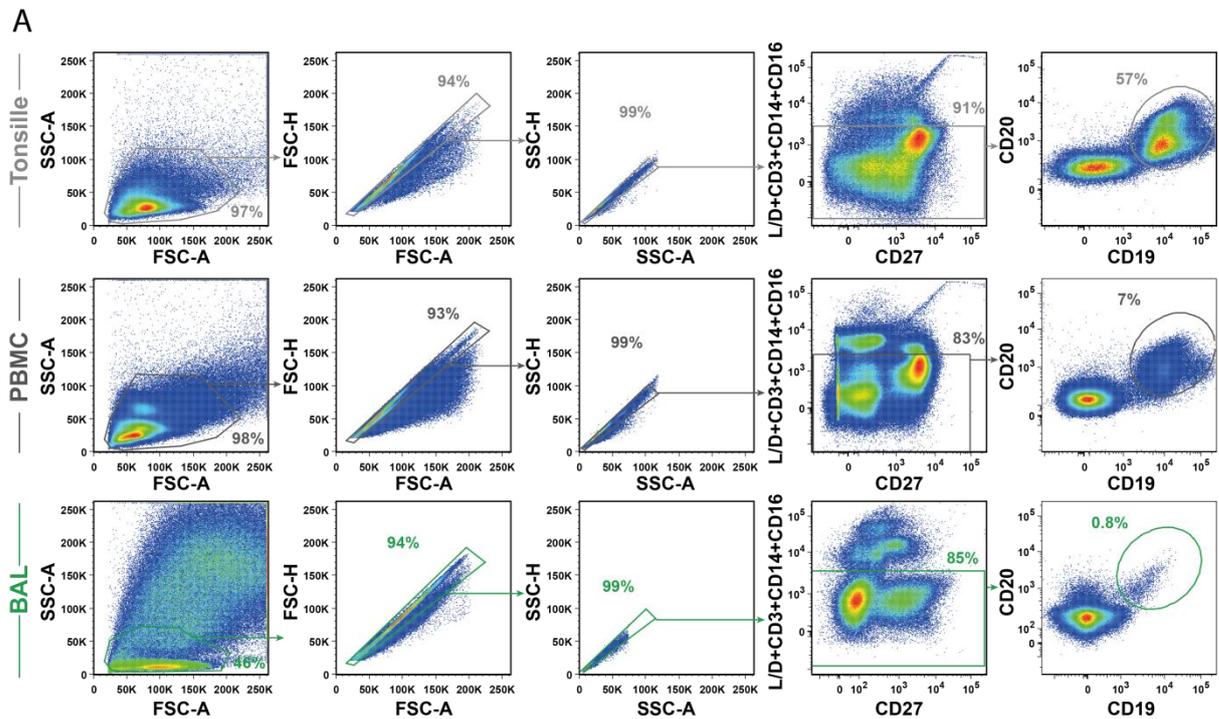
In den Granulomen, die sich bei Sarkoidose bilden, lassen sich B-Zell-Aggregate finden. Innerhalb dieser Aggregate stehen die B-Zellen in engem Kontakt zu CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen<sup>98</sup>. Im Gegensatz zu T-Zellen sind B-Zellen in der bronchoalveolären Lavage von interstitiellen Lungenerkrankungen kaum untersucht. Da gezeigt werden konnte, dass T-Zellen aus BAL B-Zell-Hilfe leisten können (3.2.6) und Zytokine und Moleküle exprimieren, die ein B-Zell-Helfer Potential der T-Zellen vermuten lassen (3.2.2, 3.2.3), stellt sich die Frage, welche Art von B-Zellen sich in der BAL finden und ob Keimzentrums-B-Zellen darunter sind.

Abbildung 17A stellt die Gating-Strategie dar. Sofern nicht anders erwähnt, beruhen alle folgenden Abbildungen auf diesem Schema und stellen die CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> Population dar.

B-Zellen allein über die CD19-Expression zu definieren, stellte sich auf BAL B-Zellen als schwierig heraus, da sich keine klare Population von CD19<sup>+</sup> Zellen abgrenzen ließ. In Kombination mit CD20 war dies jedoch gut möglich. CD20 ist ein Marker, der sich auf allen B-Zellen findet mit Ausnahme von Pro-B-Zellen, der ersten Entwicklungsstufe von B-Zellen im Knochenmark, und Plasmazellen<sup>99</sup>. In der BAL ließen sich allerdings keine CD27<sup>++</sup> CD38<sup>++</sup> Plasmazellen finden (Daten nicht gezeigt). Da keine Plasmazellen nachweisbar waren, konnte B-Zellen in der BAL als CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> definiert werden, ohne dass eine wichtige B-Zell-Population ausgeschlossen wurde.

Um die Interaktion von T- und B-Zellen in entzündeten Atemwegen besser verstehen zu können, wurden die B-Zellen aus der BAL mit denen aus tonsillärem Gewebe als lymphoides Organ, und PBMC, als gesunde Kontrolle, verglichen.

Die B-Zell Frequenzen in der BAL, bezogen auf die Lymphozytenpopulation im *Scattergate*, waren mit unter 0,1 % sehr gering. Im Vergleich dazu zeigten die PBMC mit durchschnittlich 7 % und die Tonsille mit über 49 % B-Zellen signifikant größere B-Zell-Populationen (Abbildung 17B).



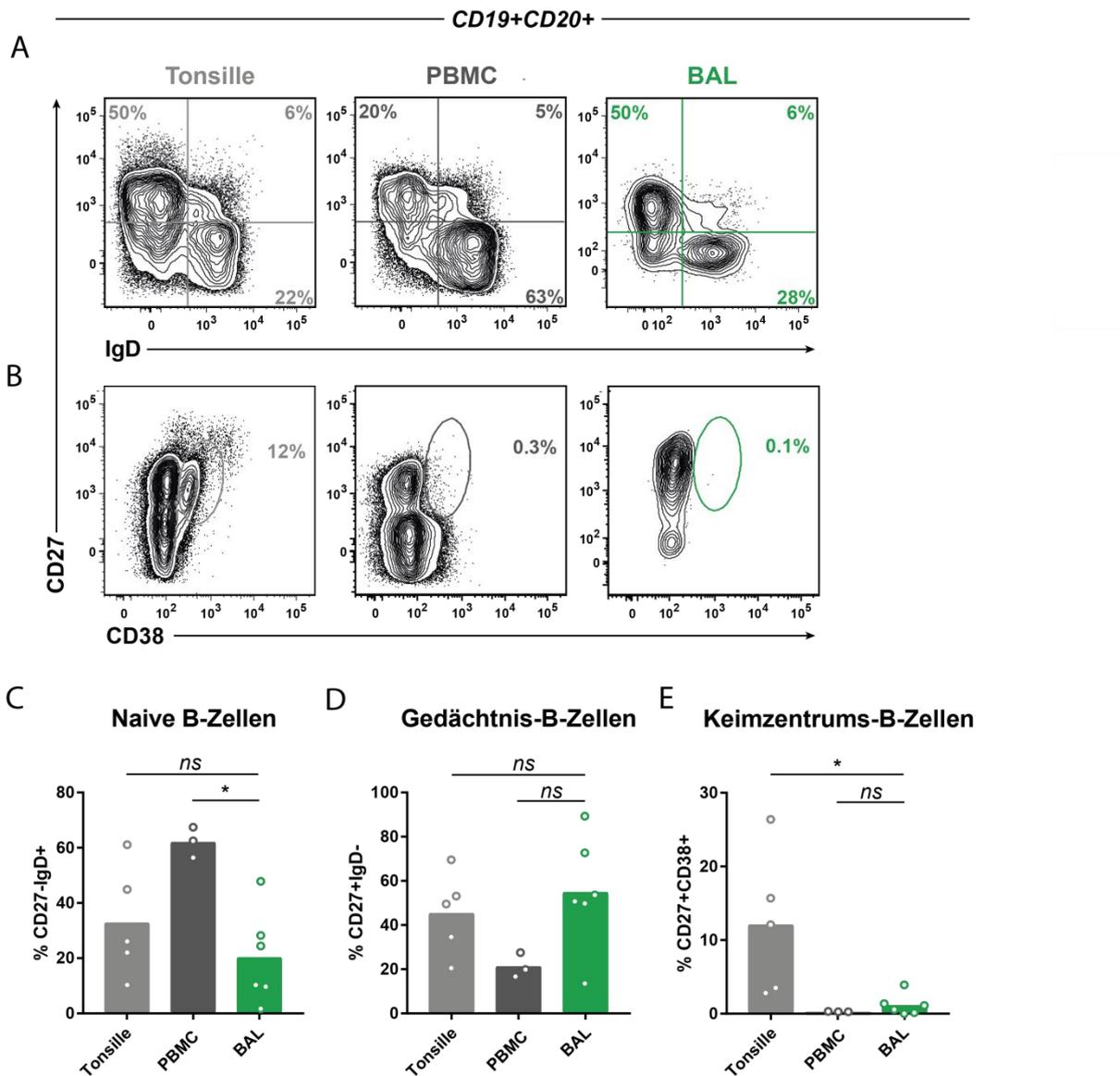
**Abbildung 17 Analyse von CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> B-Zellen aus BAL, Tonsille und PBMC.** (A) Zur Analyse von B-Zellen werden die Lymphozyten gemäß ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) von anderen Zellen und Zelltrümmern abgegrenzt. Dubletten werden anhand ihres disproportionalen Verhältnisses von Fläche und Höhe der Scatter ausgeschlossen. Mittels Lebend-Tot-Färbung (L/D) werden tote Zellen ausgegrenzt, mittels CD3 T-Zellen und mittels CD14 und CD16 Monozyten. Anschließend werden die B-Zellen durch CD19- und CD20-Expression definiert. Sofern nicht anders erwähnt, beruhen alle folgenden durchflusszytometrischen Analysen auf den hier gezeigten CD3<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> B-Zellen. Gezeigt sind repräsentative Spender. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. (B) Frequenzen der CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> von allen lebenden Zellen. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe; die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01

### 3.3.1 In der BAL finden sich klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen, aber keine Keimzentrums-B-Zellen

Zunächst wurde untersucht, welche Subklassen von B-Zellen in der BAL von entzündeten, aber nicht-infektiösen Atemwegen gefunden werden können.

Antigen-unerfahrene, naive B-Zellen lassen sich durch das Vorhandensein des Immunglobulins IgD, welches auf einen noch nicht stattgefundenen Klassenwechsel hindeutet, und das Fehlen des

Gedächtnis-Zell-Markers CD27 definieren. Gemessen an der Frequenz der naiven B-Zellen ließen sich die entzündeten Atemwege, mit 20 % naiven B-Zellen, mit lymphatischen Organen wie der Tonsille vergleichen. Unter den PBMC von gesunden Kontrollen hingegen fanden sich mehr als dreimal so viele Antigen unerfahrene B-Zellen (63 %, Abbildungen 18A und C).



**Abbildung 18** In der BAL sind die Anteile von naiven B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen vergleichbar mit der Tonsille, BAL B-Zellen zeigen aber keinen Keimzentrums-Phänotyp. (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup> naiven B-Zellen und CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen. Gezeigt ist eine repräsentative Probe. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. (B) Durchflusszytometrische Analyse der CD27<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> Keimzentrums-B-Zellen. Gezeigt ist eine repräsentative Probe. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. (C-E) Vergleichende Darstellung der Frequenz der CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> und CD27<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. Jeder Punkt entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. ns nicht signifikant; \* p < 0,05

Mit 50 % machen die Gedächtnis-B-Zellen den größten Anteil an B-Zellen in der entzündeten BAL aus. Gedächtnis-B-Zellen zeichnen sich durch Expression des Gedächtnis-Zell-Markers CD27 aus.

Sie lassen sich weiter unterteilen in IgM-Gedächtnis-Zellen, welche noch keinen Klassenwechsel vollzogen haben und daher weiter IgD exprimieren. Nach dem Klassenwechsel verschwindet die IgD-Expression und die Zellen werden als klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen bezeichnet. IgM-Gedächtnis-Zellen machten in allen untersuchten Geweben nur eine kleine Population aus. Ungefähr die Hälfte der B-Zellen in BAL und Tonsille zeigten einen klassengewechselten Gedächtnis-Phänotyp. In den PBMC war die klassengewechselte Gedächtnis-Zellpopulation nicht signifikant kleiner (Abbildungen 18A und D). Auch in B-Zellen aus Synovialflüssigkeit von RA-Patienten finden sich ähnliche Frequenzen an klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen<sup>100</sup>.

Da unter 3.2.6 gezeigt werden konnte, dass T-Zellen aus der entzündeten BAL in der Lage sind B-Zell-Hilfe zu leisten, stellte sich die Frage, ob auch Keimzentrums-B-Zellen in der BAL zu finden sind. Keimzentrums-B-Zellen wurden als CD27<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> Zellen definiert. Interessanterweise ließen sich jedoch kaum Keimzentrums-B-Zellen in den entzündeten Atemwegen nachweisen (1,2 %). Nur im lymphatischen Gewebe zeigten 12 % der CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> B-Zellen einen Keimzentrums-Phänotyp (Abbildung 18E).

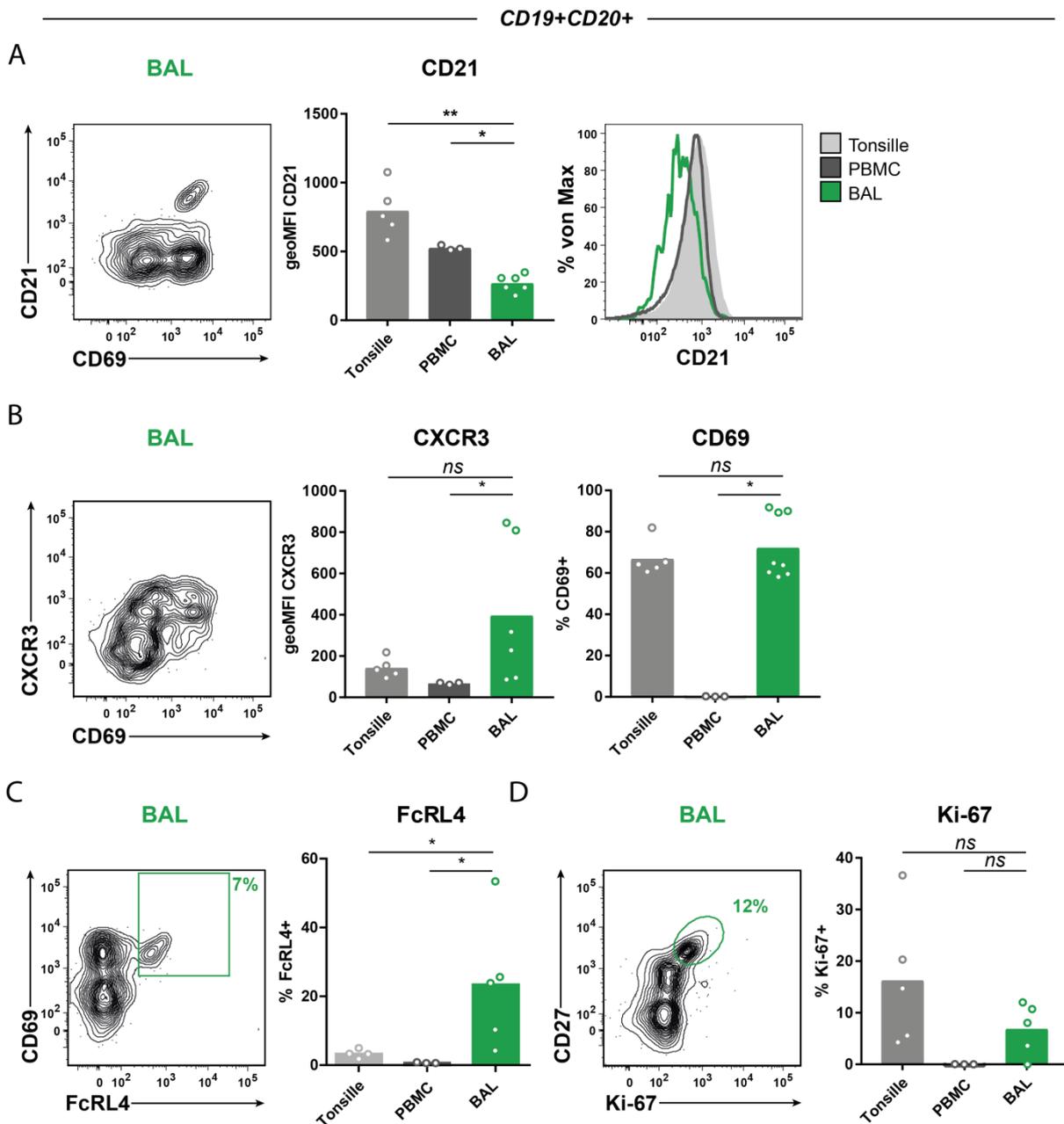
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich gleich viele Gedächtnis-B-Zellen in den entzündeten Atemwegen wie im tonsillären Gewebe finden lassen, jedoch fast keine Keimzentrums-B-Zellen in der BAL zu finden sind.

