

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR IMMUNOLOGIE  
Institutsleitung: Prof. Dr. Daniela Männel  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

# **Wege zur Th17-Zelldifferenzierung in vitro**

## Pathways to Th17-T-Cell Differentiation in vitro

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Julia Miriam Hiller**

**2012**



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR IMMUNOLOGIE  
Institutsleitung: Prof. Dr. Daniela Männel  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

# **Wege zur Th17-Zelldifferenzierung in vitro**

## Pathways to Th17-T-Cell Differentiation in vitro

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Julia Miriam Hiller**

**2012**

Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum von August 2008 bis März 2012 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Daniela Männel und Dr. Anja Lechner des Instituts für Immunologie der Universität Regensburg.

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1.Berichterstatter:	Prof. Dr. Daniela Männel
2.Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Salzberger
Tag der mündlichen Prüfung:	16.November 2012

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Langenau, den.....

.....

Julia Hiller

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung.....	9
1.1	Organisation des Immunsystems .....	9
1.2	Das angeborene Immunsystem, die frühe Phase der Immunreaktion .....	10
1.2.1	Zellen des angeborenen Immunsystems .....	10
1.2.2	Das Prinzip der Mustererkennung.....	10
1.2.3	MyD88-abhängiger und MyD88-unabhängiger Signalweg.....	13
1.2.4	TLR auf T-Zellen .....	15
1.3	T-Zelldifferenzierung im Rahmen des spezifischen Immunsystems .....	15
1.3.1	Th-Zell-Subtypen .....	16
1.3.2	Zytokine zur Differenzierung von Th17-Zellen .....	17
1.3.2.1	Die positive Regulation der Th17-Immunantwort.....	18
1.3.2.2	Die negative Regulation der Th17-Immunantwort .....	19
1.3.2.3	Einfluss von Erregern und deren Metaboliten .....	
	auf die Th17-Immunantwort.....	19
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Versuchstiere .....	21
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien .....	21
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	22
2.1.4	Kits.....	22
2.1.5	Enzyme .....	22
2.1.6	Antikörper/Konjugate .....	23
2.1.7	Oligonukleotide .....	23
2.1.8	Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	24
2.2	Methoden .....	25
2.2.1	Isolation von Lymphknotenzellen .....	25

2.2.2	Bestimmung der Lebend-Zellzahl .....	25
2.2.3	In vitro-Zellkultur .....	25
2.2.4	Durchflusszytometrie .....	26
2.2.5	Intrazelluläre Färbungen .....	27
2.2.6	RNA-Präparation.....	27
2.2.7	Herstellung von cDNA.....	28
2.2.8	Qualitative PCR (Polymerase Chain Reaction).....	29
2.2.9	Agarose Gelelektrophorese .....	30
2.2.10	Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR).....	30
2.2.11	Mathematische Grundlagen zur relativen Quantifizierung .....	31
2.2.12	Multiplex Zytokin Analyse .....	32
3	Ergebnisse .....	33
3.1	Die Rolle von IL-7 und IL-2.....	33
3.1.1	Messungen der Zytokinproduktion nach in vitro-Stimulation .....	
	mit IL-7 und IL-2.....	33
3.1.2	Induktion von IL-17-Produktion in CD4-positiven Zellen .....	35
3.1.2.1	Die Rolle von IL-7 und IL-2.....	35
3.1.2.2	Stimulation mit LPS .....	38
3.1.3	Induktion von IL-17-Produktion in CD4-negativen Zellen.....	40
3.1.3.1	Rolle von IL-7 und IL-2 .....	40
3.1.3.2	Stimulation mit LPS .....	42
3.1.4	Zytokinproduktion CD4-positiver und CD4-negative .....	
	Zellen im Überblick .....	44
3.2	Induktion der IL-17-Expression durch Stimulation mit .....	
	den TLR-Liganden LPS, Zymosan und Pam3Cys .....	48
4	Diskussion .....	51
4.1	Die Auswirkung von IL-7 auf die Th17-Antwort .....	51
4.2	IL-2 .....	53

---

4.3	Stimulation von IL-17-Produktion durch TLR.....	54
4.4	Induktion der IL-17-Produktion im Verlauf einer Infektion und ..... während einer chronischen Entzündung .....	56
4.5	Implikation dieser Arbeit für Therapieansätze .....	58
5	Zusammenfassung.....	60
6	Abbildungsverzeichnis.....	62
7	Tabellenverzeichnis.....	62
8	Abkürzungsverzeichnis.....	63
9	Literaturverzeichnis .....	65
10	Danksagung .....	74



## 1 Einleitung

### 1.1 Organisation des Immunsystems

Unser Immunsystem ist tagtäglich infektiösen Organismen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten ausgesetzt und versucht diese zu bekämpfen, bevor es zu einer Ausbreitung im Organismus, und somit zu einer Gewebeschädigung kommen kann.

Bereits einfache Organismen, wie Insekten oder Würmer, besitzen ein sogenanntes unspezifisches oder auch angeborenes Immunsystem, das in der Evolution schon sehr früh entstanden ist, und bis heute eine wichtige Säule im komplexen System der Erregerbekämpfung bildet. Des Weiteren haben die höher entwickelten Wirbeltiere zusätzlich zum unspezifischen Immunsystem im Laufe ihrer Phylogenese ein sogenanntes spezifisches (adaptives) Immunsystem entwickelt.

Während die unspezifische Immunantwort nach dem Eindringen eines Erregers sofort abläuft, benötigt die adaptive Antwort längere Zeit bis deren Zellen hinreichend aktiviert sind. Die Zellen des adaptiven Immunsystems, T- und B-Zellen, sind dann allerdings in der Lage Pathogene über ihre Antigenrezeptoren spezifisch zu erkennen und verfügen außerdem über die Fähigkeit gewonnene Information über die Struktur des Antigens in einem Langzeitgedächtnis zu speichern, um bei einer weiteren Infektion sofort darauf reagieren zu können (Murphy et al. 2008).

Wurde ein Pathogen erfolgreich bekämpft, ist es wichtig, dass regulatorische Vorgänge im Körper stattfinden, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern. Denn ungebremst proliferierende Immunzellen können schwere Schäden anrichten und zu chronischen Entzündungsvorgängen führen. Im Rahmen von Autoimmunkrankheiten wie z.B. Multipler Sklerose oder Rheumatoider Arthritis sind Zellen des adaptiven Immunsystems dauerhaft aktiviert und erkennen sogar körpereigenes Gewebe als fremd (Martens et al. 1997), (Markovic-Plese et al. 2001). Ein wichtiger Therapieansatz solcher Krankheiten scheint deshalb darin zu liegen, so spezifisch wie möglich in die Regulation dieser ungebremsten Zellaktivierung einzugreifen, ohne andere wichtige Teile der Erregerbekämpfung zu beeinträchtigen.

## 1.2 Das angeborene Immunsystem, die frühe Phase der Immunreaktion

Das angeborene Immunsystem besteht sowohl aus humoralen (z.B. dem C-reaktiven Protein CRP oder dem Komplementsystem), als auch aus zellulären Bestandteilen, wobei beiden Komponenten eine wichtige Vermittlerrolle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem einnehmen (Murphy et al. 2008).

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sollen in den nun folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

### 1.2.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Den zellulären Anteil der angeborenen Immunität bilden die natürlichen Killerzellen, Makrophagen, Granulozyten und Dendritische Zellen. Während eosinophile und basophile Granulozyten für die Abwehr von Parasiten zuständig sind, sind neutrophile Granulozyten v.a. für die Bekämpfung bakterieller Erreger essenziell. Dies erfolgt durch Phagozytose und anschließenden enzymatischen Abbau der Erreger mit Hilfe von bakteriziden Enzymen, die in den Granula der neutrophilen Granulozyten enthalten sind.

Auch Makrophagen wirken auf ähnliche Art und Weise. Sie bilden zusammen mit den Dendritischen Zellen die wichtigen Bindeglieder zur spezifischen Immunantwort, weil sie Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren und T-Zellen dadurch aktivieren können (siehe 1.3). Für die Beseitigung von Tumorzellen und virusbefallenen Zellen gibt es die Klasse der Natürlichen Killerzellen. Sie induzieren deren programmierten Zelltod (Apoptose) oder zerstören betroffene Zellen durch zytotoxische Granula.

### 1.2.2 Das Prinzip der Mustererkennung

Den Namen „unspezifisch“ trägt das angeborene Immunsystem wohl zu Unrecht, da man heute weiß, dass seine zellulären Bestandteile in der Lage sind repetitive Erregerstrukturen, die sogenannten *pathogen-associated-molecular-patterns* (PAMP), über ihre *pattern-recognition-receptors* (PRR) als körperfremd zu erkennen (Pasare, Medzhitov 2004). PAMP sind konservierte Strukturen von Mikroorganismen oder deren Metabolismus wie z.B. die Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien oder die Peptidoglykane grampositiver Bakterien (Armant, Fenton 2002).

Zur Gruppe der PRR gehören auch die Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Da sie für die Erkennung von Pathogenen eine wichtige Rolle spielen, werden sie von vielen Zellen exprimiert, die an der frühen Phase einer Immunantwort beteiligt sind. Dazu gehören

z.B. Phagozyten und Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen.

Die Aktivierung von TLR führt durch eine intrazellulären Signalkaskade nicht nur zum Ausschütten proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Interferone, sondern auch zur Hochregulierung von *major histocompatibility complex* (MHC) Molekülen und kostimulatorischen Molekülen wie CD80/CD86, die für eine hinreichende T-Zellaktivierung notwendig sind (Banchereau, Steinman 1998). Damit setzen sie sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem in Alarmbereitschaft und stellen so eine Verbindung zwischen den beiden Armen des Immunsystems her.

Bis heute wurden 11 humane und 13 murine TLR identifiziert, wobei die einzelnen Rezeptoren für bestimmte PAMP spezifisch sind (Kawai, Akira 2007). Da es transmembranäre und intrazellulär gelegene TLR gibt, unterscheidet man zwei Gruppen.

Zum Typ der transmembranären gehören TLR1, 2, 4 und 6. Sie sind durch extrazelluläre *leucin rich repeats* (LRR) und eine cytoplasmatischen Domäne gekennzeichnet. Die cytoplasmatischen Domäne ist homolog zur der des Interleukin-1 (IL-1) Rezeptors aufgebaut und trägt daher den Namen Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne (Li et al. 2009). Zur zweiten Gruppe gehören TLR3, 7, 8 und 9. Sie befinden sich intrazellulär, z.B. auf Endosomen und erkennen bakterielle oder virale Nukleinsäuren (Akira et al. 2006).

Die wichtigsten Mitglieder der TLR Familie und ihre Liganden sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

TLR	Ligand	Herkunft
TLR1	Tri-Acyl Lipopeptide	Bakterien, Mykobakterien
	Lösliche Bestandteile	Neisseria meningitidis
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide	Verschiedene Pathogene
	Peptidoglykan	Gram-positive Bakterien
	Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien
	Lipoarabinomannan	Mykobakterien
	Phenol lösliches Modulin	Staphylococcus epidermidis
	Glykoinositolphospholipide	Trypanosoma cruzi
	Glykolipide	Treponema maltophilum
	Porine	Neisserien
	Zymosan	Pilze
	Atypisches Lipopolysaccharid (LPS)	Leptospira interrogans
	Atypisches LPS	Porphyromonas gingivalis
	heat shock protein 70 (HSP70)	Wirt
TLR3	Doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien
	Taxol	Pflanzen
	Fusionsprotein	Respiratorisches-Syncytial-Virus
	Hüllproteine	Murines-Mamma-Tumor-Virus
	HSP60	Chlamydia pneumoniae
	HSP60	Wirt
	HSP70	Wirt
	TypIII Repeat der Extra Domäne A von Fibronektin	Wirt
	Oligosaccharide von Hyaluronsäure	Wirt
	Polysaccharide, Fragmente von Heparansulfat	Wirt
TLR5	Fibrinogen	Wirt
	Flagellin	Bakterien
TLR6	Di-acyl Lipopeptide	Mykoplasmen
	Zymosan	Pilze
	Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien
TLR7	Imidazoquinoline	Synthetische Verbindung
	Loxoribine	Synthetische Verbindung
	Bropirimine	Synthetische Verbindung
	Einsträngige RNA	Viren
TLR8	Imidazoquinoline	Synthetische Verbindung
	Einsträngige RNA	Viren
TLR9	CpG DNA	Bakterien
TLR10	Bisher nicht bestimmt	

Tab.1 Tabelle der TLR-Liganden, modifiziert nach Akira, Takeda 2004, Takeda et al. 2003

Die Aktivierung der TLR löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die über verschiedene cytoplasmatische Adaptorproteine in Gang gesetzt werden kann. Über mehrere Stufen von Proteinkinasen kommt es am Ende der Signalkette zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) und Interferon regulatorischen Faktoren (IRF).

Zwei Signalwege sind dabei von besonderer Bedeutung: zum einen der Weg über das Adaptorprotein *myeloid-differentiation-antigen 88* (MyD88) und der MyD88-unabhängige Weg über das *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN $\beta$*  (TRIF) (O'Neill, Bowie 2007).

### 1.2.3 MyD88-abhängiger und MyD88-unabhängiger Signalweg

MyD88 ist ein wichtiges Adapterprotein, weil es außer von TLR3 von allen TLR zur Signalweiterleitung in die Zelle benötigt wird.

Die Aktivierung von MyD88 führt zur Bindung der *IL-1 receptor-associated kinase 1* (IRAK1), die in gebundener Form von IRAK4 phosphoryliert wird und dann mit *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6) einen Komplex bildet (Li et al. 2002). TRAF6 ist eine E3 Ubiquitin Ligase, die mit der *TGF $\beta$ -activated Kinase 1* (TAK1) und weiteren Enzymen interagiert, was letztendlich zur Aktivierung von TAK1 führt. Die aktivierte TAK1 phosphoryliert den sog. *inhibitor of  $\kappa$ B komplex* (IKK). Dadurch kommt es zur Degradierung von *inhibitor of  $\kappa$ B* (I $\kappa$ B) und somit zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in den Zellkern (Takeda, Akira 2004). Auch Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) werden durch den TAK1-TRAF6 Komplex aktiviert. Sie führen zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors *activating-protein-1* (AP-1) (Karin 1995).

MyD88 defiziente Mäuse können auf Liganden von TLR2, 5, 7, 8 und 9 nicht adäquat reagieren. Eine Signalkaskade ausgehend von TLR4 ist dagegen nur teilweise eingeschränkt (Kawai et al. 1999a), weshalb man zu der Erkenntnis kam, dass auch ein MyD88-unabhängiger Weg existieren muss, der über ein anderes Adaptorprotein abläuft. Kawai et al. zeigten 1999, dass es bei MyD88-defizienten Mäusen zwar zu einer verzögerten Kinetik kommt, aber durchaus Aktivierungsvorgänge stattfinden, die ebenfalls NF $\kappa$ B-abhängige Genexpression induzieren (Kawai et al. 1999b). Eines dieser alternativen Adapterproteine ist TRIF, das vor allem für TLR3 und TLR4 eine große Rolle spielt (Hoebe et al. 2003). TRIF interagiert mit der *tank-binding-kinase-1* (TBK1) und der *I $\kappa$ B-kinase-i* (IKKi), wodurch es zur Phosphorylierung von IRF3

kommt (Akira, Takeda 2004). Phosphorylierte IRF3-Moleküle bilden Dimere und induzieren im Zellkern die Expression von Typ1 Interferonen ( $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IFN}\beta$ ) und Interferon-induzierenden-Genen (Yamamoto et al. 2003). TRIF aktiviert aber auch einen *TRAF6-receptor-interacting-protein-1* (RIP1) Komplex, wodurch ebenso wie beim MyD88-abhängigen Weg, NF $\kappa$ B aktiviert wird.

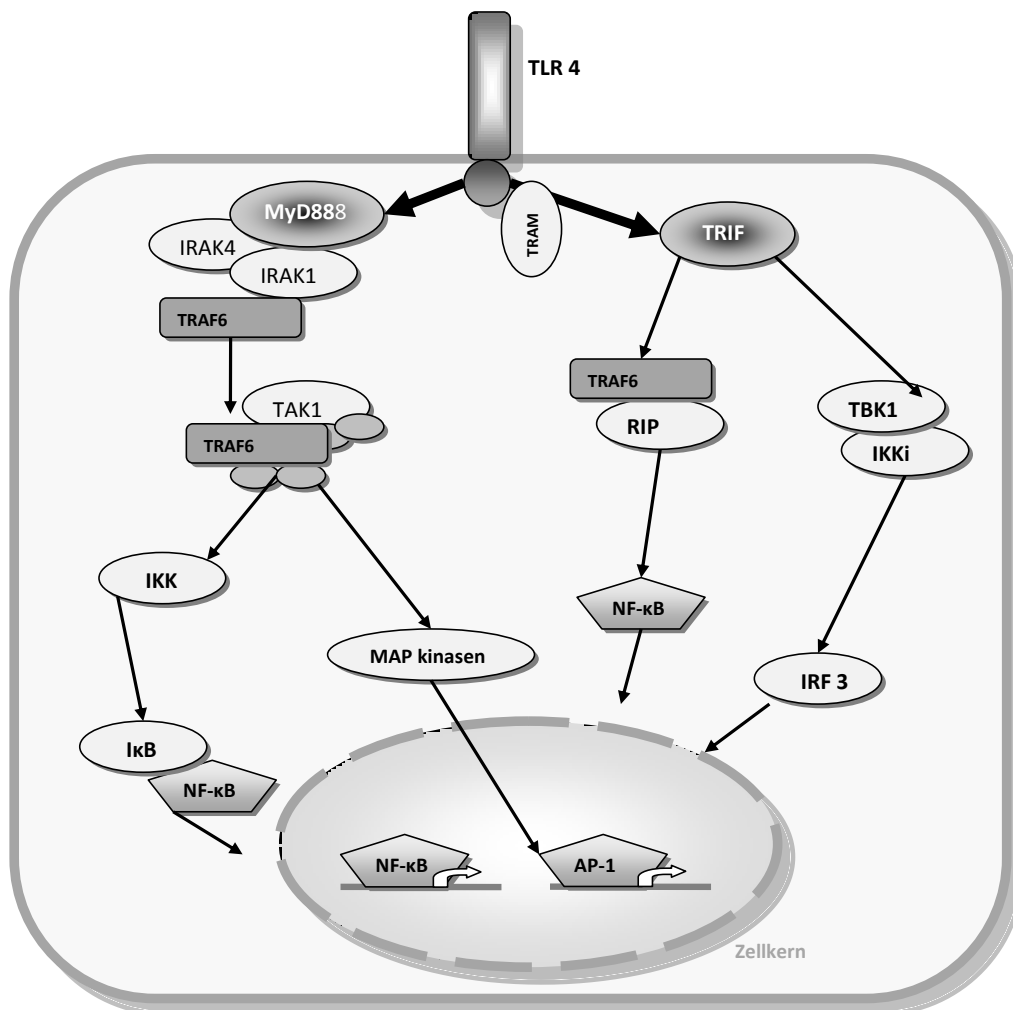


Abb.1 MyD88-abhängiger und MyD88-unabhängiger TLR-Signalweg, modifiziert nach Takeda, Akira 2004

### 1.2.4 TLR auf T-Zellen

Neben Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren auch T-Zellen bestimmte TLR (Liu, Zhao 2007), (Caramalho et al. 2003). Funktionell scheint ihnen dabei eine kostimulatorische Rolle zuzukommen, wodurch sie auf das adaptive Immunsystem Einfluss nehmen (Cottalorda et al. 2009).

