

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR IMMUNOLOGIE  
PROF. DR. DANIELA MÄNNEL  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG  
IL-17 PRODUZIERENDER CCR6+ T-HELFER-ZELLEN  
NACH IMMUNISIERUNG

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin (Dr.med.)  
der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Eugen Tausch  
2013



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR IMMUNOLOGIE  
PROF. DR. DANIELA MÄNNEL  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CHARAKTERISIERUNG  
IL-17 PRODUZIERENDER CCR6+ T-HELFER-ZELLEN  
NACH IMMUNISIERUNG

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin (Dr.med.)  
der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Eugen Tausch  
2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela Männel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2013

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 T-Lymphozyten und ihre Reifung.....	8
1.2 Die T-Zellaktivierung.....	9
1.3 Subpopulationen von T-Helfer-Zellen.....	10
1.4 Effektor und Gedächtniszellen.....	12
1.5 Chemokine und ihre Rezeptoren im Kontext der Migration von T-Zellen.....	13
1.6 Chemokine und ihre Rezeptoren in der T <sub>H</sub> -Zelldifferenzierung.....	14
1.7 IL-17 – das Effektorprotein der T <sub>H</sub> 17-Immunantwort .....	16
1.7.1. Struktur.....	16
1.7.2 IL-17 im Kontext von Infekten, Autoimmunerkrankungen, Abstoßungsreaktionen und Malignomen .....	17
1.8 Von der Immunregulation zu Behandlungskonzepten.....	20
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Material und Methoden:.....</b>	<b>23</b>
3.1 Materialien .....	23
3.1.1 Versuchstiere.....	23
3.1.2 Nährmedien und Lösungen .....	23
3.1.3 Nukleotide und Reagenzien .....	23
3.1.4 Vaccinationsmittel.....	24
3.1.5 Enzyme und rekombinante Proteine .....	24
3.1.6 Antikörper .....	24
3.1.7 Lösungen zur intrazellulären Färbung.....	25
3.1.8 Lösungen für ELISA .....	25
3.1.9 Kits .....	25
3.1.10 Geräte und Hilfsmittel.....	25
3.2 Methoden.....	26
3.2.1 Grundlagen zur Messung proliferierender Zellen .....	26

3.2.2	Methoden zur Immunisierung von TCR-transgenen Mäusen .....	26
3.2.3	In-vivo-Gabe von Bromodesoxyuridin .....	27
3.2.4	Methoden zur Zellisolation und Aufreinigung.....	27
3.2.5	Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Populationsgrößen.....	28
3.2.6	Zellen in Kultur .....	28
3.2.7	Durchflusszytometrie .....	29
3.2.8	Färbungen für die Durchflusszytometrie.....	30
3.2.9	Immunoassays .....	32
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
4.1.	Validierung der Methode zur Proliferationsmessung mittels BrdU.....	33
4.1.1.	In-vitro-Kultivierung .....	33
4.1.2	Validierung des Färbeprotokolls in der ex vivo-Proliferationsmessung.....	36
4.2.	Proliferationsmessung ex vivo gewonnener T-Lymphozyten.....	38
4.2.1.	Proliferation von T-Zellen aus dem Lymphknoten naiver Mäuse .....	38
4.2.2	Proliferation von T-Zellen nach Immunisierung mit Ovalbumin .....	39
4.2.3.	Auswirkung der Immunreaktion auf die Zellzahl .....	41
4.2.4.	Veränderungen des Anteils CD4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> -Zellen in der Milz im Verlauf der Immunreaktion .....	43
4.2.5	Proliferation von CCR6 <sup>+</sup> -Zellen in der Milz von naiven und immunisierten Mäusen. 44	
4.2.6	Identifizierung antigenspezifischer, aktiverter IL-17 Produzenten durch Reaktivierung mit spezifischem Antigen .....	46
4.3	Fähigkeit zu Gedächtnisbildung von CD4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> -Zellen.....	48
4.3.1.	Nachweis von Gedächtniszellen durch Messung der T-Zellproliferation nach in-vitro-Restimulation.....	48
	So ist davon auszugehen, dass sich unter beiden T <sub>H</sub> -Spezies vormals aktivierte Zellen finden und reaktivieren ließen. So ist CCR6 zu diesem Zeitpunkt der Immunreaktion ein Marker für Gedächtnis-T <sub>H</sub> -Zellen.....	50
4.3.2	Nachweis von Gedächtniszellen anhand der IL-17 Produktion nach Restimulation mit Ovalbumin.....	50
4.3.3.	Phänotyp von CD4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> -Zellen.....	51

<b>5. Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1    Etablierung der Methode zur <i>in vivo</i> Proliferationsmessung .....	54
5.2.    Proliferation CD4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> -Zellen in der Homöostase.....	55
5.3    Das Verhalten von CD4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> -Zellen während der Immunreaktion .....	57
5.4    Die Fähigkeit der Gedächtnisbildung und Reaktivierung von CD4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> -Zellen.....	59
5.5    Die Weiche zur Dysregulation .....	60
<b>6. Zusammenfassende Beurteilung .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>64</b>
7.1    Abkürzungen .....	64
7.2.    Publikationen.....	66
7.3    Quellen .....	67
7.4    Danksagungen .....	77
7.5.    Lebenslauf .....	78

## 1. Einleitung

Das menschliche Immunsystem vermag es, sich dem täglichen Ansturm mehrerer tausend Angreifer zu widersetzen, seien es Viren, Bakterien, Einzeller, mehrzellige Parasiten oder Pilze. Bei schweren Entzündungen erhöht sich die Körpertemperatur und Energiebereitstellung, die Produktion von Immunzellen wird gesteigert, die Durchblutung für deren Mobilisierung ortsspezifisch erhöht. Botenstoffe versetzen Leukozyten in erhöhte Abwehrbereitschaft, andere sorgen für die gezielte Ein- und Auswanderung von Zellen aller Art. Gleichzeitig werden Gedächtniszellen im Falle eines Zweitkontaktees für eine schnellere und gezielte Antwort aktiviert, andere Zellen vom Entzündungsherd abgezogen. Entscheidend ist jedoch auch der letzte Schritt der Immunantwort: Das Herunterfahren des Systems auf den Zustand vor der Entzündung und das Verbleiben auf diesem Niveau beim Fehlen pathogener Keimen. Dies verlangt nach einer Regulation des Immunsystems, die die Produktion und Aktivität von dazugehörenden Zellen der jeweiligen Situation anpasst. Während zum einen in Folge von Prävention und Hygiene Teile unseres Immunsystems wie Appendix und Rachenmandeln überflüssig geworden sind, zum anderen eine effektive Unterstützung der körpereigenen Maßnahmen durch Antibiotika, Antimykotika und Virostatika erfolgt, leiden die Menschen des postindustriellen Zeitalters zunehmend an Fehlern der Immunregulation, von denen ein Großteil kaum verstanden und nur eingeschränkt behandelbar ist. Zu dieser weitläufigen Gruppe von Krankheiten gehören neben überschießenden Entzündungsreaktionen bei z.B. Meningokokken- oder Herpesinfektionen und Allergien auch Autoimmunerkrankungen wie die Hashimoto-Thyreoditis, Diabetes mellitus Typ I, rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Dermatomyositis und Multiple Sklerose. Während eine Vitiligo, Sprue oder ein Sjögren-Syndrom mit supportiven oder diätetischen Maßnahmen von den Patienten häufig gut toleriert wird, senken rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes, Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa erheblich die Lebensqualität; Multiple Sklerose, Autoimmunhepatitis und Myasthenia gravis zusätzlich sogar die Lebenserwartung. Sie alle haben gemeinsam, dass das Immunsystem Paul Ehrlichs geprägten Begriff des „Horror autotoxicus“, also die Furcht des Körpers vor der Selbstzerstörung, verliert. Die Bestandteile des menschlichen Immunsystems richten sich gegen Strukturen, die bisher als körpereigen und damit geschützt galten. Weshalb das Immunsystem in der Unterscheidung zwischen Eigen- und Fremdantigenen versagt, ist zunehmend Thema aktueller Forschung. Hierbei wurden zum einen

## <<< Einleitung >>>

prädisponierende Faktoren oder Infektionsereignisse gefunden, die mit einem erhöhten Autoimmunrisiko einhergehen. Zum anderen fand sich im Laufe der letzten 10 Jahren durch Untersuchungen des Immunstatus an Psoriasis, Morbus Crohn oder rheumatoider Arthritis erkrankter Patienten eine hohe Korrelation von bestimmten Subspezies von T-Zellen mit einer hohen Krankheitsaktivität. Doch bevor es detaillierter wird, soll ein kurzer Überblick über wichtige Bestandteile des menschlichen Immunsystems geschaffen werden.

### **1.1 T-Lymphozyten und ihre Reifung**

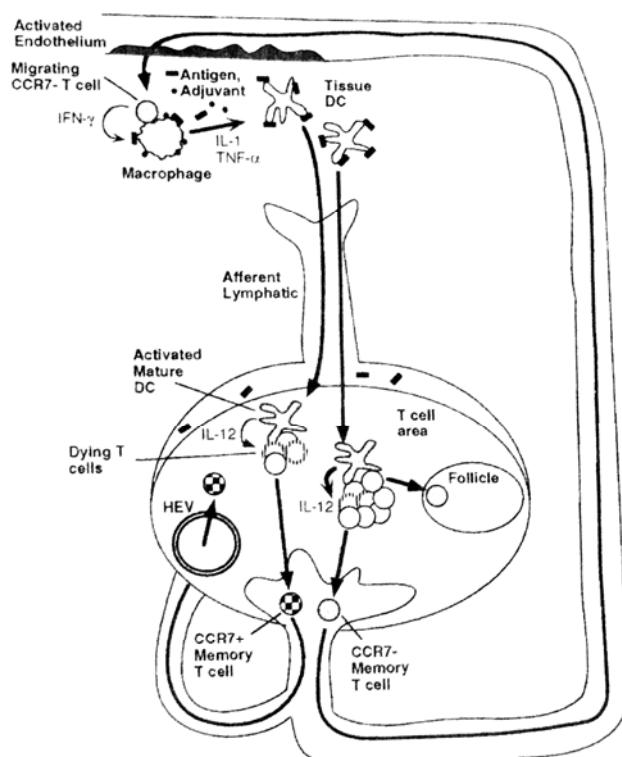
Bei Säugetieren bilden T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt, einen wichtigen Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Sie dienen zum einen der Regulation von B-Zellen und durch diese der humoralen Immunantwort, zum anderen sind sie essentiell für die zellvermittelte Abwehr sowohl gegen eingeschleppte Erreger, als auch gegen infizierte Körperzellen. Darüber hinaus bilden sie einen Teil des immunologischen Gedächtnisses und veranlassen die Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp (DTH).

Alle Lymphozyten haben ihren Ursprung im Knochenmark. Während B-Lymphozyten hier auch einen wesentlichen Teil ihrer Reifung erfahren, wandern T-Lymphozyten hierzu in den Thymus, wo zum einen nicht funktionierende (positive Selektion) und zum anderen gegen körpereigenes Antigen gerichtete T-Zellen (negative Selektion) aussortiert werden. Gleichzeitig bildet jede einzelne T-Zelle einen spezifischen T-Zell-Rezeptor aus, der sie von anderen T-Zellen unterscheidet. Dieser TCR ist in der Zellmembran verankert und besitzt eine extrazelluläre, antigenbindende Domäne ähnlich der v-Domäne von Antikörpern, die hypervariabel ist. Das Profil dieser variablen Domäne entsteht aus einer zufälligen Kombination von Gensegmenten aus den V-, D- und J-DNA-Clustern, so dass eine enorme Vielfalt von TCR entsteht, die eine antigenspezifische Reaktion des Immunsystems erst möglich macht. Als Co-Rezeptoren können von T-Lymphozyten entweder CD4 oder CD8 an der Zelloberfläche ausgebildet werden, was darüber entscheidet, ob die Zelle als zytotoxische T-Zelle vorwiegend den Zelltod befallener Körperzellen auslöst ( $CD4^-CD8^+$ ) oder als T-Helfer-Zelle ( $T_H$ -Zelle) andere Immunzellen bei der Abwehr von Keimen unterstützt ( $CD4^+CD8^-$ ). Die aus dem Thymus freigesetzten T-Lymphozyten werden aufgrund der erworbenen Fähigkeit der Immunabwehr damit als reif bezeichnet, jedoch auch als naiv, da sie noch keinen Kontakt mit Fremdantigen hatten.

## 1.2 Die T-Zellaktivierung

Jeder naive T-Lymphozyt in der Peripherie besitzt etwa 30.000 identische TCR, die sich, wie bereits erwähnt, von den TCR anderer T-Zellen unterscheiden. Handelt es sich um eine T-Helfer-Zelle, so werden mithilfe dieses Rezeptors Fremdantigene erkannt, die von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) an der Zelloberfläche gezeigt werden. Dieser Vorgang heißt antigenspezifische T-Zellaktivierung und ist maßgeblich für die Aktivierung der  $T_H$ -Zelle verantwortlich. Er findet typischerweise in peripheren Lymphknoten, Tonsillen, der Milz oder den Mukosa-assoziierten Lymphfollikeln des Darms statt, also in den sekundären Lymphorganen, durch die naive Lymphozyten nach der Reifung im Thymus zirkulieren. Diese Organe sind auch der erste Anlaufpunkt für mit Fremdantigen beladene APC, allen voran dendritischen Zellen, die gegenüber  $T_H$ -Zellen besonders erfolgreich Antigen präsentieren können (Jenkins et al., 2001).

Für die primäre T-Zell Immunantwort wurde 2001 von Jenkins et al. ein Modell aufgestellt, das bis heute weitgehend Bestand hat. Zellen des angeborenen Immunsystems kommen über Toll-like Rezeptoren (TLR) mit Fremdantigen oder Haptenen in Kontakt und führen zu einer Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$ . Daneben internalisieren sie das Antigenfragment und präsentieren es anschließend an MHC-II gebunden an der Zelloberfläche. Die Präsentation findet vorwiegend in der T-Zell Zone von ableitenden Lymphknoten statt, wo reife, naive T-Lymphozyten durch direkten Kontakt und dem von dendritischen Zellen ausgeschütteten IL-12 aktiviert werden. Die  $T_H$ -Zellen mit der höchsten Übereinstimmung mit dem Fremdantigen verlieren den Marker naiver T-Zellen, wie den Chemokinrezptor CCR7, und



**Schema 1:** Ablauf der primären Immunantwort im Lymphknoten nach Jenkins et al., 2002.

## <<< Einleitung >>>

verlassen als IFN $\gamma$  produzierende Effektorzellen die sekundären Lymphorgane zur Unterstützung der Immunantwort. Sind andere Interleukine als IL-12 vorherrschend, so entstehen andere T<sub>H</sub>-Zellsubpopulationen wie auch ein anderes Effektorzytokin. Ob im Verlauf der Immunreaktion aus der T<sub>H0</sub>-Zelle eine T<sub>H1</sub>-, T<sub>H2</sub>-, T<sub>H17</sub>- oder Treg-Zelle wird, hängt entscheidend von dem umgebenden Zytokinmilieu ab (Seder et al., 1992; Hsieh et al., 1993).

### 1.3 Subpopulationen von T-Helper-Zellen

Aufgrund der sezernierten Zytokine unterteilte man T-Helper-Zellen lange Zeit in zwei Subspezies: T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen (Mosmann et al., 1986).

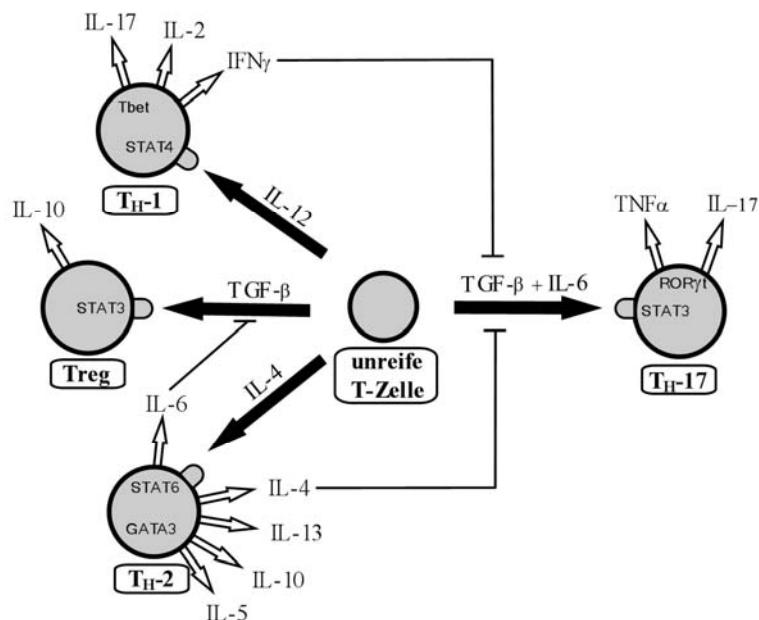
T<sub>H1</sub>-Zellen entstehen, wie in dem Szenario im Modell von Jenkins beschrieben, wenn naive T-Zellen unter dem Einfluss von Interleukin (IL)-12 aktiviert werden. Über die Ausschüttung von IFN $\gamma$  und IL-2 aktivieren sie vornehmlich Makrophagen, Granulozyten und T-Lymphozyten und dienen damit der zellulären Abwehr gegen Viren, Protozoa und intrazelluläre Bakterien. Ist hingegen IL-4 im umgebenden Zytokinmilieu vorherrschend, so führt die Differenzierung zur T<sub>H2</sub>-Subpopulation. T<sub>H2</sub>-Zellen regen über IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 IL-13 und TGF- $\beta$  v.a. B-Lymphozyten an und führen zu einer Verstärkung der humoralen Immunantwort insbesondere gegen extrazelluläre Krankheitserreger wie Würmer und Bakterien.

Mittlerweile hat man die T-Helper-Subpopulationen um mindestens zwei weitere Mitglieder ergänzt: Neben den Effektor-T-Zellen vom Typ T<sub>H1</sub> und T<sub>H2</sub> gibt es auch regulatorische T-Zellen (Treg), die über direkten Zell-Zell-Kontakt und die anti-inflammatorischen Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 einen immunmodulatorischen Charakter besitzen (Suri-Payer et al., 1998; Levings and Roncarolo, 2005). Ihre Entstehung wird durch TGF- $\beta$  und den intrazellulären Transkriptionsfaktor Foxp3 induziert, während die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 die Differenzierung naiver T<sub>H</sub>-Zellen zu Tregs inhibieren (Chen et al., 2003; Fantini et al., 2004). Die genaue Funktionsweise der Suppression anderer Zellen des Immunsystems, die unter anderem von unreifen myeloiden Zellen (IMC) übernommen wird, steht im Blickfeld aktueller Forschung (Nagaraj and Gabrilovich, 2012).