### **3.3.2 BAL B-Zellen zeigen Charakteristika von chronisch-aktivierten, gewebsständigen B-Zellen**

Um den Phänotyp der B-Zellen in der BAL noch besser verstehen zu können, wurden die Zellen auf verschiedene Marker hinsichtlich ihrer Aktivierung, Gewebsständigkeit und Proliferation untersucht.

Wehr und Kollegen beschrieben 2004 eine Population an B-Zellen, welche CD21 herunterregulierten, als chronische aktivierte B-Zellen und als Zeichen einer gerade ablaufenden Immunreaktion<sup>101</sup>. Wie in Abbildung 19 gezeigt, fanden sich diese Zellen auch in den entzündeten Atemwegen von Sarkoidose-Patienten. Im Vergleich zu Tonsille und PBMC exprimierten die B-Zellen in der BAL signifikant weniger CD21 und entsprachen somit der von Wehr untersuchten Population (Abbildung 19A).

Analog zu den T-Zellen wurden der Chemokinrezeptor CXCR3 und der Aktivierungsmarker CD69, als Marker für gewebsständige Zellen gefärbt. Beide Moleküle waren im Vergleich zu den zirkulierenden B-Zellen in tonsillären B-Zellen und den entzündeten Atemwegen vermehrt exprimiert (Abbildung 19B). Während die CD69-Expression in Tonsille und BAL nahezu gleich hoch war, unterschieden sich beide Gewebe hinsichtlich der Expression von CXCR3. Die B-Zellen aus den entzündeten Atemwegen exprimierten doppelt so viele CXCR3-Moleküle.



**Abbildung 19 BAL B-Zellen zeigen einen chronisch-aktivierten, gewebsständigen Phänotyp.** (A-D) Durchflusszytometrische Analyse der CD21-, CD69-, CXCR3-, FcRL4- und Ki-67-Expression auf CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> B-Zellen aus der BAL. Die Prozentzahlen geben die Frequenz der umrahmten Population an. (A) Das Histogramm zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität von CD21 im Vergleich zwischen Tonsille, PBMC und BAL. Vergleichende Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD21 in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. (B) Vergleichende Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität von CXCR3 und der Frequenz CD69<sup>+</sup> B-Zellen in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. (C-D) Vergleichende Darstellung der Frequenz der FcRL4<sup>+</sup> und Ki-67<sup>+</sup> B-Zellen in Tonsille, PBMC und BAL im Säulendiagramm. Jeder Punkt in den Diagrammen entspricht einer Probe, die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel. Gezeigt sind jeweils repräsentative Proben. ns nicht signifikant; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01

Als weiterer Marker für gewebsständige B-Zellen wurde *Fc-Receptor-like 4* (FcRL4), ein Mitglied der Fc-Rezeptorfamilie, der die Signalgebung des B-Zell-Rezeptors unterbinden kann, untersucht<sup>102</sup>. FcRL4 spielt eine Rolle in der B-Zell Aktivierung und Differenzierung und lässt sich unter anderem auf proinflammatorischen B-Zellen im Synovium von Patienten mit Rheumatoider Arthritis finden<sup>100</sup>.

Laut *Gene Expression Atlas* des Europäischen Instituts für Bioinformatik (EBI) wird FcRL4 überwiegend in der Tonsille exprimiert, jedoch kaum im Lungengewebe selbst<sup>103</sup>. Wie Abbildung 19C jedoch zeigt, exprimierten die B-Zellen der entzündeten Atemwege von Sarkoidose-Patienten achtmal so viel FcRL4 im Vergleich zu den tonsillären B-Zellen. In beiden Geweben fanden sich allerdings signifikant mehr FcRL4<sup>+</sup> B-Zellen als in den PBMC (Abbildung 19C).

Im nächsten Schritt wurde die Expression des nukleären Zellzyklusproteins Ki-67, welches auf proliferierende Zellen hinweist, untersucht. In den entzündeten Atemwegen zeigten 8 % der Zellen einen Ki-67<sup>+</sup> Phänotyp und damit keinen signifikanten Unterschied zu den B-Zellen aus tonsillärem Gewebe oder PBMC. Allerdings proliferierten die BAL B-Zellen in der Tendenz weniger als die tonsillären B-Zellen und mehr als zirkulierende B-Zellen (Abbildung 19D).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die B-Zellen der entzündeten Atemwege einen chronisch-aktivierten Phänotyp zeigen, gewebständig und proinflammatorisch sind, aber wenig proliferieren.

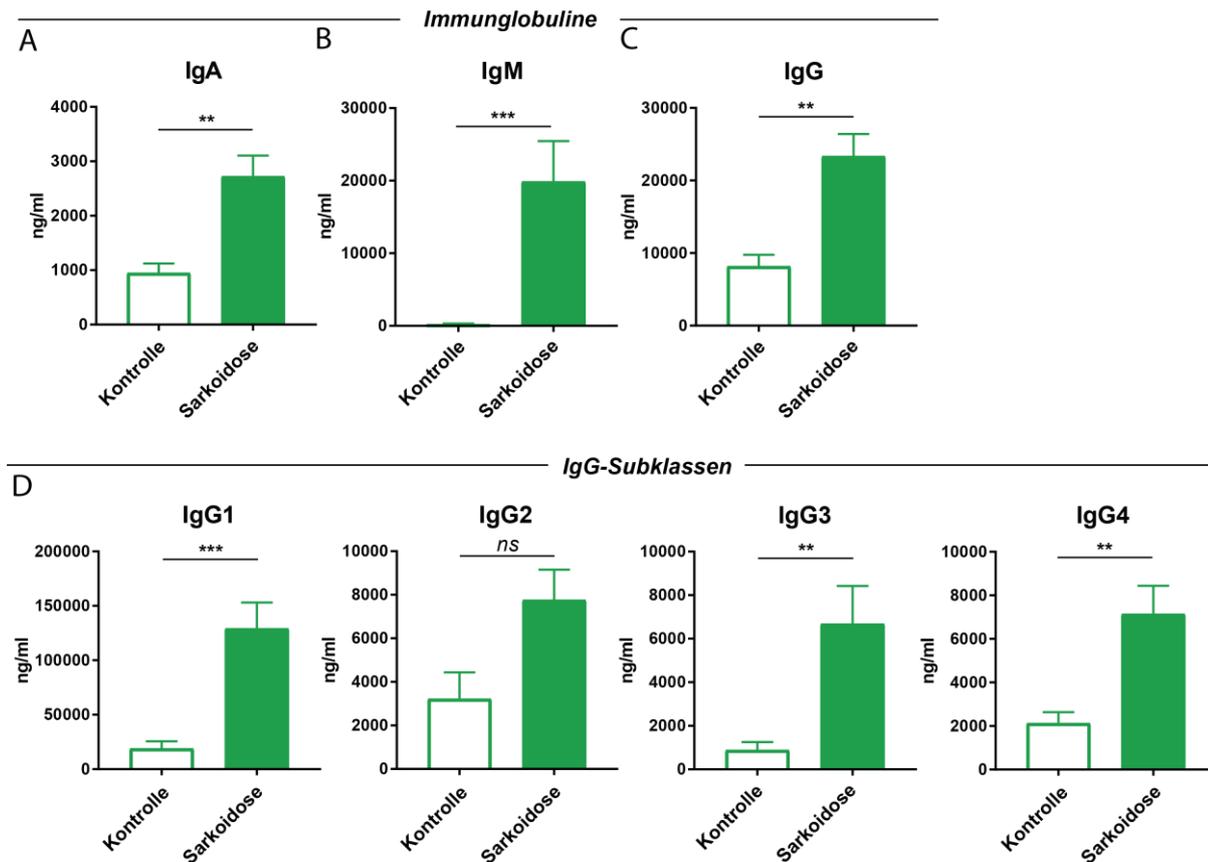
### **3.3.3 Erhöhte Immunglobulin-Konzentrationen in bronchoalveolärer Lavage von Sarkoidose-Patienten**

Um die Immunglobulin-Produktion der B-Zellen in der entzündeten BAL untersuchen zu können, wurde die Konzentration verschiedener Immunglobulin-Subklassen im Überstand der BAL von Sarkoidose-Patienten gemessen und mit der BAL von nicht-entzündlichen Kontrollen verglichen. Als Kontrollen wurden Tumorpatienten und Patienten mit idiopathischem Husten ohne lymphozytäre Alveolitis gewählt.

IgA, welches vorherrschend in mukosalem Gewebe produziert wird, wurde in Sarkoidose-Patienten in nahezu dreifach höheren Konzentrationen sezerniert (Abbildung 20A). Das erste Immunglobulin das während einer Immunantwort produziert wird, IgM, ließ sich in sehr hohen Konzentrationen im BAL-Überstand von Sarkoidose-Patienten nachweisen, während es in der Kontrollgruppe in kaum messbaren Konzentrationen vorlag (Abbildung 20B). Auch IgG, das im Serum häufigste Immunglobulin, welches erst nach der Keimzentrumsreaktion und erfolgtem Klassenwechsel gebildet wird, wurde von Sarkoidose-Patienten in mehr als doppelter Konzentration produziert (Abbildung 20C).

In einem nächsten Schritt wurden die IgG-Subklassen genauer betrachtet. In der BAL von Sarkoidose-Patienten ließ sich eine fünffach erhöhte Konzentration von IgG1 nachweisen, was für eine Th1-vermittelte Reaktion spricht. IgG2 zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Sarkoidose-Patienten und der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu wurden nahezu sechsfach erhöhte IgG3-Konzentrationen in der Patientengruppe nachgewiesen. Chronische Entzündungen, wie beispielsweise Allergien, können zu einer IgG4-dominierten Immunantwort führen<sup>104</sup>.

Durchschnittlich zeigten die Proben von Sarkoidose-Patienten eine mehr als dreifach erhöhte Produktion von IgG4 (Abbildung 20D).



**Abbildung 20 Erhöhte Immunglobulin-Konzentrationen in BAL von Sarkoidose-Patienten.** (A-D) Überstand der BAL-Proben von Sarkoidose-Patienten wurde mittels ELISA auf Immunglobulin-Konzentrationen untersucht und mit ohne lymphozytäre Alveolitis und ohne Infektion verglichen, die als Kontrolle dienten. Vergleichende Darstellung der Konzentration der Immunglobuline IgA, IgM und IgG, sowie der IgG-Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 zwischen Sarkoidose-Patienten und Kontrollen im Säulendiagramm. Die Höhe der Säulen entspricht dem arithmetischen Mittel  $\pm$  Standardfehler (SEM). ns nicht signifikant; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Diese Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Immunglobulin-Klassen mit Ausnahme von IgG2 im BAL-Überstand von Sarkoidose-Patienten signifikant erhöht waren; wobei IgM, IgG1 und IgG3 eine besonders stark erhöhte Konzentration zeigten.

## 4 Diskussion

### 4.1 TFH-ähnliche Zellen aus murinem Lungengewebe und humaner BAL im Vergleich

Sowohl bei der Untersuchung der humanen BAL als auch des murinen Lungengewebes konnten keine klassischen PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> TFH-Zellen gefunden werden. Die murinen und humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten zwar eine hohe PD-1-Expression, jedoch waren kaum CXCR5<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar. Auch der für TFH-Zellen charakteristische Transkriptionsfaktor Bcl-6 wurde von den T-Helferzellen in Mensch und Maus nicht exprimiert (Abbildungen 3 und 10). Trotz des fehlenden klassischen TFH-Phänotyps waren Gedächtnis-T-Zellen aus der humanen BAL in der Lage, Immunglobulinproduktion in B-Zellen zu induzieren (Abbildung 15). Gleiches gilt auch für die T-Zellen aus der Lunge im Atemwegsinflamationsmodell, wie frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigten<sup>54</sup>. Außerdem ließ sich die Produktion des für TFH-Zellen charakteristischen Zytokins IL-21 in den T-Zellen in Mensch und Maus nachweisen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der BAL zeigten die Fähigkeit zu einer gesteigerten IL-21-Produktion im Vergleich mit tonsillären CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 11). Auch CD40L wurde in Mensch und Maus gleichermaßen auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Lunge nachgewiesen und übertraf die Expression auf klassischen TFH-Zellen aus SLOs (Abbildungen 5 und 12).

Die T-Helferzellen aus murinem Lungengewebe und humaner BAL zeigen zudem eine hohe CD69-Expression. CD69 wird invers zu Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-1 (S1PR1) reguliert, welcher wiederum von KLF2 reguliert wird. S1PR1 vermittelt das Auswandern von Lymphozyten aus dem Gewebe, folglich deuten niedrige S1PR1- und somit hohe CD69-Expression auf einen gewebständigen Phänotyp hin<sup>86</sup>. Bei den in dieser Arbeit untersuchten T-Helferzellen handelt es sich demzufolge um Zellen, die längerfristig im Gewebe verbleiben und nicht um zirkulierende Zellen.