Johann Pötzl testete im Rahmen seiner Dissertation sortierte Th-Zellen auf ihre Expression von TLR und konnte TLR 6 ausschließlich auf Th17-Zellen nachweisen. TLR6 dient v.a. der Erkennung gram-positiven und gram-negativen Bakterien, aber auch Pilzbestandteilen. Von funktionellen Eigenschaften dieses TLR6 auf Th17-Zellen, z.B. als costimulatorische Komponente oder direkte Stimulationsmöglichkeit wurde bisher nicht berichtet.

	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR9
Th17 Zellen (Fraktion 1)	+	-	-	-	-	+	-	-
T <sub>eff</sub> Zellen (Fraktion 2)	+	-	-	-	-	-	-	-
naive Zellen (Fraktion 3)	+	+	-	+	-	-	-	+
aktivierte Zellen (Fraktion 4)	+	-	-	+	-	-	-	+

**Tab.2 Expression von TLR auf sortierten Th-Zellen (Pötzl November 2008)**

### 1.3 T-Zelldifferenzierung im Rahmen des spezifischen Immunsystems

Die Signalkette über TLR ist für die Initiierung einer Immunantwort wichtig. Durch sie kommt es zur Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die wiederum die spezifische Immunantwort einleiten können. Dabei werden verschiedene Subtypen von T-Zellen aktiviert, die jeweils verschiedenen Aufgaben nachgehen: CD4-positive, T-Helfer (Th)-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit eine wesentliche Rolle spielen, haben eine wichtige Koordinationsfunktion, weil sie weitere Zellen aktivieren, wie z.B. Makrophagen oder B-Zellen.

CD8-positive, sog. zytotoxische T-Zellen, erkennen Antigene, die von viral infizierten Zellen oder Tumorzellen präsentiert werden. Sie setzen Perforine und Proteasen zur Lyse der befallenen Zelle frei und induzieren in ihnen Apoptose.

Um die Intensität einer Immunantwort zu kontrollieren und autoimmune Prozesse zu verhindern gibt es T-regulatorische Zellen (Treg), die durch TGFβ über den

Transkriptionsfaktor Foxp3 induziert werden. Über Zytokine wie IL-10 und TGF $\beta$  hemmen sie die Ausbildung chronischer Entzündungsvorgänge und können außerdem über direkten Zell-Zell-Kontakt die Proliferation anderer Leukozyten inhibieren (Suri-Payer et al. 1998), (Levings et al. 2005).

Nach einer abgelaufenen Immunantwort verbleiben Gedächtniszellen im Blut, die weiter im Organismus zirkulieren und bei einer Reinfektion schnell zu einer erneuten Aktivierung führen. Diese Lern- und Anpassungsfähigkeit ist für das adaptive Immunsystem enorm wichtig und wird sowohl von CD4-positiven, als auch von CD8-positiven T-Zellen übernommen.

### **1.3.1 Th-Zell-Subtypen**

Lange Zeit ging man davon aus, dass sich Th-Zellen in zwei Subpopulationen gliedern: Th1- und Th2-Lymphozyten (Mosmann, Coffman 1989). Sie können durch die jeweiligen Zytokine charakterisiert werden, die sie sezernieren. In Gegenwart von IL-12 differenzieren naive Th-Zellen zu Th1-Lymphozyten, die vorwiegend Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) sezernieren. Dadurch aktivieren sie unter anderem Makrophagen, Granulozyten und T-Lymphozyten und unterstützen so vor allem die Bekämpfung intrazellulärer Erreger. Th2-Lymphozyten benötigen IL-4 zur Differenzierung und produzieren die Zytokine IL-4, IL-13, und IL-25. Sie aktivieren die humorale Immunantwort und stimulieren in B-Zellen die Produktion von Antikörpern, wodurch z.B. Würmer oder Bakterien eliminiert werden können. Eine pathologische Th1-Immunantwort wurde bisher vor allem mit Autoimmun-Prozessen in Verbindung gebracht, eine Th2 betonte dagegen mit atopischen Krankheiten wie Asthma und anderen Allergien.

Im Laufe der Jahre zeigte sich, dass neben Th1- und Th2-Lymphozyten ein weiterer Subtyp von Th-Zellen existiert, der besonders durch seine Beteiligung an chronischen Entzündungsvorgängen auf sich aufmerksam machte: die Th17-Zellen (Harrington et al. 2005), (Bettelli et al. 2007). Sie sind vor allem durch die Produktion von IL-17A und IL-17F gekennzeichnet (Hymowitz et al. 2001). Beide fördern die Expression proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und Metalloproteinasen. IL-17A rekrutiert außerdem Zellen der myeloischen Reihe wie z.B. Neutrophile Granulozyten an den Ort einer Infektion (Ghilardi, Ouyang 2007).

Welche Rolle Th17-Zellen bei der Abwehr von Infektionen genau einnehmen, ist bisher nur teilweise verstanden. Man weiß allerdings, dass sie für die Bekämpfung



extrazellulärer Bakterien und Pilze wichtig sind (Ivanov et al. 2007). Dazu gehören Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae* (Happel et al. 2005), *Bacteroides fragilis* (Chung et al. 2003), sowie Pilze, z.B. *Candida albicans* (Huang et al. 2004). Zahlreiche Hinweise deuten außerdem daraufhin, dass IL-17 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen einnimmt, die als Folge einer Infektion entstanden. So kann die Ausbildung einer reaktiven Arthritis nach *Borrelia burgdorferi* Infektion durch die Inhibition von IL-17 verhindert werden (Burchill et al. 2003). Ein kausaler Zusammenhang zwischen durch Infektion entstandenen Th17-Zellen und Autoimmunerkrankungen konnte auch im Tiermodell nachgewiesen werden: in genetisch dafür empfänglichen Mäusen kann durch Zymosan, das Th17-Zellen induziert, eine autoimmune Arthritis ausgelöst werden (Yoshitomi et al. 2005). Langrish et al. gelang es 2005 im Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) zu zeigen, dass diese Krankheit nicht, wie bisher vermutet, ein Th1-geprägter Prozess ist, sondern über IL-23 vermittelt von Th17-Zellen induziert wird (Langrish et al. 2005).

Neben IL-17 produzieren Th17-Zellen außerdem IL-22, dessen Expression durch IL-23 hochreguliert wird (Liang et al. 2006). IL-22 ist ebenfalls proinflammatorisch wirksam und an der Ausbildung von Autoimmunkrankheiten beteiligt. Vor allem bei der Entstehung der Psoriasis und am Krankheitsbild des Morbus Crohn könnte ihm eine wesentliche Rolle zukommen (Andoh et al. 2005), (Nickoloff 2007).

### **1.3.2 Zytokine zur Differenzierung von Th17-Zellen**

Die Differenzierung eines naiven CD4-positiven Lymphozyten zum spezifischen T-Lymphozyten ist ein sehr komplexer Vorgang, bei dem Zytokine eine tragende Rolle spielen. Zytokine sind kleine Proteine, die als Botenstoffe von zahlreichen Zellen exprimiert werden und ihre Wirkung durch spezifische Rezeptorbindung induzieren (Murphy et al. 2008).

Ebenso wie die Funktion der Th17-Zellen bisher nur ansatzweise erklärt werden konnte, so sind auch ihre Differenzierungswege vielfach unklar. Sowohl in vitro als auch in vivo konnten in den letzten Jahren allerdings positive und negative Regulationsmechanismen erschlossen werden, wenn auch mit vielfachen Ungereimtheiten über die genauen Zusammenhänge.

### 1.3.2.1 Die positive Regulation der Th17-Immunantwort

Es herrscht allgemeine Übereinstimmung darüber, dass in Mäusen IL-6 für die Differenzierung von Th17-Lymphozyten eine maßgebliche Rolle spielt und es konnte gezeigt werden, dass IL-6-defiziente Tiere eine deutlich reduzierte Anzahl von Th17-Zellen aufweisen (Korn et al. 2007).

IL-6 wiederum scheint in Th17-Zellen die Expression von IL-21 zu aktivieren, wodurch es über einen positiven Feedbackloop zur Eigenstimulation kommt (Korn et al. 2007), (Zhou et al. 2007). IL-21 hemmt zusätzlich die Expression von IFN $\gamma$ , so wird gesichert, dass naive T-Lymphozyten vor allem in Richtung der Th17-Antwort ausdifferenzieren und andere Differenzierungswege blockiert werden (Wei et al. 2007).

IL-23 stellt einen wichtigen Überlebensfaktor für bereits differenzierte Th17-Zellen dar. Für naive T-Lymphozyten spielt es keine Rolle, da die Expression des IL-23-Rezeptors erst während der Differenzierung durch IL-6 induziert wird (Yang et al. 2007).

Zusammen mit IL-6 spielt das Zytokin TGF $\beta$ , das normalerweise eher als antiinflammatorisches Zytokin beurteilt wird, für die Induktion der Th17-Zelldifferenzierung eine tragende Rolle. Da TGF $\beta$  auch für die Entwicklung von Treg-Zellen wichtig ist, scheint gerade die Kombination der beiden Zytokine für den Differenzierungsweg entscheidend zu sein, weil IL-6 als Inhibitor der Treg-Zellen als Weichensteller für die Entscheidung zwischen Treg- und Th17-Lymphozyten funktioniert (Veldhoen et al. 2006a), (Mangan et al. 2006). IL-6 aktiviert über den Transkriptionsaktivator STAT3 den Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t (Retinoid Acid Receptor-related Orphan Receptor  $\gamma$ -t) (Korn et al. 2007), (Zhou et al. 2007), der entscheidend für die Transkription der Gene, die für IL-17 und IL-17F kodieren, verantwortlich ist (Nishihara et al. 2007).

### **1.3.2.2 Die negative Regulation der Th17-Immunantwort**

Bereits seit längerem ist bekannt, dass sowohl das Th2-Zytokin IL-4 als auch das Th1-Zytokin IFN $\gamma$  als Suppressoren der Th17-Zellentwicklung wirksam sind (Harrington et al. 2005), (Park et al. 2005). Auch IL-27, welches von aktivierten APC exprimiert wird, wirkt sich negativ auf die Th17-Differenzierung aus (Stumhofer et al. 2007). Sowohl IFN $\gamma$  als auch IL-27 supprimieren die Effektorzellen dabei über den Transkriptionsfaktor STAT1 (Batten et al. 2006). IL-25, das selbst ein Zytokin der IL-17-Familie ist, und auch als IL-17E bezeichnet wird, fördert die Differenzierung von Th2-Lymphozyten und hemmt somit die IL-17-Produktion (Kleinschek et al. 2007), (Wang et al. 2007).

### **1.3.2.3 Einfluss von Erregern und deren Metaboliten auf die Th17-Immunantwort**

In vivo zeigte sich vielfach, dass einige Pathogene bzw. von ihnen abgeleitete Moleküle in der Lage sind die Th17-Zelldifferenzierung zu beeinflussen. Mit Hilfe von Zymosan z.B. kann man im Mausmodell die Th17-Differenzierung vorantreiben und den Beginn einer durch Immunisierung mit myelinem Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)-induzierten EAE beschleunigen (Veldhoen et al. 2006b). In vitro gelang es Infante-Duarte et al. mit Lysaten von Mycobakterien oder synthetischen Lipopeptiden, die oberflächlichen *Borrelia burgdorferi* Lipoproteinen entsprachen, IL-17-Produktion in T-Zellen zu induzieren (Infante-Duarte et al. 2000). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich mit Molekülen, abgeleitet von *Bordetella pertussis* und *Candida albicans* (Stockinger et al. 2007b).

Zwischen den physiologischen Aufgaben von Th17-Zellen und der Ausbildung von Autoimmunkrankheiten durch fehlgeleitete Aktivierungsvorgänge scheint ein schmaler Grad zu liegen, über den seit der Entdeckung dieses Subtyps kontrovers diskutiert wird. Ein genaueres Verständnis der komplexen Abläufe von Differenzierung und Wachstum dieser Zellen bietet die Möglichkeit bisherige Lücken unseres immunologischen Verständnisses zu schließen und kann hilfreich für neue, spezifische Therapieansätze sein.

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Die Differenzierung von naiven Th-Zellen in Th17-Zellen wird durch die Zytokine IL-6 und TGF $\beta$  erreicht. In dieser Arbeit soll zunächst geklärt werden, ob außerdem auch die Th-Wachstumsfaktoren IL-2 und IL-7 positiven Einfluss auf die Entwicklung IL-17-produzierender Zellen haben.

Wie in Tab.1 bereits gezeigt, kann die Differenzierung von naiven T-Zellen in aktivierte Th17-Zellen nicht nur durch Zytokine induziert werden, sondern auch durch Bestandteile von Bakterien und Pilzen. Der genaue Mechanismus ist jedoch unbekannt und konnte bislang nicht geklärt werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es daher, zu überprüfen, ob es mit Hilfe von TLR-Liganden gelingt IL-17-Expression zu induzieren und weiterhin herauszufinden, welche sich dafür besonders gut eignen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

Alle Versuchstieren waren zwischen 8 und 16 Wochen alt und wurden unter SPF (spezifisch pathogen frei) Bedingungen gehalten. Wasser und Futter stand ad libitum zur Verfügung. Bei den Mäusen handelte es sich um C57BL/6 (B6.WT), die von der Firma Charles River (Sulzfeld) und Janvier (Le Genest, Frankreich) bezogen wurden.

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Agarose	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
5xcDNA-Synthese Puffer	Promega, Mannheim
dNTP-Mix	BioRad, München
EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salinelösung (PBS)	PAA, Pasching
RPMI 1640	PAA, Pasching
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
MgCl <sub>2</sub>	Roche, Penzberg
TRIS (Trishydroxylmethylaminomethan)	USB Corporation, USA
Referenz Standards Gelelektrophorese 100bP	Invitrogen, Karlsruhe, 100bp
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich, München
Ionomycin (1mg/ml)	Sigma-Aldrich, München
Monensin (Golgi Stop)	BD Biosciences, Heidelberg
Pam3Cys	Invivogen, Toulouse
Zymosan	Invivogen, Toulouse
LPS Serotyp 011	Sigma-Aldrich, München
Rekombinantes RNAsin	Promega, Mannheim

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Taq Puffer	BioRad, München
Ladepuffer Gelelektrophorese	50mM Tris
	5mM EDTA
	Glycerol

### Nährmedium für Zellkultur

RPMI 1640
10 % (V/V) FKS, PAN Biotech, Aidenbach
50 µM Mercaptoethanol
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin

### FACS-Puffer

PBS
2 % FKS

### TAE-Puffer

20mM Tris (pH8,3)
1mM EDTA

### 2.1.4 Kits

Nucleo Spin RNA II	Macherey Nagel, Düren
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
Mouse 10plex Kit Flowcytomix	Bender Med Systems, Wien

### 2.1.5 Enzyme

M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
RNAsin	Promega, Mannheim
DNA-Polymerase (Taq Polymerase)	BioRad, München
iQ Sybr Green Supermix	BioRad, München

### 2.1.6 Antikörper/Konjugate

Verwendung	Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus CD4	Pacific Blue	RM4-5	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus IFN- $\gamma$	APC	XMG1.2	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus IL-17	PE	TC11-18H10.1	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus CCR6		140706	R&D Systems
Durchflusszytometrie	Ziege AF anti-Ratte 488	Alexa 488	-	Invitrogen
Stimulation	TGF $\beta$ 1 (rekombinant, human)			R&D Systems
Stimulation	IL-6			Ebioscience, Frankfurt
Stimulation	anti-IFN $\gamma$		MAB 485	R&D Systems
Stimulation	anti-IL-4		11B11	ebioscience, Frankfurt
Stimulation	IL-2			ebioscience, Frankfurt
Stimulation	IL-7			ebioscience, Frankfurt

### 2.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
mIL-17 <i>forward</i> mIL-17 <i>reverse</i>	5'- GTTAAGCTTGCAGCAGCGATCATCCC -3' 5'- CAACTCGAGTTCGGCTGCCTGGCGGAC -3'
$\beta$ -Aktin <i>forward</i> $\beta$ -Aktin <i>reverse</i>	5'- AGAGGGAAATCGTGCGTGAC -3' 5'- AGGCCGCTTTATGTTGAAACC-3'
tnf <i>forward</i> tnf <i>reverse</i>	5'CCCCAAAGGGATGAGAAGTT3' 5'CACTTGGTGGTTTGCTACGA3'
Oligo-dT	5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Eppendorfcups	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Kanülen	BD Bioscience, Heidelberg
Laminair Flow HB 2448-Sterilbank	Heraeus, Wehrheim
LSR II Durchflusszytometer	BD Bioscience, Heidelberg
Mikroskop	Olympus, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
Pipetten, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	BD Bioscience, Heidelberg
Sterilfilter 0,45 µm	PALL, Ann Arbor, USA
Waagen: Sartorius R16OP & Sartorius L2200S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen: Eppendorf 5810R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	BD Bioscience, Heidelberg
Zellsiebe, 40µm	BD Bioscience, Heidelberg
96-Well Platten	BD Bioscience, Heidelberg
Cycler, iQ5	BioRad, München



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation von Lymphknotenzellen

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, mit Ethanol (70 %) desinfiziert und geöffnet. Die Lymphknoten wurden inguinal und axillär entfernt, in 1 ml PBS, 2 % FCS aufbewahrt und auf Eis gestellt.

Die Lymphknoten wurden dann mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb (Maschenweite 40µM) gerieben. Um Zellverluste zu vermeiden wurde mehrmals mit PBS, 2% FCS nachgespült.

### 2.2.2 Bestimmung der Lebend-Zellzahl

Um die Zahl der lebenden Zellen aus den Lymphknoten zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Mikroskopisch kann man dabei erkennen, dass lebende Zellen Trypanblau nicht aufnehmen und sich dadurch von den toten, die blau gefärbt sind, abheben. Die Zählkammer besteht aus 4 x 16 Quadraten. Zur Bestimmung werden die lebenden Zellen aus den jeweils 16 Quadraten gezählt und um den Mittelwert zu erhalten durch 4 geteilt. Die Zellzahl kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Mittelwert der Zellzahl der 4 Blöcke} = \text{Zellzahl} \times 10^4 / \text{mL}$$

(Formel ohne Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors)

### 2.2.3 In vitro-Zellkultur

Zur Vorbereitung der Mikrotiterplatten für die Zellkultur wurden die Platten für jeweils 2h bei 37°C mit Antikörpern beschichtet. Dies erfolgte mit jeweils 50µl Tris-Puffer und 5µg/Well anti-CD3 Antikörper zur T-Zell Rezeptorstimulation. Nach der Beschichtung erfolgten mehrere Waschschrte mit PBS bzw. als letztem Schritt mit Nährmedium. Die Zellen wurden dann in entsprechender Konzentration (i.d.R.  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen/250µl/Well) aufgenommen und je nach Versuchsbedingungen mit Zytokinen in entsprechender Konzentration stimuliert. Für die Zeit der Inkubation betrug die Temperatur 37°C, die mit Wasserdampf gesättigte Luft enthielt 5% CO<sub>2</sub>.

Für das Experiment wurden isolierte Lymphknoten Zellen auf eine mit anti-CD3 beschichtete Platte ausgesät. Im Gegensatz zu vielen konventionellen Versuchsprotokollen, die im Zusammenhang mit Th17 Zellen und Zellkulturen sortierte CD4-positive Zellen verwenden, und die Platten zusätzlich mit anti-CD28 beschichten um eine TCR-Stimulation zu erreichen, wurde in diesen Versuchen

bewusst auf das Sortieren der Zellen und anti-CD28 verzichtet. Das Wachstum der Zellen in der Kultur hängt somit, abgesehen von den hinzugefügten Stimulanzien, von Interaktionen zwischen APC und Lymphozyten ab.

Um die Kultur für eine Woche erhalten zu können, war im Nährmedium zu Beginn für alle Proben ein Zytokinmix (CM) aus TGF $\beta$ , IL-6, anti-IFN $\gamma$  und anti-IL-4. Danach wurden die Proben nach dem Plan der folgenden Tabelle stimuliert und an Tag 7 geerntet.