Daneben wurde der Rolle von IL-23 bei chronisch entzündlichen Erkrankungen nachgegangen. Mit der Erkenntnis, dass die eigentlich entzündungsfördernde Komponente weniger IL-23, sondern vielmehr das dadurch induzierte Zytokin IL-17 ist (Murphy et al., 2003) konnte eine

<<< Einleitung >>>

weitere  $T_H$ -Subspezies identifiziert werden. Diese wurde daraufhin in Anlehnung an das sezernierte Interleukin  $T_{H17}$ -Zelle genannt. Dass es sich bei  $T_{H17}$ -Zellen um eine von  $T_{H1}$ -Zellen distinkte Zellpopulation handelt, ist primär nicht selbstverständlich, denn beide Subtypen besitzen die Fähigkeit, Interleukin 17A auszuschütten. Aus diesem Grund waren für die Unterscheidung weitere Untersuchungen notwendig. So produzieren in der Maus  $T_{H1}$ -Lymphozyten weitere pro-inflammatorische Zytokine wie  $IFN\gamma$ , Granzym F und G und den Apoptose-induzierenden Liganden TRAIL, während  $T_{H17}$ -Zellen keines dieser Zytokine, dafür neben IL-17A und IL-17F auch  $TNF\alpha$  produzieren (Langrish et al., 2005; McKenzie et al., 2006).



**Schema 2:** Reifung von unreifen T-Zellen zu  $T_{H1}$ -,  $T_{H2}$ -, Treg- und  $T_{H17}$ -Zellen.

Die unterschiedliche Syntheseleistung konnte auch auf Ebene der Genexpression gezeigt werden, da der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t, und nicht die  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  definierenden Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA3 eine Schlüsselrolle in der IL-17 Proteinbiosynthese von  $T_{H17}$ -Zellen besitzt (Harrington et al., 2005; Ivanov et al., 2006).

Die Untersuchung der Differenzierung von naiven  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen zur jeweiligen Subpopulation zeigte weitere Unterschiede: Während in der Maus für eine Reifung zu  $T_{H1}$ -Lymphozyten das Vorhandensein von IL-12 unerlässlich ist, wird für  $T_{H17}$ -Zellen TGF- $\beta$  und IL-

## <<< Einleitung >>>

6 benötigt (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006; Mangan et al., 2006). Darüber hinaus hemmen die  $T_{H1}$ -induzierenden Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  und das  $T_{H2}$ -induzierende IL-4 sogar die Reifung von  $T_{H17}$ -Zellen, was die Hypothese unterstreicht, es handle sich dabei um eine distinkte Subpopulation (Langrish et al., 2005; Murphy et. al., 2003).

Ungewöhnlich hierbei ist, dass das immunsuppressive TGF- $\beta$  sowohl an der Entstehung von pro-inflammatorischen  $T_{H17}$ -Zellen über die Induktion des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t beteiligt ist, wie auch an der Entstehung entzündungshemmender Tregs durch Foxp3. Die beiden Zellreihen stehen damit zwar in engem Verwandtschaftsverhältnis miteinander, sind jedoch nach derzeitiger Auffassung funktionelle Antagonisten, die eine grundlegende Steuerung der Aktivität des erworbenen Immunsystems darstellen könnten (Kimura and Kishimoto, 2010). Ein aktuelles Modell beschreibt bei Eindringen von Krankheitserregern in den Körper die Produktion von IL-6 durch Dendritische Zellen als frühe Barriere des angeborenen Immunsystems, womit die Differenzierung zu  $T_{H17}$ -Zellen zu Ungunsten der Treg-Entstehung induziert wird. Die IL-17-Produktion in der frühen Phase der Immunreaktion wiederum führt zur Stimulation von Neutrophilen Granulozyten und unterstützt so die frühe Immunabwehr (Bettelli et. al., 2006). Nicht zuletzt aufgrund dieses Zusammenhangs werden  $T_{H17}$ -Zellen als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem gesehen.

Neben der divergenten Entwicklung lassen sich die vier unterschiedlichen  $T_H$ -Subspezies auch anhand der Expression unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren, in diesem Fall Chemokinrezeptoren, voneinander unterscheiden. Erst kürzlich konnten beim Menschen und im Mausmodell CCR6 als Marker für funktionelle  $T_{H17}$ -Zellen identifiziert werden (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Pötzl et al., 2008). Diese Tatsache wurde von mir genutzt, um  $T_{H17}$ -Zellen zu markieren und anschließend durchflusszytometrisch zu analysieren.

## 1.4 Effektor und Gedächtniszellen

Neben der Einteilung der T-Lymphozyten in  $T_{H1}$ -,  $T_{H2}$ -, Treg- und  $T_{H17}$ -Zellen unterscheidet man außerdem den Aktivitätsstatus der Zellen nach der Aktivierung durch ein präsentiertes Fremdantigen. Ein Großteil der Zellen bleibt als Effektorzelle ( $T_{EFF}$ ) am Ort der Entzündung zurück, unterstützt durch Zytokinausschüttung andere Zellen des Immunsystems und stirbt nach vollständiger Beseitigung des Fremdantigens.

## <<< Einleitung >>>

Ein kleinerer Teil der Zellen wandert durch efferente Lymphgefäße aus und zirkuliert durch Milz, Payersche Plaques und weitere sekundäre Lymphorgane – diese Zellen werden zentrale Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ) genannt. Sie bilden einen Teil des immunologischen Gedächtnisses und sorgen bei Zweitkontakt mit dem Fremdantigen für eine deutlich beschleunigte Mobilisierung und Aktivierung von Immunzellen. Eine dritte Gruppe, die Effektor-gedächtniszelle bleibt auch nach der Entzündung in der Peripherie zurück und schützt den Körper vor erneutem Eindringen des gleichen Keims über die gleiche Barrierelücke. Letztendlich unterscheiden sich auch diese drei Subtypen durch ein spezifisches Chemokinprofil an ihrer Oberfläche (Woodland and Kohlmeier, 2009).

## 1.5 Chemokine und ihre Rezeptoren im Kontext der Migration von T-Zellen

Die Familie der Chemokine ähnelt strukturell ihrem erstbeschriebenen Vertreter IL-8 und ist somit eine Subklasse von Zytokinen, die vor allem der Migration von Zellen dient.

Insgesamt sind über ca. 50 Vertreter im Menschen und in der Maus beschrieben, die in vier weitere Unterfamilien abhängig von der Stellung des/der beiden Cysteinaminosäure/n –  $\alpha$  bis  $\delta$  – eingeteilt werden. Sie unterscheiden sich also in erster Linie durch ihre Struktur und nicht durch ihre Funktion. Die Namensgebung berücksichtigt die Untergliederung mit unterschiedlichen Bezeichnungen, also CXC für  $\alpha$ -Chemokine, CC für  $\beta$ -Chemokine, C für  $\gamma$ -Chemokine und CX3X für  $\delta$ -Chemokine. Wird vom Chemokinliganden gesprochen, so wird ein L- für Ligand- angehängt, wie bei CXCL8; spricht man vom Rezeptor, so endet die Bezeichnung mit R wie bei CCR6. Dabei können mehrere unterschiedliche Liganden einen Rezeptor aktivieren, ebenso, wie einige Rezeptoren einem Liganden zugeordnet werden können (Baggiolini et al., 1994).

Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren. Bindet ein Ligand an den extrazellulären Teil des Rezeptors, dissoziiert im Rahmen einer intrazellulären Signalkaskade die  $G_{\beta\gamma}$ -Einheit des G-Proteins und die Phosphoinositid-3-Kinase wird aktiviert. Diese setzt wiederum Phospaditylinositol-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) frei und letztlich folgt die Umgestaltung des Zytoskeletts zugunsten einer Zellmigration. Diese ist ein entscheidendes Kriterium für die Funktion des Immunsystems. Naive Zellen zirkulieren über das Blutgefäßsystem und durchqueren in einem mehrstufigen Prozess die Gefäßwand von hochendothelialen Venolen in Lymphknoten (Ley et al., 2007; Nourshargh and Marelli-Berg,

## <<< Einleitung >>>

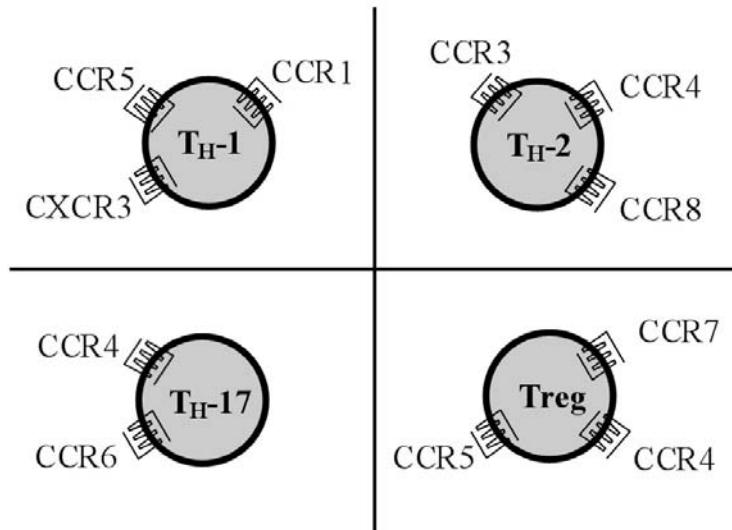
2005). Durch sog. *tethering and rolling* wird der Lymphozyt durch Interaktion des Adhäsionsmoleküls CD62L mit spezifischen Oligosacchariden der Endotheloberfläche abgebremst. Die Chemokine der Endotheloberfläche können auf entsprechende Rezeptoren der migrierenden Zelle wirken und diese aktivieren. Aktivierte Lymphozyten werden nun durch Integrine an der Gefäßwand verankert, während gleichzeitig eine Konformationsänderung der Endothelzellen stattfindet (*activation and arrest*), die eine transzelluläre Passage ermöglicht. Ist der Lymphknoten in der Nähe eines Infektfokus, so schüttet das umliegende Gewebe Chemokine aus und der Lymphozyt wandert entlang des Chemokingradienten. Zusätzlich wird durch weitere Botenstoffe wie TNF und IL-1 die Adhäsion am Endothel erleichtert (Rot and von Andrian, 2004). Immigrierende naive T-Lymphozyten können nach der Diapedese - dem Durchwandern der Gefäßwand - durch den Kontakt zu antigenbeladenen APCs aktiviert werden und differenzieren dann zu T-Effektorzellen, Zentralen Gedächtniszellen oder Effektor-Gedächtniszellen. Jeder dieser T-Zell Subtypen besitzt mit dem eigenen Aufgabenspektrum auch unterschiedliche Zielorgane. Die Fähigkeit, in unterschiedliche Zielgewebe einzuwandern und sie wieder zu verlassen, wird durch das Expressionsprofil ihrer Chemokinrezeptoren und anderen Oberflächenmarkern bestimmt. Zentrale Gedächtniszellen behalten die Fähigkeit bei, mit den Oberflächenmolekülen CD62L, CCR7 und ICAM-1 die Wände von hochendothelialen Venolen zu durchqueren und damit wie naive T-Zellen über Blutgefäße in sekundäre Lymphorgane ein- und durch die Lymphe wieder auszuwandern, was als *homing* bezeichnet wird (Weninger et al., 2001). T-Effektorzellen oder Effektorgedächtniszellen verlieren diese Fähigkeit mit dem Fehlen des Chemokin-Rezeptors 7. Sie können sekundäre Lymphorgane nicht mehr durch hochendothelialen Venolen betreten, sondern wandern über postkappiläre Venolen in Entzündungsherde der Haut, der Lamina Propria des Gastrointestinaltraktes und des Zentralen Nervensystem (Marelli-Berg et al., 2008).

## 1.6 Chemokine und ihre Rezeptoren in der $T_H$ -Zelldifferenzierung

Wie bereits beschrieben unterscheiden sich auch die  $T_H$ -Subpopulationen unter anderem auch im Hinblick auf ihre Chemokinrezeptoren. Naive  $T_H0$ -Zellen besitzen CXCR4 und das für Migration notwendigen CCR7. Reifen diese Zellen zu  $T_H1$ -Zellen, so exprimieren sie CXCR3, CCR1 und CCR5.  $T_H2$ -Zellen tragen CCR3, CCR4 und CCR8, während von  $T_H17$ -Zellen die

<<< Einleitung >>>

Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR6 exprimiert werden (Sallusto et al., 1998; Siveke and Hamann, 1998; Acosta-Rodriguez et al., 2007).



**Schema 3:** Chemokinrezeptorstatus von  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_{reg}$  und  $T_H17$  Zellen.

Der CC-Rezeptor 6 (CCR6) wurde erstmals 1996 beschrieben, gehört zu den  $\beta$ -Chemokin-Rezeptoren und kommt auf unreifen dendritischen Zellen und B-Lymphozyten sowie auf der  $T_{reg}$ - und  $T_H17$ -Subspezies von T-Lymphozyten vor. Wichtigster Ligand des Rezeptors ist das Chemokin CCL20, das proinflammatorische Wirkung besitzt und bei Erkrankungen mit autoimmuner Genese wie der Psoriasis in höherer Konzentration nachgewiesen wurde (Homey et al., 2000). Andere Chemokine sind zu CCR6 inkompatibel. Daneben wurden jedoch die  $\beta$ -Defensine hBD1 und hBD2, eigentlich dem angeborenen Immunsystem zugehörig, als Liganden für CCR6 identifiziert (Yang et al., 2001). Auch in diesem Zusammenhang wird  $CCR6^+$ -Zellen eine Brückenfunktion zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem zugesprochen. Die Arbeitsgruppe von Acosta-Rodriguez zeigte 2007 anhand humaner Zellen, dass alle IL-17-Produzenten den CC-Rezeptor 6 besitzen, auch wenn nur etwa 5-10% aller  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen IL-17 produzieren. In der  $CCR6^+$ -Gruppe befanden sich jedoch neben klassischen  $T_H17$ -Zellen auch  $T_H1$ -Zellen, die als Doppelproduzenten sowohl von IL-17 als auch IFN $\gamma$  auftraten (Acosta-Rodriguez et al., 2007). In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass im Mausmodell unter den  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen keine IL-17-IFN $\gamma$ -Doppelproduzenten und damit keine  $T_H1$ -Zellen auftraten, was durch eine Arbeitsgruppe aus Houston bestätigt wurde (Yamazaki et al., 2008). Wan et al. zeigten darüber hinaus, dass ein großer Teil von  $CCR6^+$ -T-Zellen, die zunächst kein

## <<< Einleitung >>>

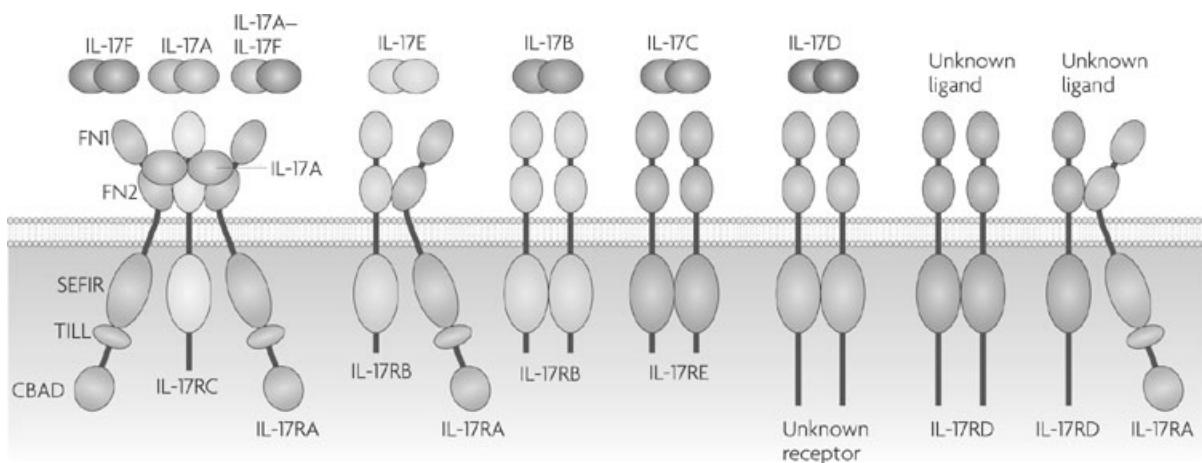
IL-17 produzierten, durch Stimulation zu IL-17 Produzenten wurden. Dies gelang nicht mit CCR6<sup>-</sup>-Zellen (Wan et al., 2011). So beschreibt eine CCR6-Expression die Fähigkeit der IL-17 Produktion und schließt im Mausmodell eine T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zugehörigkeit aus. Auch bei Tregs wurde CCR6 auf mRNA-Ebene nachgewiesen, jedoch in einer Konzentration von nur etwa einem Zehntel im Vergleich zu T<sub>H</sub>17-Zellen (Yamazaki et al., 2008).

Zusammenfassend ist eine hohe Expression von CCR6 bei Lymphozyten ein Marker für funktionelle T<sub>H</sub>17-Zellen (Pötzl et al., 2008) und damit für die Produzenten von IL-17, das in Zusammenhang mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen steht.

## 1.7 IL-17 – das Effektor-Molekül der T<sub>H</sub>17-Immunantwort

### 1.7.1 Struktur

Unter Zytokinen versteht man eine Vielzahl unterschiedlicher sezernierter oder membrangebundener Proteine, die von Immunzellen, aber auch anderen Körperzellen produziert werden. Zytokine beeinflussen eine Vielzahl von Immunfunktionen. So bewirken einige Zytokine gesteigerte Hämatopoiese oder eine lokale Gewebsentzündung, andere führen zu Fieber und zur Aktivierung und Differenzierung von Antigen-Präsentierenden Zellen oder Lymphozyten.



**Schema 4:** Die IL-17 Familie mit schematischem Aufbau von Liganden und Rezeptoren (Gaffen, 2009)

## <<< Einleitung >>>

Interleukin-17A gilt als Prototyp für die IL-17 Zytokinfamilie, zu der zusätzlich IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E und IL-17F gerechnet werden. Es besteht aus 155 Aminosäuren und wiegt in seiner typischen Form als Homodimer 35kDa - der kodierende DNA-Abschnitt hat die Länge von 1874 Basenpaaren (Yao et al., 1995). IL-17A und das zu 55% homologe IL-17F werden dabei von aktivierten T-Lymphozyten produziert, während die anderen Mitglieder der IL-17 Familie aus der Sekretion anderen Zelltypen stammen und nicht Thema dieser Arbeit sind. Die Konfiguration von IL-17A und IL-17F als Homodimere kommt durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zu Stande, aufgrund des weitestgehend identischen Aufbaus kommen auch IL-17A/IL-17F-Heterodimere vor (Hymowitz et al., 2001; Liang et al., 2007). Rezeptoren für die beschriebenen Dimere finden sich bei Mäusen in Fibroblasten, Epithel- und Mesothelzellen unterschiedlicher Organe, sowie in aus dem Knochenmark stammenden Zellreihen. Wird im weiteren Verlauf die Bezeichnung IL-17 verwendet, so ist dabei, wie aus Publikationen gewohnt, IL-17A gemeint.