Die TFH-ähnlichen Zellen, sowohl im murinen als auch im humanen Atemwegssystem lassen sich als IL-21-produzierende PD-1<sup>+</sup> CD40L<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup> Bcl-6<sup>-</sup> T-Zellen beschreiben. Für die murinen IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Lungen-T-Zellen konnte gezeigt werden, dass sie klassischen TFH-Zellen auf transkriptioneller Ebene stark ähneln (Abbildung 7). Das B-Zell-Helfer-Potential der T-Zellen aus der BAL konnte durch Induktion der Immunglobulinproduktion in B-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 15). Auch andere Gruppen konnten bereits in einem Asthma-Mausmodell PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen, die IL-21 produzierten<sup>105</sup>. Weitere Studien belegen die Existenz TFH-ähnlicher Zellen in anderen Geweben; bereits 2008 beschrieben Manzo und Kollegen CXCL13-produzierende T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten, die weder CXCR5 noch Bcl-6 exprimieren<sup>72</sup>. Diese T-Zellen

wurden von Kobayashi und Kollegen 2013 näher untersucht und als PD-1<sup>+</sup> Zellen charakterisiert, welche analog zu den T-Zellen der in dieser Studie untersuchten BAL mehr IL-21 produzieren und gleichzeitig weniger ICOS exprimieren als die tonsillären T-Zellen<sup>73</sup>. Rao und Kollegen zeigten, dass PD-1<sup>+</sup> T-Zellen aus Synovialgewebe von RA-Patienten in Kokultur mit B-Zellen B-Zell-Hilfe leisten können und die Differenzierung in Immunglobulin-produzierende Plasmablasten fördern<sup>74</sup>. In Infiltraten muriner Speicheldrüsen konnten ebenfalls Bcl-6<sup>-</sup> CXCR5<sup>-</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, welche PD-1 und ICOS exprimieren sowie IL-21 und IFN- $\gamma$  produzieren<sup>106</sup>. Lymphozytäre Infiltrate in Brustkrebspatientinnen zeigen TFH-ähnliche PD-1<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> T-Zellen, die IL-21, IFN- $\gamma$ , CXCL10 und CXCL13 produzieren, aber weder Bcl-6 noch CXCR5 exprimieren<sup>107,108</sup>. In einem Diabetes mellitus (DM) Typ-1 Mausmodell wurde in Pankreas, Darmmukosa und Speicheldrüsen eine IL-21-produzierende CCR9<sup>+</sup> Subpopulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben, die zwar Bcl-6<sup>+</sup> ist, jedoch kein CXCR5 exprimiert<sup>109</sup>. Diese Subpopulation exprimiert außerdem ICOS und PD-1 und zeigt in einer Kokultur mit B-Zellen ein gewisses B-Zell-Helfer-Potential. TFH-ähnliche Zellen wurden auch in Nierenbiopsien von Patienten mit Lupus-Nephritis beschrieben. Diese Zellen zeigen eine hohe PD-1-, ICOS-, CXCR4- und IL-21-Expression. Obwohl sie in unstrukturierten Infiltraten zu finden sind und nicht in ektopischen lymphatischen Strukturen mit organisierten Keimzentren, wurden sie als Bcl-6<sup>+</sup> beschrieben<sup>110</sup>. Diese Studie beruht jedoch auf einer rein transkriptionellen Analyse von Bcl-6 aus mikrodissoziiertem Gewebe, so dass nicht eindeutig gesagt werden kann, ob das Bcl-6 Signal von T-Zellen oder benachbarten B-Zellen mit einem Keimzentrums-Phänotyp stammt. In einem Mausmodell für systemische Sklerose finden sich CXCR5<sup>+</sup> Bcl-6<sup>-</sup> TFH-ähnliche Zellen, die PD-1 und ICOS exprimieren sowie IL-21 produzieren<sup>111</sup>.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in verschiedenen vorwiegend autoimmun vermittelten Krankheitsbildern und unterschiedlichen Organen TFH-ähnliche Zellen vorhanden sind, die zwar eine Kombination aus TFH-Zell Markern, Zytokinen und Transkriptionsfaktoren exprimieren und Potential zur B-Zell-Hilfe zeigen, sich jedoch deutlich von dem klassischen TFH-Phänotyp unterscheiden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass es sich bei IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Lunge, um solch einen TFH-ähnlichen Phänotyp handelt. IL-21 und PD-1 scheinen geeignete Marker zu sein, um diesen Phänotyp zu charakterisieren, da sich mit ihrer Hilfe eine eigenständige Population klar abgrenzen lässt, was wiederum mit CD40L nicht möglich ist.

### **4.1.1 Fehlende Expression von Bcl-6 und CXCR5 auf T-Zellen im entzündeten Lungengewebe**

Da die T-Zellen in der Lunge, die B-Zell-Hilfe leisten können, kein Bcl-6 exprimieren, stellt sich die Frage, ob man sie zu der Population der TFH-Zellen zählen kann. Die Subpopulationen der T-Helferzellen werden durch die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren und der Produktion

charakteristischer Zytokine definiert. So werden TFH-Zellen über den Transkriptionsfaktor Bcl-6 und das Signaturzytokin IL-21 identifiziert. Die in dieser Arbeit beschriebenen T-Zellen erfüllen nur eine dieser beiden Voraussetzungen: sie produzieren IL-21. Trotzdem übernehmen sie auch ohne die Expression von Bcl-6 die wichtigste Aufgabe der TFH-Zellen: sie induzieren die Immunglobulinproduktion in B-Zellen. Dass B-Zell-Hilfe in Abwesenheit von Bcl-6 möglich ist, zeigen Experimente an Bcl-6-defizienten Mäusen, in welchen sich eine CXCR5<sup>-</sup> IL-21<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> CD40L<sup>+</sup> T-Zellpopulation entwickeln kann, die in der Lage ist B-Zell-Hilfe zu leisten <sup>112</sup>. Beispielsweise wird IL-21, welches zur Entwicklung hochaffiner Antikörper-produzierenden Plasmazellen beiträgt, nicht von Bcl-6 kontrolliert <sup>113</sup>. Man könnte die T-Zellen, die in der Lunge B-Zell-Hilfe leisten, als Bcl-6<sup>-</sup> Subpopulation in der Gruppe der TFH-Zellen verstehen. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass es sich um eine andere Population von T-Zellen handelt, welche im entzündeten Gewebe die Funktion von TFH-Zellen übernimmt. Dafür würde die fehlende Bcl-6-Expression sprechen. Sowohl die Koexpression von IFN- $\gamma$  mit IL-21 in BAL T-Zellen, als auch die starke Transkription von IFN- $\gamma$  in den IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> T-Zellen der murinen Lunge im Transkriptom könnten auf einen Th-1-Phänotyp hindeuten. LPS, welches als Adjuvanz in den murinen Experimenten verwendet wurde, induziert eine Th1-Antwort, sodass sich die INF- $\gamma$ -Expression erklären lassen würde <sup>114</sup>. Ob es sich bei den hier beschriebenen Zellen um ein Subpopulation von TFH-Zellen oder einen Th-1-Phänotyp mit B-Zell-Helferfunktion handelt, wäre eine interessante Frage für weitere Untersuchungen.

Bcl-6-Expression wird durch IL-6, welches von T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen produziert wird, und IL-21 induziert <sup>115</sup>. Bcl-6 wiederum kann die PD-1- und PSGL-1-Expression beeinflussen <sup>116</sup>. Mit Hilfe von Bcl-6-Reporter-mäusen konnte gezeigt werden, dass Bcl-6 vor allem in der frühen Phase der TFH-Differenzierung eine Rolle spielt. Anschließend wird es langsam herunterreguliert <sup>117</sup>. Mit der Herunterregulation von Bcl-6 nahm auch die Proliferation der TFH-Zellen ab. Es stellt sich die Frage, ob die in dieser Arbeit betrachteten T-Zellen Bcl-6 ebenfalls bereits herunterreguliert haben. Die Herunterregulation von Bcl-6 erfolgte in den Experimenten mit Bcl-6-Reporter-mäusen zwischen Tag 5 und 10 nach subkutaner Immunisierung mit dem Hühnereiweiß Ovalbumin. Obwohl die murinen Lungen in dieser Arbeit bereits zwei Tage nach der finalen Immunisierung untersucht wurden, war keine Bcl-6<sup>+</sup> Population zu finden. Für die humanen Proben lässt sich dies schwer nachvollziehen. Die Herunterregulation von Bcl-6 im Laufe der TFH-Zell-Entwicklung scheint demnach eventuell kein Grund für die fehlende Expression von Bcl-6 zu sein.

Da die TFH-ähnlichen Zellen kein CXCR5 exprimieren, wurden neben typischen TFH-Zell-Markern auch Migrationsmarker untersucht, welche bei der Einwanderung in entzündetes Gewebe eine Rolle spielen. CCR7, der Gegenspieler zu CXCR5, der in SLOs für die Einwanderung und den Verbleib in der T-Zell-Zone verantwortlich ist, ist in der murinen Lunge noch stärker supprimiert als

in den Antigen-spezifischen T-Zellen im Lymphknoten<sup>54</sup>. Die murinen CD4<sup>+</sup>T-Zellen aus der Lunge, ebenso wie die humanen BAL CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten eine hohe Expression des Chemokinrezeptors CXCR3, der für die Migration in entzündetes Gewebe bedeutend ist (Abbildungen 6 und 13). Eine gesteigerte Expression von CXCR3 ließ sich auch in den zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Sarkoidose-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen feststellen (Abbildung 15). Im Transkriptom der murinen IL-21-produzierenden PD-1<sup>+</sup>T-Helferzellen ließ sich ebenfalls eine höhere Expression der Migrationsmarker CCR2, CCR5 und CXCR6 im Vergleich zu den klassischen TFH-Zellen aus dem Lymphknoten feststellen (Abbildung 7). Auch diese drei Marker sind für die Einwanderung in entzündetes Gewebe von Relevanz. Morgan und Kollegen beschrieben CXCR6 als Rezeptor zur T-Zell-Rekrutierung in die Lunge mit Augenmerk auf interstitielle Lungenerkrankungen<sup>118</sup>. Suzaki und Kollegen messen CCR5, ähnlich wie CXCR6, eine Rolle als Rezeptor für die Einwanderung ins entzündete Lungengewebe bei<sup>119</sup>. CCR2 wird neben der Regulation der Migration in entzündetes Gewebe ebenfalls eine immunregulatorische Funktion bei Lungenfibrose zugeschrieben<sup>120</sup>. Auf synovialen T-Zellen von RA-Patienten konnte bereits 2001 eine erhöhte Expression von CXCR3 und CCR5 nachgewiesen werden<sup>121</sup>. Eine aktuelle Studie von Rao und Kollegen zeigt auf PD-1<sup>+</sup> TFH-ähnlichen Zellen im Synovium von RA-Patienten eine erhöhte Transkription von CCR2 und CCR5<sup>74</sup>. Weitere Moleküle zur Rekrutierung könnten CXCL12 und der zugehörige Rezeptor CXCR4, welcher sowohl auf B-Zellen, als auch auf TFH-Zellen exprimiert wird, sein. CXCL12 wird von einer Subpopulation von Stromazellen in FDZ-negativen T- und B-Zell-Clustern während einer Inflammation im Lungengewebe produziert<sup>49</sup>. Folglich scheinen CCR2, CCR5, CXCR3, CXCR4 und CXCR6 gute Kandidaten für die Rekrutierung TFH-ähnlicher Zellen an den Ort der Inflammation zu sein. Es wäre interessant zu sehen, ob diese Migrationsmarker auch immunhistochemisch in der Lunge nachzuweisen sind, wo genau diese im Gewebe lokalisiert sind, ob sie in unstrukturierten Infiltraten zu finden sind und welche von ihnen von T-Zellen bzw. B-Zellen exprimiert werden, die in diesen Infiltraten in engem Kontakt miteinander stehen.

### **4.1.2 PD-1 als TFH-Zell-Marker und potentieller therapeutischer Angriffspunkt im entzündeten Lungengewebe**

PD-1 ist einer der wichtigsten Marker zur Charakterisierung von TFH-Zellen. In murinen wie auch humanen Proben zeigte sich eine Population PD-1<sup>+</sup> T-Zellen. Zwar war die Expression von PD-1 nicht ganz so hoch wie in den sekundär lymphatischen Organen, dennoch war sie in den T-Zellen der entzündeten Atemwege und der murinen Lunge signifikant höher als auf den zirkulierenden T-Zellen. Auch im Vergleich der zirkulierenden T-Zellen von Sarkoidose-Patienten mit gesunden Probanden zeigte sich eine gesteigerte PD-1-Expression.

Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung einer höheren PD-1-Expression auf BAL T-Zellen im Vergleich mit zirkulierenden T-Zellen und gesunden BAL-Kontrollen<sup>122</sup>. Braun und Kollegen konnten zeigen, dass PD-1 in aktiven Krankheitsphasen verstärkt exprimiert wird, mit Ausheilung der Krankheit normalisiert sich die PD-1-Expression jedoch wieder. Mittels Immunhistochemie konnte außerdem gezeigt werden, dass die PD-1-positiven T-Zellen in von Sarkoidose befallenen Lungen vor allem in der Region um die Granulome herum lokalisiert sind. In der intergranulomatösen Region befindet sich ebenfalls eine große Anzahl B-Zellen<sup>98</sup>. Dies spricht für eine benachbarte Lokalisation von T- und B-Zellen und die Möglichkeit, dass in diesen Infiltraten T-B-Kooperation stattfindet. Als weitere Untersuchung wäre hier eine gemeinsame immunhistochemische Färbung beider Zelltypen interessant, um die benachbarte Lokalisation zu bestätigen. Dass die PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen klassischen TFH-Zellen ähneln, konnte durch Einzelzell-RNA-Sequenzierung von PD-1<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Synovium von RA-Patienten gezeigt werden<sup>74,123</sup>.

Eine hohe Expression von PD-1 wird häufig als Zeichen der Erschöpfung von Zellen gewertet. Diese erschöpften Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihre Effektorfunktion nicht mehr ausführen können und inhibitorische Rezeptoren hochregulieren. Die Folge ist eine verminderte Effektivität der Immunantwort<sup>124,125</sup>. Zwar spielt diese Funktion von PD-1 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Rolle, nicht aber in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchaus in der Lage sind nach Kurzzeit-Stimulation Zytokine wie IL-21, CXCL13, IFN- $\gamma$  und IL-10 zu produzieren<sup>74</sup>. Für die T-Zellen aus der BAL von Sarkoidose-Patienten konnte im Rahmen dieser Arbeit ähnliches festgestellt werden. Die PD-1<sup>+</sup> T-Zellen produzierten als Antwort auf Stimulation mehr IL-21, IFN- $\gamma$  und IL-2 als PD-1<sup>-</sup> T-Zellen.

Die Zytokinexpression und mangelnde Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen scheint ein zentraler Aspekt der Pathophysiologie der Sarkoidose zu sein. Die Ausheilung der Erkrankung geht mit der Wiederherstellung der Zytokinproduktion und Zunahme der Proliferation einher<sup>126</sup>. *In vitro* Blockade von PD-1 in T-Zellen von Sarkoidose-Patienten erhöht die Kapazität zur Proliferation dieser Zellen<sup>122</sup>.

Auch in Berylliose, einer granulomatösen interstitiellen Lungenerkrankung, welche durch Inhalation von Beryllium-Staub entstehen kann, treten vermehrt PD-1<sup>+</sup> T-Zellen in der BAL auf<sup>127</sup>. Zudem korreliert die Höhe der PD-1-Expression mit der Schwere der Alveolitis. Durch *in vitro* Blockade des PD-1-Liganden konnte die T-Zell-Funktion, bezogen auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, bei Berylliose-Patienten wiederhergestellt werden.

PD-1 spielt also nicht nur in der murinen Lunge und den humanen Atemwegen eine Rolle, seine Rolle als Marker für TFH-ähnliche Zellen wurde bereits in anderen Autoimmunerkrankungen beschrieben und auch in Sarkoidose außerhalb seiner TFH-Zell-Funktion untersucht.