Probe	Stimulation und Zeitpunkt			
	LPS Tag1	IL-2 Tag 3+5	IL-7 Tag 3+5	Zytokinmix Tag 3+5
1	-	+	+	-
2	-	+	+	+
3	-	-	+	-
4	-	-	+	+
5	+	+	+	-
6	+	+	+	+
7	+	-	+	-
8	+	-	+	+

**Tab.3 Stimulationsplan der Zellkultur** Die Stimulation erfolgte dabei in folgenden Konzentrationen: IL-2 20ng/ml; IL-7 20ng/ml; TGF $\beta$  2ng/ml; IL-6 10 $\mu$ g/ml; anti-IFN $\gamma$  1mg/ml; anti-IL-4 0,5mg/ml; anti-CD3 5 $\mu$ g/well; LPS 10ng/ml

Für die Messungen der Zytokinproduktion (Kapitel 3.1.1) wurden nach 7 Tagen vor dem Ernten der Zellen Überstände der Proben abgenommen.

#### 2.2.4 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie dient der Analyse von einzelnen Zellen und beruht auf deren Eigenschaft das Licht eines Laserstrahls, den sie passieren, zu streuen. Die Menge des gestreuten Lichts ist dabei abhängig von der Zellgröße, der Oberfläche der Zellmembran und den intrazellulären Bestandteilen. Das Streulicht entlang des einfallenden Lichtstrahls wird als Forward Scatter (FSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Größe einer Zelle. Dagegen ist das Streulicht, welches im rechten Winkel zum Lichtstrahl fällt, ein Maß für die Granularität und ist als Side Scatter (SSC) definiert. Neben dem Streulicht kann man auch Fluoreszenzfarbstoffe messen. Dafür wurden in dieser Arbeit monoklonale Antikörper verwendet, die mit einem

Fluorochrom markiert sind, und sich gegen bestimmte Oberflächenproteine richten. Die Messung erfolgte für Streulicht linear und für Fluoreszenzfarbstoffe logarithmisch. Zur Vorbereitung der Proben wurden die Zellen in jeweils 50µl PBS, 2% FCS aufgenommen, wobei dem Puffer vorher die Antikörper in entsprechender Konzentration hinzugefügt worden waren. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 4°C wurden nicht gebundene Antikörper in zwei Waschschritten mit jeweils 1ml PBS, 2 % FCS entfernt und das Zellpellet dann zur Analyse in 300µl FACS Puffer aufgenommen.

### **2.2.5 Intrazelluläre Färbungen**

Um eine spezifische Zytokinproduktion nachzuweisen, wurden außerdem intrazelluläre Färbungen durchgeführt. Dafür wurden einer Zellsuspension von 200µl (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen) 50µl einer Lösung hinzugegeben, die der Stimulation der Zellen dient: das darin enthaltene Ionomycin (1µM) führt zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  und PMA (50ng/ml) zur Aktivierung der Proteinkinase C. Monensin (6µl für 4ml Medium) verhindert durch Blockade des Golgi-Apparats, dass die neu-synthetisierten Zytokine aus der Zelle transportiert werden können. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37°C erfolgte die Färbung mit dem Cytofix/Cytoperm Kit nach Herstellerangaben. Um die Zellmembran nach einem Fixierungsschritt für die jeweiligen Antikörper durchlässig zu machen, wird hierfür eine saponinhaltige Lösung verwendet. Im Anschluss an das Verfahren werden auch die intrazellulär gefärbten Proben in FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Durchflusszytometrie bei 4°C gelagert.

### **2.2.6 RNA-Präparation**

Die RNA-Präparation wurde mittels Nucleo Spin RNAII der Firma Macherey-Nagel durchgeführt und ist ebenfalls nach den Angaben des Herstellers erfolgt.

Die Zellen wurden nach der Stimulation zum Zeitpunkt 0, 2, 4, und 20 Stunden aus den Mikrotiterplatten der Zellkultur abgesaugt und in Eppendorfcups überführt. Um das Nährmedium von den Zellen zu trennen wurde für 4 Minuten bei 250 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wurde in 350µl RA1-Puffer + 3,5 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen. Um die RNA Bindung an die Filtermembran zu optimieren wurde dem Lysat 350µl 80% Ethanol zugegeben und resuspendiert.

Das Lysat wurde daraufhin auf eine Säule pipettiert und für 30s bei 11000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurden 350µl MDB (Membrane

Desalting Buffer) auf die Säule gegeben, um den darauffolgenden DNase Verdau effektiver zu machen und wiederum für 1 Minute bei 11000 x g zentrifugiert.

Um DNA-Reste zu entfernen wurde dann ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurden 90µl Reaktionspuffer mit 10µl rDNase auf die Säule pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit RA2-Puffer um die Reaktion zu stoppen. Zwei weitere Waschschriffe mit RA3-Puffer schlossen sich an und die RNA wurde zuletzt mit 60µl RNase -freiem Wasser eluiert. Bis zur darauffolgenden cDNA Synthese wurde die RNA bei -20°C gelagert.

### 2.2.7 Herstellung von cDNA

Zur Aufbereitung für eine Real-Time PCR wurde die aufgereinigte RNA mit dem Enzym M-MLV Reverse Transkriptase (Moloney-Maus-Leukämie-Virus Reverse-Transkriptase) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die RNA mit Oligo(dT) versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 12,5 µl Ansatzvolumen aufgefüllt (Prämix).

Zur Denaturierung wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 70°C im Heizblock des PCR-Cyclers inkubiert und danach auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 12,5 µl des Mastermix erfolgte die reverse Transkription bei 42°C im PCR-Cycler. Um nach der Reaktion das Enzym zu denaturieren, wurde anschließend für weitere 5 Minuten bei 85°C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die synthetisierte cDNA bei 4°C aufbewahrt.

<u>Prämix (1-fach)</u>	<u>Menge (µl)</u>
RNA (200ng-1µg)	5
Oligo(dT) (50µM)	2
ddH <sub>2</sub> O	5,5
<u>Gesamtvolumen</u>	12,5

<u>Mastermix (1-fach)</u>	<u>Menge (µl)</u>
M-MLV Puffer (5-fach)	5
dNTP Mix (10mM)	5
Rekombinantes RNAsin (40U/µl)	0,5
M-MLV RT (200U/µl)	0,5
ddH <sub>2</sub> O	1,5
<u>Gesamtvolumen</u>	12,5

### 2.2.8 Qualitative PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Methode der PCR dient dazu der DNA einer Probe zu vervielfachen und erfolgt im Wesentlichen in drei Schritten:

Während der Denaturierung werden durch hohe Temperaturen Basenpaarungen der doppelsträngigen DNA gelöst oder wie im Falle der cDNA evtl. vorhandene intramolekulare Basenpaarungen. Danach kommt die Phase des Annealing. Hierbei lagern sich synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) an jeweils einen der beiden Einzelstränge, für den sie spezifisch sind, an. Während der Elongation synthetisiert die hitzebeständige Taq-Polymerase dann im Beisein von dNTP (Desoxynukleosidtriphosphate) und Magnesiumchlorid entsprechende Einzelstränge. Durch mehrere Zyklen dieser drei Schritte kommt es dann zur exponentiellen Vermehrung des gesuchten DNA Fragments ( $2^n$ , wobei n der Anzahl der Zyklen entspricht). Die in dieser Arbeit durchgeführten qualitativen PCR dienten dem Qualitätsnachweis der cDNA und wurden zur Überprüfung auf ein Agarosegel aufgetragen.

<u>PCR-Ansatz (1-fach)</u>	<u>Menge (µl)</u>
10 x Taq-Puffer	5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5
dNTP Mix (10mM)	1
Taq-Polymerase	0,25
Primer sense	0,8
Primer antisense	0,8
ddH <sub>2</sub> O	38,65
cDNA	2µl
<u>Gesamtvolumen</u>	50µl

### 2.2.9 Agarose Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Qualität der cDNA wurde eine Agarose Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wandern die DNA Moleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen entlang eines elektrischen Feldes und werden dadurch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt.

Für die Versuche wurden 1,5% Gele verwendet. Zur Herstellung wurden zu 100ml TAE Puffer 1,5 mg Agarosepulver zugegeben und in der Mikrowelle erwärmt, um eine homogene Lösung zu erhalten. Nach kurzem Abkühlen wurde dann 2µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in einem Gelträger aufgetragen.

Als Referenz-Standard wurde ein 100bp Marker verwendet und die Elektrophorese unter konstanter Spannung durchgeführt. Die Proben wurden im Verhältnis 6:1 mit Ladepuffer gemischt und mit jeweils 10 µl auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

### 2.2.10 Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR)

Bei der Real-Time PCR wird die Amplifikation der DNA kontinuierlich mitverfolgt. Um die neu synthetisierte DNA sichtbar zu machen wird dem Reaktionsgemisch dabei der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green zugefügt, der in die DNA interkaliert, und durch eine Kamera aufgezeichnet werden kann.

Durch die Darstellung der amplifizierten DNA-Fragmente in Abhängigkeit von der Zyklenanzahl entsteht eine Funktion, in der die Fluoreszenz proportional zum Amplifikationsprodukt ansteigt. Als  $C_T$ -Wert (Threshold-Cycle) wird dabei die Zyklenanzahl bezeichnet, bei dem die Probe zum ersten Mal aus der Hintergrundfluoreszenz heraustritt und zu einer exponentiellen Kurve ansteigt.

Real-Time PCR-Ansatz (1-fach)	Menge (µl)
iQ Sybr Green Supermix (1x)	10
Primer sense	0,4
Primer antisense	0,4
cDNA	1
ddH <sub>2</sub> O	8,2
Gesamtvolumen	20

	Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklen-Anzahl
1	Denaturierung	94 (hot-start)	02:30	1
2	Denaturierung	94	00:20	40
	Annealing	58 für $\beta$ -actin 61 für IL-17 58 für tnf	00:50	
	Elongation	72	00:50	
3	Elongation	72	08:00	1
4	Denaturierung	94	1:00	1
5	Schmelzpunktkurve	55-95 (Anstieg um je 0,5°C)	0:08 (pro 0,5°C Schritt)	
6	Abkühlung	4	$\infty$	

Tab.4 Reaktionsbedingungen der Real-Time PCR

### 2.2.11 Mathematische Grundlagen zur relativen Quantifizierung

Die relative Quantifizierung zur Bestimmung der Zytokinexpression beruht auf dem Vergleich der unterschiedlichen Expressionsrate eines internen Referenzgens (House-Keeping Gen) und des zu untersuchenden Gens. Zur Berechnung wurden bei Mehrfachbestimmungen die Mittelwerte der  $C_T$ -Werte ermittelt. Als House-Keeping Gen wurde in dieser Arbeit  $\beta$ -Aktin verwendet. Wenn man den Mittelwert des House-Keeping Gens vom  $C_T$  Wert des untersuchenden Gens subtrahiert erhält man den sogenannten  $\Delta C_T$ -Wert. In dieser Arbeit wird der  $\Delta C_T$ -Wert unstimulierter Zellen als Kalibrator bezeichnet. Der sog.  $\Delta\Delta C_T$ -Werts ergibt sich dann als Differenz zwischen dem  $\Delta C_T$ -Wert stimulierter Zellen und dem Kalibrator.

Die Expressionsraten erhält man aus den negativen Potenzen des  $\Delta\Delta C_T$ -Werts.

#### Berechnung der relativen Expressionsrate

$\Delta C_T$ -Wert =  $C_T$ -Wert (zu untersuchendes Gen) -  $C_T$ -Wert (House-Keeping Gen)

$\Delta\Delta C_T$ -Werts =  $\Delta C_T$ -Wert (zu untersuchendes Gen) -  $\Delta C_T$ -Wert (Kalibrator)

Expressionsrate des zu untersuchenden Gens =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$

### **2.2.12 Multiplex Zytokin Analyse**

Zur Messung der Zytokine aus den Überständen der Zellkulturen wurde ein partikelbasiertes Immunoassayverfahren verwendet, das der Zytokinquantifizierung mittels Durchflusszytometrie dient. Dabei kann in kleinen Probenvolumina die Konzentration verschiedener Zytokine simultan bestimmt werden. Grundlage des Verfahrens sind Latexpartikel unterschiedlicher Größe und Fluoreszenzintensität, die mit Antikörpern beschichtet wurden und entsprechend der zu messenden Zytokine spezifisch sind.

Die zu untersuchenden Proben und ein Zytokinstandard werden im ersten Schritt einem Mix aus den partikel-gebundenen Primärantikörpern zugegeben, um die Zytokine an die Latexpartikel fixieren. In einem weiteren Schritt werden biotinylierte Antikörper beigefügt, die ebenfalls an die zu messenden Zytokine binden. Zuletzt kommt es durch Zugabe von Streptavidin-PE zum Binden an das Biotin-Konjugat und der Emission eines messbaren fluoreszenten Signals. Durch die Eigenfluoreszenz der Latexpartikel und die Spezifität der Antikörper können die jeweiligen Zytokine voneinander unterschieden werden. Mit Hilfe der Intensität des PE-Signals und ermittelten Standardkurven lässt sich die Zytokinkonzentration ermitteln. Das Verfahren wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.



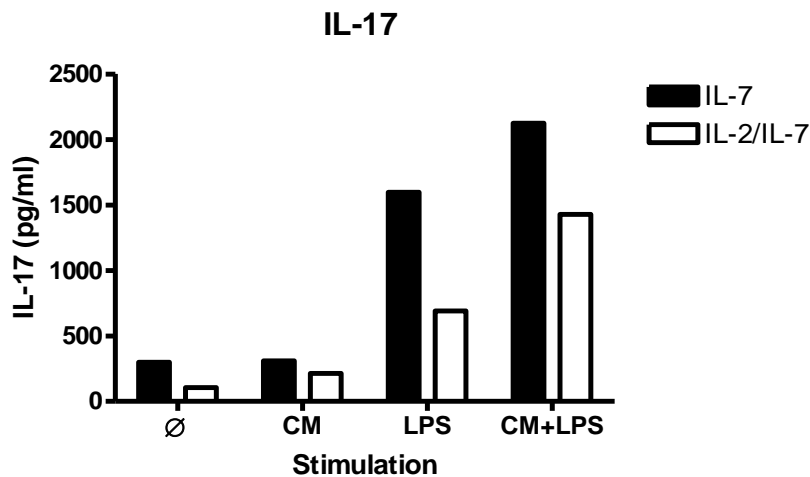
### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Die Rolle von IL-7 und IL-2**

Zytokine spielen als Botenstoffe des Immunsystems für die Proliferation von Zellen eine wichtige Rolle. Dabei können sie wachstumsfördernd oder auch wachstumshemmend auf Zellen einwirken. In früheren Arbeiten konnten wir nachweisen, dass Th17-Zellen IL-7R $\alpha$  (CD127) exprimieren (Pötzl, unpublizierte Daten), dessen Funktion bisher unklar ist. In dieser Arbeit untersuchten wir daher die Wirkung der Wachstumszytokine IL-7 und IL-2 auf die Induktion der IL-17-Produktion von in vitro-stimulierten Leukozyten.

##### **3.1.1 Messungen der Zytokinproduktion nach in vitro-Stimulation mit IL-7 und IL-2**

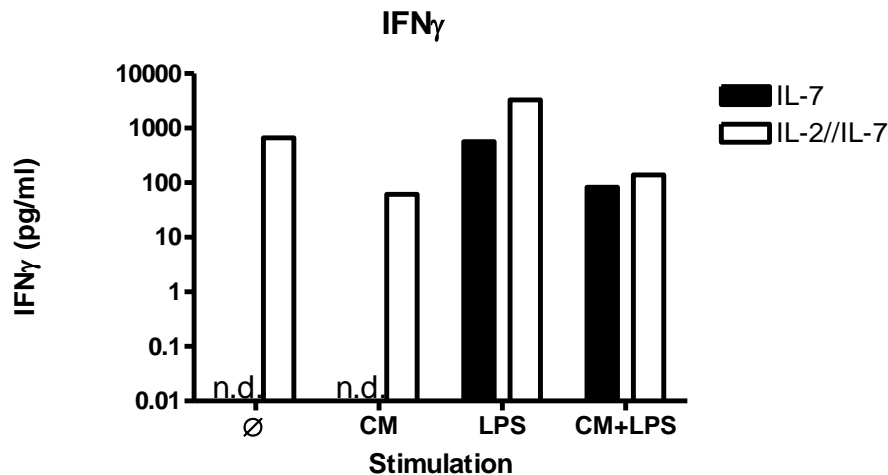
Zunächst wurde der Effekt von IL-7 und IL-2 auf die IL-17- und IFN $\gamma$ -Produktion von Lymphknotenzellen untersucht. Hierzu wurde in den Überständen der Zellkultur mit Hilfe der Multiplex Zytokinanalyse die Konzentration von IL-17 und IFN $\gamma$  bestimmt. Ausgehend von diesen Stimulationsbedingungen fügten wir in weitere Proben außerdem noch LPS als TLR-Agonist hinzu, um einen zusätzlichen Stimulationsreiz für die APC in der Zellkultur zu erhalten.



**Abb.2 IL-17-Produktion von Lymphknotenzellen nach in vitro-Stimulation**

Lymphknotenzellen von B6.WT-Mäusen wurden für 7 Tage in Nährmedium kultiviert und an Tag 1 mit anti-CD3 und einem Zytokinmix (CM) aus IL-6, TGF $\beta$ , anti-IL-4 und anti-IFN $\gamma$  stimuliert. Zusätzlich erhielt ein Teil der Proben an Tag 1 LPS. Die weitere Stimulation erfolgte an Tag 3 und 5 durch IL-7 bzw. IL-7/IL-2, ebenso wie dem CM. Die Überstände der Zellkultur wurden an Tag 7 mittels Multiplex Zytokinanalyse untersucht, um die Konzentration an IL-17 zu bestimmen (Gepoolte Zellen aus 3 Wells).

Die Stimulation mit IL-7 führte in den in vitro-kultivierten Lymphknotenzellen zur Freisetzung von IL-17. Im Vergleich dazu konnte durch eine Stimulation mit IL-6, TGF $\beta$ , anti-IFN $\gamma$  und anti IL-4 (CM), die konventionell zur Th17-Zelldifferenzierung verwendet werden, und dem Zusatz von IL-7, die IL-17-Produktion nicht wesentlich erhöht werden. Im weiteren Verlauf ergänzten wir die Stimulation durch den TLR-Agonisten LPS. Dadurch konnte die IL-17-Produktion weiter verstärkt werden. Bereits in alleiniger Kombination mit IL-7 kam es zu einer enorm gesteigerten IL-17-Produktion, die höchste IL-17-Produktionsrate jedoch erreichten wir durch eine Kombination der konventionellen Th17-Differenzierungszytokine mit IL-7 und LPS. Die Zugabe von IL-2 führte unter sämtlichen Stimulationsbedingungen zu einer Hemmung der IL-17-Produktion. Allerdings bewirkte eine zusätzliche LPS-Stimulation, dass der hemmende Effekt von IL-2 weniger stark ausgeprägt war und die IL-17-Produktion höher war, als mit alleiniger Zytokinstimulation (Abb.2)



**Abb.3 IFN $\gamma$ -Produktion von Lymphknotenzellen nach in vitro-Stimulation**

Lymphknotenzellen von B6.WT-Mäusen wurden für 7 Tage in Nährmedium kultiviert und an Tag 1 mit anti-CD3 und einem Zytokinmix (CM) aus IL-6, TGF $\beta$ , anti-IL-4 und anti-IFN $\gamma$  stimuliert. Zusätzlich erhielt ein Teil der Proben an Tag 1 LPS. Die weitere Stimulation erfolgte an Tag 3 und 5 durch IL-7 bzw. IL-7/IL-2, ebenso wie dem CM. Die Überstände der Zellkultur wurden an Tag 7 mittels Multiplex Zytokinanalyse untersucht um die Konzentration an IFN $\gamma$  zu bestimmen (Gepoolte Zellen aus 3 Wells).