Die Funktion von IL-17 kann zusammenfassend als proinflammatorisch bezeichnet werden: In der Maus konnte eine verstärkte Ausschüttung der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL5 sowie des Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktors (G-CSF) durch IL-17A ausgelöst werden, was die Proliferation, Reifung und Chemotaxis vor allem neutrophiler Granulozyten zur Folge hat (Ye et al., 2001; Moseley et al., 2003). Dass diese Beobachtung auch für das menschliche Immunsystem Bestand hat, zeigen Versuche mit humanen, epithelialen Zellen aus der Lunge (Jones and Chan, 2002; McAllister et al., 2005).

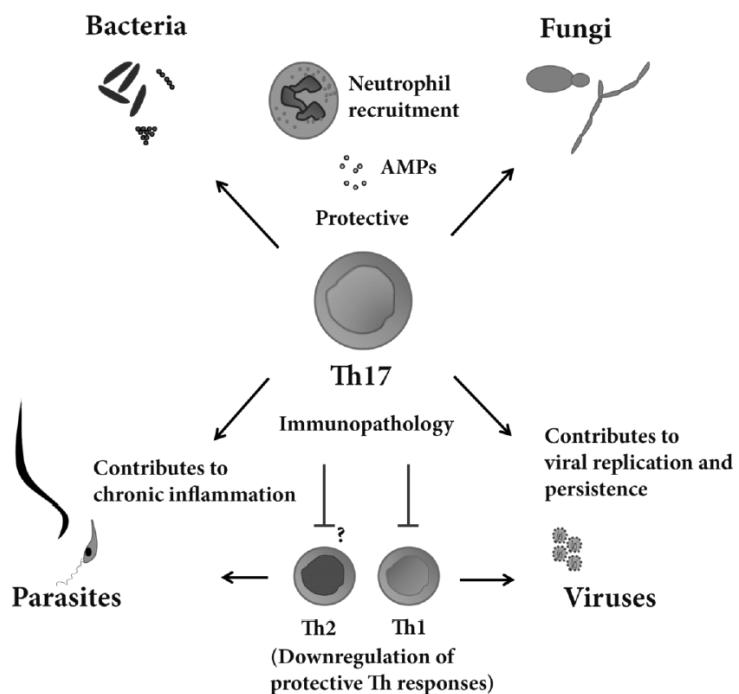
### **1.7.2 IL-17 im Kontext von Infekten, Autoimmunerkrankungen, Abstoßungsreaktionen und Malignomen**

Obwohl bei den meisten bakteriellen Infektionen B-Zellen den Hauptteil der Immunabwehr übernehmen, ist eine Aktivierung von Granulozyten für eine erfolgreiche Beseitigung von Fremdantigen unerlässlich. Eine Schlüsselrolle für die Hochregulation der B-Zell-Antwort übernehmen T<sub>H</sub>2-Zellen, während T<sub>H</sub>17-Zellen analog dazu Granulozyten stimulieren. Ein Fehlen dieser regulatorischen Funktion zeigt sich als prägnantes Beispiel bei AIDS Patienten mit deutlich reduzierter T-Zellzahl, die häufig an bakteriellen Pneumonien versterben, obwohl weder B-Zellen noch Neutrophile direkt von der HIV-Infektion betroffen sind. Für einen häufigen Erreger der Lungenentzündung, Mykoplasma pneumoniae, konnte eine Induktion von IL-17 in

<<< Einleitung >>>

CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Mäusen nachgewiesen werden (Wu et al., 2007). Ähnliches konnte für den Erreger *Citrobacter rodentium* gezeigt werden, der eine Induktion von T<sub>H</sub>17 Zellen durch eine erhöhte Ausschüttung von TGF-β bewirkte (Mangan et al., 2006). Dass die Induktion von IL-17 auch auf das Überleben der Tiere Einfluss nimmt, konnte schon 2001 dargelegt werden: Für Pneumonien durch Klebsiellaspezies wurde bei IL-17R-knockout-Mäusen eine Mortalität von 100% gegenüber 40% bei Wildtypieren beobachtet, was die Notwendigkeit von IL-17 für die Rekrutierung von Neutrophilen in die Alveolen unterstreicht (Ye et al., 2001).

Anhand der intraperitonealen Infektion von IL-17R-knockout-Mäusen mit *Toxoplasma gondii* konnte die pro-inflammatorische Wirkung von IL-17 auch anhand von Parasiten aufgezeigt werden: Wildtypiere zeigten einen raschen Anstieg von Neutrophilen im Bauchfell, der mit einer deutlichen Entzündungsreaktion mit Gewebsuntergang einherging. Während dessen zeigten die Knockout-Mäuse eine prolonzierte und weniger intensive Entzündung, die letztendlich mit einer höheren Mortalität einherging (Kelly et al., 2005).



**Schema 5:** T<sub>H</sub>17-Zellen und ihre Funktionen, (nach van de Veerdonk et al., 2009)

### <<< Einleitung >>>

Besondere Aufmerksamkeit erhält IL-17A in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen. Vormals standen  $T_{H1}$ -Zellen im Verdacht, Autoimmunerkrankungen auszulösen. Es zeigte sich jedoch, dass auch IFN $\gamma$ -defiziente Mäuse an Autoimmunerkrankungen erkrankten und dies sogar heftiger, als Wildtypiere (Tran et al., 2000). Mit  $T_{H17}$ -Zellen und ihrem Effektorprotein IL-17 steht aktuell eine andere  $T_H$ -Subspezies in Fokus. So wurde in der Haut von Psoriatikern ein erhöhter Spiegel von IL-17A mit konsekutiver Hochregulation weiterer Entzündungsmediatoren und Beeinflussung des Zellzyklus von Keratinozyten beobachtet (Teunissen et al., 1998).  $T_{H17}$ -Zellen konnten vorwiegend in der betroffenen Dermis lokalisiert und die anfangs verstärkte IL-17-mRNA-Synthese durch eine immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin auf Normalniveau reduziert werden (Lowes et al., 2008). Ebenso konnte im Mausmodell für die Rheumatoide Arthritis durch eine antikörpervermittelte Inaktivierung von IL-17A und F eine Reduktion der Zerstörung von Gelenkknorpel und knöchernen Gelenkstrukturen erreicht werden (Lubberts et al., 2004). Eine wichtige Rolle für die Schwere der Gelenkentzündung konnte insbesondere  $T_{H17}$ -Zellen zugeordnet werden, die den Oberflächenmarker CCR6 besaßen (Hirota et al., 2007). Fujinos Gruppe gelang es 2003 einen Zusammenhang von IL-17 und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen herzustellen, indem sie Patienten mit Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn anderen Patienten mit ischämischer oder bakterieller Kolitis gegenüberstellte und bei beiden Patientengruppen eine quantitative Bestimmung von IL-17 und IL-17-mRNA in der entzündeten Darmmucosa durchführte. Dabei ließ sich nur bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine erhöhte IL-17-Expression und die zugehörige mRNA nachweisen – vornehmlich in T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen (Fujino et al., 2003). Auch bei Multiple Sklerose konnten IL-17-produzierende Lymphozyten in einer weit höheren Zahl in akut entzündeten Arealen nachgewiesen werden, als im Lymphknoten oder in inaktiven Läsionen (Tzartos et al., 2008). Ebenso sind  $T_{H17}$ -Zellen für die Überbrückung der Blut-Hirnschranke verantwortlich und führen über die Rekrutierung weiterer Leukozyten zur Entzündung des ZNS (Kebir et al., 2007). Auch im Mausmodell für die Multiple Sklerose, der Experimentellen Autoimmunenzephalitis, zeigten IL-17-Knock-out Mäuse oder mit IL-17-Antikörper behandelte Tiere eine deutlich verminderte Entzündungsaktivität (Komiyama et al., 2006; Hofstetter et al., 2005). Zuletzt wurden auch verschiedene maligne Tumore auf IL-17 produzierende Zellen untersucht. Beispielsweise gelang einer Gruppe aus Lübeck bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der

## <<< Einleitung >>>

Nachweis einer erhöhten Zahl von  $T_{H17}$ -Zellen sowohl im peripheren Blut, als auch unter den infiltrierenden T-Zellen im Bereich des Tumors und seiner befallener Lymphknotenmetastasen. Da die Angiogenese des Malignoms durch  $T_{H17}$ -Zellen gestört wurde, nahm man einen tumorsuppressiven Effekt der Subpopulation an (Kesselring et al., 2010). Andererseits wurde ein Jahr zuvor IL-17 für das Wachstum von malignen Melanomen verantwortlich gemacht, was der Rolle als Gegenspieler des tumorprotektiven  $IFN\gamma$  zugeschrieben wurde (Wang et al., 2009). Letztendlich ist eine allgemeine Aussage über den Effekt von  $T_{H17}$ -Zellen auf Malignome aktuell nicht möglich.

## 1.8 Von der Immunregulation zu Behandlungskonzepten

$T_{H17}$ -Zellen werden als proinflammatorische Lymphozyten sowohl mit der Abwehr von bakteriellen Erregern als auch mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Treg Zellen zeigen im Gegenteil ein weitgehend immunsuppressives Verhalten. Umso überraschender war die Erkenntnis, dass die Entwicklung beider Subpopulationen aus unreifen T-Zellen durch ein und dasselbe Zytokin, TGF- $\beta$ , induziert wird (Mangan et al., 2006). Hierbei aktiviert TGF- $\beta$  die Bildung sowohl des Transkriptionsfaktoren Foxp3, der für die Reifung zur Treg Zelle verantwortlich ist, als auch von ROR $\gamma$ t als Aktivator der  $T_{H17}$ -Zellreifung. (Zhou et al., 2008). Die Steuerung der Entwicklung erfolgt durch das Akut-Phase-Protein IL-6. In dessen Anwesenheit entsteht ein Ungleichgewicht der Faktoren, so dass eine erhöhte Bildung von  $T_{H17}$ -Zellen resultiert, während bei Fehlen von IL-6 v.a. Treg Zellen entstehen (Bettelli et al, 2006). Aus den Erkenntnissen dieser Grundlagenforschung entstand letztendlich die Idee, durch eine medikamentöse Reduktion des proinflammatorischen IL-6 die Entwicklung von  $T_{H17}$ -Zellen aus unreifen T-Zellen zu kontrollieren. Im Modell der kollageninduzierten Arthritis konnte durch Antikörper gegen den IL-6 Rezeptor eine Reduktion der  $T_{H17}$ -Induktion und der Gelenkentzündung beobachtet werden, auch wenn bereits differenzierte Zellen nicht beeinflusst wurden (Fujimoto et al., 2008). Heute wird Tocilizumab als Anti-IL-6R-Antikörper bei Patienten mit therapieresistenten Formen der rheumatoiden Arthritis eingesetzt (Emery et al., 2008; Genovese et al., 2008). Letztendlich kann zwar nicht beurteilt werden, ob der Therapieerfolg des Medikaments auf die allgemeine anti-inflammatoryische Wirkung, die beispielsweise auch bei TNF-Blockern oder dem IL-1-Antagonisten Anakinra auftritt, oder aber auf die Inhibition der

<<< Einleitung >>>

$T_{H17}$ -Reifung beruht. Darüber hinaus sind 2012 auch zwei Anti-IL-17-Antikörper bei Patienten mit Psoriasis in der klinischen Erprobung. Ixekizumab konnte in einer Phase II Studie subkutan appliziert eine deutliche Reduktion der Krankheitssymptome bei zwei von drei Patienten hervorrufen (Leonardi et al., 2012). Zu ähnlichen Untersuchungsergebnissen kam eine Phase II Studie mit dem Anti-IL-17R-Antikörper Brodalumab, so dass beide Substanzen gute Chancen für die Zulassung zur Therapie der Psoriasis haben (Papp et al., 2012). Die Entstehung von einem „Biological“ wie Tocilizumab zeigt, dass eine langjährige Grundlagenforschung zum Verständnis zellularer und molekularer Vorgänge in unserem Körper zur Linderung oder Heilung von bisher nicht therapierbaren Erkrankungen unerlässlich ist.

<<< Zielsetzung >>>

## **2. Zielsetzung**

$T_{H17}$ -Zellen wird eine Schlüsselrolle in der Fehlregulation der Immunsystems bei vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen zugesprochen. Aber es fehlen noch immer experimentelle Daten zu ihrer Rolle und ihrer Entstehung in einer anti-infektiven, protektiven Abwehrreaktion. Daher hatte diese Promotionsarbeit zum Ziel, ihre Entstehung und Regulation im Verlauf einer Vakzinierung mit dem Modellantigen Ovalbumin zu untersuchen.

Im Mittelpunkt meines Interesses stand dabei die starke Proliferation von  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen, die bis dato jedoch nur *in vitro* aufgezeigt wurde. Kritisch ist die Isolation der Zellen von umgebenden Strukturen, Zytokinen und migrerenden Zellen zu sehen, ebenso die unnatürliche Dauerstimulation durch  $CD3^+$ -Antikörper in der Zellkultur – all dies kann eine Ursache für fehlerhafte Ergebnisse sein. So war ein Hauptbestandteil meiner Arbeit die Messung der Proliferation von  $CCR6^+$   $T_{H17}$ -Zellen *in vivo*. Um diese durchflusszytometrisch darstellen zu können, musste im Labor die Methodik der BrdU-Verabreichung mit anschließender intrazellulärer Färbung der Zell-DNA validiert werden.

Darüber hinaus galt es zu untersuchen, wie die Population im Hinblick auf ihre Proliferation auf eine antigenspezifische Stimulation reagiert. So bestand eine weitere Aufgabe der Arbeit darin, mithilfe der Vaccinierung von TCR-transgenen Mäusen antigenspezifische Proliferation von  $T_{H17}$ -Zellen zu Beginn und in der Hochphase der Immunreaktion zu messen und mit derer von anderen T-Helper-Zellen zu vergleichen.

Schließlich wurde untersucht, ob  $T_{H17}$ -Zellen während der Infektpause aus dem Lymphknoten in weitere sekundäre Lymphorgane auswandern und hier durch antigenspezifische Restimulation aktiviert und zur Produktion von IL-17 veranlasst werden können. Zum anderen wurde die Fähigkeit zur schnellen Reaktivierung bei Zweitkontakt mit Fremdantigen *in vivo* nach dem Ablauf der Akutphase der Immunreaktion überprüft.

## **3. Material und Methoden:**

### **3.1 Materialien**

#### **3.1.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere kamen C57BL/6-OTII Mäuse zum Einsatz, die einen Ovalbumin spezifischen T-Zell-Rezeptor tragen, also eine spezifische Immunantwort ausschließlich auf Ovalbumin entwickeln können. Eine Besonderheit ist zusätzlich das Fehlen von CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten. Sie sind auf Grundlage von C57BL/6-Mäusen von Charles River (Sulzfeld) in der Mauszucht der Universität Regensburg gezüchtet worden. Daneben kamen nicht transgene C57BL/6- Tiere zum Einsatz. Alle verwendeten Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen gehalten und vor Einschleusung in die Versuche auf Transgenität untersucht.

#### **3.1.2 Nährmedien und Lösungen**

Phosphat-gepufferte Salinelösung / PBS (Biochrom, Berlin)

Fetales Kälberserum /FCS (Biochrom)

RPMI 1640 (PAN Biotech, Aidenbach)

Gepufferte Salinelösung nach Hanks / HBSS (Invitrogen, Karlsruhe)

Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München)

Dimethylsulfoxid / DMSO (Sigma-Aldrich)

HEPES-Puffer (Sigma-Aldrich)

Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

TWEEN 20 (Sigma-Aldrich)

Citratpuffer pH5 (Sigma-Aldrich)

Bovines Serum Albumin / BSA (Biochrom)

#### **3.1.3 Nukleotide und Reagenzien**

CFSE (Invitrogen)

Bromdesoxyuridin / BrdU (Invitrogen)

<<< Material und Methoden >>>

Saponin (1g in 10ml PBS gelöst = 0,1g/ml)

PMA (Sigma Aldrich)

Ionomycin (Sigma Aldrich)

Golgi Stop (BD Biosciences, Heidelberg)

### **3.1.4 Vaccinationsmittel**

Ovalbumin (Sigma-Aldrich)

CpG-ODN 1668 (Operon Technologies, Alameda, CA)

### **3.1.5 Enzyme und rekombinante Proteine**

DNase (Sigma Aldrich)

### **3.1.6 Antikörper**

Für die durchflusszytometrische Messung wurden folgende Antikörperfärbungen benutzt:

<u>Antikörper (Klon)</u>	<u>Konjugat</u>	<u>Hersteller</u>
Ratte-anti-Maus CD4 (RM4-5)	Pacific Blue	(BD Biosciences)
Ratte-anti-Maus CD4 (RM4-5)	FITC	(BD Biosciences)
Ratte-anti-Maus CD45 (RA3-6B2)	PerCP	(BD Biosciences)
Ratte-anti-Maus CD45 (RA3-6B2)	PE	(BD Biosciences)
Ratte-anti-Maus CD8a (53-6.7)	APC	(BD Biosciences)
Ratte-anti-Maus CD62L (MEL-14)	PE	(BD Biosciences)
Hamster-anti-Maus CD69 (H1.2F3)	PE-Cy7	(EBiosciences, Frankfurt)
Ratte-anti-Maus Inf-g (XMG1.2)	PE	(BD Biosciences)
Ratte-anti-Maus IL-17 (TC11-18H10.1)	PE	(BD Biosciences)
Maus-anti-BrdU (B44)	FITC	(BD Biosciences)
Maus-anti-BrdU (3D4)	PE	(BD Biosciences)
Ratte-anti Maus CCR6 (140706)	Biotin	(R&D Systems, Wiesbaden)

<<< Material und Methoden >>>

Ziege-Anti-Ratte-AK

Alexa-Fluor-647 (Invitrogen)

### 3.1.7 Lösungen zur intrazellulären Färbung

FACS-Puffer (FP): PBS/ 2% FCS / 15mM Hepes

Fixationspuffer (FIX): PBS / 4% Paraformaldehyd / 15mM Hepes

Permeabilisationspuffer (PERM): PBS/ 2% FCS/ 0,5% Saponin / 15mM HEPES

Permeabilisations-Wasch-Puffer (PERM/WASH): PBS/ 2%FCS/ 0,2% Saponin / 15mM HEPES

Nukleopermeabilisationslösung (NP): 90% FCS / 10%DMSO

DNase-Lösung: PBS, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 15mM HEPES

### 3.1.8 Lösungen für ELISA

Wasch-Puffer: PBS mit 0,05% Tween 20

Block-Puffer: PBS mit 1%BSA, 0,05%NaN<sub>3</sub>

Reagent diluent: TBS mit 0,05% Tween 20 und 0,1% BSA für IFN $\gamma$ -Nachweis bzw.