### 4.1.3 TFH-Signaturzytokin IL-21 im entzündeten Gewebe und als potentieller therapeutischer Ansatzpunkt

IL-21 nimmt eine zentrale Rolle in der Kommunikation zwischen T- und B-Zellen ein und wird von TFH-Zellen als charakteristisches Zytokin produziert<sup>128</sup>. Dieses Zytokin ist notwendig für die Bildung von Keimzentren, induziert den Klassenwechsel zu IgG und IgA sowie die Immunglobulin-Produktion in B-Zellen und koordiniert somit die Differenzierung von B-Zellen hin zu langlebigen, hochaffinen Plasmazellen<sup>129–131</sup>. Obwohl sich Keimzentren und Plasmazellen auch in IL-21-Rezeptor-defizienten Mäusen finden, haben diese Keimzentren eine kürzere Lebensdauer und die Immunglobulinkonzentrationen im Serum nehmen frühzeitiger ab<sup>132</sup>. IL-21 ist demnach essentiell, um voll funktionsfähige Keimzentren und TFH-Zellen zu generieren. Da in IL-21-defizienten Mäusen weniger TFH-Zellen entstehen, spielt IL-21 offensichtlich auch in der TFH-Zell-Differenzierung eine Rolle<sup>129,133</sup>. Wie in späteren Studien allerdings gezeigt werden konnte, reguliert IL-21 die TFH-Differenzierung nicht direkt. Stattdessen handelt es sich um einen indirekten Effekt durch die Wirkung von IL-21 auf B-Zellen<sup>134,135</sup>. Zusätzlich supprimiert IL-21 die Expression von FoxP3 und damit die Differenzierung von T-Zellen in regulatorische T-Zellen<sup>136</sup>.

Diese Arbeit zeigte eine höhere Expression von TFH-Markern auf IL-21<sup>+</sup> T-Zellen aus dem murinen Lungengewebe als auf deren IL-21<sup>-</sup> Vergleichspopulation (Abbildung 5). Die humanen BAL T-Zellen wiesen eine hohe Anzahl IL-21-produzierender T-Zellen auf (Abbildung 11), zudem wurde IL-21 zusammen mit anderen TFH-Markern koexprimiert.

Neben Sarkoidose gibt es zahlreiche Autoimmunerkrankungen, in denen eine erhöhte IL-21-Produktion beschrieben wurde, wie beispielsweise chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), SLE und Hashimoto Thyreoiditis<sup>19,130,137</sup>. In einem DM-Typ 1 Mausmodell zeigen die peripheren T-Zellen sowie CCR9<sup>+</sup> T-Zellen in Pankreas und Speicheldrüsen erhöhte IL-21-Expression<sup>138</sup>. Durch die Blockade des IL-21-Rezeptors konnte der Blutzuckerspiegel in den Mäusen gesenkt werden<sup>109</sup>. Außerdem lassen sich Hinweise auf eine Assoziation von Polymorphismen im IL-21 Genlocus mit dem Risiko des Auftretens einer Autoimmunerkrankung finden<sup>139</sup>.

In einem SLE-Mausmodell zeigen IL-21-defiziente Mäuse eine erhöhte Protektion gegenüber der Krankheitsentstehung, denn es lassen sich keine typischen Zeichen des SLE wie Hypergammaglobulinämie, Autoantikörperproduktion oder histologische Nierenveränderungen nachweisen<sup>140</sup>. Ähnliche Beobachtungen konnten in Mausmodellen für experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) und DM-Typ 1 gemacht werden<sup>136,141</sup>. Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von IL-21 im DM-Typ 1 Mausmodell zu erhöhter Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$ <sup>142</sup>; Injektion von IL-21 kann murine autoimmune Arthritis triggern<sup>143</sup>.

In der humanen BAL fand sich außerdem eine große Subpopulation IL-21- und IFN- $\gamma$ -koproduzierender T-Zellen. Diese Überlappung von TFH- und Th1-Phänotyp wird beim Menschen vor allem kurz nach der Aktivierung der Zellen beobachtet und vermutlich durch IL-21 induziert<sup>144</sup>. In einem DM-Typ 1-Mausmodell und in der Darmschleimhaut von CED Patienten konnten ebenfalls T-Zellen gefunden werden, welche IL-21 und IFN- $\gamma$  parallel exprimieren<sup>137,138</sup>.

Ein IL-21-neutralisierendes Fusionsprotein IL-21R/Fc wurde bereits in Mausmodellen für verschiedene Autoimmunerkrankungen eingesetzt. In einem Modell für systemische Sklerose wurde unter Gabe von IL-21R/Fc die Abnahme von PD-1<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> TFH-ähnlichen Zellen beobachtet<sup>111</sup>. Eine Verbesserung des klinischen Bilds, der Entzündungszeichen oder der Histologie konnte in Mausmodellen für CED, murine autoimmune Arthritis, RA und SLE beobachtet werden<sup>145-148</sup>. Eine Phase-I-Studie mit einem monoklonalen Antikörper gegen IL-21 (NNC0114-0006) in SLE und eine Phase-II-Studie in RA-Patienten sind bereits abgeschlossen, es liegen zurzeit allerdings noch keine Ergebnisse vor<sup>149,150</sup>.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL-21 sowie der zugehörige Rezeptor in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine zentrale Rolle einnimmt, insbesondere bei der B-Zell-Hilfe, und damit einen möglichen Ansatzpunkt für zukünftige Therapien bietet, der in folgenden Untersuchungen näher beachtet werden sollte.

#### 4.1.4 Die Rolle von ICOS als TFH-Marker im Lungengewebe

Die Ergebnisse dieser Arbeit zu ICOS-Expression im Lungengewebe lassen auf den ersten Blick keine eindeutige Aussage über die Rolle von ICOS treffen. Die ICOS-Expression auf transgenen T-Zellen aus murinem Lungengewebe war vergleichbar mit der Expression im Lymphknoten. In beiden Organen war die ICOS-Expression auf IL-21-produzierenden T-Zellen höher als auf der IL-21<sup>-</sup> Vergleichspopulation. (Abbildung 5). Dennoch zeigte eine Blockade von ICOS-L lediglich im Lymphknoten eine Suppression des TFH- und Keimzentrums-B-Zell-Phänotyps, was sich an der Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität von PD-1 und der Abnahme der GL7<sup>+</sup> PNA<sup>+</sup> B-Zellen um jeweils die Hälfte festmachen lässt (Abbildung 8). Durch die ICOS-L-Blockade wird die Kostimulation über ICOS-L unterbunden. Auf den T-Zellen wird ICOS weiterhin exprimiert. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Kostimulation durch ICOS-L für die TFH-ähnlichen Zellen in der Lunge keine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der Funktionen von TFH-ähnlichen Zellen und in der Ausbildung von Keimzentren vermittelt. Die T-Zellen aus den BAL-Proben ließen im besten Fall eine Tendenz zu vermehrter ICOS-Expression auf PD-1<sup>+</sup> Zellen erkennen. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer Transkriptomanalyse der T-Zellen aus BAL-Proben von Sarkoidose-Patienten zeigen, dass ICOS in BAL-T-Zellen noch seltener transkribiert wird als in zirkulierenden oder tonsillären T-Zellen (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe).

Es stellt sich die Frage, weshalb TFH-ähnliche Zellen im Lungengewebe ICOS-unabhängig sein könnten. ICOS induziert über die Suppression des Transkriptionsfaktors KLF2 die Transkription von CXCR5 und unterdrückt die Transkription von PSGL1, S1PR1, CD62L und CCR7<sup>84</sup>. Die Expression von CXCR5 ermöglicht TFH-Zellen das Einwandern in die B-Zell-Zone. Follikulär dendritische Zellen und Makrophagen in der B-Zell Zone sekretieren CXCL13, den Liganden für CXCR5, entlang dessen Gradienten die Migration in die B-Zell-Zone erfolgt<sup>8,151</sup>. Im Gegensatz dazu wird der Verbleib in der T-Zell-Zone durch CCR7 und PSGL-1 vermittelt, deren Expression durch ICOS-Kostimulation jedoch herunterreguliert wird. Demzufolge bereitet ICOS-Kostimulation den TFH-Zellen den Weg in die B-Zell-Zone und sichert dort ihren Verbleib. Da sich in den unstrukturierten lymphozytären Infiltraten in der Lunge keine B- und T-Zell-Zonen abgrenzen lassen, keine FDZ zu finden<sup>54</sup> sind und auch keine vermehrte Sekretion von CXCL13 nachzuweisen war, legen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung nahe, dass TFH-ähnliche Zellen im Lungengewebe die Kostimulation durch ICOS für eine erfolgreiche Interaktion mit B-Zellen nicht benötigen. Weiterführend würde sich dadurch die fehlende Auswirkung der ICOS-L-Blockade auf TFH-ähnliche Zellen und Keimzentrums-B-Zellen in der Lunge erklären lassen. Allerdings bleibt die Frage offen, wie T- und B-Zellen im entzündeten Lungengewebe zueinander finden, um miteinander zu interagieren.

In vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe mit ICOS-L-Knock-out-Mäusen zeigte sich, analog zu der ICOS-L-Blockade, eine signifikante Abnahme der PD-1-Expression im Lymphknoten, nicht aber in der Lunge<sup>152</sup>. Allerdings zeigten diese Experimente eine dezimierte Anzahl an Keimzentrums-B-Zellen in der Lunge. Eventuell spielt ICOS für die Funktion der TFH-ähnlichen Zellen der Lunge doch eine Rolle. Da aber ein vollständiger Knock-out und keine kurzzeitige Blockade diesen Effekt herbeiführt, könnte es möglich sein, dass die ICOS-Kostimulation bereits bei beginnender Immunreaktion bedeutsam ist. Der Effekt scheint sich abzuspielen, bevor die Blockade 8 Tage nach der ersten Immunisierung begonnen wurde. Das würde einen entscheidenden Unterschied zum Lymphknoten darstellen, da in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, dass ICOS im Lymphknoten vor allem in der späten Phase der Keimzentrumsreaktion zur Aufrechterhaltung des TFH-Phänotyps beiträgt<sup>153</sup>.

In den humanen BAL-Proben zeigten die CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen nur eine geringe Expression des Kostimulators ICOS (Abbildung 12). Sakthivel und Kollegen konnten nachweisen, dass ICOS in Sarkoidose-Patienten vor allem auf regulatorischen T-Zellen hochreguliert wird. CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> T-Zellen zeigten hierbei jedoch keinen Unterschied im Vergleich zu gesunden Kontrollen<sup>88</sup>.

Die ICOS-Färbung auf den humanen Zellen wurde mit dem Antikörper-Klon F44 durchgeführt. In Testversuchen unserer Arbeitsgruppe zeigte dieser Klon allerdings nur eine schwache Affinität zu ICOS und färbt somit nur auf Zellen mit hoher ICOS-Expression. Aus Mangel an Proben war es erst im

Laufe der Experimente möglich einen zweiten Antikörper-Klon, MIC-1096, auf den BAL-Zellen auszutesten. Wie Testversuche in unserer Arbeitsgruppe zeigten, ist MIC-1096 im Gegensatz zu F44 hochaffin für ICOS. In der Probefärbung mit MIC-1096 zeigte sich eine deutliche ICOS<sup>+</sup> Population auf den T-Zellen. Da bislang nur eine Probefärbung durchgeführt wurde, könnte dies ein Zufall sein. Es könnte allerdings auch bedeuten, dass die ICOS-Expression zwar geringer ist, als in den tonsillären T-Zellen, ICOS aber dennoch exprimiert wird. Dafür würde auch die Tendenz zu vermehrter ICOS-Expression im Vergleich zu den zirkulierenden T-Zellen sprechen.

Insgesamt lässt sich keine eindeutige Aussage zur der Funktion von ICOS im entzündeten Lungengewebe treffen, sodass weitere Untersuchungen notwendig sind, um diese Funktion genauer definieren zu können.

#### **4.1.5 CD40L als TFH-Zell-Marker und potentieller therapeutischer Angriffspunkt im entzündeten Lungengewebe**

Dass CD40L eine zentrale Rolle in der Kommunikation zwischen T- und B-Zellen einnimmt, zeigt das Hyper-IgM-Syndrom, ein primärer Immundefekt, welcher durch eine CD40L-Defizienz hervorgerufen wird. Patienten leiden häufig unter opportunistischen Infektionen, die, aufgrund von defektem Immunglobulin-Isotypwechsel während der Keimzentrumsreaktion und daraus resultierender dezimierter IgA-, IgG- und IgE-Produktion vom Immunsystem nicht in Schach gehalten werden können<sup>25</sup>. Des Weiteren finden sich im Blut verringerte Frequenzen zirkulierender TFH-Zellen<sup>154</sup>.

CD40L wurde sowohl auf den IL-21<sup>+</sup> T-Zellen im murinen Lungengewebe als auch auf den T-Zellen der humanen BAL verstärkt exprimiert (Abbildungen 5 und 12). Die T-Zellen der BAL zeigten eine höhere CD40L-Expression als zirkulierende oder tonsilläre T-Zellen. In Kombination mit anderen TFH-Zell-Markern wie IL-21 oder PD-1 ließ sich allerdings keine klare Population abgrenzen, sodass sich CD40L nicht dazu eignet die Population TFH-ähnlicher Zellen in Lunge oder Atemwegen in durchflusszytometrischen Analysen zu definieren.

Auf den zirkulierenden T-Zellen von Sarkoidose-Patienten war CD40L im Vergleich zu gesunden Kontrollen ebenfalls signifikant erhöht (Abbildung 16). Da in dieser Arbeit nur wenige Patienten und gesunde Probanden untersucht wurden, wäre es interessant, ob sich diese Beobachtung auch in einer größeren Kohorte machen lässt und ob sich CD40L möglicherweise als diagnostischer Marker für den Krankheitsverlauf bei Sarkoidose eignet. Erhöhte CD40L-Expression auf zirkulierenden T-Zellen findet sich nicht nur in Sarkoidose, sondern auch in Autoimmunerkrankungen wie SLE, systemischer Sklerose, CED und juveniler idiopathischer Arthritis<sup>154-158</sup> und ist im Falle von SLE auch mit der Krankheitsaktivität assoziiert.

Callard und Kollegen zeigten 1993, dass der CD40-Signalweg von essentieller Bedeutung für die Keimzentrumsbildung, somatische Hypermutation, Affinitätsreifung und den Klassenwechsel ist <sup>160</sup>. Folglich ist die Interaktion zwischen T- und B-Zellen über CD40L und CD40 entscheidend, um hochaffine Plasmazellen zu generieren. Sogar CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind in der Lage B-Zell-Hilfe zu leisten, wenn sie CD40L exprimieren <sup>161</sup>. Des Weiteren induziert CD40L die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-12, TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  <sup>162</sup>. Die Stimulation von Monozyten über CD40, in Kombination mit IFN- $\gamma$ , trägt außerdem zur Fusion der Monozyten zu Langhans Riesenzellen bei, welche sich in den Granulomen von Sarkoidose-Patienten befinden <sup>163</sup>.