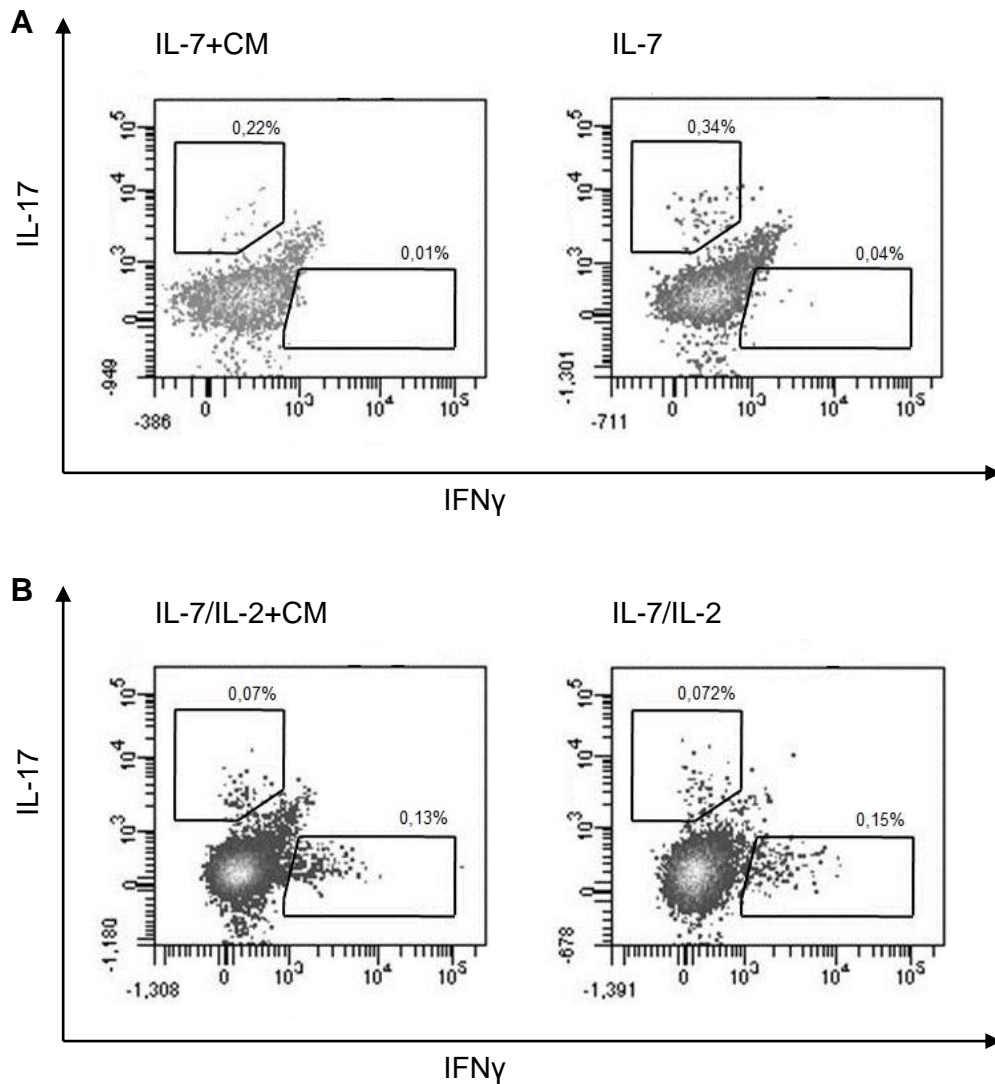
IL-7 spielte als Stimulanz für die Produktion von IFN $\gamma$  keine Rolle. Weder eine alleinige Stimulation mit IL-7 noch die Kombination mit dem Zytokinmix zur Th17-Differenzierung begünstigten die IFN $\gamma$ -Produktion. Erst nach Zugabe von LPS konnten messbare Konzentrationen von IFN $\gamma$  unter IL-7-Stimulation detektiert werden.

IL-2 hingegen förderte unter allen Stimulationsbedingungen die Produktion von IFN $\gamma$ . Besonders gut zur Stimulation geeignet war eine Kombination aus IL-2 und LPS (Abb.3).

### 3.1.2 Induktion von IL-17-Produktion in CD4-positiven Zellen

#### 3.1.2.1 Die Rolle von IL-7 und IL-2

Da sich aus den Zytokinkonzentrationen der Zellkulturüberstände keine Aussage darüber treffen lässt, ob Th-Zellen zur Zytokinsekretion wesentlich beitrugen, führten wir im Folgenden eine durchflusszytometrische Analyse der IL-17- und IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen durch.



**Abb.4 Zytokinproduktion CD4-positiver nach Stimulation mit IL-7 bzw. IL-7/IL-2**

(A+B) Lymphknotenzellen von B6.WT-Mäusen wurden für 7 Tage in Nährmedium kultiviert und an Tag 1 mit anti-CD3 und einem Zytokinmix (CM) aus IL-6, TGF $\beta$ , anti-IL-4 und anti-IFN $\gamma$  stimuliert. Nach dem Ernten erfolgte eine Analyse der IL-17- und IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie.

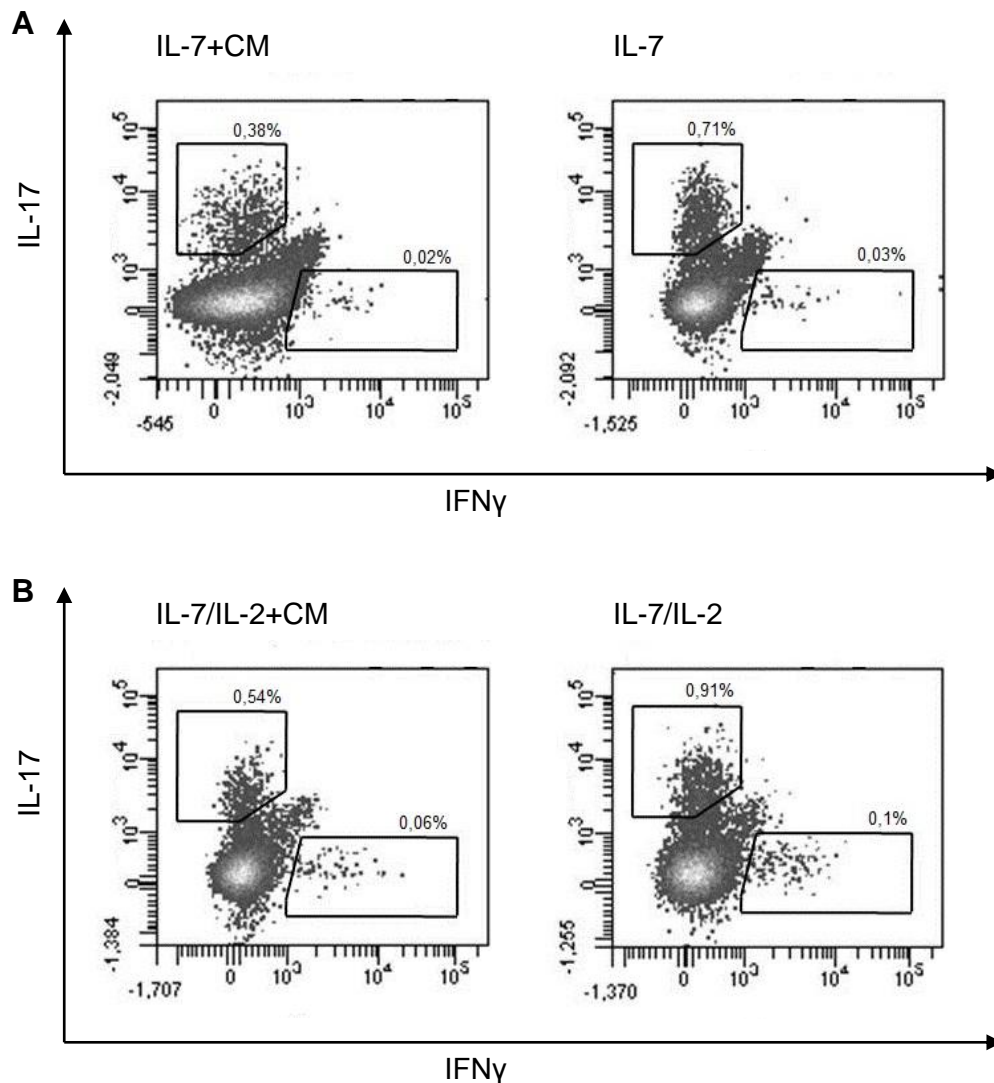
(A) Gezeigt sind zytokinproduzierende CD4-positive Zellen, die zusätzlich an Tag 3 und 5 IL-7 erhielten, in der linken Darstellung in Kombination mit dem CM, rechts nur in Gegenwart von IL-7.

(B) Gezeigt sind zytokinproduzierende CD4-positive Zellen, die zusätzlich an Tag 3 und 5 IL-7/IL-2 erhielten, in der linken Darstellung in Kombination mit dem CM, rechts nur in Gegenwart von IL-7/IL-2 (Gepoolte Zellen aus drei Wells).

Die Stimulation von Lymphknotenzellen mit IL-7 führte dazu, dass bevorzugt IL-17-produzierende CD4-positive Zellen zu detektieren waren, während der Anteil an IFN $\gamma$ -Produzenten sehr gering war (Abb.4A).

Es zeigte sich, dass der Anteil an CD4-positiven IL-17-Produzenten, der durch alleinige Stimulation mit IL-7 induziert wurde, vergleichbar war mit der Kombination von IL-7 und dem Zytokinmix zur Th17-Differenzierung. Verglichen mit Lymphknotenzellen, die direkt ohne vorherige in vitro-Kultur stimuliert und gefärbt wurden, war der Anteil an CD4-positiven Zellen, die IL-17 exprimieren, unter allen Stimulationsbedingungen jedoch verhältnismäßig gering. Diese enthielten ca. 1% CD4-positive IL-17-Produzenten (Johannes Pötzl, unpublizierte Daten). Es war also festzuhalten, dass sich die in vitro-Stimulation per se nicht eignete, um Th17-Zellen zu expandieren. Die Zugabe von IL-2 blockierte sowohl unter IL-7 Stimulation als auch unter Stimulation mit IL-7 und Th17-Differenzierungszytokinen das Wachstum IL-17-produzierender Zellen und begünstigte das Wachstum von IFN $\gamma$ -Produzenten (Abb.4B).

### 3.1.2.2 Stimulation mit LPS



**Abb.5 Zytokinproduktion CD4-positiver Zellen nach zusätzlicher TLR-Stimulation**

(A+B) Lymphknotenzellen von B6.WT-Mäusen wurden für 7 Tage in Nährmedium kultiviert und an Tag 1 mit anti-CD3 und einem Zytokinmix (CM) aus IL-6, TGF $\beta$ , anti-IL-4 und anti-IFN $\gamma$  stimuliert. Zur TLR Stimulation erfolgte an Tag 1 außerdem die Zugabe von LPS. Nach dem Ernten erfolgte eine Analyse der IL-17- und IFN $\gamma$ -produzierender Zellen mittels Durchflusszytometrie.

(A) Gezeigt sind zytokinproduzierende CD4-positive Zellen, die zusätzlich an Tag 3 und 5 IL-7 erhielten, in der linken Darstellung in Kombination mit dem CM, rechts nur in Gegenwart von IL-7.

(B) Gezeigt sind zytokinproduzierende CD4-positive Zellen, die zusätzlich an Tag 3 und 5 IL-7/IL-2 erhielten, in der linken Darstellung in Kombination mit dem CM, rechts nur in Gegenwart von IL-7/IL-2 (Gepoolte Zellen aus drei Wells).

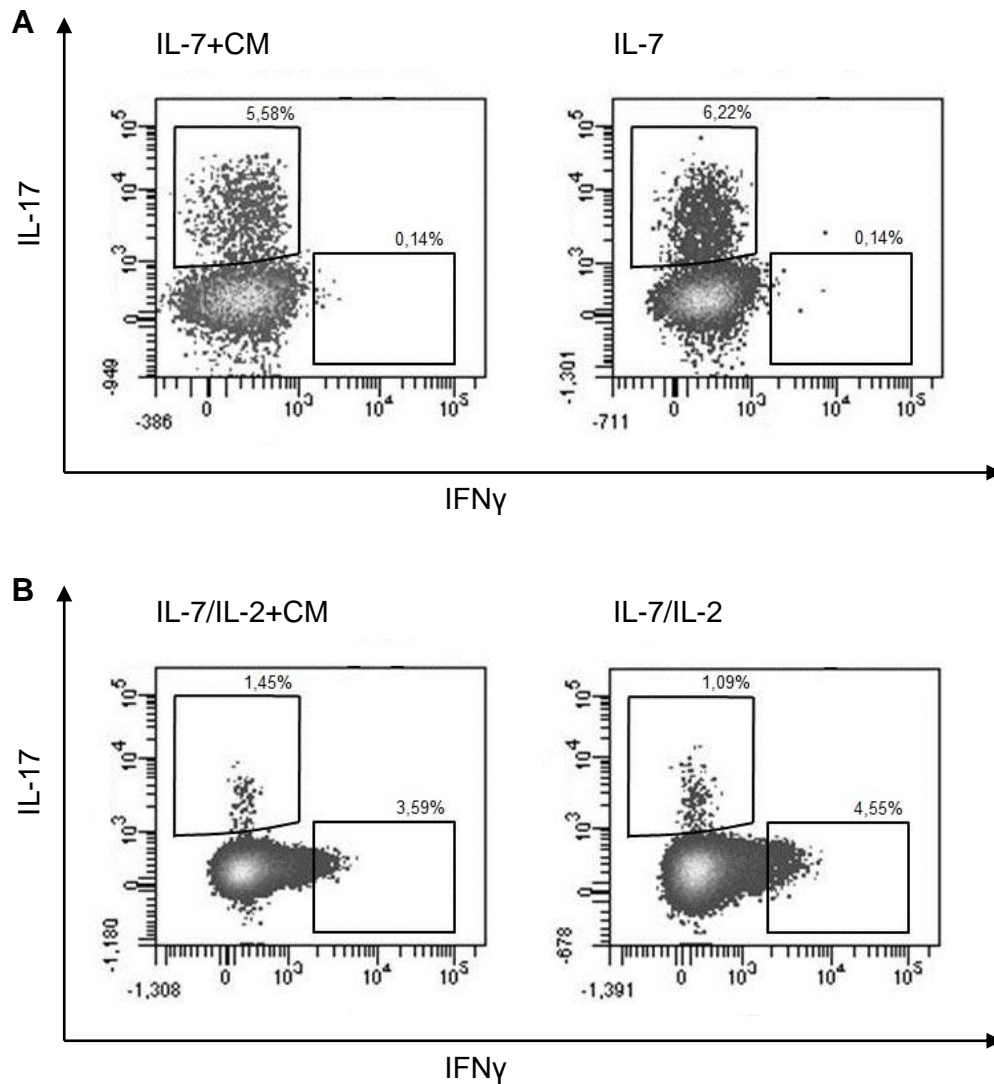
Die Zugabe des TLR-Agonisten LPS förderte das Wachstum CD4-positiver IL-17-Produzenten zusätzlich und verdreifachte ihren Anteil im Vergleich zu den korrespondierenden Proben in Abb.4A. Auch hier erzeugte IL-7 in Kombination mit LPS einen höheren Anteil IL-17-produzierender Zellen als LPS in Kombination mit IL-7 und dem Zytokinmix zur Th17-Zelldifferenzierung (Abb.5A).

Im Gegensatz zu den Stimulationsbedingungen ohne LPS

Abb.4) konnte IL-2 das Wachstum IL-17-produzierender Th-Zellen bei zusätzlicher Behandlung mit LPS jedoch nicht mehr blockieren. Es bewirkte zwar weiterhin eine leichte Steigerung des Anteils von IFN $\gamma$ -Produzenten, gleichzeitig wurde aber auch das Wachstum von IL-17-Produzenten stimuliert (Abb.5B).

### 3.1.3 Induktion von IL-17-Produktion in CD4-negativen Zellen

#### 3.1.3.1 Rolle von IL-7 und IL-2



**Abb.6 Zytokinproduktion CD4-negativer Zellen nach Stimulation mit IL-7 bzw. IL-7/IL-2**

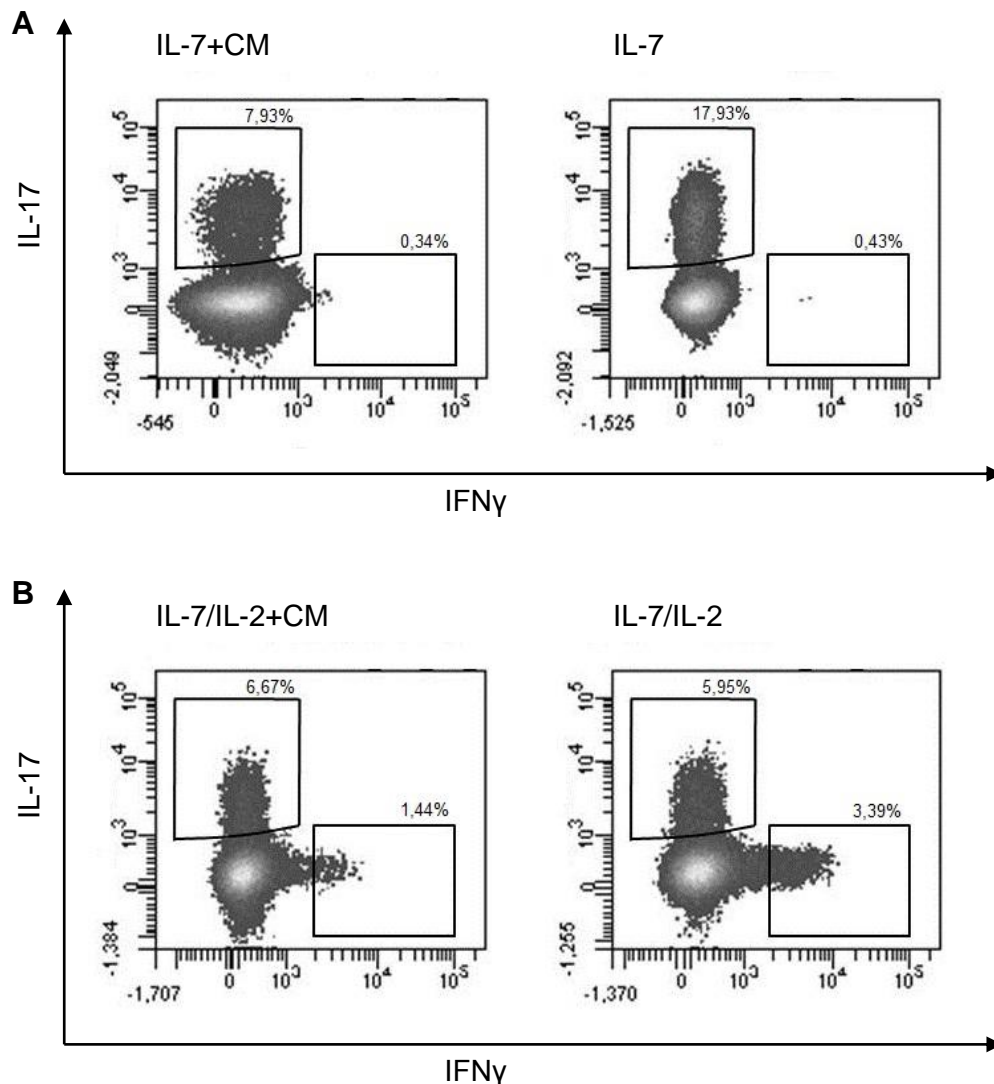
(A+B) Lymphknotenzellen von B6.WT-Mäusen wurden für 7 Tage in Nährmedium kultiviert und an Tag 1 mit anti-CD3 und einem Zytokinmix (CM) aus IL-6, TGF $\beta$ , anti-IL-4 und anti-IFN $\gamma$  stimuliert. Nach dem Ernten erfolgte eine Analyse der IL-17- und IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie.