PBS mit 0,05% Tween 20 und 0,1% BSA für IL-17-Nachweis

Substrat-Puffer: 1 TMB-Tablette gelöst in 1ml DMSO, Zugabe von 5ml 0,1M Citratpuffer pH5,  
4ml ddH<sub>2</sub>O und 10 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.1.9 Kits

BrdU Flow Kit von BD Biosciences, aus dem der FITC-konjugierte anti-BrdU-Antikörper, BD Cytofix/Cytoperm Puffer und BD Cytoperm Plus Puffer verwendet wurden.

Maus IFN $\gamma$  DuoSet ELISA Development Kit (DY485, R&D Systems, Minneapolis, USA)

Maus IL-17 DuoSet ELISA Development Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA)

beide bestehend aus Fängerantikörper, Detektionsantikörper, Standard und Streptavidin-HRP.

### 3.1.10 Geräte und Hilfsmittel

LSR II (BD Biosciences, München): Durchflusszytometer zur Analyse von Zellpopulationen

FACS DIVA (BD Biosciences, München): Software zur Auswertung von FACS-Messungen

FlowJo (Free Star, Inc., Ashland, USA): Software zur Visualisierung von FACS-Messungen

GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, USA): Software zur Statistik- und Diagrammerstellung.

ELISA-Reader (MWG-BioTech, Ebersberg)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Grundlagen zur Messung proliferierender Zellen

Da in dieser Arbeit eine antigeninduzierte Proliferation gemessen wurde, ist die sorgfältige Auswahl der dafür geeigneten Methode sehr wichtig. Während die Messung von aktivierten Zellen mithilfe exprimierter Rezeptoren (z.B. CD44) oder produzierter Zytokine nicht sicher mit einer hohen Zellteilung dieser korreliert, ermöglichen die Moleküle Carboxyfluorescein (CFSE), SNARF-1 und Bromdesoxyuridin (BrdU) einen direkten Nachweis für Zellteilung. CFSE und SNARF-1 werden kovalent an Zellproteine gebunden und somit in der Zelle fixiert. Ihr Gehalt nimmt bei der anschließenden Zellteilung stufenweise ab. Appliziertes BrdU wird als Thymidinanalagon bei jeder Zellteilung in die DNA der Tochterzellen eingebaut. Je häufiger sich also Zellen bei vorhandenem BrdU teilen, desto häufiger kommt das markierte Oligonukleotid in ihrer DNA vor. Es kann nach der Zellentnahme mit anti-BrdU-Antikörpern durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Der große Vorteil von Bromdesoxyuridin im Vergleich zu CFSE und SNARF-1 ist die Möglichkeit der Applikation in das lebende Tier. Die Zellen bauen während ihrer Teilung das Nukleosidanalogon ein und erlauben damit die Erhebung des Proliferationsstatus *in vivo*.

### 3.2.2 Methoden zur Immunisierung von TCR-transgenen Mäusen

Den TCR-transgenen C57BL/6I-OTII Mäusen wurden 100 $\mu$ g Ovalbumin und 10nmol CpG subkutan in die laterale Fußsohle injiziert (Injektionskanüle 27G, BD Biosciences), was nach ca. 24h zu einer makroskopisch sichtbaren Schwellung des Fußes führte. Ovalbumin bewirkte dabei die antigenspezifische Immunreaktion, CpG-ODN unterstützt als begleitende Immunstimulanz die Immunantwort. Die Tötung der Tiere mit Organentnahme fand je nach Versuch zwei, drei, sechs oder 22 Tage nach Immunisierung statt. Für den letztgenannten Zeitpunkt wurde mittels einer erneuten Applikation von 100 $\mu$ g Ovalbumin in die selbe Fußsohle an Tag 10 nach Erstimmunisierung die Immunantwort restimuliert. Auf CpG konnte bei der Zweitapplikation verzichtet werden.

### **3.2.3 In-vivo-Gabe von Bromdesoxyuridin**

Zur Verabreichung von Bromdesoxyuridin wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Entweder wurden vier bis 24 Stunden vor der Zellentnahme 2mg BrdU in 200ml PBS gelöst und intraperitoneal injiziert oder BrdU in der Konzentration 0,8mg / ml in PBS gelöst über drei Tage ins lichtgeschützte Trinkwasser gegeben.

### **3.2.4 Methoden zur Zellisolation und Aufreinigung**

#### *Zellisolation aus Lymphknoten und Milz*

Die Tiere wurden mittels Genickbruch getötet, mit Ethanol desinfiziert und mit dem Skalpell eröffnet. Entnommen wurden die Popliteal- und Inguinallymphknoten des beimpften Beines bei den immunisierten Mäusen bzw. eines der Beine bei nicht immunisierten Kontrolltieren. In anderen Versuchen wurden die Milzen entnommen. Sowohl Lymphknoten, als auch Milzen wurden während der folgenden Behandlung separat in HBSS auf Eis gestellt. Die Aufarbeitung der Lymphknoten erfolgte manuell mit zwei Pinzetten in Petri-Schalen mit anschließender Filtrierung durch einen Filter mit einer Porengröße von 70  $\mu$ m. Die Milzen wurden mit Plastikstößeln auf einem Metallsieb zerrieben, so dass die freien Zellen in Lösung gebracht und vom Milzstroma separiert wurden. Die Zellausbeute lag bei den Lymphknoten zwischen  $2 \times 10^7$  Zellen (Inguinallymphknoten einer immunisierten Maus) und  $4 \times 10^5$  Zellen (Popliteallymphknoten einer nicht immunisierten Maus), bei den Milzpräparationen nach der Erylyse bei etwa  $1 \times 10^8$  Zellen. Aufgrund der gründlichen mechanischen Aufarbeitung wurde auf den Kollagenaseverdau verzichtet, da dieser bei ähnlich hoher Zellausbeute zu einer hohen Zahl amorpher Zellen unter dem Mikroskop führte.

#### *Erylyse der Milzzellen*

Da die größte Zellfraktion in der Milz von Erythrozyten gebildet wird, musste diese vor der Kultivierung oder Färbung der Immunzellen beseitigt werden. Dazu wurden die Zellen für fünf Minuten in Erythrozytolyselösung bestehend aus 0,17M NH<sub>4</sub>Cl in PBS-Lösung gepuffert mit 20mM HEPES bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten mit 250 x g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellmasse in PBS / 2% FCS gelöst. Anschließend wurde der Waschschritt zwei weitere Male wiederholt.

### 3.2.5 Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Populationsgrößen

Nach Isolation aus den jeweiligen Organen wurde die Zellsuspension mit Trypanblau gefärbt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Tote Zellen zeichnen sich durch Aufnahme des Farbstoffes aus und wurden nicht mitgezählt. So wurde die Lebendgesamtzellzahl ermittelt.

Die Bestimmung der Größe einzelner Populationen erfolgte nach spezifischer Antikörperfärbung mithilfe des Durchflusszytometers. Hier wurde im *forward scatter* und *sideward scatter* anhand von Größe und Granularität der Zellen Detritus ausgefiltert. Anschließend wurde der Anteil der CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Fraktion an allen gemessenen lebenden Zellen bestimmt und mit der Gesamtzellzahl multipliziert. Dieses Vorgehen erlaubt eine Bestimmung der Populationsgröße.

### 3.2.6 Zellen in Kultur

#### *In vitro-Stimulation und BrdU-Fütterung*

Auf einer 96 Well Platte wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro well in RPMI mit 1 $\mu$ g des Lektins Concanavalin A über 24h bei 37°C stimuliert. Für einen guten Verabreichungszeitpunkt von BrdU wurde den Zellen entweder zwei, sechs oder 24 Stunden vor der Entnahme aus der Kultur 0,02 $\mu$ mol BrdU zugesetzt.

#### *In vitro-Stimulation mit Zytokinmessung*

Die Milz-Zellen wurden auf einer 96 Well Platte zu je  $5 \times 10^3$  pro well in RPMI / 10% FCS ausgesät. Zur Stimulation wurden

PMA (Sigma Aldrich)	5ng/ml	0,01pg/ Well	und
Ionomycin (Sigma Aldrich)	1 $\mu$ M/ml	0,2pg/Well	unter
GolgiStop (BD)		60pl/Well	zugeführt.

Nach 4h wurden die Zellen entnommen, auf Oberflächenantigene und inkorporiertes BrdU gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

#### *Proliferationsassay*

$5 \times 10^7$  erythrozytengereinigte Milz-Zellen wurden mit 1,25 $\mu$ M CFSE in 5ml PBS für 8 min bei

## <<< Material und Methoden >>>

37°C inkubiert und anschließend zweimal mit kaltem FACS-Puffer gereinigt. Nach Aussaat auf eine 96 Well Platte mit ca.  $1 \times 10^6$  Zellen / well in RPMI dienten 0,125g Ovalbumin / well der antigenspezifischen Stimulation. Als Antibiotikazusatz kamen 100 $\mu$ g/ml Streptomycin und 100U/ml Penicillin zum Einsatz. Nach vier Tagen wurden die Zellen geerntet, gepoolt und anschließend gefärbt und gemessen.

### *Zytokinproduktion für ELISA-Messung*

Die Überstände der ausgesäten Zellen der Proliferationsassays wurden nach 72 Stunden entnommen und mittels Immunoassay die Konzentration von IFN $\square$  und IL-17 bestimmt.

### **3.2.7 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Bestimmung von Zellen. Hierzu ist eine vorherige Markierung der Zellen mit Hilfe von farbstoffkonjugierten Antikörpern notwendig, die sich an spezifische Zellbestandteile anlagern. Für eine Färbung von Oberflächenmolekülen der Zellmembran ist eine einfache Aussenfärbung nötig, für die Färbung von intrazellulärem Material wie Proteinen und DNA müssen Zellbarrieren vorher permeabilisiert werden. Die markierten Zellen gleiten im LSR II-Durchflusszytometer (BD) in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom hintereinander durch eine Kapillare, wo sie vier Laser unterschiedlicher Wellenlänge passieren. Das dabei erzeugte Streulicht wird zur Ermittlung der Zellgröße (*forward scatter*) und der Granularität (*sideward scatter*) genutzt. Gleichzeitig werden die an den Zellen haftenden Fluorochrome abhängig von der Wellenlänge des Lasers mehr oder weniger stark angeregt und emittieren dann Licht, das durch Detektoren aufgefangen wird. So kann mit dem LSR II (BD) jede Zelle theoretisch auf 12 unterschiedliche Farbstoffe und damit ebenso viele unterschiedliche Zellbestandteile überprüft werden. Die Fluoreszenz-Signale wurden mit logarithmischer Skala aufgenommen, die FSC- und SSC-Signale mit linearer.

Ein Problem der Messung mehrerer unterschiedlicher Fluorochrome in einer Probe entsteht durch sich überschneidende Emissionsspektren. Je näher die Detektionswellenlängen für fluoreszenzmarkierte Antikörper zusammenliegen, desto höher ist die Interferenz. Da bei den durchgeführten Versuchen zwischen vier und sechs unterschiedliche Moleküle pro Messglas bestimmt wurden, strahlten die Fluorochrome unvermeidbar in die Detektionsbereiche anderer Fluorochrome ein, was durch Kompensationen soweit möglich auszugleichen versucht wurde.

## <<< Material und Methoden >>>

Hierzu wurde v.a. die automatische Kompensationsberechnung des Software FACSDiva (BD Biosciences) verwendet, wofür Messgläser mit Einzelfärbungen angefertigt und einzeln eingelesen werden mussten. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software FACSDiva (BD Biosciences), die Aufarbeitung für die schriftliche Präsentation mit der FloJo Software (Tree Star Inc, Ashland)

### **3.2.8 Färbungen für die Durchflusszytometrie**

#### *Oberflächenfärbung*

Für die durchflusszytometrische Messung wurden sowohl Zellen aus der Kultur, als auch ex-vivo verwendet. Pro FACS-Tube (BD Biosciences) wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit 50 $\mu$ l FACS-Puffer und Fluorochrom markiertem Antikörper für 20min auf Eis inkubiert und anschließend mit FP gewaschen. Da der FITC markierte CCR6-Ratte-anti-Maus-AK mit der anschließenden Permeabilisations- oder Fixationsprozedur interagierte, wurde stattdessen mit einem biotinylierten Ratte-anti-Maus CCR6 AK gefärbt (ebenfalls 20min auf Eis), der darauffolgend mit dem  $\alpha$ -rat Alexa 647-AK (20min auf Eis) fluoreszent markiert und dieser anschließend mit Rattenserum für 10min bei Raumtemperatur geblockt wurde.

Im anschließenden Schritt wurden die Zellen mit weiteren Außenfärbungen versehen, indem sie mit fluoreszenteren Antikörpern für 20min auf Eis inkubiert wurden.

#### *Intrazelluläre Färbungen*

Für die Intrazelluläre BrdU-Färbung wurde nach zwei unterschiedlichen Protokollen gearbeitet: Während Protokoll A (adaptiert an (Rothaeusler and Baumgarth, 2006)) für die in vitro kultivierten Zellen erfolgreich verwendet werden konnte, zeigten sich unerwartet Zuverlässigkeitsdefizite bei der Färbung von Zellen, die BrdU in vivo aufgenommen haben. Für ex vivo Versuche kam deshalb als Protokoll B das BrdU Flow Kit Staining Protocol von BD Biosciences zur Anwendung, das einen tadellosen Nachweis ermöglichte.

#### *Fixation und Permeabilisation nach Protokoll A*

Die Zellen wurden mit 75 $\mu$ l *FIX* pro Probe über Nacht auf Eis inkubiert und am nächsten Morgen mit *Perm/Wash* gewaschen. Daraufhin erfolgte eine zehnminütige Permeabilisation der Zellmembran mit 75 $\mu$ l *PERM* pro Probe auf Eis. Nach einem Waschvorgang mit *Perm/Wash* wurde durch 30minütige Behandlung mit NP auf Eis im Dunkeln auch die Nukleusmembran

<<< Material und Methoden >>>

permeabilisiert, woraufhin nach wiederholtem Waschen mit Faxpuffer eine Refixation mit 75 µl *FIX* erfolgte.

*DNase-Verdau und BrdU-Färbung nach Protokoll A*

Die nun fixierten Zellen wurden zweimal mit *PERM/WASH* gewaschen und mit 500µl DNase Lösung + 20U DNase pro Tube für 1h bei 37°C inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden 35 µl *PERM/WASH* und 15 µl BrdU-Antikörper (PE) für 30 Minuten auf die Zellen gegeben, woraufhin nochmals gewaschen wurde und die Zellen anschließend in 300 µl FP gelöst zur Messung verwendet werden konnten.

*Fixation und Permeabilisation nach Protokoll B*

Fixiert wurde mit 100µl BD Cytofix/Cytoperm für 30 Minuten bei Raumtemperatur, wobei gleichzeitig eine Permeabilisation der Zellmembran bewirkt wurde. Nach einem Waschvorgang mit *PERM/WASH* wurde auch die Nukleusmembran mithilfe von 100µl BD Cytoperm Plus (bestehend aus PBS, 1% BSA, 0,01% TritonX-100) durch zehnminütige Inkubation auf Eis permeabilisiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschritt und es wurde erneut mit 100µl BD Cytofix/Cytoperm fixiert, diesmal für fünf Minuten.

*DNase-Verdau und BrdU-Färbung nach Protokoll B*

Die fixierten Zellen wurden anschließend mit Perm/Wash gewaschen und mit 30µg DNase gelöst in 100µl PBS pro Tube für 1h bei 37°C inkubiert. Nach anschließendem Waschen fand die intrazelluläre Färbung mit 20µl anti-BrdU-Antikörper + 30µl Perm/Wash für 20min bei Raumtemperatur statt. Daraufhin wurden die Zellen in 300µl Faxpuffer gelöst und durchflusszytometrisch erfasst.

*Intrazelluläre Zytokinfärbung*

Für die Intrazelluläre Färbung von IL-17 und IFN $\gamma$  wurden die Zellen aus der Zellkultur zu  $1 \times 10^6$  Zellen pro FACS-Röhrchen gepoolt und nach der Oberflächenfärbung mit 100µl FIX für 15min bei Raumtemperatur fixiert. Nach anschließendem Waschschritt mit *PERM/WASH* wurde mit 100µl PERM für 20min bei 4°C permeabilisiert und wiederholt mit *PERM/WASH* gewaschen. Die Färbung fand mit 0,5µl IL-17- oder IFN $\gamma$ -Antikörpern gelöst in 100µl PERM bei

## <<< Material und Methoden >>>

Raumtemperatur statt, ebenso wurden auch die Isotypkontrollen behandelt. Nach 30min und einem anschließenden Waschschritt mit PERM/WASH können die Zellen dann in FACS-Puffer gelöst und im FACS gemessen werden.

### 3.2.9 Immunoassays

#### *Vorbereitung von Überstand und 96-well Platte*

Der zu messende Überstand wurde 72h nach Kultivierung von Milzzellen in einer Multititerplatte unter dauerhafter antigenspezifischer Stimulation mit Ovalbumin (0,125g / 1x10<sup>6</sup> Zellen) entnommen und bei -20°C in Eppendorf-Cups eingefroren.

Der IFN $\gamma$ - bzw. IL-17-Capture-Antikörper wurde in der Konzentration 4 $\mu$ g/ml in PBS gelöst und anschließend zu 100 $\mu$ l/Probe ausplattiert (Coden). Die Platte wurde anschließend über Nacht unter Wasserdampfsättigung bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich der Antikörper an den Plattenboden anheftete. Nach dreimaligem Waschen mit Wasch-Puffer wurde 300 $\mu$ l Block-Puffer / Probe über eine Stunde feucht bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wieder gewaschen.