In den frühen 2000er Jahren wurden bereits einige Studien zu CD40L-Blockade in Autoimmunerkrankungen durchgeführt. Dabei wurde bei der Lupus-Nephritis unter der Blockade eine Verbesserung der Entzündungsparameter, Anticardiolipin-Antikörpertiter und Hämaturie festgestellt <sup>164</sup>. In einem DM-Typ 1-Mausmodell konnte durch die Blockade von CD40L die Entstehung zytotoxischer T-Zellen verhindert und die Blutzuckerwerte verbessert werden <sup>165</sup>. Als zusätzlicher positiver Effekt der CD40L-Blockade wurde beobachtet, dass regulatorische T-Zellen unter der Blockade expandieren und damit zur Kontrolle von Autoimmunität beitragen <sup>166</sup>. Allerdings führte die Therapie mit CD40L auch zu einer steigenden Inzidenz thrombembolischer Komplikationen <sup>167</sup>. Da die Komplikationen vermutlich durch die Fc-Domäne des Antikörpers ausgelöst wurden, begann die Entwicklung neuer Antikörper mit fehlender Fc-Domäne. Die neuen Antikörper zeigten im Tiermodell bereits vielversprechende Ergebnisse <sup>168</sup>. Xie und Kollegen beobachteten sinkende ds-DNA-Titer, Verbesserung des Körpergewichts, verminderte Proteinurie und längeres Überleben in einem Lupus Mausmodell <sup>169</sup>. Drei Phase-I-Studien bestätigten bereits, dass der Antikörper vom Menschen gut vertragen wird, auch in Hinblick auf thrombembolische Komplikationen <sup>170-172</sup>.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse sollte CD40L im Hinblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten von Autoimmunerkrankungen und aufgrund der Rolle von CD40L in der Granulombildung in besonderem Maße für Sarkoidose weiter im Auge behalten und untersucht werden. Zur Definition von TFH-ähnlichen Zellen in den Atemwegen eignet er sich allerdings nicht, da sich in Kombination mit anderen TFH-Zell-Markern keine eindeutige Population abgrenzen lässt.

### **4.2 B-Zellen aus humaner BAL und murinem Lungengewebe im Vergleich**

Insgesamt fanden sich nur sehr geringe B-Zell-Frequenzen in der humanen BAL im Vergleich zu Tonsille und PBMC (Abbildung 17). Auch in anderen Autoimmunerkrankungen sind B-Zellen im entzündeten Gewebe rar; zum Beispiel in COVID-Patienten oder in Speicheldrüsen von Sjögren-Patienten <sup>173</sup>. Obwohl Sarkoidose häufig als T-Zell-vermittelte Erkrankung beschrieben wird, gibt es

viele Hinweise, dass auch humorale Mechanismen eine bedeutende Rolle spielen. Die in dieser Arbeit untersuchten Sarkoidose-Patienten zeigten beispielsweise erhöhte Immunglobulin-Konzentrationen im BAL-Überstand (Abbildung 20).

Die wenigen, in der BAL vorhandenen, B-Zellen ähneln den B-Zellen aus der Tonsille sehr. Neben dem Fehlen von Keimzentrums-B-Zellen unterscheiden sich die B-Zellen in Tonsille und BAL nur anhand ihrer CD21-Expression (Abbildung 19). Auch in der BAL von Patienten mit CVID und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten sind die CD21<sup>-</sup> Zellen die dominierende B-Zell-Population. Die CD21<sup>-</sup> B-Zellen sind eine Gruppe gewebsständiger B-Zellen, die sich vor allem im peripheren Gewebe, wie zum Beispiel den Atemwegen, finden lassen. Im Gesunden kommen sie nur in geringer Frequenz vor und expandieren auf inflammatorische Reize hin sehr schnell<sup>174</sup>. CD21<sup>-</sup> B-Zellen sind ein Zeichen für stattfindende autoimmune B-Zell-Aktivität<sup>101</sup>. Wehr und Kollegen postulierten, dass diese Zellen durch Autoantigene chronisch aktiviert werden. CD11c ist ein weiterer Marker, der mit autoimmunen B-Zellen in Zusammenhang steht und im Synovium von RA-Patienten auf B-Zellen detektiert wurde<sup>123</sup>. Neben der expandierten Population der CD21<sup>-</sup> B-Zellen fiel auch die vermehrte Expression von FcRL4 im Vergleich mit den tonsillären B-Zellen auf (Abbildung 19). Hohe FcRL4-Expression zusammen mit niedriger CD21- und hoher CD11c-Expression wurde von Yeo und Kollegen als proinflammatorische, pathogene Population in Patienten mit RA beschrieben<sup>100</sup>. In einer weiteren Untersuchung von BAL B-Zellen wäre es interessant zu untersuchen, ob die CD21<sup>-</sup> B-Zellen und die FcRL4<sup>+</sup> B-Zellen in den Atemwegen CD11c exprimieren.

Die Anwesenheit von Keimzentrums-B-Zellen im entzündeten Gewebe ist bei Betrachtung von TFH-Zellen von besonderem Interesse. In der murinen Lunge war dies der Fall. Da 96 % der Infiltrate im Atemwegs-Inflamationsmodell FDZ-negativ sind<sup>54</sup>, liegt die Vermutung nahe, dass Keimzentrums-B-Zellen in der Lunge auch außerhalb von ELS entstehen können. In der humanen BAL waren keine Keimzentrums-B-Zellen nachweisbar (Abbildung 18). Da auch in der murinen BAL keine Keimzentrums-B-Zellen zu finden waren, im Lungengewebe jedoch sehr wohl, stellen sich die Fragen, ob Keimzentrums-B-Zellen im humanen Lungengewebe ebenfalls vorhanden sind und weshalb sie in der BAL nicht detektierbar sind. Auch in der Literatur sind keine Beschreibungen von Keimzentrums-B-Zellen in der humanen BAL zu finden. Leider war es nicht möglich Lungenbiopsien von Sarkoidose-Patienten im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, um herauszufinden ob und wenn ja, wo sich Keimzentrums-B-Zellen in der Lunge finden. Für die Abwesenheit von Keimzentrums-B-Zellen in der BAL lassen sich drei mögliche Erklärungen finden. Erstens besteht die Möglichkeit, dass die lymphozytären Infiltrate, in denen Keimzentrums-B-Zellen entstehen, nicht direkt an den Atemwegen lokalisiert sind. Im murinen Atemwegs-Inflamationsmodell konnte allerdings immunhistochemisch gezeigt werden, dass sich Infiltrate mit Keimzentrums-B-Zellen auch

nahe den Atemwegen entwickeln<sup>54</sup>. Zweitens könnten die Keimzentrums-B-Zellen sehr fest an anderen Zellen oder der extrazellulären Matrix verankert sein, sodass sie sich bei einer BAL nicht herauswaschen lassen. Drittens muss in Erwägung gezogen werden, dass sich in der Lunge von Sarkoidose-Patienten keine Keimzentrums-B-Zellen bilden. Histologische Untersuchungen der Lungen von Sarkoidose-Patienten zeigten lymphozytäre, B-Zell dominierte Infiltrate zwischen den Granulomen, die keine strukturierte Morphologie von Keimzentren zeigen<sup>98</sup>. In diesen Aggregaten finden sich außerdem CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen und einige Plasmazellen. Allerdings würde dies nicht das Fehlen der Keimzentrums-B-Zellen in der murinen BAL erklären, da hier eindeutig Keimzentrums-ähnliche B-Zellen im Lungengewebe nachgewiesen wurden.

Ein Hinweis, dass B-Zellen an der Pathogenese von Sarkoidose beteiligt sein könnten, zeigt auch die Wirksamkeit von Rituximab, einem Antikörper, der gegen CD20 gerichtet ist und dadurch zu einer Depletion von CD20<sup>+</sup> B-Zellen führt. Anti-CD20-Antikörper führen in der Maus zu einem Verlust aller B-Zellen, mit Ausnahme der Keimzentrums-B-Zellen<sup>175</sup>. Die Therapie zeigte eine positive Auswirkung auf die forcierte Vitalkapazität und 6-min Gehstrecke in einer Phase I/II Studie, sowie in mehreren Einzelfallstudien<sup>176</sup>. Da die Keimzentrums-B-Zellen noch vorhanden sind, sind sie auch in der Lage Überlebenssignale an TFH-Zellen zu senden. TFH-Zellen verschwinden nur bei einer Depletion der Keimzentrums-B-Zellen. Der positive Effekt, der in Sarkoidose-Patienten beobachtet wird, dürfte somit nicht auf eine dezimierte Zahl an TFH-Zellen zurückzuführen sein, sondern vermutlich direkt durch die B-Zellen hervorgerufen werden. Die momentan in der Sarkoidose-Therapie eingesetzten Medikamente, Glukokortikoide, Methotrexat und Azathioprin, richten sich sowohl gegen T-Zellen, als auch gegen B-Zellen. In Kombination zeigen diese Erkenntnisse, dass B-Zellen in Sarkoidose vermutlich eine größere Rolle spielen als vormals angenommen, sodass ihnen in Grundlagen- und klinischer Forschung mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte.

### 4.3 Limitationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen im Licht einiger Limitationen betrachtet werden. Die Stichprobe, auf die sich die Ergebnisse der humanen Proben stützen, ist sehr klein. Insgesamt konnten lediglich 9 BAL-Proben durchflusszytometrisch untersucht werden; mit dem Überstand von 16 Proben wurde ein ELISA durchgeführt. Mit einer größeren Anzahl an Patienten und Kontrollen könnten auch die verschiedenen radiologischen Stadien der Sarkoidose verglichen werden. Weiterhin wäre es interessant zu sehen, ob sich die Expression der TFH-Zell-Marker verändert je nachdem, ob es sich um ein Löfgren-Syndrom oder eine chronische Sarkoidose handelt. Gleichmaßen könnte eine größere Stichprobe zeigen, ob eine Behandlung oder ein Abheilen der

Erkrankung einen Einfluss auf die TFH-Zell-Marker hat. Diese Untersuchungen könnten einen genaueren Einblick in die Funktion von TFH-ähnlichen Zellen im Verlauf der Erkrankungen geben.

Auch ist die Stichprobe hinsichtlich der Geschlechterverteilung nicht repräsentativ. Erwartungsgemäß hätten mehr Frauen als Männer in die Studie eingeschlossen werden sollen. Allerdings wurden in unserer Studie 12 männliche und lediglich 4 weibliche Patienten eingeschlossen. Ungeklärt bleibt, ob dies eine Auswirkung auf die Ergebnisse hat.

Eine weitere Limitation ergibt sich aus der Tatsache, dass die verwendeten Kontrollen keine gesunden Probanden waren. Verständlicherweise war es uns nicht möglich, die BAL gesunder Probanden zu gewinnen, da für diese Untersuchung unter anderem eine Narkose notwendig ist. Deshalb wurden unter den Patienten, bei denen aufgrund ihrer Symptomatik eine BAL gewonnen wurde, nach einer möglichst guten Vergleichsgruppe gesucht. Patienten mit einer Entzündung sollten ausgeschlossen werden, da ein möglichst ruhendes Immunsystem untersucht werden sollte. Es bot sich an, Patienten mit idiopathischem Husten oder Bronchialkarzinomen zu untersuchen, wobei ungeklärt ist, inwiefern sich ein bei Tumorerkrankungen verändertes Immunsystem auf die Ergebnisse auswirkt. Alle Patienten mit einer lymphozytären Alveolitis, die Hinweis auf ein entzündliches Geschehen gibt, wurden ausgeschlossen. Durchschnittlich zeigten die Kontrollen einen CD4/CD8-Quotienten, der leicht über der Norm lag. Allerdings erfüllten die Kontrollen nicht die Diagnosekriterien der Sarkoidose. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Kontrollen nicht der idealen Vorstellung entsprechen, als Korrelat für ein nicht-entzündetes System erlauben sie dennoch den Vergleich zu den Sarkoidose-Proben.

#### **4.4 Relevanz und Perspektiven**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von T-Zellen, die B-Zell-Hilfe leisten können, im entzündeten Lungengewebe von Mensch und Maus untersucht und näher charakterisiert. Außerdem sollte ein Vergleich zwischen TFH-ähnlichen Zellen aus dem entzündeten Lungengewebe und klassischen TFH-Zellen gezogen werden. Darüber hinaus diente diese Arbeit dem Vergleich von TFH-ähnlichen Zellen aus der BAL am Beispiel von Sarkoidose mit TFH-ähnlichen Zellen aus einem murinen Atemwegs-Inflammationsmodell.

Durch ihre zentrale Rolle in der humoralen Immunantwort, nehmen TFH-Zellen in Antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen einen bedeutenden Platz ein. TFH-Zellen finden sich nicht nur in den sekundär lymphatischen Organen und organisierten Keimzentren, sondern auch im entzündeten Gewebe. Allerdings lassen sich TFH-ähnliche Zellen in den entzündeten Atemwegen nicht anhand der klassischen TFH-Zell-Marker CXCR5 und Bcl-6 erkennen.

Das murine Atemwegs-Inflammationsmodell ermöglicht es, TFH-Zellen in entzündetem Lungengewebe und dem drainierenden Lymphknoten zu untersuchen. Die BAL-Proben von Sarkoidose-Patienten erlauben einen Vergleich von murinen und humanen Daten. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten sowohl im Menschen als auch in der Maus eine abgrenzbare Population von IL-21<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Zellen. Die IL-21<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten zusätzlich weitere TFH-Zell-Marker wie CD40L. Zudem waren die T-Zellen aus der humanen BAL von Sarkoidose-Patienten und des Atemwegs-Inflammationsmodells in der Lage Immunglobulinproduktion von Gedächtnis-B-Zellen zu stimulieren. Durch Expression der Rezeptoren CXCR3, CCR2 und CCR5 besitzen die IL-21<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T-Zellen, im Gegensatz zu klassischen TFH-Zellen, die Fähigkeit in chronisch entzündetes Gewebe einzudringen. Als darauf aufbauende Untersuchung wäre es interessant, ein Transkriptom der IL-21<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T-Zellen aus BAL-Proben zu analysieren und ein Vergleich mit klassischen TFH-Zellen der Tonsille anzustellen.

Zusammenfassend erweitert die Identifikation von IL-21<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> als TFH-ähnlichen Phänotyp das Spektrum der B-Zell-helfenden T-Zellen, die als Targets gegen proinflammatorische T-Zellen in SLO und entzündetem Gewebe dienen können.

TFH-Zellen stellen ein interessantes Target in der Therapie von Autoimmunerkrankungen dar. Um bestimmte Zellen oder Botenstoffe auszuschalten, die in der Pathogenese einer Erkrankung eine wichtige Rolle spielen, werden vermehrt spezifische Antikörper eingesetzt. Wie diese Arbeit zeigt, lassen sich TFH-ähnliche Zellen im Gewebe nur schlecht durch einen einzelnen Marker identifizieren. Durch Antikörper, die nur gegen einen dieser Marker gerichtet sind, würden auch andere Zellen eliminiert werden und damit das Risiko für Nebenwirkungen steigern. Eine Kombination von zwei Markern hingegen würde die Anzahl der Zellen, die fälschlicherweise durch die Antikörper markiert und eliminiert werden deutlich reduzieren, da beide Marker von diesem Antikörper gebunden werden müssten, um dessen Wirkung zu entfalten. Folglich wäre es interessant einen Antikörper herzustellen und zunächst im Atemwegs-Inflammationsmodell zu testen, der beispielsweise PD-1 und ICOS erkennt. Als vorwiegend intrazelluläres Molekül würde sich CD40L für einen solchen Antikörper nicht eignen. Da auch IL-21 als Zytokin für einen solchen Antikörper nicht optimal geeignet wäre, könnte man das bereits in anderen Mausmodellen getestete IL-21-neutralisierende Fusionsprotein IL-21R/Fc auch im Atemwegs-Inflammationsmodell testen.