(A) Gezeigt sind zytokinproduzierende CD4-negative Zellen, die zusätzlich an Tag 3 und 5 IL-7 erhielten, in der linken Darstellung in Kombination mit dem CM, rechts nur in Gegenwart von IL-7.  
 (B) Gezeigt sind zytokinproduzierende CD4-negative Zellen, die zusätzlich an Tag 3 und 5 IL-7/IL-2 erhielten, in der linken Darstellung in Kombination mit dem CM, rechts nur in Gegenwart von IL-7/IL-2 (Gepoolte Zellen aus drei Wells).



Auch für CD4-negative Zellen war zu beobachten, dass IL-7 zu einer vergleichbaren IL-17-Expressionsrate führte, wie die Kombination mit IL-7 und dem Zytokinmix zur Th17-Differenzierung (Abb.6A). Ebenso wie bei bei der Subpopulation der CD4-positiven Zellen bewirkte eine zusätzliche Gabe von IL-2 wiederum eine Verringerung des Anteils an IL-17-Produzenten, wohingegen der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender Zellen gesteigert wurde (Abb.6B).

### 3.1.3.2 Stimulation mit LPS



**Abb.7 Zytokinproduktion CD4-negativer Zellen nach zusätzlicher TLR-Stimulation**

(A+B) Lymphknotenzellen von B6.WT-Mäusen wurden für 7 Tage in Nährmedium kultiviert und an Tag 1 mit anti-CD3 und einem Zytokinmix (CM) aus IL-6, TGFβ, anti-IL-4 und anti-IFNγ stimuliert. Zur TLR-Stimulation erfolgte an Tag 1 außerdem die Zugabe von LPS. Nach dem Ernten erfolgte eine Analyse der IL-17- und IFNγ-produzierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie.

(A) Gezeigt sind zytokinproduzierende CD4-negative Zellen, die zusätzlich an Tag 3 und 5 IL-7 erhielten, in der linken Darstellung in Kombination mit dem CM, rechts nur in Gegenwart von IL-7.

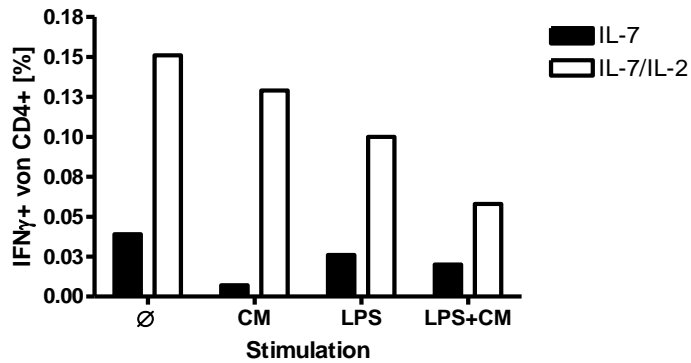
(B) Gezeigt sind zytokinproduzierende CD4-negative Zellen, die zusätzlich an Tag 3 und 5 IL-7/IL-2 erhielten, in der linken Darstellung in Kombination mit dem CM, rechts nur in Gegenwart von IL-7/IL-2 (Gepoolte Zellen aus drei Wells).

Die Zugabe von LPS bewirkte einen besonders ausgeprägten positiven Effekt auf das Wachstum CD4-negativer IL-17-Produzenten. Vor allem die Kombination mit IL-7 eignete sich sehr gut um IL-17-Produktion in CD4-negativen Zellen zu erzielen. Ihr Anteil betrug 17,03% der Gesamtzellen; einen mehr als doppelt so hohen Anteil an IL-17-Produzenten als die Kombination mit IL-7 und dem Zytokinmix (Abb.7A).

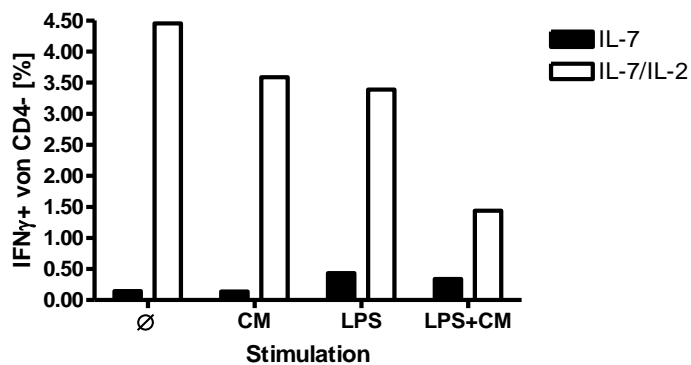
Die Zugabe von IL-2 zu IL-7-stimulierten Zellen verringerte wiederum den Anteil der IL-17-produzierenden Zellen auf ein Drittel (Abb.7B), wohingegen IL-2 den Anteil der IL-17-Produzenten bei der Kombination mit IL-7 und dem Zytokinmix zur Th-17-Zelldifferenzierung nur geringfügig beeinflusste und gleichzeitig den Anteil von IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen erhöhte.

### 3.1.4 Zytokinproduktion CD4-positiver und CD4-negativer Zellen im Überblick

#### A) IFN $\gamma$ -Produktion CD4-positive Zellen



#### B) IFN $\gamma$ -Produktion CD4-negative Zellen



**Abb.8 IFN $\gamma$ -Produktion von CD4-positiven und CD4-negativen Zellen im Überblick, die jeweils mit IL-7 bzw. IL-7/IL-2 stimuliert wurden.**

Lymphknotenzellen von B6.WT-Mäusen wurden für 7 Tage in Nährmedium gehalten und an Tag 1 mit anti-CD3 und einem Zytokinmix (CM) aus IL-6, TGF $\beta$ , anti-IL-4 und anti-IFN $\gamma$  stimuliert. Zusätzlich erhielt ein Teil der Proben an Tag 1 LPS. Die weitere Stimulation erfolgte an Tag 3 und 5 durch IL-7 bzw. IL-7/IL-2, ebenso wie dem CM. Nach dem Ernten erfolgte eine Analyse der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie.

(A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil IFN $\gamma$ -produzierender Zellen an CD4<sup>+</sup> Zellen.

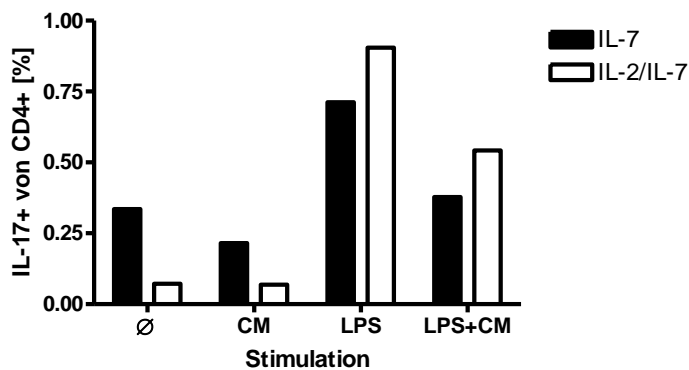
(B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil IFN $\gamma$  produzierender Zellen an CD4<sup>-</sup> Zellen

(Gepoolte Zellen aus 3 Wells).

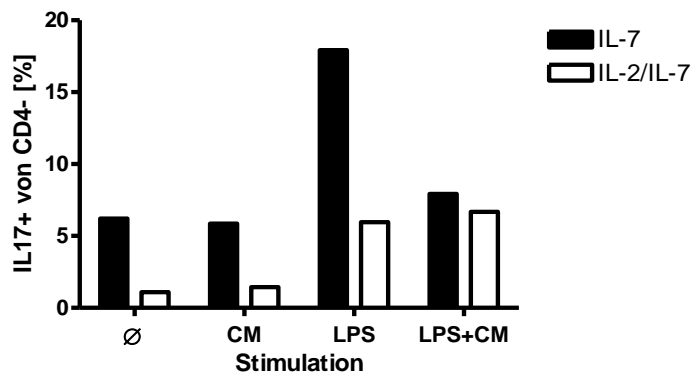
IL-2 förderte unter allen Bedingungen das Wachstum IFN $\gamma$ -produzierender Zellen. Dies gilt sowohl für CD4-positive als auch für CD4-negative Zellen, war für CD4-negative Zellen (4,5% IFN $\gamma$ -Produzenten) jedoch deutlicher ausgeprägt als für die Population der CD4-positiven Zellen (0,15% IFN $\gamma$ -Produzenten). Als IFN $\gamma$ -Quelle unter den CD4-negativen Zellen kommen vor allem CD8-positive T-Zellen oder NK-Zellen in Frage. Es wurde deutlich, dass IL-2 alleine den Anteil an IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen erhöhte. Die Kombination mit anderen Zytokinen oder LPS führte stets zu einer Verringerung der IFN $\gamma$ -Produzenten.

IL-7 alleine ist für das Wachstum IFN $\gamma$ -produzierender Zellen unbedeutend und führte in keinem der Fälle zu einer nennenswerten IFN $\gamma$ -Produktion (Abb.8).

### A) IL-17-Produktion CD4-positive Zellen



### B) IL-17-Produktion CD4-negative Zellen



**Abb.9 IL-17-Produktion von CD4-positiven und CD4-negativen Zellen im Überblick, die jeweils mit IL-7 bzw. IL-7/IL-2 stimuliert wurden.**

Lymphknotenzellen von B6.WT-Mäusen wurden für 7 Tage in Nährmedium gehalten und an Tag 1 mit anti-CD3 und einem Zytokinmix (CM) aus IL-6, TGF $\beta$ , anti-IL-4 und anti-IFN $\gamma$  stimuliert. Zusätzlich erhielt ein Teil der Proben an Tag 1 LPS. Die weitere Stimulation erfolgte an Tag 3 und 5 durch IL-7 bzw. IL-7/IL-2, ebenso wie dem CM. Nach dem Ernten erfolgte eine Analyse der IL-17-produzierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie.

(A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil IFN $\gamma$ -produzierender Zellen an CD4<sup>+</sup> Zellen.

(B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil IFN $\gamma$  produzierender Zellen an CD4<sup>-</sup> Zellen (Gepoolte Zellen aus 3 Wells).

Im Gegensatz zu den Daten bezüglich der IFN $\gamma$ -Produktion förderte IL-7 das Wachstum IL-17-produzierender Zellen.

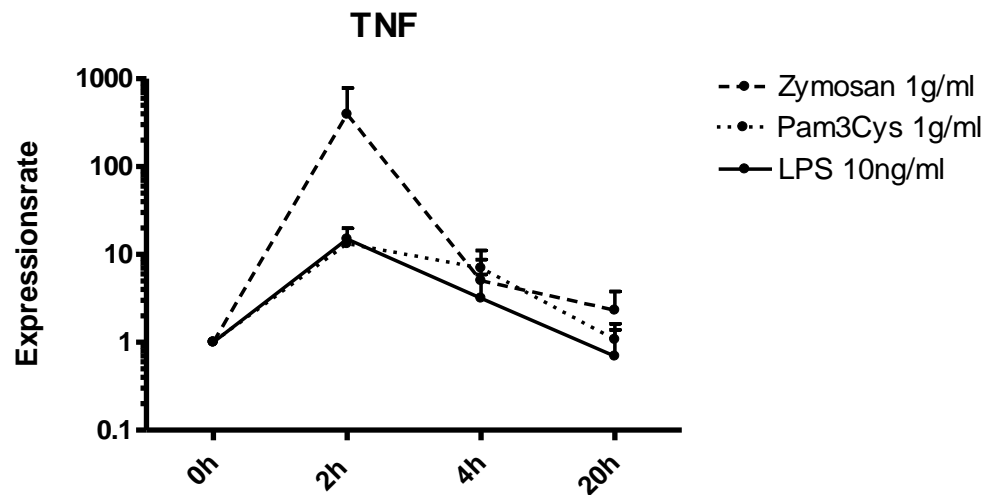
Dieser Effekt zeigte sich besonders bei den CD4-negativen Zellen, aber auch bei den CD4-positiven Zellen war die alleinige Stimulation mit IL-7 für das Wachstum IL-17-produzierender Zellen besser geeignet als die Kombination von IL-7 mit dem konventionell verwendeten Zytokinmix aus IL-6, TGF $\beta$ , anti-IFN $\gamma$  und anti IL-4.

Eine zusätzliche Steigerung der IL-17-Produktion bewirkte außerdem der TLR-Agonist LPS in Kombination mit IL-7, was ebenfalls für CD4-positive und CD4-negative Zellen der Fall war. IL-2 blockierte unter allen Stimulationsbedingungen das Wachstum von IL-17-Produzenten, solange kein LPS hinzugefügt wurde. Bei zusätzlicher TLR-Stimulation mit LPS erfolgte die Hemmung der IL-17 Produktion nur noch bei den CD4-negativen Zellen (Abb.9).

### **3.2 Induktion der IL-17-Expression durch Stimulation mit den TLR-Liganden LPS, Zymosan und Pam3Cys**

Unsere vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass LPS einen günstigen Effekt auf die IL-17-Produktion besitzt (Abb.9). Der positive Effekt der LPS-Stimulation auf die IL-17-Produktion von Lymphknotenzellen kann indirekt durch eine Aktivierung von Dendritischen Zellen, Monozyten und B-Zellen verursacht werden, die daraufhin eine Th17-polarisierte Immunantwort induzieren. Als weiterer Ansatzpunkt kann aber auch ein direkter Effekt auf die IL-17-produzierenden Zellen angenommen werden, da wir in früheren Arbeiten bereits dokumentierten, dass auch CD4-positive T-Zellen TLR1, 2, 4, 6, und 9 exprimieren (Tab.2). Im Folgenden untersuchten wir daher, die IL-17-Expression von Milzzellen nach Stimulation mit LPS, Zymosan und Pam3Cys zu verschiedenen Zeitpunkten nach in vitro-Stimulation mittels RT-PCR. Die Ermittlung der optimalen Konzentration der TLR-Liganden erfolgte dabei in Vorversuchen. Um zu überprüfen, ob die Stimulation erfolgreich war, wurde zunächst die TNF-Expression bestimmt.

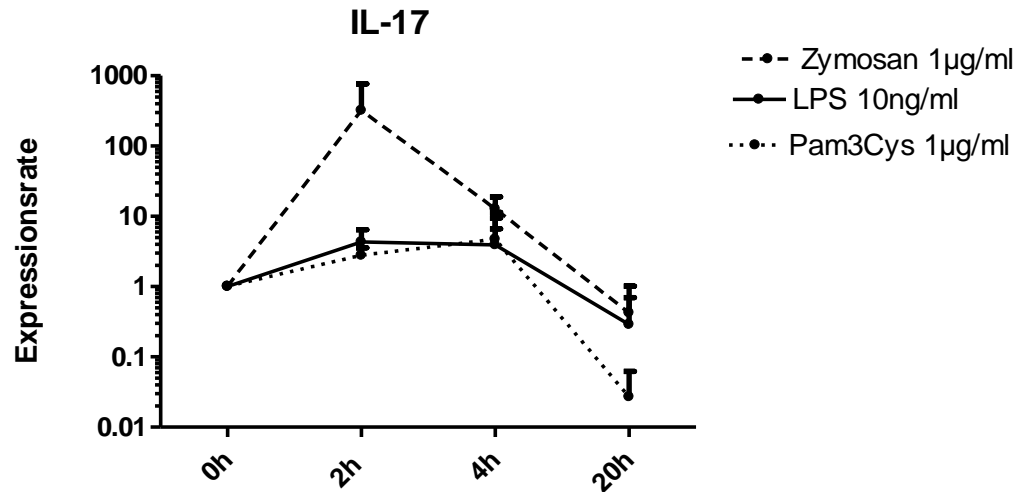




**Abb.10 TNF-Expressionsrate nach Stimulation mit Zymosan, LPS und Pam3Cys**

Milzzellen aus B6.WT-Mäusen wurden in Nährmedium kultiviert und durch verschiedene TLR-Agonisten je nach Probe für 2, 4 und 20h stimuliert. Nach der Stimulation erfolgte eine RNA-Isolation, die in cDNA umgeschrieben wurde. Im Anschluss wurde zur Bestimmung der Expressionsrate von TNF eine Real-Time-PCR durchgeführt (n=2).

Es zeigte sich, dass die TNF-Expressionsrate erwartungsgemäß vor allem direkt nach Stimulation (2h) anstieg, um danach wieder abzufallen. Mit Zymosan wurden dabei die höchsten Expressionsraten erreicht, Pam3Cys und LPS hatten einen vergleichbaren Effekt auf die TNF-Expression. Aus den TNF-Expressionsraten war erkennbar, dass es sich um eine erfolgreiche Stimulation handelte (Abb.10).



**Abb.11 IL-17-Expressionsrate nach Stimulation mit Zymosan, LPS und Pam3Cys**

Milzzellen aus B6.WT-Mäusen wurden in Nährmedium kultiviert und durch verschiedene TLR-Agonisten je nach Probe für 2, 4 und 20h stimuliert. Nach der Stimulation erfolgte eine RNA-Isolation, die in cDNA umgeschrieben wurde. Im Anschluss wurde zur Bestimmung der Expressionsrate von IL-17 eine Real-Time-PCR durchgeführt (n=2).

Eine Induktion der IL-17-Expression konnte durch Stimulierung mit allen drei TLR-Liganden erreicht werden. Am wirksamsten war dabei die Stimulierung mit Zymosan nach 2h, während die IL-17-Expressionsrate nach 4h bereits wieder deutlich abgefallen war und sich an die IL-17-Expression, die durch LPS und Pam3Cys erreicht wurde, annäherte.

Die Expressionsraten nach LPS Stimulation erreichten zwischen 2 und 4h ein Plateau um danach wieder zu sinken, unter der Stimulation mit Pam3Cys steigerten sich die Expressionsraten bis 4h und sanken dann ebenso.

Alle drei Stimulanzen zeigten eine Tendenz nach 20h unter die unstimulierte Expressionsrate (0h) abzufallen, besonders ausgeprägt jedoch Pam3Cys (Abb.11).

## 4 Diskussion

Th17-Zellen sind seit ihrer Entdeckung als Subpopulation der CD4-positiven T-Zellen Gegenstand intensiver Forschung. Neben ihrer Beteiligung an Autoimmunkrankheiten (Kolls, Lindén 2004), wird ihnen auch eine wichtige Aufgabe bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene zugeschrieben und eine Vermittlerrolle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (Aujla et al. 2007), (Stockinger et al. 2007b). Wichtige Wachstumsfaktoren für ihre Proliferation in vitro sind TGF $\beta$  und IL-6, ebenso bewirkt eine Neutralisierung von IFN $\gamma$  und IL-4 eine Blockierung in Richtung Th1- und Th2-Zellen und eine relative Expansion von Th17-Zellen (Stockinger, Veldhoen 2007). Zahlreiche Arbeitsgruppen verwenden diese Stimulation daher als konventionelles Protokoll zur in vitro Kultur von Th17-Zellen. Obwohl Th17-Zellen nach dem aktuellen Stand funktionell wichtig für die Abwehr mikrobieller Erreger sind, bleibt bislang jedoch offen, durch welche Signale es im Verlauf einer ursprünglich protektiven Immunantwort zu einer Weichenstellung kommt, die zu einer chronischen Entzündungsreaktion führt, oder durch die es zur Ausbildung einer Autoimmunkrankheit kommt.