#### *Assay Prozedur*

Für die Erstellung einer Eichgerade wurden 60ng / ml IL-17 bzw. IFN $\gamma$ -Standard in *reagent diluent* gelöst und eine Verdünnungsreihe mit den Konzentration 2ng / ml, 1ng / ml, 0,5ng / ml, 0,25ng / ml, 0,125ng / ml 0,0625ng / ml, 0,031252ng / ml und 0ng / ml in doppelter Ausführung auf die 96 well Platte aufgetragen. Ebenso wurden die zu messenden Proben aufgetaut und in doppelter Ausführung zu 50 $\mu$ l / well ausplattiert. Für den d6-Wert der IFN $\gamma$ -Messung wurde die Probe vorher 1:5 verdünnt, um in den Messbereich zu fallen. Der zweistündigen Inkubation und dem erneuten Waschschritt folgte das Auftragen von 40ng IFN $\gamma$ - bzw. 20ng IL-17-Detektions-Antikörper pro well, gelöst in 100 $\mu$ l Reagent Diluent. Nach 2h Inkubation und einem weiteren Waschvorgang wurde 0,5 $\mu$ l HRP-Streptavidin / well in TBS für IFN $\gamma$  bzw. PBS für IL-17 gelöst und für 20min inkubiert. Wieder wurde gewaschen, nun mit je 100 $\mu$ l Substratlösung / well für 20min inkubiert und anschließend die Reaktion mit 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Anschließend konnten die IFN $\gamma$ - bzw. IL-17-Konzentrationen im ELISA-Reader anhand der optischen Dichte der gefärbten Probe gemessen werden.

## 4. Ergebnisse

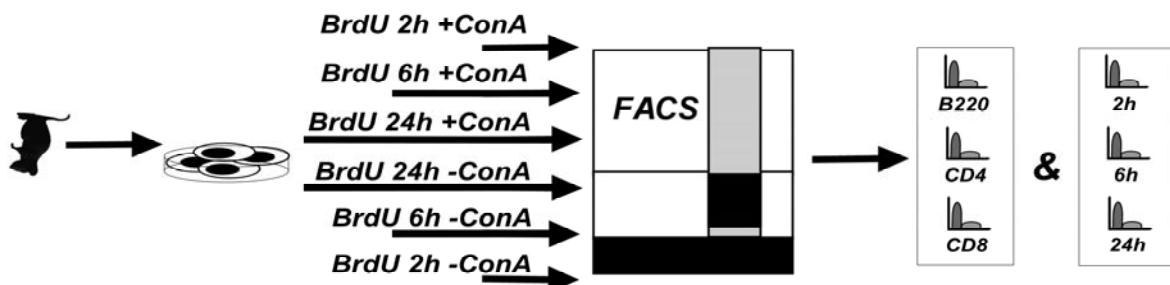
Die Umstände zur Entwicklung von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen zu autoreaktiven Krankheitsauslösern sind bisher nicht im Detail bekannt. Die Kenntnis ihrer Entstehung und ihrer Interaktion im Verlauf einer Immunreaktion könnte für ein pathogenetisches Modell hilfreich sein. Aus diesem Grund wurde die Teilungsrate von CCR6<sup>+</sup>-Zellen in Ruhe und nach antigenspezifischen Proliferation in vivo untersucht und mit der Gesamtpopulation aller T<sub>H</sub>-Zellen verglichen. Ebenso wurde die Fähigkeit zur systemischen Zirkulation analysiert.

### 4.1. Validierung der Methode zur Proliferationsmessung mittels BrdU

Mithilfe des Nukleotids Bromodesoxyuridin (BrdU) wurde im Folgenden die Teilungsrate von CCR6-positiven und CCR6-negativen T<sub>H</sub>-Zellen in Ruhe und nach antigenspezifischer Aktivierung untersucht. Zur Verfügung standen zwei veröffentlichte Methoden: „Evaluation of intranuclear BrdU detection procedures for use in multicolor flow cytometry“ (Rothaeusler and Baumgarth, 2006) und das „BrdU Flow Kit Staining Protocol“ (BD Biosciences), die auf ihre Anwendbarkeit zunächst *in vitro* und anschließend *in vivo* getestet wurden. Außerdem sollte die Methode soweit angepasst werden, dass eine hohe Spezifität der Färbung gewährleistet war.

#### 4.1.1. In-vitro-Kultivierung

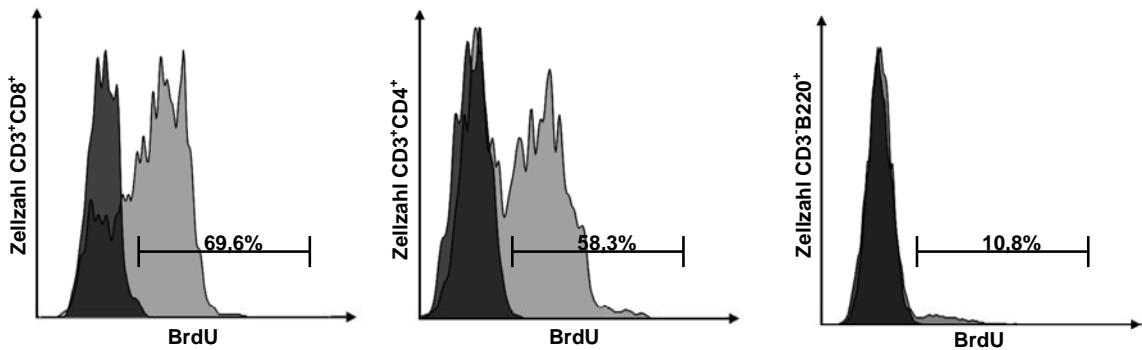
Da BrdU als Marker für Zellstimulation/Zellteilung verwendet werden sollte, musste zuerst geprüft werden, ob das Nukleosidanalogon möglichst nur von sich teilenden Zellen aufgenommen wird. Aus diesem Grund wurde ein Teil der Zellen mit Concanavalin A (Con A) stimuliert und im Bezug auf die BrdU-Aufnahme mit unstimulierten Zellen verglichen. Zusätzlich wurde innerhalb der stimulierten Gruppe noch zwischen unterschiedlichen lymphozytären Subpopulationen verglichen.



**Schema 6:** Analyseschema für den Versuch 4.1.1

<<< Ergebnisse >>>

Einer C57BL/6 Maus wurde die Milz entnommen, daraus Zellen isoliert, die Erythrozyten entfernt und anschließend unter BrdU-Befütterung für unterschiedliche Zeiträume in Kultur genommen. Die Zellen wurden nach Schema 6 in Gruppen aufgeteilt und nach 24h in FACS-tubes überführt. Anschließend wurden die Zellen unter Stimulation mit Con A mit einer Oberflächenfärbung versehen, intrazellulär mit einer Oberflächenfärbung gegen CD4, CD8 und B220 versehen, intrazellulär mit Antikörpern gegen das Nukleosidanalogon BrdU gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

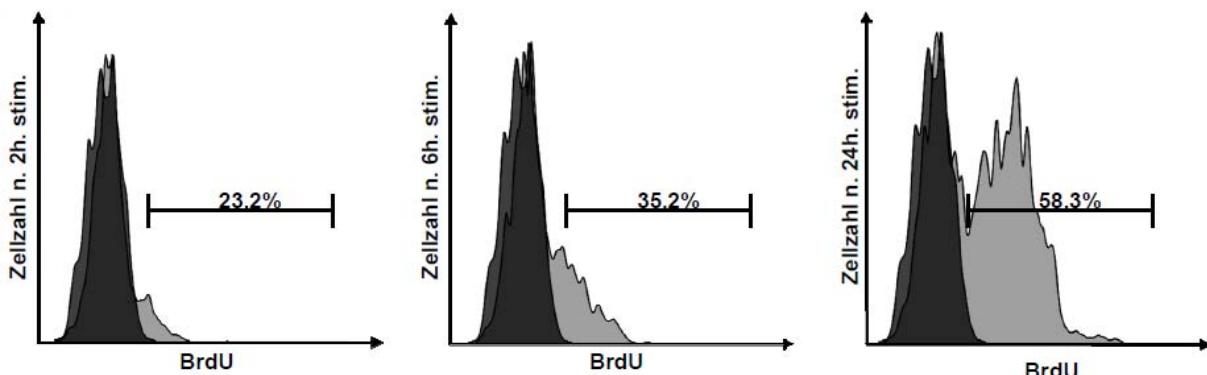


**Abbildung 1: Spezifität des BrdU-Einbaus.** Milzzellen wurden für 24h in BrdU-haltigem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die X-Achse stellt den Nachweis von BrdU, die Y-Achse die Zellzahl dar. Gezeigt ist in grau die  $CD3^+CD8^+$  Population (links),  $CD3^+CD4^+$ -positive Population (mitte) und die  $CD3^+B220^+$  Population (rechts) nach 24 stündiger Stimulation jeweils verglichen mit der dazugehörigen Isotyp-Kontrolle in schwarz.

In der stimulierten Population bauten 58,3% aller CD4-positiven und 69,6% aller CD8-positiven T-Lymphozyten BrdU ein. Im Vergleich dazu waren nur 10,8% aller B-Lymphozyten BrdU-positiv (Abb. 1). Dieser Unterschied erklärt sich mit der Tatsache, dass Con A über den TCR-Komplex vornehmlich die Teilung von T-Lymphozyten und nicht von B-Lymphozyten induziert. Im Vergleich dazu zeigte die unstimulierte Population nur einen Einbau von 0,1% (Daten nicht gezeigt). Somit konnte ich zeigen, dass BrdU spezifisch in sich teilende Zellen aufgenommen und in die DNA eingebaut wird, wo man es anschließend durch eine intrazelluläre Färbung nachweisen kann.

<<< Ergebnisse >>>

Darüber hinaus musste die optimale Zeitspanne der BrdU-Verabreichung für die CD4-positive Subpopulation gefunden werden. Ist der Verabreichungszeitraum für BrdU zu lange, so bauen aufgrund der Tatsache, dass in einem lebenden Organismus eine physiologische Rate an Zellteilungen vorhanden ist, die meisten Zellen schlussendlich das Nukleosidanalogon ein, so dass sich stimulierte Zellen nicht mehr von unstimulierten unterscheiden lassen. Wird Bromodesoxyuridin zu spät verabreicht, so besteht die Gefahr, in der Frühphase der Immunreaktion teilungsaktive Zellen nicht zu markieren. So sollen möglichst viele der stimulierten Zellen und möglichst wenige der unstimulierten Zellen BrdU-positiv sein. Aus einer C57BL/6 Maus wurden hierfür Zellen aus der Milz entnommen und in Gruppen getrennt in Kultur genommen. Jede Gruppe wurde dabei unterschiedlich lang BrdU ausgesetzt. Nach 24h wurden alle Zellgruppen in Proberöhrchen überführt und im Durchflusszytometer analysiert.



**Abbildung 2: Kinetik des BrdU-Einbaus in T<sub>H</sub>-Zellen abhängig von der Dauer der BrdU-Verabreichung**  
 Milzzellen wurden für 2h, 6h und 24h in BrdU-haltigem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die X-Achse stellt den Nachweis von BrdU, die Y-Achse die Zellzahl dar. Dargestellt ist eine 2h (links), 6h (mitte) und 24h (rechts) mit BrdU befütterte Population jeweils verglichen mit dem Isotypen (schwarz).

Eine BrdU-Verabreichung über zwei oder sechs Stunden bot keinen Vorteil gegenüber der Gabe über 24h, da die unstimulierte Population zu allen Zeitpunkten weniger als 0,1% BrdU<sup>+</sup> Zellen aufwies. Im Gegensatz zu dieser profitierten die stimulierten T-Helfer-Zellen deutlich vom längeren Anbieten von BrdU, ihr Anteil stieg von 23,2% nach 2h und 35% nach 6h auf

## <<< Ergebnisse >>>

schließlich 58,3% nach 24h (Abb. 2). Somit ist eine BrdU-Verabreichung von mindestens 24h als optimal anzusehen.

### **4.1.2 Validierung des Färbeprotokolls in der ex vivo-Proliferationsmessung**

Da die Spezifität des BrdU-Einbaus auf proliferierende Zellen sicher gestellt und der optimale Zeitpunkt des Einbaus für eine in-vitro-Untersuchung ermittelt wurde, erfolgte nun die Anwendung von BrdU für die Proliferationsanalyse in vivo.

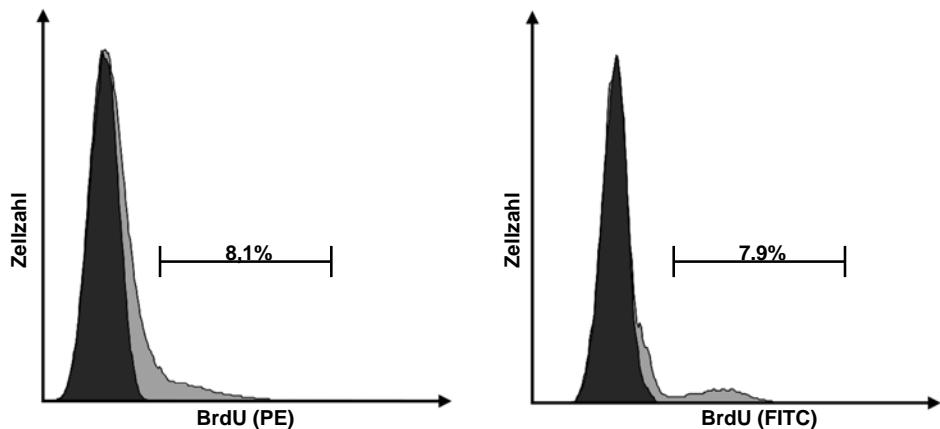
Das Ziel der Untersuchung war, die Fähigkeit zur antigenspezifischen Proliferation von CCR6<sup>+</sup>- mit derer von CCR6<sup>-</sup>-Zellen nach Vakzinierung zu vergleichen. Da bei einer immunkompetenten Maus bei Exposition mit einem spezifischen Antigen in vivo nur wenige T-Zellen antigenspezifisch aktiviert werden, benutzte ich C57BL/6-OTII Mäuse, die größtenteils für Ovalbumin-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen besitzen. Bei Exposition mit dem Hühnereiweiß Ovalbumin findet so eine deutliche T-Zellimmunreaktion statt, die den Nachweis von unterschiedlichen T-Zellpopulationen gewährleistet.

#### *In vivo Protokollvalidierung und Umstellung auf Protokoll B*

Den C57BL/6-OTII Mäusen wurde 100 µg Ovalbumin mit 10 ng CpG in die lateralen Fußsohlen injiziert und nach vier Tagen 0,8 mg BrdU intraperitoneal gespritzt. Nach 24h wurden die poplitealen und inguinalen Lymphknoten entfernt, daraus Zellen gewonnen, mit anti-TCR, anti-CD4, anti-CCR6 und nach Protokoll A (siehe Material und Methoden) mit anti-BrdU gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Messung ergab kein positives Signal des PE-konjugierten Anti-BrdU-Antikörpers, ebenso verlief ein weiterer Versuch mit einem FITC-konjugierten Anti-BrdU-Antikörpers ohne Nachweis von BrdU<sup>+</sup> Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies ist entweder auf fehlenden Einbau des Nukleosidanalogons in die DNA oder unzureichende Anflutung von BrdU-Antikörpern im Zellkern zurückzuführen. Da auch Modifikationen des Protokolls keinen Erfolg zeigten, wurde der Ablauf auf Protokoll B umgestellt und weiter modifiziert (Siehe Material und Methoden). Dieses sieht die Verabreichung von BrdU über drei Tage über das Trinkwasser vor, was die Tiere zusätzlich vor dem Stress intraperitonealer Injektionen bewahrt. Der verlängerte Substitutionszeitraum gewährleistet die ausreichende Aufnahme des Nukleosidanalogons durch die Tiere und korreliert mit den aus Versuch 1.1.2 gewonnenen Erkenntnissen, die für eine lange Gabe von BrdU sprechen. Nach Umstellung auf Protokoll B konnte die BrdU<sup>+</sup> Population nachgewiesen werden.

### <<< Ergebnisse >>>

Einen weiteren Erfolg in der Darstellung der proliferierenden Zellen brachte die Umstellung des anti-BrdU-PE-Antikörpers auf anti-BrdU-FITC. Letzterer definiert eine im Vergleich zum Isotyp deutlich abgegrenzte Population an proliferierenden Zellen (Abb. 3)



**Abbildung 3: Gegenüberstellung der BrdU-Färbungen unter Verwendung von PE- (links) und FITC-konjugiertem (rechts) anti-BrdU-Antikörper.** C57BL/6-OTII Mäuse wurden mit Ovalbumin und CpG immunisiert. An d4 wurde für 24h BrdU (i.p.) verabreicht. Lymphknotenzellen wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden auf CD4<sup>+</sup>-Zellen gegated. Im Histogramm ist das BrdU-Signal der CD4<sup>+</sup>-Zellen dargestellt. Schwarz zeigt die Isotyp-Kontrollfärbung, grau die anti-BrdU-gefärbte Population. Die deutliche Bande der FITC- nicht aber der PE-Färbung erlauben eine zweifelsfreie Differenzierung zwischen BrdU-positiver und BrdU-negativer Population.

Mit beiden Antikörpern konnte dabei ein etwa gleich hoher Anteil proliferierender Zellen nachgewiesen werden. Der FITC-konjugierte Antikörper zeigte im Vergleich zum PE-markiertem Antikörper eine deutliche Rechtsverschiebung der BrdU<sup>+</sup> Population im Histogramm und die Differenzierung zwischen BrdU<sup>+</sup> und BrdU<sup>-</sup> konnte so deutlich verbessert werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde für die Messung der Proliferation in den folgenden Versuchen ausschließlich Protokoll B mit FITC-konjugiertem Anti-BrdU-Antikörper und BrdU-Substitution per os herangezogen.