Um die hier beschriebenen Ergebnisse zu reproduzieren und zu festigen, wäre es nötig eine größere Stichprobe an Sarkoidose-Patienten zu untersuchen. Außerdem war kein Vergleich der TFH-ähnlichen Zellen zwischen entzündeten Atemwegen in Sarkoidose und einer gesunden Population möglich. Dieser Vergleich wäre interessant in Zusammenhang mit der Frage in welchem Maße sich die T-Zellen in den Atemwegen unter inflammatorischen Bedingungen verändern. Ergänzend wäre

eine immunhistochemische Analyse der IL-21<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> T-Zellen im murinen Atemwegs-Inflammationsmodell und in humanen Proben interessant, um ihre Lokalisation im Vergleich mit Antigen-spezifischen B-Zellen oder Keimzentrums-B-Zellen bewerten zu können.

## Literaturverzeichnis

1. Murphy K, Weaver C. Grundlagen Der Adaptiven Immunität. In: *Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie*. Berlin: Springer Spektrum; 2018:16-31.
2. Murphy K, Weaver C, Lieber M, Neuberger M, Schatz D, Sleckman B, Tucker P. Die Entstehung von Antigenrezeptoren in Lymphozyten. In: *Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie*. Berlin: Springer Spektrum; 2018:221-272.
3. Murphy K, Weaver C, Cancro M, Carter R, Crispe I, Hogquist K, Huseby E, Kang J, Robey E. Die Entwicklung der B- und T-Lymphozyten. In: *Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie*. Berlin: Springer Spektrum; 2018:377-442.
4. Murphy K, Weaver C, Cancro M, Hagerman A, Kearney J, Randall T, Ravetch J, Tucker H. Die humorale Immunantwort. In: *Murphy K, Weaver, C. Janeway Immunologie*. Berlin: Springer Spektrum; 2018:517-580.
5. Murphy K, Weaver C, Carbone F, Crotty S, Heath B, Jenkins M, Rudensky A, Sakaguchi S. Die T-Zell vermittelte Immunität. In: *Murphy K, Weaver, C. Janeway Immunologie*. Berlin: Springer Spektrum; 2018:443-516.
6. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Förster R. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 2000;192(11):1545-1552. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104797>.
7. Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*. 2000;192(11):1553-1562. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104798>.
8. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*. 1996;87(6):1037-1047. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978608>.
9. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med*. 1999;190(8):1123-1134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523610>.
10. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, Dent AL, Craft J, Crotty S. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*. 2009;325(5943):1006-1010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608860>.
11. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang Y-H, Dong C. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science*. 2009;325(5943):1001-1005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19628815>.
12. Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, Srivastava M, Linterman M, Zheng L, Simpson N, Ellyard JJ, Parish IA, Ma CS, Li Q-J, Parish CR, Mackay CR, Vinuesa CG. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*. 2009;31(3):457-468. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631565>.
13. Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, Tsai LM, Kawamoto S, Marshall JL, Ramiscal RR, Chan TD, Gatto D, Brink R, Yu D, Fagarasan S, Tarlinton DM, Cunningham AF, Vinuesa CG. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J Exp Med*. 2011;208(7):1377-1388. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708925>.
14. Odegard JM, Marks BR, DiPlacido LD, Poholek AC, Kono DH, Dong C, Flavell RA, Craft J. ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2008;205(12):2873-2886.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981236>.
15. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*. 2016;45(3):471-482. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27653600>.
  16. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan ICM. Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:335-368. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907215>.
  17. Hutloff A, Büchner K, Reiter K, Baelde HJ, Odendahl M, Jacobi A, Dörner T, Kroczeck RA. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3211-3220. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15476242>.
  18. Wang L, Sun Y, Zhang Z, Jia Y, Zou Z, Ding J, Li Y, Xu X, Jin L, Yang T, Li Z, Sun Y, Zhang J-Y, Lv S, Chen L, Li B, Gershwin ME, Wang F-S. CXCR5+ CD4+ T follicular helper cells participate in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 2015;61(2):627-638. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25042122>.
  19. Zhu C, Ma J, Liu Y, Tong J, Tian J, Chen J, Tang X, Xu H, Lu L, Wang S. Increased frequency of follicular helper T cells in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):943-950. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22188745>.
  20. Saito R, Onodera H, Tago H, Suzuki Y, Shimizu M, Matsumura Y, Kondo T, Itoyama Y. Altered expression of chemokine receptor CXCR5 on T cells of myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol*. 2005;170(1-2):172-178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214223>.
  21. Liu R, Wu Q, Su D, Che N, Chen H, Geng L, Chen J, Chen W, Li X, Sun L. A regulatory effect of IL-21 on T follicular helper-like cell and B cell in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R255. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23176102>.
  22. Ma J, Zhu C, Ma B, Tian J, Baidoo SE, Mao C, Wu W, Chen J, Tong J, Yang M, Jiao Z, Xu H, Lu L, Wang S. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:827480. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22649468>.
  23. Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, Yu D, Domaschek H, Whittle B, Lambe T, Roberts IS, Copley RR, Bell JI, Cornall RJ, Goodnow CC. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature*. 2005;435(7041):452-458. <http://www.nature.com/articles/nature03555>.
  24. Feng X, Wang D, Chen J, Lu L, Hua B, Li X, Tsao BP, Sun L. Inhibition of aberrant circulating Tfh cell proportions by corticosteroids in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2012;7(12):e51982. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284839>.
  25. Fischer A. Primary Immune Deficiency Diseases. In: *Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill; 2012:2695-2706.
  26. Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, van Schaik S, Notarangelo L, Geha R, Roncarolo MG, Oettgen H, De Vries JE, Aversa G, Terhorst C. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*. 1998;395(6701):462-469. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9774102>.
  27. Ma CS, Avery DT, Chan A, Batten M, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Kreins AY, Averbuch D, Engelhard D, Magdorf K, Kilic SS, Minegishi Y, Nonoyama S, French MA, Choo S, Smart JM, Peake J, Wong M, Gray P, Cook MC, Fulcher DA, Casanova J-L, Deenick EK, Tangye SG. Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood*. 2012;119(17):3997-4008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22403255>.
  28. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(7):447-462. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24948366>.
  29. Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand

- CM. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol.* 2001;167(2):1072-1080. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441118>.
30. Humby F, Bombardieri M, Manzo A, Kelly S, Blades MC, Kirkham B, Spencer J, Pitzalis C. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med.* 2009;6(1):e1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19143467>.
31. Luther SA, Lopez T, Bai W, Hanahan D, Cyster JG. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity.* 2000;12(5):471-481. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843380>.
32. Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, Matloubian M, Cyster JG. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol.* 2002;169(1):424-433. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077273>.
33. Scheel T, Gursche A, Zacher J, Häupl T, Berek C. V-region gene analysis of locally defined synovial B and plasma cells reveals selected B cell expansion and accumulation of plasma cell clones in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(1):63-72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20882667>.
34. Chang A, Henderson SG, Brandt D, Liu N, Guttikonda R, Hsieh C, Kaverina N, Utset TO, Meehan SM, Quigg RJ, Meffre E, Clark MR. In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J Immunol.* 2011;186(3):1849-1860. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187439>.
35. Bombardieri M, Barone F, Humby F, Kelly S, McGurk M, Morgan P, Challacombe S, De Vita S, Valesini G, Spencer J, Pitzalis C. Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 2007;179(7):4929-4938. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878393>.
36. Jones GW, Jones SA. Ectopic lymphoid follicles: inducible centres for generating antigen-specific immune responses within tissues. *Immunology.* 2016;147(2):141-151. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26551738>.
37. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Hartson L, Kusser K, Tighe MP, Klonowski KD, Lefrançois L, Cauley LS, Harmsen AG, Lund FE, Randall TD. Persistence and responsiveness of immunologic memory in the absence of secondary lymphoid organs. *Immunity.* 2006;25(4):643-654. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045819>.
38. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, Woodland DL, Lund FE, Randall TD. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med.* 2004;10(9):927-934. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15311275>.
39. Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, Schärli P, Laissue JA, Baggiolini M, Ugucioni M. BCA-1 is highly expressed in Helicobacter pylori-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J Clin Invest.* 1999;104(10):R49-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562310>.
40. Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jörg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SHE. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol.* 2004;204(2):217-228. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15376257>.
41. de Chaisemartin L, Goc J, Damotte D, Validire P, Magdeleinat P, Alifano M, Cremer I, Fridman W-H, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean M-C. Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res.* 2011;71(20):6391-6399. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900403>.

42. Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie J-J, Rochaix P, Girard J-P. Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* 2011;71(17):5678-5687. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846823>.
43. Cheng J, Torkamani A, Grover RK, Jones TM, Ruiz DI, Schork NJ, Quigley MM, Hall FW, Salomon DR, Lerner RA. Ectopic B-cell clusters that infiltrate transplanted human kidneys are clonal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(14):5560-5565. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415369>.
44. Coppola D, Nebozhyn M, Khalil F, Dai H, Yeatman T, Loboda A, Mulé JJ. Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am J Pathol.* 2011;179(1):37-45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703392>.
45. Cañete JD, Celis R, Moll C, Izquierdo E, Marsal S, Sanmartí R, Palacín A, Lora D, de la Cruz J, Pablos JL. Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(5):751-756. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495732>.
46. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A, Aloisi F. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 2007;204(12):2899-2912. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984305>.
47. Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, Daridon C, Saraux A, Youinou P, Pers J-O. Ectopic germinal centers are rare in Sjogren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. *J Immunol.* 2009;182(6):3540-3547. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265132>.
48. Armengol MP, Juan M, Lucas-Martín A, Fernández-Figueras MT, Jaraquemada D, Gallart T, Pujol-Borrell R. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol.* 2001;159(3):861-873. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549579>.
49. Fleige H, Ravens S, Moschovakis GL, Bölter J, Willenzon S, Sutter G, Häussler S, Kalinke U, Prinz I, Förster R. IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. *J Exp Med.* 2014;211(4):643-651. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24663215>.
50. Söderström N, Biörklund A. Organization of the invading lymphoid tissue in human lymphoid thyroiditis. *Scand J Immunol.* 1974;3(3):295-301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4137096>.
51. Thurlings RM, Wijbrandts CA, Mebius RE, Cantaert T, Dinant HJ, van der Pouw-Kraan TCTM, Verweij CL, Baeten D, Tak PP. Synovial lymphoid neogenesis does not define a specific clinical rheumatoid arthritis phenotype. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1582-1589. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512774>.
52. Reynisdottir G, Olsen H, Joshua V, Engström M, Forsslund H, Karimi R, Sköld CM, Nyren S, Eklund A, Grunewald J, Catrina AI. Signs of immune activation and local inflammation are present in the bronchial tissue of patients with untreated early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(9):1722-1727. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26530319>.
53. Salajegheh M, Pinkus JL, Amato AA, Morehouse C, Jallal B, Yao Y, Greenberg SA. Permissive environment for B-cell maturation in myositis muscle in the absence of B-cell follicles. *Muscle Nerve.* 2010;42(4):576-583. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20740627>.
54. Vu Van D, Beier KC, Pietzke L-J, Al Baz MS, Feist RK, Gurka S, Hamelmann E, Kroczeck RA, Hutloff A. Local T/B cooperation in inflamed tissues is supported by T follicular helper-like cells. *Nat Commun.* 2016;7:10875. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26915335>.
55. Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the

- European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ER. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):736-755.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430755>.
56. Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, Rossman MD, Yeager H, Bresnitz EA, DePalo L, Hunninghake G, Iannuzzi MC, Johns CJ, McLennan G, Moller DR, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Rybicki B, Weinberger SE, Terrin ML, Knatterud GL, Cherniak R, Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS) research group. Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(10 Pt 1):1885-1889.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734441>.
57. Boeck C. Multiple Benign Sarkoid Of The Skin. *Arch Dermatol*. 1982;118(10):710.  
<http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.1982.01650220014003>.
58. James DG, Sharma OP. From Hutchinson to now: a historical glimpse. *Curr Opin Pulm Med*. 2002;8(5):416-423. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12172446>.
59. Pietinalho A, Hiraga Y, Hosoda Y, Löfroos AB, Yamaguchi M, Selroos O. The frequency of sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan. A comparative epidemiological study. *Sarcoidosis*. 1995;12(1):61-67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7617979>.
60. Baughman R, Lower E. Sarcoidosis. In: *Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill; 2012:2805-2813.
61. Song Z, Marzilli L, Greenlee BM, Chen ES, Silver RF, Askin FB, Teirstein AS, Zhang Y, Cotter RJ, Moller DR. Mycobacterial catalase-peroxidase is a tissue antigen and target of the adaptive immune response in systemic sarcoidosis. *J Exp Med*. 2005;201(5):755-767.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753209>.
62. Newman LS, Rose CS, Bresnitz EA, Rossman MD, Barnard J, Frederick M, Terrin ML, Weinberger SE, Moller DR, McLennan G, Hunninghake G, DePalo L, Baughman RP, Iannuzzi MC, Judson MA, Knatterud GL, Thompson BW, Teirstein AS, Yeager H, Johns CJ, Rabin DL, Rybicki BA, Cherniak R, ACCESS Research Group. A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(12):1324-1330. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15347561>.
63. Prezant DJ, Dhala A, Goldstein A, Janus D, Ortiz F, Aldrich TK, Kelly KJ. The incidence, prevalence, and severity of sarcoidosis in New York City firefighters. *Chest*. 1999;116(5):1183-1193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559074>.
64. Barnard J, Rose C, Newman L, Canner M, Martyny J, McCammon C, Bresnitz E, Rossman M, Thompson B, Rybicki B, Weinberger SE, Moller DR, McLennan G, Hunninghake G, DePalo L, Baughman RP, Iannuzzi MC, Judson MA, Knatterud GL, Teirstein AS, Yeager H, Johns CJ, Rabin DL, Cherniak R, ACCESS Research Group. Job and industry classifications associated with sarcoidosis in A Case-Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS). *J Occup Environ Med*. 2005;47(3):226-234. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761318>.
65. Kucera GP, Rybicki BA, Kirkey KL, Coon SW, Major ML, Maliarik MJ, Iannuzzi MC. Occupational risk factors for sarcoidosis in African-American siblings. *Chest*. 2003;123(5):1527-1535. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740270>.
66. Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, Thompson BW, Rossman MD, Bresnitz EA, Terrin ML, Moller DR, Barnard J, Baughman RP, DePalo L, Hunninghake G, Johns C, Judson MA, Knatterud GL, McLennan G, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Teirstein AS, Weinberger SE, Yeager H, Cherniak R, ACCESS Research Group. Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(11):2085-2091. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739139>.
67. Rossman MD, Thompson B, Frederick M, Maliarik M, Iannuzzi MC, Rybicki BA, Pandey JP, Newman LS, Magira E, Beznik-Cizman B, Monos D, ACCESS Group. HLA-DRB1\*1101: a

- significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites. *Am J Hum Genet.* 2003;73(4):720-735. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508706>.
68. Iannuzzi MC, Maliarik MJ, Poisson LM, Rybicki BA. Sarcoidosis susceptibility and resistance HLA-DQB1 alleles in African Americans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(9):1225-1231. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615619>.
69. Hunninghake GW, Crystal RG. Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *N Engl J Med.* 1981;305(8):429-434. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6454846>.
70. Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. Sarcoidosis. *N Engl J Med.* 2007;357(21):2153-2165. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032765>.
71. Kamphuis LS, van Zelm MC, Lam KH, Rimmelzwaan GF, Baarsma GS, Dik WA, Thio HB, van Daele PL, van Velthoven ME, Batstra MR, van Hagen PM, van Laar JA. Perigranuloma localization and abnormal maturation of B cells: emerging key players in sarcoidosis? *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(4):406-416. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239158>.
72. Manzo A, Vitolo B, Humby F, Caporali R, Jarrossay D, Dell'accio F, Ciardelli L, Ugucioni M, Montecucco C, Pitzalis C. Mature antigen-experienced T helper cells synthesize and secrete the B cell chemoattractant CXCL13 in the inflammatory environment of the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* 2008;58(11):3377-3387. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18975336>.
73. Kobayashi S, Murata K, Shibuya H, Morita M, Ishikawa M, Furu M, Ito H, Ito J, Matsuda S, Watanabe T, Yoshitomi H. A distinct human CD4+ T cell subset that secretes CXCL13 in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 2013;65(12):3063-3072. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022618>.
74. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, Donlin LT, Henderson LA, Wei K, Mizoguchi F, Teslovich NC, Weinblatt ME, Massarotti EM, Coblyn JS, Helfgott SM, Lee YC, Todd DJ, Bykerk VP, Goodman SM, Pernis AB, Ivashkiv LB, Karlson EW, Nigrovic PA, Filer A, Buckley CD, Lederer JA, Raychaudhuri S, Brenner MB. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature.* 2017;542(7639):110-114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28150777>.
75. Oxenius A, Bachmann MF, Zinkernagel RM, Hengartner H. Virus-specific MHC-class II-restricted TCR-transgenic mice: effects on humoral and cellular immune responses after viral infection. *Eur J Immunol.* 1998;28(1):390-400. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9485218>.
76. Weinreich MA, Takada K, Skon C, Reiner SL, Jameson SC, Hogquist KA. KLF2 transcription-factor deficiency in T cells results in unrestrained cytokine production and upregulation of bystander chemokine receptors. *Immunity.* 2009;31(1):122-130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19592277>.
77. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest.* 1996;97(9):2063-2073. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621796>.
78. Sonoda E, Pewzner-Jung Y, Schwers S, Taki S, Jung S, Eilat D, Rajewsky K. B cell development under the condition of allelic inclusion. *Immunity.* 1997;6(3):225-233. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9075923>.
79. Zou YR, Takeda S, Rajewsky K. Gene targeting in the Ig kappa locus: efficient generation of lambda chain-expressing B cells, independent of gene rearrangements in Ig kappa. *EMBO J.* 1993;12(3):811-820. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8458339>.
80. Frey O, Meisel J, Hutloff A, Bonhagen K, Bruns L, Kroczeck RA, Morawietz L, Kamradt T. Inducible costimulator (ICOS) blockade inhibits accumulation of polyfunctional T helper 1/T helper 17 cells and mitigates autoimmune arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(8):1495-1501. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498202>.
81. Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Akdis M, Andr a I, Annunziato F, Bacher P, Barnaba V,

- Battistini L, Bauer WM, Baumgart S, Becher B, Beisker W, Berek C, Blanco A, Borsellino G, Boulais PE, Brinkman RR, Büscher M, Busch DH, Bushnell TP, Cao X, Cavani A, Chattopadhyay PK, Cheng Q, Chow S, Clerici M, Cooke A, Cosma A, Cosmi L, Cumano A, Dang VD, Davies D, De Biasi S, Del Zotto G, Della Bella S, Dellabona P, Deniz G, Dessing M, Diefenbach A, Di Santo J, Dieli F, Dolf A, Donnenberg VS, Dörner T, Ehrhardt GRA, Endl E, Engel P, Engelhardt B, Esser C, Everts B, Dreher A, Falk CS, Fehniger TA, Filby A, Fillatreau S, Follo M, Förster I, Foster J, Foulds GA, Frenette PS, Galbraith D, Garbi N, García-Godoy MD, Geginat J, Ghoreschi K, Gibellini L, Goettlinger C, Goodyear CS, Gori A, Grogan J, Gross M, Grützkau A, Grummitt D, Hahn J, Hammer Q, Hauser AE, Haviland DL, Hedley D, Herrera G, Herrmann M, Hiepe F, Holland T, Hombrink P, Houston JP, Hoyer BF, Huang B, Hunter CA, Iannone A, Jäck H-M, Jávega B, Jonjic S, Juelke K, Jung S, Kaiser T, Kalina T, Keller B, Khan S, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*. 2017;47(10):1584-1797. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29023707>.
82. Bishop YM, Fienberg SE, Holland PW. Measures of association and agreement. In: *Discrete Multivariate Analysis Theory and Practice*. New York, NY: Springer New York; 2007:373-400. <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-72806-3>.
83. Feist R. Die Relevanz des induzierbaren Kostimulators ICOS für die Differenzierung und Aufrechterhaltung der folliculären T-Helferzellen in vivo. 2012:30-37.
84. Weber JP, Fuhrmann F, Feist RK, Lahmann A, Al Baz MS, Gentz L-J, Vu Van D, Mages HW, Haftmann C, Riedel R, Grün JR, Schuh W, Kroczeck RA, Radbruch A, Mashreghi M-F, Hutloff A. ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *J Exp Med*. 2015;212(2):217-233. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25646266>.
85. Veerman KM, Williams MJ, Uchimura K, Singer MS, Merzaban JS, Naus S, Carlow DA, Owen P, Rivera-Nieves J, Rosen SD, Ziltener HJ. Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs. *Nat Immunol*. 2007;8(5):532-539. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17401367>.
86. Shiow LR, Rosen DB, Brdicková N, Xu Y, An J, Lanier LL, Cyster JG, Matloubian M. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*. 2006;440(7083):540-544. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16525420>.
87. Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi C-F, Cheng J, Sher A, Morse HC, Liu C, Schwartzberg PL, Leonard WJ. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science*. 2002;298(5598):1630-1634. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446913>.
88. Sakthivel P, Grunewald J, Eklund A, Bruder D, Wahlström J. Pulmonary sarcoidosis is associated with high-level inducible co-stimulator (ICOS) expression on lung regulatory T cells--possible implications for the ICOS/ICOS-ligand axis in disease course and resolution. *Clin Exp Immunol*. 2016;183(2):294-306. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26415669>.
89. Mutz K-O, Heilkenbrinker A, Lönne M, Walter J-G, Stahl F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(1):22-30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23020966>.
90. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, Miyajima A, Yoshimura A. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood*. 1997;89(9):3148-3154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9129017>.
91. Johnston RJ, Choi YS, Diamond JA, Yang JA, Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *J Exp Med*. 2012;209(2):243-250. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271576>.
92. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999;397(6716):263-266. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9930702>.
93. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott

- GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi G. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*. 1999;402(6763):827-832. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617205>.
94. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest*. 1996;97(9):2063-2073. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621796>.
95. Robinson BW, McLemore TL, Crystal RG. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest*. 1985;75(5):1488-1495. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3923038>.
96. Müller-Quernheim J, Saltini C, Sondermeyer P, Crystal RG. Compartmentalized activation of the interleukin 2 gene by lung T lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol*. 1986;137(11):3475-3483. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3491139>.
97. Miedema JR, Kaiser Y, Broos CE, Wijssenbeek MS, Grunewald J, Kool M. Th17-lineage cells in pulmonary sarcoidosis and Löfgren's syndrome: Friend or foe? *J Autoimmun*. 2018;87:82-96. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841117308053>.
98. Fazel SB, Howie SE, Krajewski AS, Lamb D. B lymphocyte accumulations in human pulmonary sarcoidosis. *Thorax*. 1992;47(11):964-967. <http://thorax.bmj.com/cgi/doi/10.1136/thx.47.11.964>.
99. Kehrl JH, Riva A, Wilson GL, Thévenin C. Molecular mechanisms regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression. *Immunol Today*. 1994;15(9):432-436. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167569994902739>.
100. Yeo L, Lom H, Juarez M, Snow M, Buckley CD, Filer A, Raza K, Scheel-Toellner D. Expression of FcRL4 defines a pro-inflammatory, RANKL-producing B cell subset in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(5):928-935. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24431391>.
101. Wehr C, Eibel H, Masilamani M, Illges H, Schlesier M, Peter H-H, Warnatz K. A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. *Clin Immunol*. 2004;113(2):161-171. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15451473>.
102. Ehrhardt GRA, Davis RS, Hsu JT, Leu C-M, Ehrhardt A, Cooper MD. The inhibitory potential of Fc receptor homolog 4 on memory B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13489-13494. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597715>.
103. EBI Gene Expression Atlas. [https://www.ebi.ac.uk/gxa/search?geneQuery=fcRL4&species=&conditionQuery=&bs=%257B%2522homo sapiens%2522%253A%255B%2522ORGANISM\\_PART%2522%255D%252C%2522bos taurus%2522%253A%255B%2522ORGANISM\\_PART%2522%255D%252C%2522chlorocebus sabaues%2522%253A%255B%2522ORGANISM\\_PART%2522%255D%252C%2522gallus gallus%2522%253A%25](https://www.ebi.ac.uk/gxa/search?geneQuery=fcRL4&species=&conditionQuery=&bs=%257B%2522homo sapiens%2522%253A%255B%2522ORGANISM_PART%2522%255D%252C%2522bos taurus%2522%253A%255B%2522ORGANISM_PART%2522%255D%252C%2522chlorocebus sabaues%2522%253A%255B%2522ORGANISM_PART%2522%255D%252C%2522gallus gallus%2522%253A%25). Accessed June 23, 2019.
104. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014;5:520. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368619>.
105. Coquet JM, Schuijs MJ, Smyth MJ, Deswarte K, Beyaert R, Braun H, Boon L, Karlsson Hedestam GB, Nutt SL, Hammad H, Lambrecht BN. Interleukin-21-Producing CD4(+) T Cells Promote Type 2 Immunity to House Dust Mites. *Immunity*. 2015;43(2):318-330. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26287681>.
106. Haskett S, Ding J, Zhang W, Thai A, Cullen P, Xu S, Petersen B, Kuznetsov G, Jandreski L, Hamann S, Reynolds TL, Allaire N, Zheng TS, Mingueneau M. Identification of Novel CD4+ T Cell Subsets in the Target Tissue of Sjögren's Syndrome and Their Differential Regulation by the Lymphotoxin/LIGHT Signaling Axis. *J Immunol*. 2016;197(10):3806-3819. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27815440>.
107. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, Ravoet M, Le Buanec H, Sibille C, Manfouo-Foutsop G, Veys I, Haibe-Kains B, Singhal SK, Michiels S, Rothé F, Salgado R, Duvallier H, Ignatiadis M, Desmedt C, Bron D, Larsimont D, Piccart M, Sotiriou C, Willard-Gallo

- K. CD4<sup>+</sup> follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2873-2892. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778140>.
108. Gu-Trantien C, Migliori E, Buisseret L, de Wind A, Brohée S, Garaud S, Noël G, Dang Chi VL, Lodewyckx J-N, Naveaux C, Duvillier H, Goriely S, Larsimont D, Willard-Gallo K. CXCL13-producing TFH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer. *JCI insight*. 2017;2(11):e91487. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28570278>.
109. McGuire HM, Walters S, Vogelzang A, Lee CMY, Webster KE, Sprent J, Christ D, Grey S, King C. Interleukin-21 is critically required in autoimmune and allogeneic responses to islet tissue in murine models. *Diabetes*. 2011;60(3):867-875. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21357471>.
110. Liarski VM, Kaverina N, Chang A, Brandt D, Yanez D, Talasnik L, Carlesso G, Herbst R, Utset TO, Labno C, Peng Y, Jiang Y, Giger ML, Clark MR. Cell distance mapping identifies functional T follicular helper cells in inflamed human renal tissue. *Sci Transl Med*. 2014;6(230):230ra46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24695686>.
111. Taylor DK, Mittereder N, Kuta E, Delaney T, Burwell T, Dacosta K, Zhao W, Cheng LI, Brown C, Boutrin A, Guo X, White WI, Zhu J, Dong H, Bowen MA, Lin J, Gao C, Yu L, Ramaswamy M, Gaudreau M-C, Woods R, Herbst R, Carlesso G. T follicular helper-like cells contribute to skin fibrosis. *Sci Transl Med*. 2018;10(431):eaaf5307. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29514998>.
112. Miyauchi K, Sugimoto-Ishige A, Harada Y, Adachi Y, Usami Y, Kaji T, Inoue K, Hasegawa H, Watanabe T, Hijikata A, Fukuyama S, Maemura T, Okada-Hatakeyama M, Ohara O, Kawaoka Y, Takahashi Y, Takemori T, Kubo M. Protective neutralizing influenza antibody response in the absence of T follicular helper cells. *Nat Immunol*. 2016;17(12):1447-1458. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27798619>.
113. Kroenke MA, Eto D, Locci M, Cho M, Davidson T, Haddad EK, Crotty S. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *J Immunol*. 2012;188(8):3734-3744. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427637>.
114. Watanabe S, Inoue J. Intracellular Delivery of Lipopolysaccharide Induces Effective Th1-Immune Responses Independent of IL-12. *PLoS One*. 2013.
115. Chen X, Ma W, Zhang T, Wu L, Qi H. Phenotypic Tfh development promoted by CXCR5-controlled re-localization and IL-6 from radiation-resistant cells. *Protein Cell*. 2015;6(11):825-832. <http://link.springer.com/10.1007/s13238-015-0210-0>.
116. Poholek AC, Hansen K, Hernandez SG, Eto D, Chandele A, Weinstein JS, Dong X, Odegard JM, Kaech SM, Dent AL, Crotty S, Craft J. In Vivo Regulation of Bcl6 and T Follicular Helper Cell Development. *J Immunol*. 2010;185(1):313-326. <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0904023>.
117. Kitano M, Moriyama S, Ando Y, Hikida M, Mori Y, Kurosaki T, Okada T. Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. *Immunity*. 2011;34(6):961-972. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761311001956>.
118. Morgan AJ, Guillen C, Symon FA, Huynh TT, Berry MA, Entwisle JJ, Briskin M, Pavord ID, Wardlaw AJ. Expression of CXCR6 and its ligand CXCL16 in the lung in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(12):1572-1580. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16393323>.
119. Suzaki Y, Hamada K, Nomi T, Ito T, Sho M, Kai Y, Nakajima Y, Kimura H. A small-molecule compound targeting CCR5 and CXCR3 prevents airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J*. 2008;31(4):783-789. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18094012>.
120. Milger K, Yu Y, Brudy E, Irmeler M, Skapenko A, Mayinger M, Lehmann M, Beckers J, Reichenberger F, Behr J, Eickelberg O, Königshoff M, Krauss-Etschmann S. Pulmonary CCR2+CD4+ T cells are immune regulatory and attenuate lung fibrosis development. *Thorax*. 2017;72(11):1007-1020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28780502>.