### 4.1 Die Auswirkung von IL-7 auf die Th17-Antwort

IL-7 gilt generell als wichtiger Differenzierungsfaktor für B- und T-Zellen und spielt vor allem für Th-Gedächtniszellen als Überlebensfaktor eine essentielle Rolle (Hofmeister et al. 1999), (Chetoui et al. 2010). Phänotypisch exprimieren Th17-Zellen CD44 und CD69, sind jedoch negativ für CD62L (Pötzl November 2008). Dies sind Marker für T-Zellen, die bereits Kontakt mit Antigenen hatten, wie T-Effektor- und T-Gedächtniszellen (Pure, Cuff 2001). Studien zeigen auch, dass es durch IL-23 zur Hochregulation des IL-7R $\alpha$  auf bereits aktivierten Th17-Zellen kommt (McGeachy et al. 2009). Auch wir konnten in früheren Arbeiten feststellen, dass Th17-Zellen IL-7R $\alpha$ -positiv sind (Pötzl, unpublizierte Daten) wobei die funktionelle Bedeutung des IL-7R $\alpha$  für Th17-Zellen bislang unklar ist.

Aufgrund dieser phänotypischen Eigenschaften von Th17-Zellen testeten wir die Wirkung von IL-7 auf diese Th-Zell-Subpopulation. Dabei zeigte sich, dass man nach einmaliger Stimulation mit IL-6 und TGF $\beta$  durch alleinige IL-7-Stimulation an den Folgetagen einen höheren Anteil an CD4-positiven IL-17-Produzenten erhält, als in einer Kombination der konventionellen Th17-Stimulationsbedingungen (TGF $\beta$ , IL-6, anti-IFN $\gamma$ , anti-IL-4) mit IL-7. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass IL-7 als

Überlebensfaktor für Th17-Zellen eine größere Rolle spielt, als bislang angenommen wurde. In Korrelation zu diesem Ergebnis zeigen Studien, dass Patienten mit Autoimmunkrankheiten wie Sjögren Syndrom, Rheumatoider Arthritis oder auch Chronischer Colitis erhöhte IL-7 Serum- bzw. Speichelspiegel aufweisen (Hartgring et al. 2006), (Totsuka et al. 2007).

In dieser Arbeit zeigte sich aber auch, dass der höchste Anteil an IL-17-Produzenten, der durch IL-7-Stimulation erreicht werden konnte, CD4-negativ war. Als Grund hierfür kann angeführt werden, dass der CD4-Rezeptor, wie auch eine Reihe von anderen Oberflächenmolekülen nach Stimulation in vitro herunter reguliert wird (Elliott et al. 2000). Ebenso produzieren zahlreiche andere IL-7-responsive Immunzellen, wie z.B.  $\gamma\delta$  T-Zellen, ebenfalls IL-17.  $\gamma\delta$  T-Zellen sezernieren im Verlauf einer Infektion mit E.coli bereits frühzeitig IL-17 (Shibata et al. 2007), und steuern bei einer Immunantwort nach Infektion mit *M. tuberculosis* den Hauptanteil an IL-17A bei (Lockhart et al. 2006). Die Tatsachen, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen ebenfalls IL-17R $\alpha$  exprimieren (Jameson, Havran 2007) und IL-7 und IL-15 abhängig proliferieren unterstützen diese These (Baccala et al. 2005).

Neben  $\gamma\delta$  T-Zellen kommen auch NK-T-Zellen und Lymphoid-tissue inducer (Lti)-like-Zellen (Takahashi et al. 2008), (Colonna 2009), (Doisne et al. 2009). (Sato-Takayama et al. 2008) als mögliche Quelle von IL-17 in Frage. All diesen Zellen ist gemeinsam, dass sie wichtige Rollen in der Überwachung von Geweben mit Barrierefunktion wie z.B. Darm, Rachenschleimhaut, Lunge und Haut einnehmen. Eine nachgewiesene Verbindung zwischen IL-7-Stimulation und IL-17-Expression für die oben genannten Immunzellpopulationen findet sich in der Literatur bisher allerdings nicht.

IL-7 gehört zu den Mitgliedern der gemeinsamen  $\gamma_c$ -Kette ( $\gamma_c$ )-Zytokinfamilie, wie IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 und IL-21. Rezeptoren der  $\gamma_c$ -Familie binden und aktivieren Janus Kinasen (JAK1 und JAK3). Diese phosphorylieren spezifische Transkriptionsfaktoren, die *signal-transducers-and-activators-of-transcription* (STAT), welche dimerisieren und nach Translokation in den Zellkern die Transkription von Genen induzieren (Rochman et al. 2009). Der Rezeptor für IL-7 besteht dabei aus dem Heterodimer der  $\gamma_c$ - und der IL-7R $\alpha$ -Kette. Intrazellulär können dadurch STAT1, 3 und 5 aktiviert werden, wobei die Kaskade über STAT5 für IL-7 die wichtigste Rolle spielt (Rosenthal et al. 1997), (Adamson et al. 2009). Unsere Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass der Signalweg von IL-7 bei der Induktion IL-17-produzierender Zellen

nicht über STAT5 verläuft, da es über STAT5 zur Expansion von Treg und Th2 Zellen kommt und dies zu einer Inhibition von Th17-Zellen führen würde (Adamson et al. 2009). Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass ebenso wie bei IL-6 der Signalweg über STAT3 aktiviert wird, der zu einer Hochregulation des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t führt, und somit IL-17 Produktion induziert.

## 4.2 IL-2

IL-2, ein weiteres Mitglied der  $\gamma_c$ -Familie ist ebenso wie IL-7 ein Überlebensfaktor für T-Zellen und in vitro für das Wachstum von Th1-Zellen wichtig (Letourneau et al. 2009). Dies zeigte sich auch in dieser Arbeit. In der Kombination von TGF $\beta$ , IL-6, anti-IFN $\gamma$  und anti-IL-4 mit IL-2 weisen die Zellen einen erhöhten Anteil an IFN $\gamma$ -Produzenten (z.B. Th1-Zellen) auf. In diesen Versuchsansätzen zeigte sich auch, dass IL-2 in vitro den Anteil CD4-positiver IL-17-Produzenten senkte. Es bleibt jedoch offen, durch welche molekularen Mechanismen dies erfolgt. IL-2 zeigt in Bezug auf seine intrazelluläre Signalkaskade ein sehr ähnliches Profil wie IL-7. Neben STAT1 und 3 wird hier ebenfalls hauptsächlich der Transkriptionsfaktor STAT5 aktiviert (Adamson et al. 2009). Da die Differenzierung von Th17-Zellen durch STAT3 und ROR $\gamma$ t reguliert wird, kommen für die durch IL-2 ausgelöste Inhibition der Th17-Zellgenerierung, mehrere Möglichkeiten in Frage, die im Folgenden näher erläutert werden sollen. STAT5 bindet an den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t und führt so direkt zur Inhibition der Expression Th17-spezifischer Gene. Des Weiteren bewirkt eine Aktivierung von STAT5 eine Hochregulation des inhibitorischen Regulatorproteins Socs3, was zu einer Hemmung von STAT3 führt und damit zu verminderter IL-17-Expression (Chen et al. 2006). Eine essentielle Rolle kommt dem Hauptsignalweg der IL-2-Signaltransduktion über STAT5 außerdem bei der Induktion des Transkriptionsfaktors Foxp3, der vor allem von Treg-Zellen exprimiert wird, zu. Auch Foxp3 bindet an ROR $\gamma$ t und blockiert dadurch die Expression Th17-spezifischer Gene (Ichiyama et al. 2008), (Burchill et al. 2007).

Treg-Zellen wirken anti-inflammatorisch und sind damit im Gegensatz zu den pro-inflammatorischen Th17-Zellen für die negative Regulation der Immunantwort zuständig. Trotz dieser gegensätzlichen Funktion stehen Treg-Zellen in Bezug auf ihren Differenzierungsweg mit Th17-Zellen eng in Verbindung (Shevach et al. 2006). TGF $\beta$  alleine induziert über den Transkriptionsfaktor Foxp3 die Differenzierung von Treg-Zellen aus naiven T-Zellen. Eine Kombination aus TGF $\beta$  und dem

Akutphasenprotein IL-6 hingegen hemmt die Entstehung von Treg-Zellen und ist essentiell für die Differenzierung von Th17-Zellen (Bettelli et al. 2006). Diese Dichotomie von Th17-Zellen und Treg-Zellen zeigt sich auch bei der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten, bei der es zu einer Dysbalance zwischen Th17-Zellen und Treg-Zellen kommt, und dadurch zu einer ungebremsten Immunantwort. Ausgehend von diesen Erkenntnissen vermuteten wir daher, dass IL-2 an dem Erhalt einer Balance dieser beiden Zellsubpopulationen beteiligt ist und auf die Expansion von Th17-Zellen einen inhibitorischen Effekt ausübt. Bislang gibt es bereits Erkenntnisse darüber, dass ein Mangel an IL-2 mit Autoimmunkrankheiten assoziiert ist. So entwickeln z.B. IL-2-defiziente Mäuse Autoantikörper, die zu hämolytischen Anämien führen, und auf die Fehlregulation von Treg-Zellen zurückgeführt wurden (Suzuki et al. 1995). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen aber auch nahe, dass es bei einer IL-2-Defizienz zusätzlich zu dem bereits beschriebenen relativen Mangel an Treg-Zellen, zu einer fehlenden Hemmung der IL-17-Produktion und somit zu einem Überschießen der Th17 Immunantwort kommen könnte.

#### **4.3 Stimulation von IL-17-Produktion durch TLR**

Während im Laufe der Jahre einige Zytokine erschlossen wurden, die zur Th17-Differenzierung beitragen, wurden auch immer mehr mikrobielle Bestandteile entdeckt, die über TLR-Aktivierung auf APC einen Th17-induzierenden Stimulus bewirken. TLR spielen eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem und knüpfen so eine Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (Akira, Takeda 2004). Diese Bedeutung zeigt sich auch in Bezug auf Th17-Zellen: lösliche Botenstoffe in den Zellüberständen von TLR-aktivierten mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PMBC) induzieren in Th-Zellen unabhängig von einem direkten Zell-Zell Kontakt, eine erhöhte IL-17-Expression (Kattah et al. 2008). Ebenso führt die epikutane Applikation von TLR-Agonisten in C57BL/6 und BALB/c Mäusen zur Generierung von Th17-Zellen (Wang et al. 2009).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch Zugabe von LPS im Vergleich zu den vorangehenden Stimulationen eine Steigerung der IL-17-Produktion sowohl durch CD4-positive, als auch CD4-negative Zellen erreicht werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die TLR-Stimulation auf APC zur Produktion von IL-6, IL-1 und TNF führt und so die Th17-Zelldifferenzierung vorantreibt. Zusätzlich sezernieren

stimulierte APC IL-23, welches zusätzlich einen wichtigen Überlebensfaktor für Th17-Zellen darstellt (Veldhoen et al. 2006b).

Neben APC tragen auch T-Zellen TLR, deren Expression vom jeweiligen Aktivierungsstatus der T-Zelle abhängig ist und dementsprechend reguliert wird. CD4-positive T-Zellen z.B. reagieren auf eine Stimulation ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) mit einer Hochregulierung des TLR2 und TLR4, während die Expression von TLR5 dadurch herunter reguliert wird (Komai-Koma et al. 2004), (Crellin et al. 2005). Komai-Koma et al. zeigten, dass der TLR2 auf CD4-positiven T-Zellen durchaus von funktioneller Bedeutung ist, da die Zellen über den entsprechenden TLR-Liganden kostimuliert werden können (Komai-Koma et al. 2004).

Unbekannt ist bisher, ob die direkte Stimulation von T-Zellen mit TLR-Agonisten unabhängig von APC die Produktion von Zytokinen induzieren kann. Johannes Pötzl konnte in seiner Arbeit zeigen, dass Th17-Zellen sowohl TLR1 als auch TLR6 exprimieren (Pötzl November 2008). Beide Rezeptoren bilden Heterodimere mit TLR2 (Underhill 2003), (Pasare, Medzhitov 2005). TLR2 konnte auf RNA-Ebene in unseren Arbeiten bisher nicht nachgewiesen werden. Dies könnte, wie oben bereits erwähnt, in einer unzureichenden Aktivierung der T-Zellen begründet sein.

Wir testeten daher in dieser Arbeit die Auswirkung der Stimulation mit spezifischen TLR-Liganden auf die IL-17-Expressionsraten von Milzzellen. Unter den Stimulanzen bewirkte Zymosan nach bereits 2 Stunden die höchste IL-17-Expressionsrate. Dieser Zellwandbestandteil von *Saccharomyces cerevisiae* induziert eine Entzündungsreaktion vor allem über ein Heterodimer von TLR2 und TLR6 (Ozinsky et al. 2000). Man könnte daher vermuten, dass die IL-17-Produktion durch Zymosanstimulation über einen TLR6-abhängigen Weg Th17-Zellen direkt aktiviert. Zu zeigen bleibt, dass isolierte Th-Zellen APC-unabhängig auf einen TLR-6 Stimulus mit erhöhter IL-17-Expression reagieren. Methodenbedingt lassen sich in dieser Arbeit auch keine sicheren Rückschlüsse auf Th17-Zellen als Ursprung der IL-17-Zytokinproduktion schließen.

#### **4.4 Induktion der IL-17-Produktion im Verlauf einer Infektion und während einer chronischen Entzündung**

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit und aus der Literatur folgendes Modell zur Rolle von Th17-Zellen während einer Infektion oder aber einer chronischen Entzündung entwickeln. Kommt es im Organismus zu einer Infektion wie es in unseren Versuchen z.B. durch einen starken Entzündungsstimulus wie Zymosan oder LPS simuliert wurde, findet man sehr früh IL-17-produzierende Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt Erkenntnisse aus der Literatur, die den Th17-Zellen eine Rolle als Verbindungsglieder zwischen angeborener und adaptiver Immunität zuweisen (Khader et al. 2007). Diese These wird auch von der Tatsache gestützt, dass Th 17-Zellen bereits an der frühen Phase einer Immunantwort beteiligt sind und für die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle spielen (Witowski et al. 2000). Im weiteren Verlauf der Infektion jedoch kommt es zur Ausbildung einer adaptiven Immunantwort und das Zytokinmilieu ändert sich. Es werden vermehrt IL-4 und IFN $\gamma$  produziert, wodurch die Th1- und Th2-Zellen Immunantwort aktiviert werden. Des Weiteren steigt die Konzentration an IL-2. Die erhöhten IL-2 Spiegel könnten eine Erklärung dafür sein, dass sich die Anzahl von Th17-Zellen nach Beginn einer Infektion relativ schnell reduziert (Pötzl November 2008).

Interessanterweise deuten die in vitro Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Inhibition durch IL-2 auf IL-17 Produzenten nur funktioniert, so lange kein starker pro-inflammatorischer Stimulus vorhanden ist. Denn in Kombination mit LPS entfaltet IL-2 keinen inhibitorischen Effekt auf die IL-17-Produktion.

In Korrelation zeigten Veldhoen et. al, dass Treg-Zellen indirekt auch zu einem erhöhten Anteil von Th17-Zellen führen können und begründen dies damit, dass Treg in Dendritischen Zellen (DC) IL-10-Produktion induzieren, welches IL-12 hemmt und dadurch die Differenzierung von Th17-Zellen unterstützt (Veldhoen et al. 2006a). Eine weitere Ursache könnte auch die starke Suppression von Th1- und Th2- Zellen durch Treg-Zellen sein, wodurch die Produktion von IL-4 und IFN $\gamma$  zusätzlich unterdrückt wird, und die Tatsache, dass Treg-Zellen die Expression von TGF $\beta$  in DC stimulieren, welches für Th17-Zellen, ebenso wie für Treg-Zellen einen wichtigen Wachstumsfaktor darstellt. Zusätzlich wird bei Stimulation mit LPS vermehrt IL-23 gebildet, das den Th17-Phänotyp weiter stabilisiert (Hue et al. 2006).



Alles in allem erscheint es sinnvoll, dass die Inhibition auf Th17-Zellen durch IL-2 vor allem unter Bedingungen stattfindet, unter denen die Entzündung nur gering stattfindet, wie sie beim Abklingen einer Immunreaktion vorherrschen. In dieser Situation können Treg-Zellen ihrer Aufgabe nachkommen T-Zellaktivierung und – Proliferation zu inhibieren und somit vor der Entwicklung von chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunkrankheiten zu schützen.

Eine Störung des Gleichgewichts zwischen anti- und pro-inflammatorischer Immunreaktion könnte unter folgender Situation entstehen. Während einer Infektion kommt es, vor allem durch die damit verbundene Stimulation mit TLR-Agonisten wie z.B. LPS und weiteren bakteriellen Komponenten, zu einem starken Entzündungsstimulus. Epidemiologisch gibt es Hinweise darauf, dass vorangehende Infekte mit rezidivierenden Schüben von Autoimmunkrankheiten wie z.B. Exazerbationen der Multiplen Sklerose vergesellschaftet sind (Buljevac et al. 2002). Im Anschluss an eine Infektion läuft eine Autoimmunkrankheit, auch wenn sie initial z.B. durch TLR-Agonisten ausgelöst wurde (Wucherpfennig 2001), in unserer Vorstellung auf einem eher niedrigen Stimulationsniveau ab. Das veränderte Zytokinmilieu kann dazu führen, dass Th17-Zellen in dieser Situation wichtige Überlebenssignale erhalten, die für die Aktivierung anderer T-Zellsubpopulationen nicht ausreichend sind. Ein solches Signal kann z.B. IL-7 darstellen und ist wie folgt zu erklären: naive CD4-positive T-Zellen, die in getrennten Proben durch Zytokine stimuliert wurden, die jeweils spezifisch für die Differenzierung von Th1-, Th17- und Treg-Zellen sind, weisen nach 4 Tagen unterschiedlich hohe Expressionsraten für IL-7R $\alpha$  auf (Liu et al. 2010). Übertragen auf die Situation in einer Autoimmunkrankheit könnte dies bedeuten, dass IL-17-produzierende Zellen aufgrund ihrer Rezeptordichte unter bestimmten Bedingungen sehr viel sensibler auf Wachstumsfaktoren reagieren als andere T-Zellen und dadurch wesentlich stärker proliferieren.

Sicherlich muss die Entstehung einer Autoimmunkrankheit als multifaktorieller Prozess betrachtet werden, zu dem dieser Erklärungsansatz nur einen Teil beiträgt.

In Entwicklungsländern z.B. lässt sich mit zunehmender Industrialisierung auch ein Anstieg von solchen Krankheiten verzeichnen (Shapira et al. 2010), was darauf hindeutet, dass neben intrinsischen Faktoren auch die Umwelt eine große Rolle spielt.

#### 4.5 Implikation dieser Arbeit für Therapieansätze

Liu et al. konnten vor kurzer Zeit zeigen, dass ein selektiver Antagonist des IL-7R $\alpha$  wirksam für die Reduktion von Th17-Zellen im Mausmodell der EAE ist (Liu et al. 2010). Dabei wurden Th1- und Treg- Zellen, die den IL-7R $\alpha$  auf einem niedrigeren Niveau ebenfalls exprimieren, nur wenig beeinträchtigt. Sollte sich dies auf den Menschen übertragen lassen, wäre es evtl. eine Möglichkeit bereits differenzierte Th17-Zellen von Patienten mit Autoimmunkrankheiten in ihrer Funktion zu beeinträchtigen und den Kreislauf der chronischen Entzündungsreaktion zu unterbrechen.