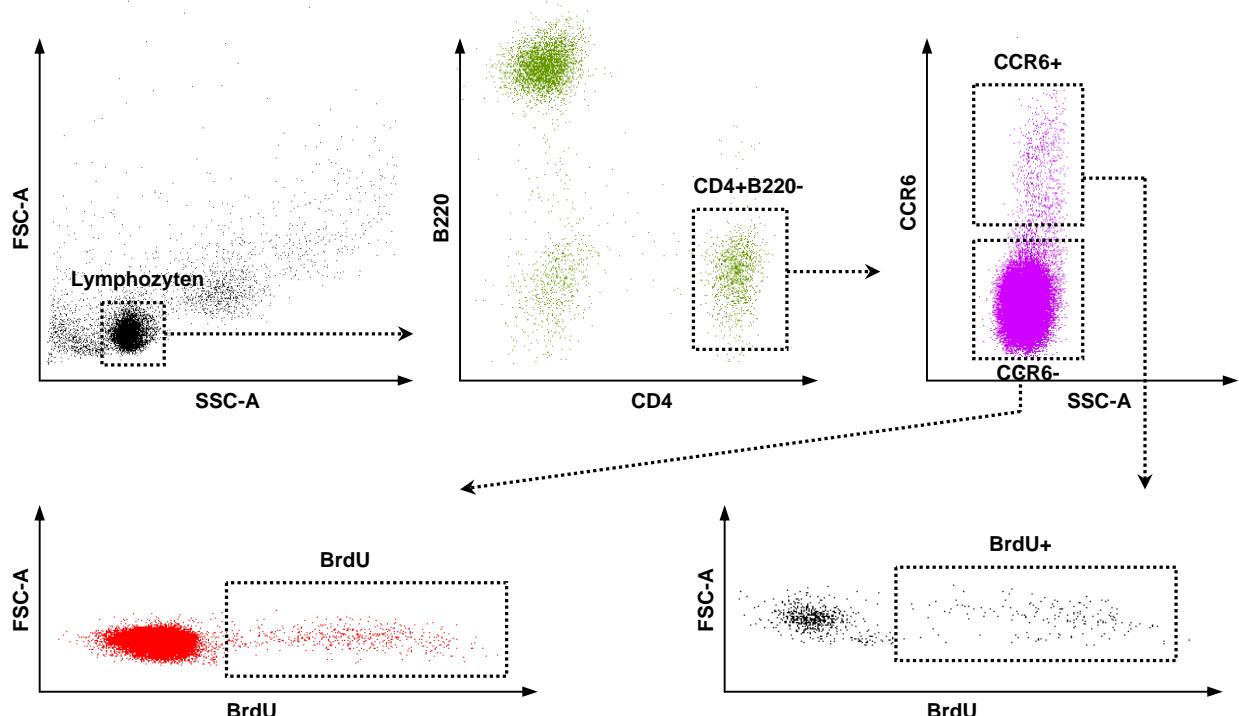
<<< Ergebnisse >>>

## 4.2. Proliferationsmessung ex vivo gewonnener T-Lymphozyten

Da  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen bisher u.a. als autoreaktive Zellen beschrieben wurden, sollte nun ermittelt werden, inwiefern sie sich in ihrer Proliferation in Homöostase von  $CD4^+CCR6^-$ -T-Helfer-Zellen unterscheiden.

### 4.2.1. Proliferation von T-Zellen aus dem Lymphknoten naiver Mäuse

Über drei Tage hinweg wurde C57BL6-OT-II-Mäusen BrdU über das Trinkwasser verabreicht. Nach Tötung der Tiere wurden Zellen aus Popliteallymphknoten entnommen, anschließend nach Protokoll B mit anti-CD4-, anti-CCR6- und anti-BrdU-Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer nach Schema 7 analysiert.



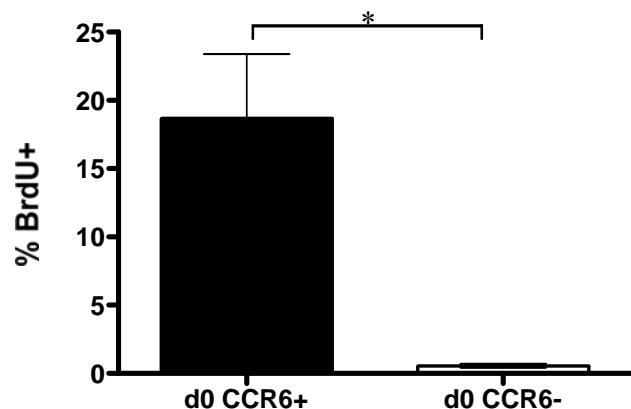
**Schema 7:** Schematische Darstellung der Proliferationsanalyse: Gate 1 wählt wenig granulierte Zellen mittlerer Zellgröße aus, unter denen gate 2 ausschließlich  $CD4^+B220^-$  Zellen selektiert. Diese werden in Dot-Plot 3 in eine  $CCR6^+$ - und  $CCR6^-$ -Subpopulation geteilt und anschließend getrennt voneinander auf BrdU-Gehalt analysiert.

Im Lymphknoten wurde  $CCR6$  nur von  $1,6 \pm 0,4\%$  und in der Milz von  $2,6 \pm 0,5\%$  aller  $T_H$ -Lymphozyten exprimiert (Daten nicht gezeigt).  $CCR6$ -positive Zellen in der  $CD4$ -negativen Population – meist B-Lymphozyten – ließen sich zu einem deutlich höheren Prozentsatz

### <<< Ergebnisse >>>

nachweisen, gehörten jedoch nicht zu den untersuchten  $T_H$ -Zellen und wurden nicht mit einbezogen (Daten nicht gezeigt). Gemessen wurde anschließend die Zell-Proliferation der beschriebenen  $CD4^+CCR6^+$ -Population und der  $CD4^+CCR6^-$ -Vergleichsgruppe anhand der Markierung des in die Zell-DNA eingebauten BrdU-Nukleotids mit fluorochrom-konjugierten Antikörpern.

Im Lymphknoten proliferierten  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen mit  $18,7 \pm 4,3\%$  deutlich aktiver als  $CD4^+CCR6^-$ -Zellen mit  $0,6 \pm 0,1\%$ . In einer naiven Maus wies also die kleine Population von  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen damit eine etwa 30mal stärkere Zellteilung auf, als andere  $CD4^+$ -Zellen. Diese Subpopulation zeigte also einen hohen Zellumsatz auch ohne spezifisches Fremdantigen, während  $CD4^+CCR6^-$ -Zellen im naiven Tier keine nennenswerte Proliferation im Lymphknoten zeigten.



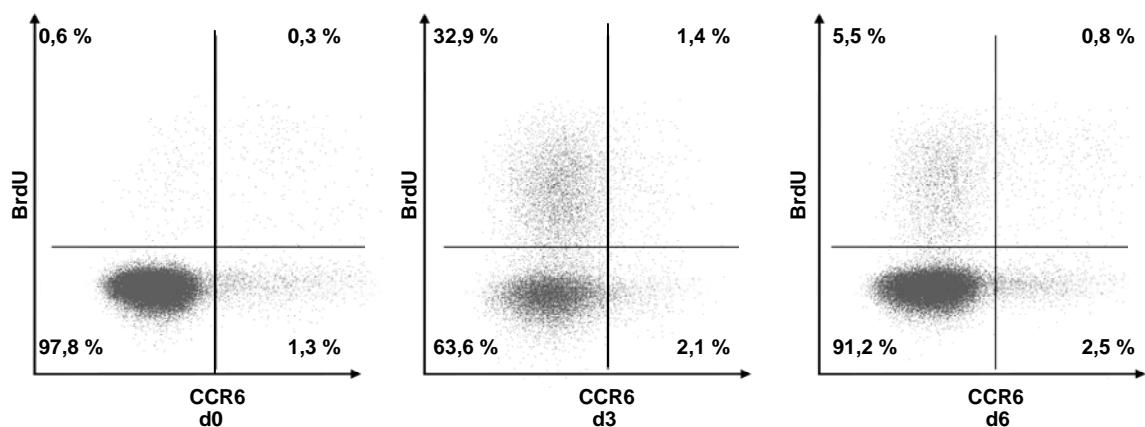
**Abbildung 4: Anteil BrdU<sup>+</sup>Zellen in den ableitenden Lymphknoten naiver Mäuse.** C57BL/6 OT-II Mäuse wurde für drei Tage BrdU im Trinkwasser verabreicht. Lymphknotenzellen wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD4, CCR6 und BrdU markiert. Die Zellen wurden gegated auf  $CD4^+CCR6^+$ - und  $CD4^+CCR6^-$ -Zellen. Der prozentuale Anteil der BrdU<sup>+</sup>- Zellen innerhalb der  $CD4^+CCR6^+$ -Population ist schwarz, die der  $CD4^+CCR6^-$ -Population weiß dargestellt. (n=6) \*  $P < 0,01$

#### 4.2.2 Proliferation von T-Zellen nach Immunisierung mit Ovalbumin

Auf antigenspezifische Stimulation proliferieren Effektor-T-Lymphozyten in der Akutphase einer Immunreaktion und wandern anschließend als Effektorzellen zum Entzündungsherd. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob  $CD4^+CCR6^+$ -Lymphozyten ein ähnliches Verhalten aufweisen. Dazu wurde C57BL6OTII-Versuchsmäusen Ovalbumin in beide Hinterpfoten geimpft

### <<< Ergebnisse >>>

und die Tiere drei Tage (Gruppe 1) bzw. sechs Tage (Gruppe 2) später getötet. Mit der Verabreichung von BrdU über das Trinkwasser wurde jeweils drei Tage vor der Tötung begonnen. Anschließend wurden die poplitealen Lymphknoten wie in 2.1 präpariert, die Zellen isoliert, gezählt, gefärbt und analysiert. Die Zeitpunkte der Zellentnahme wurden so gewählt, dass sie repräsentativ für den Beginn (Tag 3) und den Höhepunkt (Tag 6) der Immunreaktion stehen. Für den Zeitpunkt vor der Immunisierung werden die Daten der naiven Mäuse aus 2.1 verwendet.



**Abbildung 5: Proliferation von CD4<sup>+</sup> Zellen an Tag 0 (links), Tag 3 (mitte) und Tag 6 (rechts) der Immunreaktion.** C57BL/6 OT-II Mäuse wurden mit Ovalbumin und CpG für drei und sechs Tage immunisiert. Drei Tage vor Beendigung des Versuchs wurde BrdU im Trinkwasser verabreicht. Lymphknotenzellen wurden mit Antikörpern gegen CD4, CCR6 und BrdU markiert. Die Zellen wurden gated auf CD4<sup>+</sup>-Zellen. Auf der X-Achse wird nach CCR6<sup>+</sup> aufgetragen, auf der Y-Achse nach BrdU<sup>+</sup>. Blots repräsentativ für sechs Tiere (d0, d3) bzw. drei Tiere (d6).

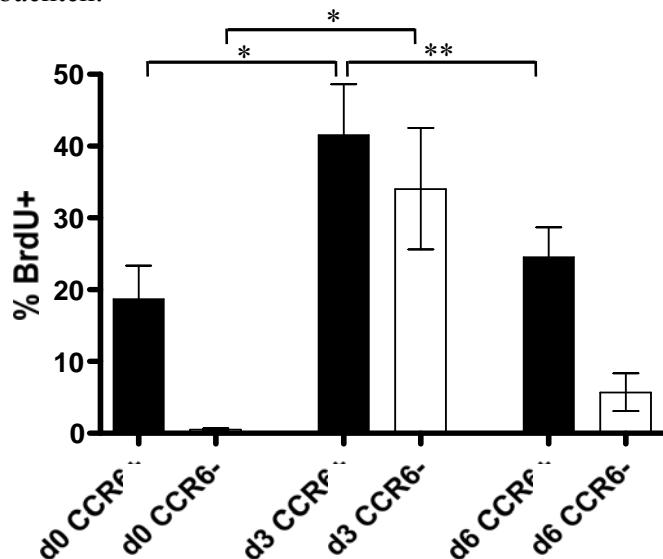
Betrachtet man in Abbildung 5 die DotBlot-Grafik der nicht immunisierten Maus, so wird neben dem geringen Anteil von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen auch deren starke Proliferation ersichtlich. Obwohl unter allen T<sub>H</sub>-Zellen die CCR6<sup>+</sup>-Population nur 1,6% ausmachte, stellte sie ein Drittel (0,3% gegen 0,6%) aller proliferierenden T<sub>H</sub>-Lymphozyten einer naiven Maus dar (Abb. 5).

Betrachtet man den Verlauf der Immunreaktion nach Antigengabe (Abb. 6), so zeigten an Tag 3 CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen eine deutliche Steigerung ihres proliferierenden Anteils auf 34,1 ± 7,7% und damit einen starken Anstieg gegenüber den nicht immunisierten Tieren. Das injizierte Antigen führte also die entsprechende Aktivierung der Immunzellen im Lymphknoten herbei. Dabei stieg

### <<< Ergebnisse >>>

auch der proliferierende Anteil der  $CD4^+CCR6^+$ -Population um den Faktor 2 auf  $41,5 \pm 6,5\%$ , die Zellen zeigten ebenfalls eine Reaktion auf die Immunisierung.

An Tag 6 nach Antigengabe wurde bei beiden Subpopulationen wieder ein Absinken der Proliferation beobachtet: Die  $CD4^+CCR6^+$ -Population proliferierte noch zu  $24,5 \pm 3,4\%$ , die  $CD4^+CCR6^-$  zu  $5,7 \pm 2,1\%$ . Betrachtet man beide Populationen im Verlauf der Immunreaktion, so stieg sowohl bei  $CCR6^+$ - $T_H$ -Zellen, als auch bei  $CCR6^-$ - $T_H$ -Zellen der Anteil der proliferierenden Zellen zum Tag 3 nach Immunisierung an und nahm dann anschließend zu Tag 6 wieder ab, ohne den Ausgangswert zu erreichen. Während des gesamten Verlaufs zeigt die  $CD4^+CCR6^+$ -Population eine im Vergleich zur  $CD4^+CCR6^-$  Gruppe stärkere Proliferation (Abb. 6). Fernab dessen lässt sich auch ein Wachstums des  $CCR6^+$ -Anteils an allen  $CD4^+$  Zellen von 1,6 % auf 3,4 % beobachten.



**Abbildung 6: Darstellung des proliferierenden Anteils von  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen (schwarz) und  $CD4^+CCR6^-$  Zellen (weiß) an Tag 0, Tag 3 und Tag 6 der Immunreaktion.** C57BL/6 OT-II Mäuse wurden mit Ovalbumin und CpG für drei und sechs Tage immunisiert. Drei Tage vor Beendigung des Versuchs wurde BrdU im Trinkwasser verabreicht. Lymphknotenzellen wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD4, CCR6 und BrdU markiert. Die Zellen wurden gegated auf  $CD4^+ CCR6^+$ - und  $CD4^+ CCR6^-$ -Zellen. Dargestellt ist der Anteil der BrdU+-Zellen innerhalb der  $CD4^+CCR6^+$ - und  $CD4^+CCR6^-$ -Population. (n = 6 (d0, d3); n = 3 (d6)) \*  $P < 0,05$  für  $CCR6^+$  und  $CCR6^-$ ; \*\*  $P < 0,05$  für  $CCR6^+$

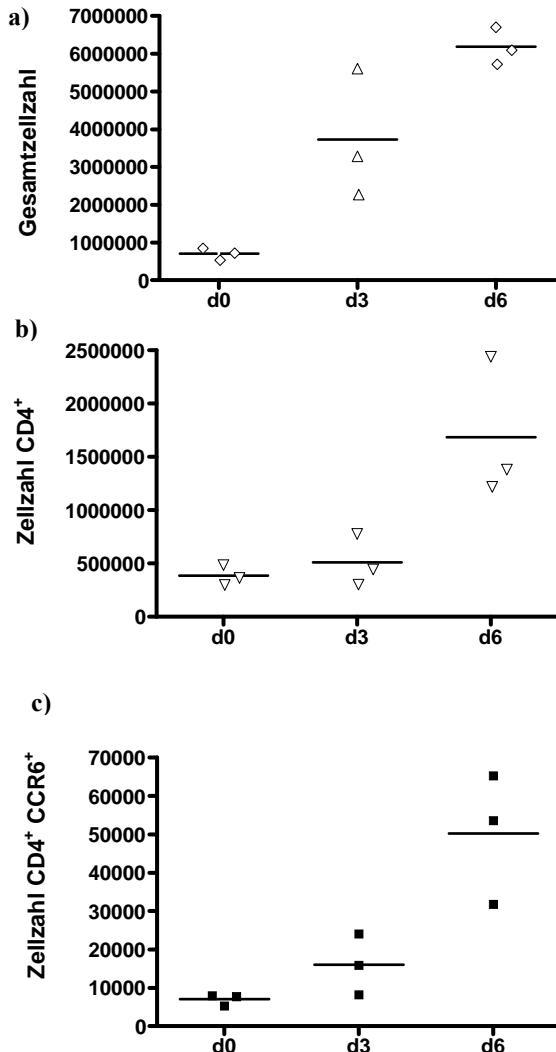
#### 4.2.3. Auswirkung der Immunreaktion auf die Zellzahl

In Versuch 4.2.2 war bereits auffällig, dass die Lymphknoten immunisierter Tiere im Vergleich zu derer naiver Tiere einen höheren Anteil von  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen beherbergten. Im Folgenden

<<< Ergebnisse >>>

wurde ermittelt, inwiefern sich dieser Anstieg und die Zellproliferation auf die absoluten Zellzahlen auswirkten. Dabei wurde die Veränderung der Gesamtzellzahl, aller CD4<sup>+</sup> - und speziell der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen im Verlauf der Immunreaktion im ableitenden Lymphknoten, hier dem Popliteallymphknoten des geimpften Beines, gemessen.

Im Vergleich zum Zeitpunkt vor Immunisierung stieg die Zellularität zum Tag 3 der



Immunreaktion von  $0,7 \pm 0,1 \times 10^6$  auf  $3,7 \pm 1,3 \times 10^6$  pro Lymphknoten (Abb. 7a). Dabei konnte ein steter Anstieg im Anteil der B-Zellen verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der vakzinierungsbedingten massiven Zunahme an Gesamtzellen im Lymphknoten, die bereits während der Präparation sichtbar war, sank der Anteil der CD4<sup>+</sup> Population an den Gesamtzellen in den verwendeten Tieren von 55% im naiven Lymphknoten auf unter 14% am Tag 3 der Immunreaktion, die Zellzahl der Population stieg dabei lediglich auf das 1,3-fache an (Abb. 7b). Innerhalb der CD4<sup>+</sup>Fraktion nahm der CCR6<sup>+</sup>-Anteil in derselben Zeit deutlich zu. Dabei vermehrten sich die Zellen von  $7,0 \pm 1,2 \times 10^3$  auf  $16,1 \pm 2,3 \times 10^3$  an Tag 3 (Abb. 7c). Von Tag 3 bis Tag 6 der Immunreaktion wuchs die Gesamtzellzahl erneut um  $2,5 \pm 0,4 \times 10^6$  Zellen an, etwa die Hälfte des Anstiegs ging nun jedoch auf CD4<sup>+</sup> Zellen zurück, die

**Abbildung 7: Zellzahl aller Zellen (a), der CD4<sup>+</sup>Zellen (b) und der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>Zellen (c) an Tag 0, Tag 3 und Tag 6 der Immunreaktion.** C57BL/6 OT-II Mäuse wurden mit Ovalbumin und CpG für 3 und 6 Tage immunisiert. 3 Tage vor Beendigung des Versuchs wurde BrdU im Trinkwasser verabreicht. Lymphknotenzellen wurden isoliert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD4 und CCR6 markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Ausgehend von der Anzahl der durch Zählung ermittelten Lymphknotenzellzahl (a) wurde die Zahl der CD4<sup>+</sup>- Zellen (b) und der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen (c) berechnet. Jedes Symbol steht für die Zellzahl eines Tieres, der Strich für den Mittelwert aus drei Tieren.