121. Patel DD, Zachariah JP, Whichard LP. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clin Immunol.* 2001;98(1):39-45.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11141325>.
122. Braun NA, Celada LJ, Herazo-Maya JD, Abraham S, Shaginurova G, Sevin CM, Grutters J, Culver DA, Dworski R, Sheller J, Massion PP, Polosukhin V V., Johnson JE, Kaminski N, Wilkes DS, Oswald-Richter KA, Drake WP. Blockade of the programmed death-1 pathway restores sarcoidosis CD4(+) T-cell proliferative capacity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(5):560-571. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25073001>.
123. Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, Goodman SM, Tabechian D, Hughes LB, Salomon-Escoto K, Watts GFM, Jonsson AH, Rangel-Moreno J, Meednu N, Rozo C, Apruzzese W, Eisenhaure TM, Lieb DJ, Boyle DL, Mandelin AM, Boyce BF, DiCarlo E, Gravallesse EM, Gregersen PK, Moreland L, Firestein GS, Hacohen N, Nusbaum C, Lederer JA, Perlman H, Pitzalis C, Filer A, Holers VM, Bykerk VP, Donlin LT, Anolik JH, Brenner MB, Raychaudhuri S. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol.* 2019;20(7):928-942. <http://www.nature.com/articles/s41590-019-0378-1>.
124. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):486-499. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26205583>.
125. Kamphorst AO, Ahmed R. Manipulating the PD-1 pathway to improve immunity. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(3):381-388.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791513000393>.
126. Oswald-Richter KA, Richmond BW, Braun NA, Isom J, Abraham S, Taylor TR, Drake JM, Culver DA, Wilkes DS, Drake WP. Reversal of global CD4+ subset dysfunction is associated with spontaneous clinical resolution of pulmonary sarcoidosis. *J Immunol.* 2013;190(11):5446-5453. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23630356>.
127. Palmer BE, Mack DG, Martin AK, Gillespie M, Mroz MM, Maier LA, Fontenot AP. Up-regulation of programmed death-1 expression on beryllium-specific CD4+ T cells in chronic beryllium disease. *J Immunol.* 2008;180(4):2704-2712.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250483>.
128. Lüthje K, Kallies A, Shimohakamada Y, Belz GT, Light A, Tarlinton DM, Nutt SL. The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nat Immunol.* 2012;13(5):491-498. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22466669>.
129. Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR, King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity.* 2008;29(1):127-137.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18602282>.
130. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim H-P, Wang G, Qi C-F, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC, Lipsky PE, Leonard WJ. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol.* 2004;173(9):5361-5371. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494482>.
131. Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R, Tangye SG. IL-21-Induced Isotype Switching to IgG and IgA by Human Naive B Cells Is Differentially Regulated by IL-4. *J Immunol.* 2008;181(3):1767-1779.  
<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.181.3.1767>.
132. Rasheed MAU, Latner DR, Aubert RD, Gourley T, Spolski R, Davis CW, Langley WA, Ha S-J, Ye L, Sarkar S, Kalia V, Konieczny BT, Leonard WJ, Ahmed R. Interleukin-21 is a critical cytokine for the generation of virus-specific long-lived plasma cells. *J Virol.* 2013;87(13):7737-7746.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637417>.
133. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang Y, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity.* 2008;29(1):138-149.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761308002732>.

134. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, Verma NK, Smyth MJ, Rigby RJ, Vinuesa CG. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med*. 2010;207(2):353-363. <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20091738>.
135. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, Corcoran LM, Godfrey DI, Toellner K-M, Smyth MJ, Nutt SL, Tarlinton DM. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell–intrinsic mechanism. *J Exp Med*. 2010;207(2):365-378. <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20091777>.
136. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 2007;448(7152):480-483. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17581589>.
137. Sarra M, Monteleone I, Stolfi C, Fantini MC, Sileri P, Sica G, Tersigni R, Macdonald TT, Pallone F, Monteleone G. Interferon-gamma-expressing cells are a major source of interleukin-21 in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(8):1332-1339. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20186935>.
138. King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell*. 2004;117(2):265-277. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084263>.
139. Liu J, Cen H, Ni J, Zhang M, Li P, Yang X-K, Leng R-X, Pan H-F, Ye D-Q. Association of IL-21 polymorphisms (rs907715, rs2221903) with susceptibility to multiple autoimmune diseases: a meta-analysis. *Autoimmunity*. 2015;48(2):108-116. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25074442>.
140. Bubier JA, Sproule TJ, Foreman O, Spolski R, Shaffer DJ, Morse HC, Leonard WJ, Roopenian DC. A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSb-Yaa mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(5):1518-1523. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164519>.
141. Spolski R, Kashyap M, Robinson C, Yu Z, Leonard WJ. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(37):14028-14033. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779574>.
142. Sutherland APR, Van Belle T, Wurster AL, Suto A, Michaud M, Zhang D, Grusby MJ, von Herrath M. Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2009;58(5):1144-1155. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208913>.
143. Chevalier N, Thorburn AN, Macia L, Tan J, Juglair L, Yagita H, Yu D, Hansbro PM, Mackay CR. Inflammation and lymphopenia trigger autoimmunity by suppression of IL-2-controlled regulatory T cell and increase of IL-21-mediated effector T cell expansion. *J Immunol*. 2014;193(10):4845-4858. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339665>.
144. Ma CS, Suryani S, Avery DT, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B, Deenick EK, Tangye SG. Early commitment of naïve human CD4(+) T cells to the T follicular helper (T(FH)) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(8):590-600. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19721453>.
145. Fina D, Sarra M, Fantini MC, Rizzo A, Caruso R, Caprioli F, Stolfi C, Cardolini I, Dottori M, Boirivant M, Pallone F, MacDonald TT, Monteleone G. Regulation of Gut Inflammation and Th17 Cell Response by Interleukin-21. *Gastroenterology*. 2008;134(4):1038-1048.e2. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508508001157>.
146. Ryu J-G, Lee J, Kim E-K, Seo H-B, Park J-S, Lee S-Y, Moon Y-M, Yoo S-H, Park Y, Park S-H, Cho M-L, Kim H-Y. Treatment of IL-21R-Fc control autoimmune arthritis via suppression of STAT3 signal pathway mediated regulation of the Th17/Treg balance and plasma B cells. *Immunol Lett*. 2015;163(2):143-150. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447400>.
147. Young DA, Hegen M, Ma HLM, Whitters MJ, Albert LM, Lowe L, Senices M, Wu PW, Sibley B, Leathurby Y, Brown TP, Nickerson-Nutter C, Keith JC, Collins M. Blockade of the interleukin-

- 21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(4):1152-1163.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17393408>.
148. Herber D, Brown TP, Liang S, Young DA, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K. IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J Immunol.* 2007;178(6):3822-3830.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339481>.
149. A Randomised, Double-blind, Placebo-controlled, Parallel-group Trial to Assess Clinical Efficacy of NNC0114-0006 in Subjects With Active Rheumatoid Arthritis.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01647451>. Accessed June 23, 2019.
150. An Investigation of Safety and Tolerability of NNC0114-0006 in Subjects With Systemic Lupus Erythematosus (SLE). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01689025>. Accessed June 23, 2019.
151. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, Browning JL, Lipp M, Cyster JG. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature.* 2000;406(6793):309-314. <http://www.nature.com/articles/35018581>.
152. Van D, Bauer L, Kroczeck RA, Hutloff A. ICOS Costimulation differentially affects T cells in secondary lymphoid organs and inflamed tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018:437-447.
153. Lahmann A. Maintenance of T follicular helper cells in the last phases of the germinal center reaction. 2018:51-56.
154. Cicalese MP, Gerosa J, Baronio M, Montin D, Licciardi F, Soresina A, Dellepiane RM, Miano M, Baselli LA, Volpi S, Dufour C, Plebani A, Aiuti A, Lougaris V, Fousteri G. Circulating Follicular Helper and Follicular Regulatory T Cells Are Severely Compromised in Human CD40 Deficiency: A Case Report. *Front Immunol.* 2018;9:1761.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30131802>.
155. Kimura K, Tsuda H, Kwangseok Y, Tamura N, Kanai Y, Kobayashi S. Study of plasma levels of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus patients who have undergone plasmapheresis. *Ther Apher Dial.* 2005;9(1):64-68.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15828909>.
156. Vakkalanka RK, Woo C, Kirou KA, Koshy M, Berger D, Crow MK. Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheum.* 1999;42(5):871-881. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10323442>.
157. Komura K, Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Elevated circulating CD40L concentrations in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2004;31(3):514-519.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14994397>.
158. Ludwiczek O, Kaser A, Tilg H. Plasma levels of soluble CD40 ligand are elevated in inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18(2):142-147.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12548417>.
159. Prahalad S, Martins TB, Tebo AE, Whiting A, Clifford B, Zeff AS, McNally B, Bohnsack JF, Hill HR. Elevated serum levels of soluble CD154 in children with juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2008;6:8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18507862>.
160. Callard RE, Armitage RJ, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today.* 1993;14(11):559-564.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506037>.
161. Frensch M, Stark R, Matzmohr N, Meier S, Durlanik S, Schulz AR, Stervbo U, Jurchott K, Gebhardt F, Heine G, Reuter MA, Betts MR, Busch D, Thiel A. CD40L expression permits CD8+ T cells to execute immunologic helper functions. *Blood.* 2013;122(3):405-412.  
<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-02-483586>.
162. Ferrer IR, Liu D, Pinelli DF, Koehn BH, Stempora LL, Ford ML. CD40/CD154 blockade inhibits dendritic cell expression of inflammatory cytokines but not costimulatory molecules. *J Immunol.* 2012;189(9):4387-4395. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002440>.

163. Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. The CD40-CD40L axis and IFN- $\gamma$  play critical roles in Langhans giant cell formation. *Int Immunol*. 2012;24(1):5-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22058328>.
164. Boumpas DT, Furie R, Manzi S, Illei GG, Wallace DJ, Balow JE, Vaishnaw A, BG9588 Lupus Nephritis Trial Group. A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(3):719-727. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12632425>.
165. Hänninen A, Martinez NR, Davey GM, Heath WR, Harrison LC. Transient blockade of CD40 ligand dissociates pathogenic from protective mucosal immunity. *J Clin Invest*. 2002;109(2):261-267. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11805138>.
166. Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)/CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med*. 2001;193(11):1311-1318. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390438>.
167. Kawai, Andrews, Colvin, Sachs, Cosimi. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med*. 2000;6(2):114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655073>.
168. Shock A, Burkly L, Wakefield I, Peters C, Garber E, Ferrant J, Taylor FR, Su L, Hsu Y-M, Hutto D, Amirkhosravi A, Meyer T, Francis J, Malcolm S, Robinson M, Brown D, Shaw S, Foulkes R, Lawson A, Harari O, Bourne T, Maloney A, Weir N. CDP7657, an anti-CD40L antibody lacking an Fc domain, inhibits CD40L-dependent immune responses without thrombotic complications: an in vivo study. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:234. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26335795>.
169. Xie JH, Yamniuk AP, Borowski V, Kuhn R, Susulic V, Rex-Rabe S, Yang X, Zhou X, Zhang Y, Gillooly K, Brosius R, Ravishankar R, Waggie K, Mink K, Price L, Rehfuss R, Tamura J, An Y, Cheng L, Abramczyk B, Ignatovich O, Drew P, Grant S, Bryson JW, Suchard S, Salter-Cid L, Nadler S, Suri A. Engineering of a novel anti-CD40L domain antibody for treatment of autoimmune diseases. *J Immunol*. 2014;192(9):4083-4092. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670803>.
170. Goldwater R, Keirns J, Blahunka P, First R, Sawamoto T, Zhang W, Kowalski D, Kaibara A, Holman J. A phase 1, randomized ascending single-dose study of antagonist anti-human CD40 ASKP1240 in healthy subjects. *Am J Transplant*. 2013;13(4):1040-1046. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23356210>.
171. Tocoian A, Buchan P, Kirby H, Soranson J, Zamacona M, Walley R, Mitchell N, Esfandiari E, Wagner F, Oliver R. First-in-human trial of the safety, pharmacokinetics and immunogenicity of a PEGylated anti-CD40L antibody fragment (CDP7657) in healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2015;24(10):1045-1056. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25784719>.
172. Chamberlain C, Colman PJ, Ranger AM, Burkly LC, Johnston GI, Otoul C, Stach C, Zamacona M, Dörner T, Urowitz M, Hiepe F. Repeated administration of dapirolizumab pegol in a randomised phase I study is well tolerated and accompanied by improvements in several composite measures of systemic lupus erythematosus disease activity and changes in whole blood transcriptomic profile. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(11):1837-1844. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28780512>.
173. Salomonsson S, Jonsson M V, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmström P, Wahren-Herlenius M, Jonsson R. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2003;48(11):3187-3201. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613282>.
174. Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, Foerster C, Hoenig M, Driessen G, van der Burg M, van Dongen JJ, Wiech E, Visentini M, Quinti I, Prasse A, Voelken N, Salzer U, Goldacker S, Fisch P, Eibel H, Schwarz K, Peter H-H, Warnatz K. Circulating CD21low B cells in common

- variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13451-13456. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666505>.
175. Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, Ronchi F, Ansel KM, Lanzavecchia A, Sallusto F. Persistent Antigen and Germinal Center B Cells Sustain T Follicular Helper Cell Responses and Phenotype. *Immunity*. 2013;38(3):596-605. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761313000988>.
176. Sweiss NJ, Lower EE, Mirsaeidi M, Dudek S, Garcia JGN, Perkins D, Finn PW, Baughman RP. Rituximab in the treatment of refractory pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J*. 2014;43(5):1525-1528. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24488568>.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich, Lisa Jasmin Müller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktionelle Korrelate Follikulärer T-Helferzellen in der Lunge von Sarkoidose-Patienten und in einem murinen Atemwegs-Inflamationsmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (siehe oben) 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

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

### Kongressbeiträge

Laura Bauer, Annette Lahmann, Lisa Jasmin Müller, Dana Vu Van, Andreas Hutloff. T follicular helper (like) memory cells in lymphoid versus non-lymphoid organs have unique properties. Poster, Germinal Center Conference, Venedig, 14.-17.09.2017.

Laura Bauer, Lisa Jasmin Müller, Dana Vu Van, Andreas Hutloff. T follicular helper (like) memory cells in lymphoid versus non-lymphoid organs confer systemic and local protection. Poster, 16th DGfI B Cell Forum, Masserberg, 12.-14.04.2018.

Laura Bauer, Lisa Jasmin Müller, Dana Vu Van, Andreas Hutloff. T follicular helper (like) memory cells in lymphoid versus non-lymphoid organs confer systemic and local protection. Poster, Keystone Symposium "B Cells: Mechanisms in Immunity and Autoimmunity", Dresden, 17.-21.06.2018.

Laura Bauer, Lisa Jasmin Müller, Andreas Hutloff. T follicular helper (-like) memory cells in lung tissue. Poster, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), München, 10.-13.09.2019

### Publikationen

Daten bislang unpubliziert. Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit befindet sich die Publikation zu Teilen dieser Dissertation mit dem Titel „Lung-infiltrating T cells in sarcoidosis exhibit follicular helper-like properties“ noch in Bearbeitung.

## **Danksagung**

Meine Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.