IL-2 wurde initial aufgrund seines wachstumsfördernden Effekt auf T-Zellen in vitro entdeckt. Daher fand es Verwendung in Therapieversuchen bei Patienten mit abgeschwächtem Immunsystem wie Krebs- und HIV-Patienten (Chetoui et al. 2010), (Liu, Zhao 2007). Doch die Tatsache, dass IL-2-defiziente Mäuse häufiger Autoimmunkrankheiten entwickeln, führte schließlich zu der Erkenntnis, dass IL-2 wohl ebenso ein wachstumslimitierender Faktor für T-Zellen sein muss. Heutzutage ist bekannt, dass dies auf den wachstumsfördernden Effekt von IL-2 auf Treg-Zellen zurückzuführen ist (Burchill et al. 2007). Im Gegensatz dazu haben Studien vor kurzem aber auch gezeigt, dass IL-2 offensichtlich in hoher Konzentration auch zur Differenzierung von CD4-positiven und CD8-positiven Gedächtniszellen führt (Stockinger 2007), (Stockinger, Veldhoen 2007). Ein solcher Effekt ist bei autoimmunen Prozessen selbstverständlich nicht erwünscht und lässt in Bezug auf Therapiemöglichkeiten mit IL-2 auf eine äußerst geringe therapeutische Breite schließen. Das zeigen auch Versuche mit NOD Mäusen in denen hohe Dosen von IL-2 die Bildung von Inselzellautoantikörper beschleunigten und dadurch zu einem Typ1 Diabetes führten, während niedrige IL-2-Konzentrationen dieses Entgleisen durch Wachstum von Treg-Zellen verhindern konnten (Stockinger et al. 2007a). Um von einem inhibitorischen Effekt von IL-2 auf Th17-Differenzierung profitieren zu können, scheint es daher notwendig, verschiedene Signalwege des Zytokins weiter zu entschlüsseln und dadurch spezifischere Ansatzpunkte für eine gezielte anti-inflammatorische Therapie zu ermitteln. Die Signaltransduktion nach Stimulation des IL-2 Rezeptors bietet diesbezüglich diverse Möglichkeiten, da IL-2 über STAT1, 3 und 5 verschiedene Wege aktiviert, um die Transkription von pro- aber auch anti-inflammatorischen Genen zu induzieren.

Ein Beispiel für ein solches Medikament ist Rapamycin, das bislang als Immunsuppressivum bei akuter Transplantatabstoßung verwendet wird. Battaglia et al. gelang es mit Hilfe von Rapamycin gezielt CD4+CD25+Foxp3<sup>+</sup>-Zellen zu expandieren, während CD4+CD25<sup>-</sup> T-Effektorzellen inhibiert wurden. Die Arbeitsgruppe führt diesen spezifischen Effekt auf die Hemmung des mTOR-vermittelten IL-2-Signalwegs zurück, der mit dem Wachstum von Treg-Zellen nicht interferiert (Battaglia et al. 2005). Die Erweiterung unseres Verständnisses von Zytokinsignalwegen ist daher sicherlich notwendig für das Entwickeln gezielter Therapien gegen T-Zell vermittelte Krankheiten.

Obwohl TLR bereits seit Langem als wichtige Strukturen zur Erkennung mikrobieller Strukturen gelten, wird immer deutlicher, dass sie durch Erkennung körpereigener Strukturen bei der Beseitigung apoptotischer Zellen und der Bereinigung verletzen Gewebes wichtige Aufgaben übernehmen. Das Auffinden endogener TLR-Agonisten bietet daher für die Ätiologie autoimmuner Krankheiten neue Erklärungsansätze (Brentano et al. 2005), (Wiersinga, van 2005). Auch für Th17-Zellen könnten endogene TLR-Agonisten als Wachstumsstimulus von Bedeutung sein und so eine Erklärung liefern, warum diese Th-Zellen besonders mit chronischen Entzündungen assoziiert sind. Für zahlreiche Autoimmunkrankheiten konnte bereits gezeigt werden, dass diese mit bestimmten TLR-Polymorphismen korrelieren. Dabei spielen für atopische Krankheiten wie Asthma z.B. TLR2- und TLR4-Polymorphismen eine Rolle (Smit et al. 2007). Auch für Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn gibt es Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass sie mit einem bestimmten TLR4-Polymorphismus assoziiert sind (Franchimont et al. 2004). Erfolgversprechende Arbeiten im Mausmodell gibt es bereits für die Anwendung von TLR7- und TLR9-Inhibitoren, die die IFN $\alpha$ -Expression hemmen, was die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie den Systemischen Lupus Erythematoses oder Psoriasis verzögern könnte. Eine solche Therapie hat den Vorteil einer sehr spezifischen Wirkung ohne zu sehr in protektive Teile der Immunabwehr zu interferieren (Barrat, Coffman 2008). Sollte sich zeigen, dass die erhöhte IL-17-Expression in weiteren autoimmunen Prozessen ebenfalls in Zusammenhang mit TLR-Polymorphismen gebracht werden kann, bietet dies neue Ansätze einer weitaus gezielteren Therapie, als es sie bisher gibt.

## 5 Zusammenfassung

Th17-Zellen sind seit ihrer Entdeckung als Subpopulation der CD4-positiven T-Zellen Gegenstand intensiver Forschung. Neben ihrer Beteiligung an Autoimmunkrankheiten wird ihnen auch eine wichtige Aufgabe bei der Abwehr extrazellulärer Pathogene zugeschrieben und eine Vermittlerrolle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Wichtige Wachstumsfaktoren für ihre Proliferation in vitro sind TGF $\beta$  und IL-6. Obwohl Th17-Zellen nach dem aktuellen Stand funktionell wichtig für die Abwehr mikrobieller Erreger sind, bleibt bislang jedoch offen, durch welche Signale es im Verlauf einer ursprünglich protektiven Immunantwort zu einer Weichenstellung kommt, die zu einer chronischen Entzündungsreaktion führt, oder durch die es zur Ausbildung einer Autoimmunkrankheit kommt. Es ist daher essentiell, weitere Faktoren zu detektieren, die sich positiv oder negativ auf das Wachstum von Th17-Zellen auswirken.

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass sich neben IL-6 und TGF $\beta$  auch das Zytokin IL-7 positiv auf das Wachstum von Th17-Zellen in vitro auswirkt. Diese Ergebnisse korrelieren mit Studien, in denen nachgewiesen wurde, dass Patienten mit Autoimmunkrankheiten wie Sjögren Syndrom, Rheumatoider Arthritis oder auch Chronischer Colitis erhöhte IL-7 Serum- bzw. Speichelspiegel aufweisen. Der Signalweg von IL-7 könnte dabei ähnlich wie bei IL-6 über STAT3 aktiviert werden, was in weiteren Versuchen zu zeigen bleibt.

Einen negativen Effekt übte dagegen IL-2 aus, das in vitro den Anteil CD4-positiver IL-17-Produzenten senkte. Es zeigte sich jedoch, dass dieser Effekt durch einen starken Entzündungsstimulus wie z.B. LPS abgeschwächt werden kann.

Die Differenzierung von naiven T-Zellen in aktivierte Th17-Zellen kann neben Zytokinen auch durch Bestandteile von Bakterien und Pilzen induziert werden. Diesbezüglich erreichten wir in vitro vor allem mit dem Pilzwandbestandteil Zymosan erhöhte IL-17-Expressionsraten in Milzzellen. Es bleibt zu zeigen, ob dieser Effekt aufgrund einer indirekten Stimulation über antigen-präsentierende Zellen stattfindet oder ein direkter Weg über TLR6-Stimulation existiert. Diesen Rezeptor exprimieren auch Th17-Zellen selbst, unklar ist bisher jedoch seine funktionelle Bedeutung.

**Abstract**

Since their discovery as an essential subset of CD4-positive T-cells, Th17-T-Cells have been the focus of intensive research. Along with their involvement in autoimmune diseases, they seem to fulfill an important response in the defense of extracellular pathogens and are obviously also a major link between innate and adaptive immunity. For differentiation in vitro, IL-6 and TGF $\beta$  are necessary growth factors. Nowadays Th17-T-cells are considered to be essential in defending microbial pathogens, however, it is still not clear which signals initiate the development from an originally protective immunological response into a chronic response of inflammation or autoimmune disorder. Therefore, it is essential to detect more significant factors that influence the differentiation of Th17-T-cells in a positive or negative aspect.

In my dissertation, I could show that, along with IL-6 and TGF $\beta$ , the cytokine IL-7 also induces Th17-associated cytokine secretion.

These results are consistent with studies that show elevated serum and saliva-levels of IL-7 in patients with Rheumatoid Arthritis, Sjögren Syndrome and Chronic Colitis.

In regards to this, the signaling pathway of IL-7 might also use STAT3, like IL-6 does, which needs to be verified in further experiments.

In contrast, IL-2 achieved an inhibition of CD4-positive IL-17 producing T-cells. However this effect was less remarkable in an environment of strong inflammation, for example with LPS.

Beside cytokines, the differentiation of Th17-T-cells can also be induced by bacterial or fungal components. Referring to this, we could achieve elevated expression rates of IL-17 in murine spleen cells stimulated by Zymosan, a cell-wall preparation from *Saccharomyces cerevisiae*. Nevertheless it still needs to be verified if this effect is achieved by a direct pathway of TLR-6 dependent stimulation or if Antigen-presenting cells are responsible for the delineated effects.

TLR6-receptors for example, are also expressed by Th17-T-cells themselves, however, their functional response is still not clear.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abb.1 MyD88-abhängiger und MyD88-unabhängiger TLR-Signalweg, modifiziert nach Takeda, Akira 2004.....	14
Abb.2 IL-17-Produktion von Lymphknotenzellen nach in vitro-Stimulation .....	34
Abb.3 IFN $\gamma$ -Produktion von Lymphknotenzellen nach in vitro-Stimulation.....	35
Abb.4 Zytokinproduktion CD4-positiver nach Stimulation mit IL-7 bzw. IL-7/IL-2 .....	36
Abb.5 Zytokinproduktion CD4-positiver Zellen nach zusätzlicher TLR-Stimulation .....	38
Abb.6 Zytokinproduktion CD4-negativer Zellen nach Stimulation mit IL-7 bzw. IL-7/IL-2 .....	40
Abb.7 Zytokinproduktion CD4-negativer Zellen nach zusätzlicher TLR-Stimulation .....	42
Abb.8 IFN $\gamma$ -Produktion von CD4-positiven und CD4-negativen Zellen im Überblick, die jeweils mit IL-7 bzw IL-7/IL-2 stimuliert wurden. ....	44
Abb.9 IL-17-Produktion von CD4-positiven und CD4-negativen Zellen im Überblick, die jeweils mit IL-7 bzw. IL-7/IL-2 stimuliert wurden.....	46
Abb.10 TNF-Expressionsrate nach Stimulation mit Zymosan, LPS und Pam3Cys .....	49
Abb.11 IL-17-Expressionsrate nach Stimulation mit Zymosan, LPS und Pam3Cys .....	50

## 7 Tabellenverzeichnis

Tab.1 Tabelle der TLR-Liganden, modifiziert nach Akira, Takeda 2004, Takeda et al. 2003 .....	12
Tab.2 Expression von TLR auf sortierten Th-Zellen (Pötzl November 2008) .....	15
Tab.3 Stimulationsplan der Zellkultur.....	26
Tab.4 Reaktionsbedingungen der Real-Time PCR .....	31

## 8 Abkürzungsverzeichnis

CRP	C-Reaktives Protein
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
AP-1	<i>activating-protein-1</i>
APC	Antigen-Präsentierende Zelle
B6.WT	<i>black-6.wild-type</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	complementary-DNA
CM	Zytokinmix
C <sub>T</sub>	<i>threshold-cycle</i>
DC	Dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	<i>double-distilled water</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
EAE	Experimentelle Autoimmune Encephalitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälber Serum
Foxp3	<i>forkhead-box-protein p3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSP	<i>heat shock protein</i>
IFN	Interferon
IKK	<i>inhibitor of κB komplex</i>
IKKi	<i>IκB-kinase-i</i>
IL	Interleukin
IL-7R	IL-7 Rezeptor
IRAK1	<i>IL-1 receptor associated kinase 1</i>
IRF	Interferon regulatorische Faktoren
IκB	<i>inhibitor of κB</i>
JAK	Janus Kinasen
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin rich repeats</i>
Lti	<i>lymphoid-tissue inducer</i>
m	milli
M	Meter
M.tuberculosis	Mykobakterium tuberculosis
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
MDB	<i>membrane desalting buffer</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
M-MLV	Moloney -Maus-Leukämie-Virus
MOG	Myelines Oligodendrozyten Protein
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>

n.d.	nicht detektierbar
NFκB	<i>nuclear factor κB</i>
NK-Zelle	Natürliche-Killer Zelle
NOD-Maus	<i>non-obese diabetic mouse</i>
Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
PAMP	<i>pathogen-associated-molecular-pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
PMBC	TLR-aktivierte Mononukleäre Zellen aus Peripherem Blut
PRR	<i>pattern-recognition-receptor</i>
RIP1	<i>TRAF6-receptor-interacting-protein-1</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RORγt	<i>retinoid acid receptor-related orphan receptor γ-t</i>
RT-PCR	<i>realtime-polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde
SCC	<i>side scatter</i>
Socs3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBK1	<i>tank-binding-kinase-1</i>
TCR	T-Zell Rezeptor
T <sub>eff</sub>	T-Effektor Zelle
TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
Th	T-Helfer Zelle
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF6	<i>TNF-receptor associated factor 6</i>
Treg	T-regulatorische Zelle
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
γc-Zytokine	Zytokine der gemeinsamen γ-Kette



## 9 Literaturverzeichnis

Adamson, Adewole S.; Collins, Kalonji; Laurence, Arian; O'Shea, John J. (2009): The Current STATus of lymphocyte signaling: new roles for old players. In: *Current opinion in immunology*, Jg. 21, H. 2, S. 161–166. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.coi.2009.03.013.

Akira, Shizuo; Takeda, Kiyoshi (2004): Toll-like receptor signalling. In: *Nature reviews. Immunology*, Jg. 4, H. 7, S. 499–511. Online verfügbar unter doi:10.1038/nri1391.

Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell*, Jg. 124, H. 4, S. 783–801. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cell.2006.02.015.

Andoh, Akira; Zhang, Zhuobin; Inatomi, Osamu; Fujino, Sanae; Deguchi, Yasuyuki; Araki, Yoshio et al. (2005): Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. In: *Gastroenterology*, Jg. 129, H. 3, S. 969–984. Online verfügbar unter doi:10.1053/j.gastro.2005.06.071.

Armant, Myriam A.; Fenton, Matthew J. (2002): Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. In: *Genome biology*, Jg. 3, H. 8, S. REVIEWS3011.

Aujla, Shean J.; Dubin, Patricia J.; Kolls, Jay K. (2007): Th17 cells and mucosal host defense. In: *Seminars in immunology*, Jg. 19, H. 6, S. 377–382. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.smim.2007.10.009.

Baccala, Roberto; Witherden, Deborah; Gonzalez-Quintial, Rosana; Dummer, Wolfgang; Surh, Charles D.; Havran, Wendy L.; Theofilopoulos, Argyrios N. (2005): Gamma delta T cell homeostasis is controlled by IL-7 and IL-15 together with subset-specific factors. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, Jg. 174, H. 8, S. 4606–4612.

Banchereau, J.; Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature*, Jg. 392, H. 6673, S. 245–252. Online verfügbar unter doi:10.1038/32588.

Barrat, F. J.; Coffman, R. L. (2008): Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. In: *Immunological reviews*, Jg. 223, S. 271–283. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00630.x.

Battaglia, Manuela; Stabilini, Angela; Roncarolo, Maria-Grazia (2005): Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. In: *Blood*, Jg. 105, H. 12, S. 4743–4748. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2004-10-3932.

Batten, Marcel; Li, Ji; Yi, Sothy; Kljavin, Noelyn M.; Danilenko, Dmitry M.; Lucas, Sophie et al. (2006): Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. In: *Nature immunology*, Jg. 7, H. 9, S. 929–936. Online verfügbar unter doi:10.1038/ni1375.

Betelli, Estelle; Carrier, Yijun; Gao, Wenda; Korn, Thomas; Strom, Terry B.; Oukka, Mohamed et al. (2006): Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. In: *Nature*, Jg. 441, H. 7090, S. 235–238. Online verfügbar unter doi:10.1038/nature04753.

Betelli, Estelle; Korn, Thomas; Kuchroo, Vijay K. (2007): Th17: the third member of the effector T cell trilogy. In: *Current opinion in immunology*, Jg. 19, H. 6, S. 652–657. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.coi.2007.07.020.

Brentano, Fabia; Schorr, Olivier; Gay, Renate E.; Gay, Steffen; Kyburz, Diego (2005): RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 52, H. 9, S. 2656–2665. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.21273.

Buljevac, D.; Flach, H. Z.; Hop, W. C. J.; Hijdra, D.; Laman, J. D.; Savelkoul, H. F. J. et al. (2002): Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. In: *Brain : a journal of neurology*, Jg. 125, H. Pt 5, S. 952–960.

Burchill, Matthew A.; Nardelli, Dean T.; England, Douglas M.; DeCoster, David J.; Christopherson, John A.; Callister, Steven M.; Schell, Ronald F. (2003): Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with *Borrelia burgdorferi*. In: *Infection and immunity*, Jg. 71, H. 6, S. 3437–3442.

Burchill, Matthew A.; Yang, Jianying; Vogtenhuber, Christine; Blazar, Bruce R.; Farrar, Michael A. (2007): IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 178, H. 1, S. 280–290.

Caramalho, Iris; Lopes-Carvalho, Thiago; Ostler, Dominique; Zelenay, Santiago; Haury, Matthias; Demengeot, Jocelyne (2003): Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 197, H. 4, S. 403–411.

Chen, Zhi; Laurence, Arian; Kanno, Yuka; Pacher-Zavisin, Margit; Zhu, Bing-Mei; Tato, Cristina et al. (2006): Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 103, H. 21, S. 8137–8142. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0600666103.

Chetoui, N.; Boisvert, M.; Gendron, S.; Aoudjit, F. (2010): Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. In: *Immunology*, Jg. 130, H. 3, S. 418–426. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03244.x.

Chung, Doo Ryeon; Kasper, Dennis L.; Panzo, Ronald J.; Chitnis, Tanuja; Grusby, Michael J.; Sayegh, Mohamed H. et al. (2003): CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 170, H. 4, S. 1958–1963.

Colonna, Marco (2009): Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. In: *Immunity*, Jg. 31, H. 1, S. 15–23. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.immuni.2009.06.008.

Cottalorda, Anne; Mercier, Blandine C.; Mbitikon-Kobo, Florentin M.; Arpin, Christophe; Teoh, Denise Y. L.; McMichael, Andrew et al. (2009): TLR2 engagement on memory CD8(+) T cells improves their cytokine-mediated proliferation and IFN-gamma secretion in the absence of Ag. In: *European journal of immunology*, Jg. 39, H. 10, S. 2673–2681. Online verfügbar unter doi:10.1002/eji.200939627.

Crellin, Natasha K.; Garcia, Rosa V.; Hadisfar, Omeed; Allan, Sarah E.; Steiner, Theodore S.; Levings, Megan K. (2005): Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 175, H. 12, S. 8051–8059.

Doisne, Jean-Marc; Becourt, Chantal; Amniai, Latiffa; Duarte, Nadia; Le Luduec, Jean-Benoît; Eberl, Gérard; Benlagha, Kamel (2009): Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t+ and respond preferentially under inflammatory conditions. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 183, H. 3, S. 2142–2149. Online verfügbar unter doi:10.4049/jimmunol.0901059.

Elliott, S. R.; Robertson, D. M.; Zola, H.; Macardle, P. J. (2000): Expression of the costimulator molecules, CD40 and CD154, on lymphocytes from neonates and young children. In: *Human immunology*, Jg. 61, H. 4, S. 378–388.

Franchimont, D.; Vermeire, S.; El Housni, H.; Pierik, M.; van Steen, K.; Gustot, T. et al. (2004): Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. In: *Gut*, Jg. 53, H. 7, S. 987–992.

Ghilardi, Nico; Ouyang, Wenjun (2007): Targeting the development and effector functions of TH17 cells. In: *Seminars in immunology*, Jg. 19, H. 6, S. 383–393. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.smim.2007.10.016.