### <<< Ergebnisse >>>

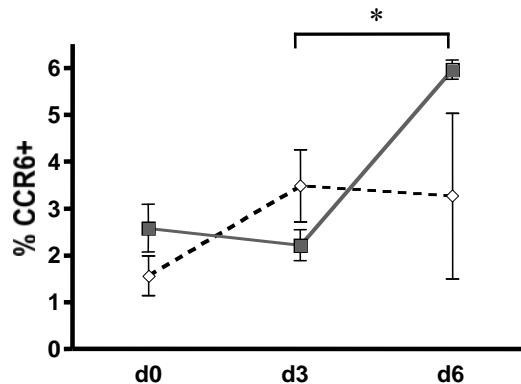
sich auf das 3,3-fache des Ausgangswertes vermehrten. Die CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Anzahl stieg in ähnlichem Maße auf 50,2 x 10<sup>3</sup> Zellen an, so dass ihr Anteil an der CD4<sup>+</sup> Population weitgehend gleich blieb.

Insbesondere in der Frühphase der Immunreaktion zeigte somit die CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Population im Vergleich zu CCR6<sup>-</sup>-T<sub>H</sub>-Zellen ein stärkeres Wachstum. Insgesamt ist an Tag 3 ein moderater, an Tag 6 eine starker Anstieg der CD4<sup>+</sup>-Zellen zu beobachten, der nicht allein mit den Proliferationsergebnissen aus 4.2.2 erklärbar ist. Diese zeigten den Gipfel der Proliferation an Tag 3. Eine mögliche Erklärung hierfür, die Auswanderung aktiver T-Zellen und die Einwanderung naiver Zellen, soll mit Versuch 4.2.4 untersucht werden.

#### **4.2.4. Veränderungen des Anteils CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen in der Milz im Verlauf der Immunreaktion**

Um die Wanderung der T-Zellen zwischen der Milz als wichtigem sekundären Lymphorgan und dem aktivierten Lymphknoten nachzuvollziehen, wurde zeitgleich zu der Entnahme aus dem Lymphknoten bei allen Tieren auch Zellen aus den Milzen entnommen. Damit sollte zum einen der Proliferationsstatus der Milz-CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen mit ihren Gegenstücken im Lymphknoten verglichen werden, zum anderen wurde eine denkbare Reaktion der Milzzellen im Verlauf der Immunreaktion untersucht. Hier ist aufgrund der hohen Gesamtzellzahl und höheren Zellverlusten durch Erylyse ein Nachweis von Zellzahlveränderungen wenig erfolgsversprechend. Vielmehr wird der Prozentsatz von CCR6<sup>+</sup>-Zellen innerhalb des CD4<sup>+</sup> Kollektives betrachtet. Den aus Versuch 4.2 präparierten Mäusen wurde neben den Lymphknoten die Milzen entnommen, auf einem Zellsieb aufgereinigt, mit Erylysepuffer von Erythrozyten gereinigt und die gewonnenen Leukozyten anschließend im gleichen Verfahren wie bei Versuch 4.2. mit Oberflächen- und Anti-BrdU-Antikörpern (für 2.3.2) gefärbt. (n= 6 (d0, d3); n=3 (d6)) Jedes der untersuchten nicht immunisierten Kontrolltiere zeigte in der Milz einen höheren CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Anteil, als in den poplitealen oder inguinalen Lymphknoten. Im Mittel exprimierten bei naiven Tieren 2,6 ± 0,5% aller Milz-T<sub>H</sub>-Zellen den CCR6-Rezeptor. Nach Vaccinierung blieb der Anteil mit 2,2 ± 0,3% an Tag 3 ähnlich hoch und stieg zu Tag 6 deutlich auf 6,0 ± 0,2% an. In Abb. 8 sind vergleichend die Anteile der CCR6<sup>+</sup>-Zellen an der CD4<sup>+</sup> Population im naiven (d0) bzw. vaccinierten (d3, d6) Lymphknoten aufgetragen. Hier blieb nach leichtem Anstieg zum Tag 3 der Anteil der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Population zum Tag 6 hin in etwa gleich.

<<< Ergebnisse >>>

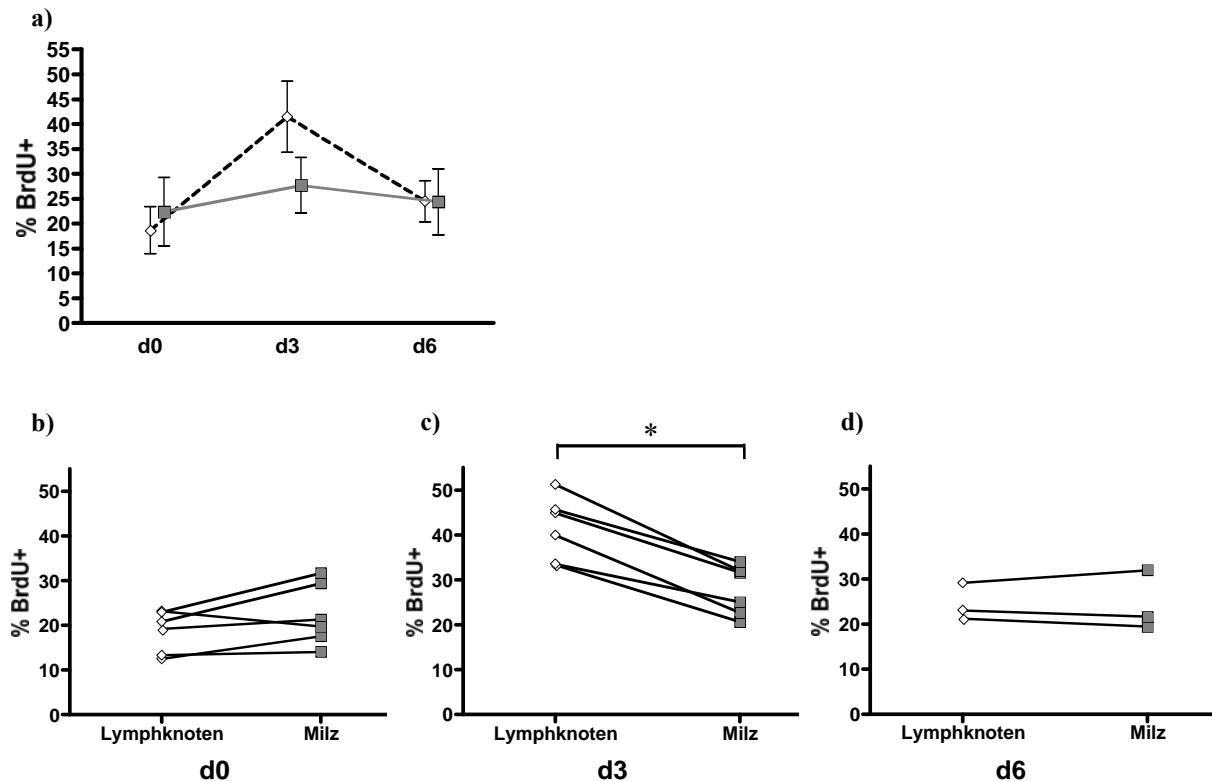


**Abbildung 8: Veränderung des CCR6-Anteils an CD4<sup>+</sup>Zellen in Lymphknoten und Milz vor Immunisierung und an d3 und d6 nach Immunisierung.** C57BL/6 OT-II Mäuse wurden mit Ovalbumin und CpG für 3 und 6 Tage immunisiert. 3 Tage vor Beendigung des Versuchs wurde BrdU im Trinkwasser verabreicht. Lymphknoten und Milz wurden entnommen und Einzelzellen wurden isoliert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD4 und CCR6 markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Anteil der CCR6<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>-Population in Lymphknoten (weiße Rauten) und Milz (schwarze Quadrate) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Vakzinierung (n = 6 (d0, d3); n = 3 (d6); \* P < 0,01 für Milzzellen).

#### 4.2.5 Proliferation von CCR6<sup>+</sup>-Zellen in der Milz von naiven und immunisierten Mäusen.

Der Versuchsaufbau gleicht dem von Versuch 4.2.1 und 4.2.2, es werden Lymphknoten und Milzen entnommen und die Proliferation in den jeweiligen Organen gemessen. In der Milz naiver Tiere proliferierten  $22,4 \pm 6,3\%$  der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen und damit bei fünf von sechs Tieren etwas mehr als in den Lymphknoten der Tiere (Abb 9a, b). Hierbei bestand zwischen den beiden Organen also kein signifikanter Unterschied. Anders verhielt sich dies drei Tage nach Antigenexposition am Fuß der Tiere: Die Proliferation der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen in der Milz zeigte sich mit  $27,7 \pm 5,1\%$  ähnlich hoch wie an Tag 0, während im Lymphknoten aufgrund der Antigenexposition eine deutlich verstärkte Zellteilung zu beobachten war. Hierbei lag die Proliferationsrate aller sechs Tiere in der Milz deutlich unter dem Niveau der Proliferation im ableitenden Lymphknoten. (Abb. 7c). Auch wenn wenige Immunzellen in der Frühphase der Immunreaktion in die Milz eingewandert sein mochten, so führten sie hier nicht zu einer signifikanten Verstärkung der Proliferation von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen.

<<< Ergebnisse >>>



**Abbildung 9: Prozentualer Anteil proliferierender CCR6<sup>+</sup>Zellen im Vergleich zwischen Lymphknoten und Milz an drei Zeitpunkten der Immunreaktion.** C57BL/6 OT-II Mäuse wurden mit Ovalbumin und CpG für 3 und 6 Tage immunisiert. 3 Tage vor Beendigung des Versuchs wurde BrdU im Trinkwasser verabreicht. Die Milzen und die Lymphknoten wurden entnommen und jeweils Einzelzellen isoliert, die wiederum mit Antikörpern gegen CD4, CCR6 und BrdU markiert und durchflusszytometrisch analysiert wurden.

Die Zellen wurden gegated auf CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen.

- a) Dargestellt ist der Anteil an BrdU<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Population in Lymphknoten (weiße Rauten) und Milzen (schwarze Quadrate) (n= 6 (d0, d3); n=3 (d6)).
- b) Jedes Tier wird durch zwei Prozentwerte dargestellt: Einen für den proliferierenden Anteil von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen im Lymphknoten (jeweils links), den anderen für dieselbe Population in der Milz (jeweils rechts). Zur Darstellung der Zusammengehörigkeit werden Milz und Lymphknoten eines jeden Tieres mit einem Strich verbunden. (n= 6 (d0, d3); n=3 (d6); \* P < 0,05).

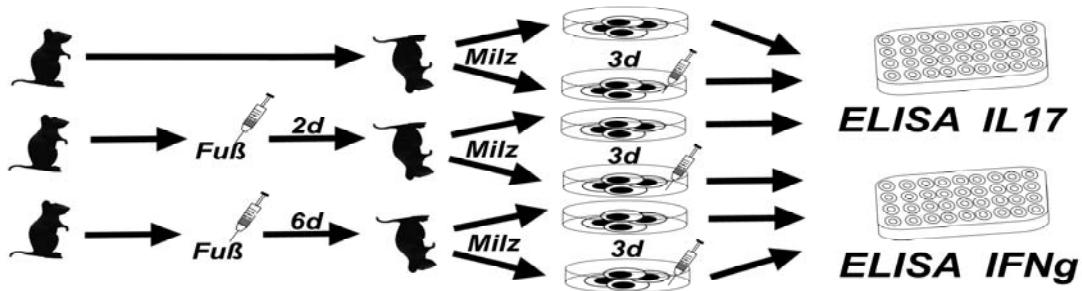
Am Tag 6 fiel die Proliferationsrate der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Population in der Milz auf  $24,4 \pm 5,5\%$  und im Lymphknoten auf  $24,5 \pm 3,4\%$  ab, womit sich die Proliferationsraten anglichen (Abb. 7d). Der in 4.2.4 beobachtete Anstieg des CCR6<sup>+</sup> Anteils innerhalb der CD4<sup>+</sup> Population der Milz an Tag 6 wird also nicht von einer Verstärkung der Zellproliferation begleitet, sondern bringt die CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Populationen in Milz und Lymphknoten auf ein ähnliches Proliferationsniveau.

## <<< Ergebnisse >>>

Dies deutet auf eine Migration der Zellen aus dem Lymphknoten in die Milz und in weitere Lymphorgane hin. Um dies zu bestätigen, werden an Tag 6 nach Immunisierung in der Milz Zellen gewonnen und durch die Zweitexposition mit Ovalbumin restimuliert.

### 4.2.6 Identifizierung antigenspezifischer, aktivierter IL-17 Produzenten durch Reaktivierung mit spezifischem Antigen

Werden Zellen durch Zytokine oder Zell-Zell-Bindungen aktiviert, so reagieren sie mit Proliferation, gesteigerter Sezernierung von Zytokinen und einer Veränderung des Rezeptorprofils auf ihrer Zellmembran. Werden beispielsweise  $T_{H1}$ -Zellen durch APCs aktiviert, so sezernieren sie  $IFN\gamma$ . Parallel dazu konnte für  $T_{H17}$ -Zellen die Produktion von IL-17 nach Stimulation aufgezeigt werden (Pötzl et al., 2008). Diese Tatsachen wurden im folgenden Versuch genutzt, um einen indirekten Nachweis von T-Zellmigration aus den poplitealen Lymphknoten in die Milz zu erbringen - insbesondere für aktivierte  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen. Ein Teil der C57BL/6-Versuchstiere - auf transgene Tiere wurde für die Zytokindarstellung verzichtet- wurde mit Ovalbumin immunisiert und zwei bzw. sechs Tage später getötet. Die Milzzellen wurden entnommen, aufgereinigt und über drei Tage in Kultur gehalten (Schema 8). Sowohl die Zellen naiver als auch vorimmunisierter Tiere wurden getrennt. Von jeder Gruppe wurde ein Teil der Zellen in Medium kultiviert, die andere Teil mit Ovalbumin stimuliert bzw. restimuliert. Im Anschluss wurden Überstände gewonnen und mittels ELISA die Mengen an  $IFN\gamma$  und IL-17 im Überstand bestimmt.



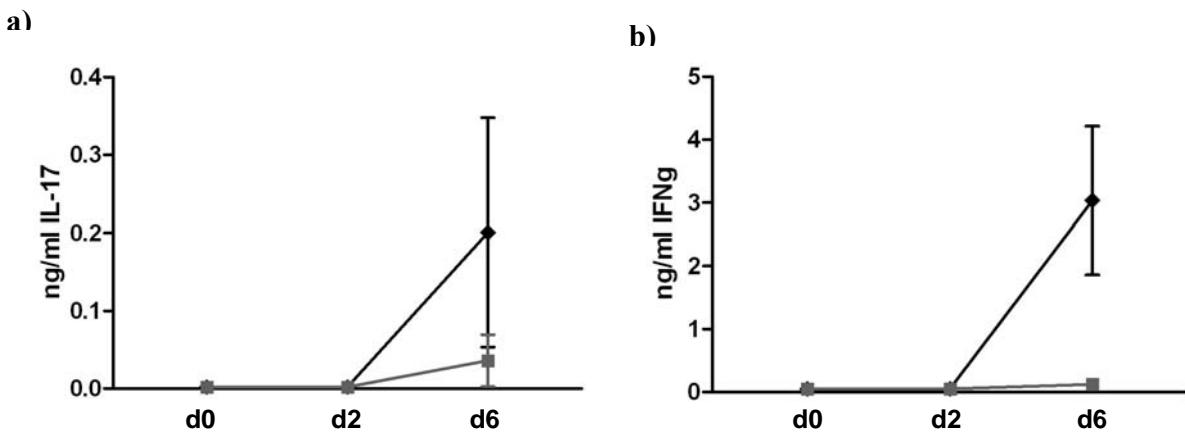
**Schema 8:** Messung der Sekretion von IL-17 und  $IFN\gamma$  bei naiven und zwei bzw. sechs Tage immunisierten Tieren.

Für die Zeitpunkte vor Immunisierung und zwei Tage nach Immunisierung zeigten die Zellen keine Produktion von IL-17 oder  $IFN\gamma$  (Abb. 10). Im Überstand der sechs Tage immunisierten

### <<< Ergebnisse >>>

Tiere konnte IFN $\gamma$  nachgewiesen werden. Um zu erfassen, ob die IL-17 Produktion aufgrund der Ovalbuminreexposition erfolgte oder die Zellen unspezifisch Zytokine produzierten, wurde die Zytokinproduktion der ovalbuminexponierten Zellen mit den ebenfalls an Tag 6 entnommenen aber unstimuliert kultivierten Zellen verglichen. Die ovalbuminexponierte Gruppe produzierte mit  $3,0 \pm 1,0$  ng/ml etwa 44 mal so viel IFN $\gamma$ , wie die nicht exponierte. Dies weist darauf hin, dass sich an Tag 6 bereits aktivierte T-Zellen in der Milz befinden, die auf Ovalbuminstimulation in vitro nochmals deutlich stärker mit der Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IFN $\gamma$  reagieren.

Bei der Messung von IL-17 konnte ebenfalls nur an Tag 6 ein positiver Nachweis erbracht werden. Auch hier wurde der Überstand von  $36 \pm 27$  pg/ml IL-17 (über der Nachweisgrenze) bei im Medium kultivierten Zellen von den ovalbuminexponierten Produzenten mit  $200 \pm 120$  pg/ml IL-17 deutlich übertroffen. Zusammenfassend konnte also frühestens sechs Tage nach Immunisierung und vorwiegend nach antigenspezifischer Restimulation eine Zytokinproduktion durch Milzzellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Produktion von IL-17 und IFNg nach antigenspezifischer in-vitro-Restimulation von CD4 $^+$ CCR6 $^+$ -Zellen in der Milz diejenigen Zellen erfasst, die im Vorfeld im Lymphknoten aktiviert wurden und an Tag 6 nach Immunisierung in die Milz eingewandert waren.