Happel, Kyle I.; Dubin, Patricia J.; Zheng, Mingquan; Ghilardi, Nico; Lockhart, Christie; Quinton, Lee J. et al. (2005): Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 202, H. 6, S. 761–769. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20050193.

Harrington, Laurie E.; Hatton, Robin D.; Mangan, Paul R.; Turner, Henrietta; Murphy, Theresa L.; Murphy, Kenneth M.; Weaver, Casey T. (2005): Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. In: *Nature immunology*, Jg. 6, H. 11, S. 1123–1132. Online verfügbar unter doi:10.1038/ni1254.

Hartgring, S. A. Y.; Bijlsma, J. W. J.; Lafeber, F. P. J. G.; van Roon, J. A. G. (2006): Interleukin-7 induced immunopathology in arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases*, Jg. 65 Suppl 3, S. iii69-74. Online verfügbar unter doi:10.1136/ard.2006.058479.

Hoebe, K.; Du, X.; Georgel, P.; Janssen, E.; Tabeta, K.; Kim, S. O. et al. (2003): Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. In: *Nature*, Jg. 424, H. 6950, S. 743–748. Online verfügbar unter doi:10.1038/nature01889.

Hofmeister, R.; Khaled, A. R.; Benbernou, N.; Rajnavolgyi, E.; Muegge, K.; Durum, S. K. (1999): Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. In: *Cytokine & growth factor reviews*, Jg. 10, H. 1, S. 41–60.

Huang, Weitao; Na, Li; Fidel, Paul L.; Schwarzenberger, Paul (2004): Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. In: *The Journal of infectious diseases*, Jg. 190, H. 3, S. 624–631. Online verfügbar unter doi:10.1086/422329.

Hue, Sophie; Ahern, Philip; Buonocore, Sofia; Kullberg, Marika C.; Cua, Daniel J.; McKenzie, Brent S. et al. (2006): Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 203, H. 11, S. 2473–2483. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20061099.

Hymowitz, S. G.; Filvaroff, E. H.; Yin, J. P.; Lee, J.; Cai, L.; Risser, P. et al. (2001): IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and

implications for receptor binding. In: *The EMBO journal*, Jg. 20, H. 19, S. 5332–5341. Online verfügbar unter doi:10.1093/emboj/20.19.5332.

Ichiyama, Kenji; Yoshida, Hideyuki; Wakabayashi, Yu; Chinen, Takatoshi; Saeki, Kazuko; Nakaya, Mako et al. (2008): Foxp3 inhibits ROR $\gamma$ mat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR $\gamma$ mat. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 283, H. 25, S. 17003–17008. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M801286200.

Infante-Duarte, C.; Horton, H. F.; Byrne, M. C.; Kamradt, T. (2000): Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 165, H. 11, S. 6107–6115.

Ivanov, Ivaylo I.; Zhou, Liang; Littman, Dan R. (2007): Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. In: *Seminars in immunology*, Jg. 19, H. 6, S. 409–417. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.smim.2007.10.011.

Jameson, Julie; Havran, Wendy L. (2007): Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. In: *Immunological reviews*, Jg. 215, S. 114–122. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00483.x.

Karin, M. (1995): The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 270, H. 28, S. 16483–16486.

Kattah, Michael G.; Wong, Michael T.; Yocum, Matthew D.; Utz, Paul J. (2008): Cytokines secreted in response to Toll-like receptor ligand stimulation modulate differentiation of human Th17 cells. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 58, H. 6, S. 1619–1629. Online verfügbar unter doi:10.1002/art.23497.

Kawai, T.; Adachi, O.; Ogawa, T.; Takeda, K.; Akira, S. (1999a): Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. In: *Immunity*, Jg. 11, H. 1, S. 115–122.

Kawai, T.; Adachi, O.; Ogawa, T.; Takeda, K.; Akira, S. (1999b): Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. In: *Immunity*, Jg. 11, H. 1, S. 115–122.

Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2007): TLR signaling. In: *Seminars in immunology*, Jg. 19, H. 1, S. 24–32. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.smim.2006.12.004.

Khader, Shabaana A.; Bell, Guy K.; Pearl, John E.; Fountain, Jeffrey J.; Rangel-Moreno, Javier; Cilley, Garth E. et al. (2007): IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. In: *Nature immunology*, Jg. 8, H. 4, S. 369–377. Online verfügbar unter doi:10.1038/ni1449.

Kleinschek, Melanie A.; Owyang, Alexander M.; Joyce-Shaikh, Barbara; Langrish, Claire L.; Chen, Yi; Gorman, Daniel M. et al. (2007): IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 204, H. 1, S. 161–170. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20061738.

Kolls, Jay K.; Lindén, Anders (2004): Interleukin-17 family members and inflammation. In: *Immunity*, Jg. 21, H. 4, S. 467–476. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.immuni.2004.08.018.

Komai-Koma, Mousa; Jones, Louise; Ogg, Graham S.; Xu, Damo; Liew, Foo Y. (2004): TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 101, H. 9, S. 3029–3034. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0400171101.

Korn, Thomas; Bettelli, Estelle; Gao, Wenda; Awasthi, Amit; Jäger, Anneli; Strom, Terry B. et al. (2007): IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. In: *Nature*, Jg. 448, H. 7152, S. 484–487. Online verfügbar unter doi:10.1038/nature05970.

Langrish, Claire L.; Chen, Yi; Blumenschein, Wendy M.; Mattson, Jeanine; Basham, Beth; Sedgwick, Jonathan D. et al. (2005): IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 201, H. 2, S. 233–240. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20041257.

Letourneau, S.; Krieg, C.; Pantaleo, G.; Boyman, O. (2009): IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*, Jg. 123, H. 4, S. 758–762. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jaci.2009.02.011.

Levings, Megan K.; Gregori, Silvia; Tresoldi, Eleonora; Cazzaniga, Sabrina; Bonini, Chiara; Roncarolo, Maria Grazia (2005): Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. In: *Blood*, Jg. 105, H. 3, S. 1162–1169. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2004-03-1211.

Li, Shyun; Strelow, Astrid; Fontana, Elizabeth J.; Wesche, Holger (2002): IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 99, H. 8, S. 5567–5572. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.082100399.

Li, Xinyan; Jiang, Song; Tapping, Richard I. (2009): Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. In: *Cytokine*. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cyto.2009.08.010.

Liang, Spencer C.; Tan, Xiang-Yang; Luxenberg, Deborah P.; Karim, Riye; Dunussi-Joannopoulos, Kyriaki; Collins, Mary; Fouser, Lynette A. (2006): Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 203, H. 10, S. 2271–2279. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20061308.

Liu, Guangwei; Zhao, Yong (2007): Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells. In: *Immunology*, Jg. 122, H. 2, S. 149–156. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02651.x.

Liu, Xuebin; Leung, Stewart; Wang, Chunxia; Tan, Zhu; Wang, Ji; Guo, Taylor B. et al. (2010): Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. In: *Nature medicine*, Jg. 16, H. 2, S. 191–197. Online verfügbar unter doi:10.1038/nm.2077.

Lockhart, Euan; Green, Angela M.; Flynn, JoAnne L. (2006): IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md, Jg. 177, H. 7, S. 4662–4669.

Mangan, Paul R.; Harrington, Laurie E.; O'Quinn, Darrell B.; Helms, Whitney S.; Bullard, Daniel C.; Elson, Charles O. et al. (2006): Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. In: *Nature*, Jg. 441, H. 7090, S. 231–234. Online verfügbar unter doi:10.1038/nature04754.

- Markovic-Plese, S.; Cortese, I.; Wandinger, K. P.; McFarland, H. F.; Martin, R. (2001): CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. In: *The Journal of clinical investigation*, Jg. 108, H. 8, S. 1185–1194. Online verfügbar unter doi:10.1172/JCI12516.
- Martens, P. B.; Goronzy, J. J.; Schaid, D.; Weyand, C. M. (1997): Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism*, Jg. 40, H. 6, S. 1106–1114. Online verfügbar unter doi:10.1002/1529-0131(199706)40:6<1106::AID-ART14>3.0.CO;2-#.
- McGeachy, Mandy J.; Chen, Yi; Tato, Cristina M.; Laurence, Arian; Joyce-Shaikh, Barbara; Blumenschein, Wendy M. et al. (2009): The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. In: *Nature immunology*, Jg. 10, H. 3, S. 314–324. Online verfügbar unter doi:10.1038/ni.1698.
- Mosmann, T. R.; Coffman, R. L. (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. In: *Annual review of immunology*, Jg. 7, S. 145–173. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045.
- Murphy, Kenneth; Travers, Paul; Walport, Mark; Ehrenstein, Michael; Janeway, Charles (2008): *Janeway's immunobiology*. 7. ed. New York, NY: Garland Science.
- Nickoloff, Brian J. (2007): Cracking the cytokine code in psoriasis. In: *Nature medicine*, Jg. 13, H. 3, S. 242–244. Online verfügbar unter doi:10.1038/nm0307-242.
- Nishihara, Mika; Ogura, Hideki; Ueda, Naoko; Tsuruoka, Mineko; Kitabayashi, Chika; Tsuji, Fumio et al. (2007): IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. In: *International immunology*, Jg. 19, H. 6, S. 695–702. Online verfügbar unter doi:10.1093/intimm/dxm045.
- O'Neill, Luke A. J.; Bowie, Andrew G. (2007): The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. In: *Nature reviews. Immunology*, Jg. 7, H. 5, S. 353–364. Online verfügbar unter doi:10.1038/nri2079.
- Ozinsky, A.; Underhill, D. M.; Fontenot, J. D.; Hajjar, A. M.; Smith, K. D.; Wilson, C. B. et al. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 97, H. 25, S. 13766–13771. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.250476497.
- Park, Heon; Li, Zhaoxia; Yang, Xuexian O.; Chang, Seon Hee; Nurieva, Roza; Wang, Yi-Hong et al. (2005): A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. In: *Nature immunology*, Jg. 6, H. 11, S. 1133–1141. Online verfügbar unter doi:10.1038/ni1261.
- Pasare, Chandrashekhara; Medzhitov, Ruslan (2004): Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. In: *Microbes and infection / Institut Pasteur*, Jg. 6, H. 15, S. 1382–1387. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.micinf.2004.08.018.
- Pasare, Chandrashekhara; Medzhitov, Ruslan (2005): Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. In: *Advances in experimental medicine and biology*, Jg. 560, S. 11–18. Online verfügbar unter doi:10.1007/0-387-24180-9\_2.
- Pötzl, Johann (November 2008): Identifizierung von CCR6 als Marker für Th17 Zellen bei der Infekt-Abwehr und Autoimmunerkrankungen. Dissertation. Betreut von Prof.

Dr. Daniela M. Männel. Regensburg. Regensburg, Institut für Immunologie, naturwissenschaftliche Fakultät III der Universität Regensburg.

Pure, E.; Cuff, C. A. (2001): A crucial role for CD44 in inflammation. In: Trends in molecular medicine, Jg. 7, H. 5, S. 213–221.

Rochman, Yrina; Spolski, Rosanne; Leonard, Warren J. (2009): New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. In: Nature reviews. Immunology, Jg. 9, H. 7, S. 480–490. Online verfügbar unter doi:10.1038/nri2580.

Rosenthal, L. A.; Winestock, K. D.; Finbloom, D. S. (1997): IL-2 and IL-7 induce heterodimerization of STAT5 isoforms in human peripheral blood T lymphoblasts. In: Cellular immunology, Jg. 181, H. 2, S. 172–181. Online verfügbar unter doi:10.1006/cimm.1997.1208.

Satoh-Takayama, Naoko; Vosshenrich, Christian A. J.; Lesjean-Pottier, Sarah; Sawa, Shinichiro; Lochner, Matthias; Rattis, Frederique et al. (2008): Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. In: Immunity, Jg. 29, H. 6, S. 958–970. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.immuni.2008.11.001.

Shapira, Y.; Agmon-Levin, N.; Shoenfeld, Y. (2010): Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. In: Journal of autoimmunity, Jg. 34, H. 3, S. J168-77. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jaut.2009.11.018.

Shevach, Ethan M.; DiPaolo, Richard A.; Andersson, John; Zhao, Dong-Mei; Stephens, Geoffrey L.; Thornton, Angela M. (2006): The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. In: Immunological reviews, Jg. 212, S. 60–73. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00415.x.

Shibata, Kensuke; Yamada, Hisakata; Hara, Hiromitsu; Kishihara, Kenji; Yoshikai, Yasunobu (2007): Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production. In: Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 178, H. 7, S. 4466–4472.

Smit, L. A. M.; Bongers, S. I. M.; Ruven, H. J. T.; Rijkers, G. T.; Wouters, I. M.; Heederik, D. et al. (2007): Atopy and new-onset asthma in young Danish farmers and CD14, TLR2, and TLR4 genetic polymorphisms: a nested case-control study. In: Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, Jg. 37, H. 11, S. 1602–1608. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02831.x.

Stockinger, Brigitta (2007): Good for Goose, but not for Gander: IL-2 interferes with Th17 differentiation. In: Immunity, Jg. 26, H. 3, S. 278–279. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.immuni.2007.03.001.

Stockinger, Brigitta; Veldhoen, Marc (2007): Differentiation and function of Th17 T cells. In: Current opinion in immunology, Jg. 19, H. 3, S. 281–286. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.coi.2007.04.005.

Stockinger, Brigitta; Veldhoen, Marc; Martin, Bruno (2007a): Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. In: Seminars in immunology, Jg. 19, H. 6, S. 353–361. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.smim.2007.10.008.

Stockinger, Brigitta; Veldhoen, Marc; Martin, Bruno (2007b): Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. In: Seminars in immunology, Jg. 19, H. 6, S. 353–361. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.smim.2007.10.008.

- Stumhofer, J. S.; Silver, J.; Hunter, C. A. (2007): Negative regulation of Th17 responses. In: *Seminars in immunology*, Jg. 19, H. 6, S. 394–399. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.smim.2007.11.006.
- Suri-Payer, E.; Amar, A. Z.; Thornton, A. M.; Shevach, E. M. (1998): CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 160, H. 3, S. 1212–1218.
- Suzuki, H.; Kündig, T. M.; Furlonger, C.; Wakeham, A.; Timms, E.; Matsuyama, T. et al. (1995): Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. In: *Science* (New York, N.Y.), Jg. 268, H. 5216, S. 1472–1476.
- Takahashi, Nozomi; Vanlaere, Ineke; Rycke, Riet de; Cauwels, Anje; Joosten, Leo A. B.; Lubberts, Erik et al. (2008): IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 205, H. 8, S. 1755–1761. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20080588.
- Takeda, Kiyoshi; Akira, Shizuo (2004): TLR signaling pathways. In: *Seminars in immunology*, Jg. 16, H. 1, S. 3–9.
- Takeda, Kiyoshi; Kaisho, Tsuneyasu; Akira, Shizuo (2003): Toll-like receptors. In: *Annual review of immunology*, Jg. 21, S. 335–376. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
- Totsuka, T.; Kanai, T.; Nemoto, Y.; Makita, S.; Okamoto, R.; Tsuchiya, K.; Watanabe, M. (2007): IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md, Jg. 178, H. 8, S. 4737–4748.
- Underhill, David M. (2003): Macrophage recognition of zymosan particles. In: *Journal of endotoxin research*, Jg. 9, H. 3, S. 176–180. Online verfügbar unter doi:10.1179/096805103125001586.
- Veldhoen, Marc; Hocking, Richard J.; Atkins, Christopher J.; Locksley, Richard M.; Stockinger, Brigitta (2006a): TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. In: *Immunity*, Jg. 24, H. 2, S. 179–189. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001.
- Veldhoen, Marc; Hocking, Richard J.; Flavell, Richard A.; Stockinger, Brigitta (2006b): Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. In: *Nature immunology*, Jg. 7, H. 11, S. 1151–1156. Online verfügbar unter doi:10.1038/ni1391.
- Wang, Li-Fang; Chiu, Hsien-Ching; Hsu, Chih-Jung; Liu, Ching-Yi; Hsueh, Yu-Han; Miaw, Shi-Chuen (2009): Epicutaneous sensitization with a protein antigen induces Th17 cells. In: *Journal of dermatological science*, Jg. 54, H. 3, S. 192–197. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jdermsci.2008.12.011.
- Wang, Yui-Hsi; Angkasekwinai, Pornpimon; Lu, Ning; Voo, Kui Shin; Arima, Kazuhiko; Hanabuchi, Shino et al. (2007): IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 204, H. 8, S. 1837–1847. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20070406.
- Wei, Lai; Laurence, Arian; Elias, Kevin M.; O'Shea, John J. (2007): IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 282, H. 48, S. 34605–34610. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.M705100200.



Wiersinga, W. J.; van, der Poll T. (2005): [Toll-like receptors and the significance for clinical medicine]. In: *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, Jg. 149, H. 21, S. 1150–1155.

Witowski, J.; Pawlaczyk, K.; Breborowicz, A.; Scheuren, A.; Kuzlan-Pawlaczyk, M.; Wisniewska, J. et al. (2000): IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 165, H. 10, S. 5814–5821.

Wucherpfennig, K. W. (2001): Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. In: *The Journal of clinical investigation*, Jg. 108, H. 8, S. 1097–1104. Online verfügbar unter doi:10.1172/JCI14235.

Yamamoto, Masahiro; Sato, Shintaro; Hemmi, Hiroaki; Hoshino, Katsuaki; Kaisho, Tsuneyasu; Sanjo, Hideki et al. (2003): Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. In: *Science* (New York, N.Y.), Jg. 301, H. 5633, S. 640–643. Online verfügbar unter doi:10.1126/science.1087262.

Yang, Xuexian O.; Panopoulos, Athanasia D.; Nurieva, Roza; Chang, Seon Hee; Wang, Demin; Watowich, Stephanie S.; Dong, Chen (2007): STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. In: *The Journal of biological chemistry*, Jg. 282, H. 13, S. 9358–9363. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.C600321200.

Yoshitomi, Hiroyuki; Sakaguchi, Noriko; Kobayashi, Katsuya; Brown, Gordon D.; Tagami, Tomoyuki; Sakihama, Toshiko et al. (2005): A role for fungal {beta}-glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. In: *The Journal of experimental medicine*, Jg. 201, H. 6, S. 949–960. Online verfügbar unter doi:10.1084/jem.20041758.

Zhou, Liang; Ivanov, Ivaylo I.; Spolski, Rosanne; Min, Roy; Shenderov, Kevin; Egawa, Takeshi et al. (2007): IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. In: *Nature immunology*, Jg. 8, H. 9, S. 967–974. Online verfügbar unter doi:10.1038/ni1488.

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, weil sie mit aufmunternden Worten und moralischer Unterstützung immer für mich da waren.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Daniela Männel, die mir die Arbeit in ihrem Institut ermöglicht hat.

Namentlich danke ich Dr. Anja Lechner für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Bereitstellung dieses interessanten Themas. Unersetzlich war für mich ihre ständige Betreuung, ihre unermüdliche Hilfe beim Planen der Experimente, beim Erlernen von Methoden und die kompetente Begleitung meiner Arbeit.

Ebenfalls ganz herzlich Danken möchte ich Catherine Botterand, für ihre geduldige und stets freundliche Hilfe im Rahmen meiner Versuche.

Im Weiteren danke ich Anja Reihle, die sich trotz der fachfremden und komplizierten Materie nicht davon abschrecken ließ, meine Arbeit auf Rechtschreibung und Grammatik Korrektur zu lesen.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und mir stets kompromisslos mit Rat und Tat zur Seite stehen um mich zu unterstützen.

Außerdem danke ich Steffen dafür, dass er immer für mich da ist, ein offenes Ohr für mich hat und es jederzeit versteht mich aufzumuntern und mir neue Motivationsansätze zu geben.

Julia Hiller

Februar 2012