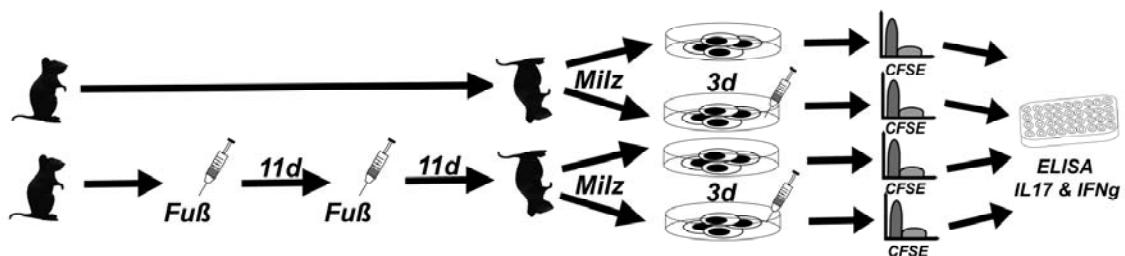
**Abbildung 10: Produktion von IL-17 (a) und IFN $\gamma$  (b) im Verlauf der Immunreaktion.** C57BL/6 Mäuse wurden mit Ovalbumin und CpG für zwei und sechs Tage immunisiert. Lymphknoten und Milz wurden entnommen und Einzelzellen wurden isoliert. Die Zellen wurden für drei Tage in vitro in Medium mit oder ohne Ovalbumin kultiviert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und IL-17- und IFN $\gamma$ -Protein im ELISA quantifiziert. Schwarze Rauten stehen für mit Ovalbumin restimulierte Zellen, graue Quadrate für in Medium gehaltene Zellen. Nachweisgrenze für IFN $\gamma$  50 pg/ml, für IL-17 20 pg/ml (n = 3).

## 4.3 Fähigkeit zu Gedächtnisbildung von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen

Bisher konnte gezeigt werden, dass CCR6<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen bei einer antigenstimulierten Immunreaktion durch eine Steigerung der Proliferation in vivo reagieren. Die Messung der Zytokinproduktion von Milzzellen lässt den Schluss zu, dass CCR6<sup>+</sup>-T<sub>H</sub>-Zellen nach Aktivierung und Proliferation im Lymphknoten auch in die Milz emigrieren, also in unmittelbarer Folge einer Immunaktivierung als aktivierte Zellen systemisch zirkulieren. Nun soll darüber hinaus geprüft werden, ob diese Zellen das Potential haben, auch nach Ablauf der Immunreaktion bei erneuter Exposition auf Antigen spezifisch zu reagieren.

### 4.3.1. Nachweis von Gedächtniszellen durch Messung der T-Zellproliferation nach *in-vitro*-Restimulation

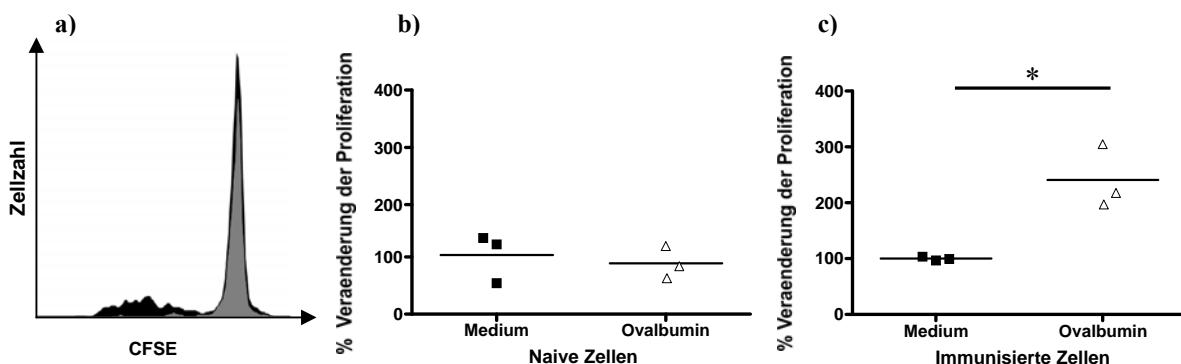
Für den Versuch wurden C57BL/6-Mäuse mit Ovalbumin und dem Adjuvans CpG in beide Hinterpfoten geimpft und diese Prozedur nach elf Tagen ohne Adjuvans wiederholt, um die Expansion antigenspezifischer Zellen zu verstärken (*boost*). 22 Tage nach der ersten Impfung wurden die Tiere getötet, die Milzen entnommen, daraus Zellen gewonnen und die verbleibenden Zellen schließlich in zwei getrennten Gruppen in Kultur genommen. Gruppe 1 wurde über drei Tage mit Ovalbumin stimuliert, Gruppe 2 wurde über denselben Zeitraum ohne Stimulans kultiviert. Als Vergleichspopulation dienten Milzzellen naiver Mäuse, die auf gleiche Weise gewonnen, gereinigt und in zwei Gruppen kultiviert wurden (Schema 9). Am dritten Tag wurde erneut die Proliferationsrate der Zellen im Durchflusszytometer mittels CFSE bestimmt.



**Schema 9:** Versuchsablauf zur Ermittlung der Fähigkeit zur antigenspezifischen Restimulation nach Ende der akuten Immunreaktion.

<<< Ergebnisse >>>

Wie in Versuch 4.2.1 proliferierten CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen deutlich stärker als CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>-Zellen (Abb. 11a). Dies zeigte sich in allen vier Gruppen, also unabhängig vom Immunstatus und der Exposition mit Ovalbumin in vitro. So zeigten beispielsweise die in vitro kultivierten CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Zellen naiver Mäuse in der CFSE Markierung zu  $4,7 \pm 1,4\%$  eine Proliferation, während es bei den CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen  $34,7 \pm 11,7\%$  waren. Vorimmunisierte CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> Zellen zeigten an Tag 22 mit  $11,9 \pm 0,3\%$  eine verminderte Zellteilung (Daten nicht gezeigt). Wurde den Zellen in vitro Ovalbumin zugesetzt, so konnte bei CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>-Zellen naiver Tiere keine Veränderung in der Proliferation beobachtet werden (Abb. 11b für CCR6<sup>+</sup>). Die Zellen der vormals immunisierten Mäuse zeigten bei Reexposition mit Ovalbumin eine deutliche Steigerung der Proliferation (Abb. 11c). Bei CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Zellen stieg die Teilungsrate auf das 3,3-fache (nicht gezeigt), bei CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>- Zellen auf das 2,4-fache an.



**Abbildung 11 :Proliferation von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen nach Restimulation mit Ovalbumin in vitro.**

C57BL/6 Mäuse wurden wie in Schema 9 dargestellt immunisiert. An Tag 22 wurde die Milz entnommen und Einzelzellen isoliert. Die Zellen wurden mit CFSE markiert und für drei Tage in vitro mit Ovalbumin antigenspezifisch restimuliert. Die Zellen wurden in der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse auf CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen aufgetrennt und deren CFSE-Signal analysiert.

- a) Die Proliferation von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen (schwarz) und CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Zellen (grau) sind als Histogramm durch das CFSE-Signal übereinander projiziert dargestellt. Eine Linksverschiebung bedeutet einen niedrigeren CFSE-Gehalt und damit einhergehend eine höhere Proliferation der Zellen ( $n = 3$ ).
- b, c) Verglichen wird die Proliferation von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen mit (weiße Dreiecke) und ohne (schwarze Quadrate) antigenspezifischer Stimulation. b) zeigt Zellen naiver Tiere, c) von Tieren 22 Tage nach Immunisierung mit Ovalbumin. In jeder Abbildung wird die Proliferation im Nährmedium auf 100% normiert (jeweils links) mit der Proliferation in vitro antigenstimulierter Zellen (jeweils rechts) verglichen. Jedes Symbol entspricht einem Versuchstier, der Mittelwert wird durch horizontale Balken dargestellt (\*  $P < 0,01$ ).

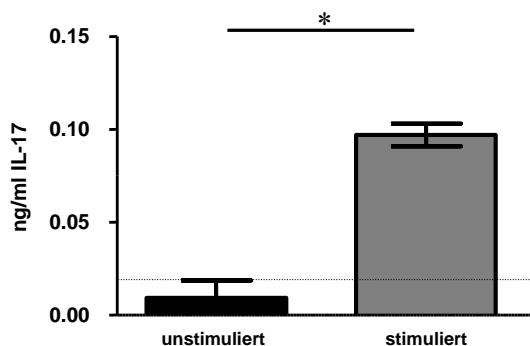
## <<< Ergebnisse >>>

So ist davon auszugehen, dass sich unter beiden  $T_H$ -Spezies vormals aktivierte Zellen finden und reaktivieren ließen. CCR6 ist zu diesem Zeitpunkt der Immunreaktion ein Marker für Gedächtnis- $T_H$ -Zellen.

### 4.3.2 Nachweis von Gedächtniszellen anhand der IL-17 Produktion nach Restimulation mit Ovalbumin

Um die erhöhte Proliferation bei Restimulation mit spezifischem Antigen auch auf Ebene der Zytokinproduktion zu bestätigen, wurde auch bei diesen Zellen ein Immunoassay zum Nachweis von IL-17 durchgeführt. Die Zellen wurden wie in 4.3.1. beschrieben aus der Milz entnommen und in zwei Gruppen in Kultur gehalten. Nach 72h wurden die Überstände beider Gruppen auf IL-17 mithilfe des ELISA-Immunoassays untersucht.

Der Überstand der mit Ovalbuminantigen exponierten Zellen enthielt mit  $97 \pm 9\text{ pg} / \text{ml}$  einen deutlich über der Nachweisgrenze befindlichen Wert. Die ohne spezifischem Antigen kultivierten Zellen zeigten keine IL-17 Produktion, was die Ergebnisse aus Versuch 4.3.1. auch auf Ebene der Zytokinproduktion untermauert. Auch 22 Tage nach Immunisierung, also in der Gedächtnisphase der Immunreaktion, waren IL-17-produzierende Zellen in der Milz nachweisbar.



**Abbildung 12: IL-17 Produktion nach Restimulation 22 Tage nach Erstimmunisierung**

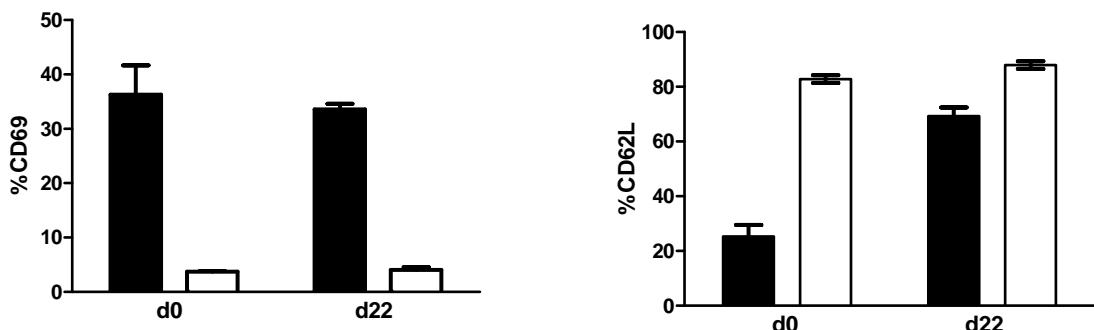
C57BL/6 Mäuse wurden wie in Schema 9 dargestellt immunisiert. An Tag 22 wurde die Milz entnommen und Einzelzellen isoliert. Die Zellen wurden für drei Tage *in vitro* mit Ovalbumin antigenspezifisch restimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden entnommen und die Produktion von IL-17 im ELISA quantifiziert. Der graue Balken steht für die Produktion von IL-17 mit Ovalbumin im Medium, der schwarze Balken für die IL-17-Produktion ohne Ovalbuminstimulation. ( $n = 3$ ;  $*P < 0,01$ ).

### <<< Ergebnisse >>>

Bei Antigenreexposition in vitro konnten diese Zellen im Gegensatz zu Zellen aus naiven Tieren sofort mit der Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-17 reagieren. CCR6 ist also ebenfalls ein Marker für lymphozytäre Gedächtniszellen.

#### 4.3.3. Phänotyp von $CD4^+CCR6^+$ -Zellen

Hierzu wurden die Tiere wie in Versuch 4.3.1 mit Ovalbumin und CpG immunisiert, nach 22 Tagen getötet und ihre Milzzellen in Kultur genommen. Es wurde über drei Tage unter CFSE-Zugabe in vitro antigenspezifisch restimuliert, anschließend gegen CD4, CCR6, CD62L und CD69 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Parallel wurden die Zellen naiver Mäuse unter gleichen Bedingungen kultiviert und antigenspezifisch stimuliert. CD69 gehört zu den frühesten Markern aktivierter T-Lymphozyten (Testi et al, 1989). CD62L, auch als L-Selektin bezeichnet, wird von naiven Lymphozyten und ruhenden Zentralen Gedächtniszellen zum Einwandern in sekundäre Lymphorgane benötigt und wird nicht von Effektorzellen exprimiert. Der Nachweis von CD69 gelang bei  $33,6 \pm 1,0\%$  aller  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen und  $4,1 \pm 0,5\%$  aller  $CD4^+CCR6^-$  Zellen aus der Milz. Dabei korrelierte die Präsenz von CD69 mit einer niedrigen Expression von CFSE und damit einer hohen Proliferation (Daten nicht gezeigt). Wie in den zuvor durchgeführten BrdU-Messungen erweist sich also die  $CD4^+CCR6^+$ -Population als sehr teilungsaktiv.



**Abbildung 13: Expression von CD69 und CD62L bei naiven und vorimmunisierten  $T_H$ -Zellen.** C57BL/6 Mäuse wurden wie in Schema 9 dargestellt immunisiert. An Tag 22 wurde die Milz entnommen und Einzelzellen isoliert. Die Zellen wurden mit CFSE markiert und für drei Tage in vitro mit Ovalbumin antigenspezifisch restimuliert. CD4, CD69, CD62L und CCR6 wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden gegated auf  $CD4^+CCR6^+$  Zellen (schwarze Balken) und  $CD4^+CCR6^-$  Zellen (weiße Balken). Dargestellt ist der Anteil an  $CD69^+$  (linkes Diagramm) und  $CD62L^+$  Zellen (rechtes Diagramm) innerhalb der jeweiligen Th-Zellsubpopulation ( $n = 3$ ).

<<< Ergebnisse >>>

Für eine hohe Zellaktivität spricht auch die geringe Expression von CD62L. Die CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen naiver Tiere exprimierten zu  $25,3\% \pm 4,2\%$  CD62L und unterschieden sich damit deutlich von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Zellen. Diese zeigten zu  $82,2\% \pm 1,5\%$  den CD62-Liganden, was einen sehr geringen Aktivitätsstatus nahe legt. Betrachtet man die Versuchstiere 22 Tage nach Immunisierung, so fällt die Expression von CD62L bei CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Zellen mit  $88,0\% \pm 1,5\%$  ähnlich hoch wie bei den naiven Tieren aus. Innerhalb der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Population stieg die Zahl CD62L positiver Zellen auf  $69,3\% \pm 1,5\%$  an Tag 22 nach Immunisierung an, was darauf hindeuten könnte, dass nun auch T<sub>CM</sub> im peripheren Lymphknoten vorhanden sind.

## 5. Diskussion

Paul Ehrlich, Nobelpreisträger für Medizin und einer der Väter der Immunologie, prägte einst den Begriff des *Horror autotoxicus*, der die Furcht des Immunsystems beschrieb, den eigenen Körper zu zerstören. Noch zu seinen Lebzeiten musste er diese These nach dem Fund von Antitoxinen gegen körpereigene Strukturen relativieren. Heute sind Autoimmunerkrankungen ein wichtiges und in seiner Prävalenz stetig steigendes Problem der westlichen Welt. Allein die Zahl der an rheumatoider Arthritis erkrankten Deutschen wird auf 800.000 geschätzt (Herold, 2009). Die Ätiologie dieser oder anderer Autoimmunerkrankungen bleibt wie viele pathogenetische Einzelschritte bislang unserer Erkenntnis verborgen. Dennoch zeigt es sich beispielsweise in der bereits eingesetzten anti-TNF-Therapie, dass es lohnenswert ist, ein für die Krankheitsaktivität wichtiges Zytokin zu finden und es gezielt auszuschalten. Der Erfolg dieses Vorgehens wird durch therapeutischen Einsatz von Antikörpern gegen IL-1 oder den IL-6-Rezeptor bestätigt. Aktuell steht IL-17 im Verdacht, eine maßgebliche Rolle bei Chronischen Darmerkrankungen, Multipler Sklerose, Psoriasis, Rheumatoider Arthritis und anderen Krankheiten mit autoreaktivem Hintergrund zu spielen. Mit  $T_{H17}$ -Zellen wurden wichtige Produzenten des Zytokins beschrieben und auch mehrfach in erhöhter Zahl im entzündeten Gewebe nachgewiesen.

Zur Eingrenzung von  $T_{H17}$ -Zellen wurde die Oberflächenmoleküle CD4 und CCR6 herangezogen. Zwar kann damit nur ein Teil dieser T-Zell Subpopulation markiert werden, dieser beinhaltet jedoch die aktiven, IL-17 produzierenden T-Zellen mit Ausschluss von  $T_{H1}$ -Zellen (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Pötzl et al., 2008). Zusätzlich gibt es auch Hinweise darauf, dass es sich bei  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen um Effektorzellen handelt, da insbesondere diese Zellen in autoimmun-getriggerten Entzündungen in extralymphatischen Geweben auftauchen (Hirota et al., 2007).

## 5.1 Etablierung der Methode zur *in vivo* Proliferationsmessung

Um die Aktivität dieser Subpopulation zu erfassen, wurde zunächst die Proliferationsmessung von T-Lymphozyten mittels BrdU-Einbau etabliert. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass BrdU nur von stimulierten Lymphozyten aufgenommen wird und eine Verabreichung über 24h eine bessere Erfassung sich teilender Zellen ermöglicht, ohne dabei einen deutlich höheren Anteil ruhender Zellen einzuschliessen. Trotz der tadellosen Funktion des Protokolls von Rothäusler et al. *in vitro*, konnte nach subkutaner Injektion von BrdU in die Pfoten lebender Mäuse das Nukleosidanalogon nicht zuverlässig mittels Anti-BrdU-Antikörpern nachgewiesen werden. Ein Wechsel des BrdU-Antikörpers brachte keinen Erfolg, auch ein Auswechseln der Fixierung und der DNase (Daten nicht gezeigt) war wirkungslos. Die Umstellung der BrdU Applikation von intraperitoneal auf *per os* zeigte zunächst eine schwer quantifizierbare und unspezifische Proliferation unterschiedlicher Zellen. Da die Permeabilisation der Zellmembran durch Substanzen auf Saponinbasis bei Färbungen zytoplasmatischer Strukturen gelang (Daten nicht gezeigt), wird letztendlich von einer mangelnden Permeabilisation der Kernmembran durch den Nukleopermpuffer ausgegangen. Dies verhinderte das Vordringen der Anti-BrdU-Antikörper an Nukleotide der DNA. Durch die Benutzung des BrdU Flow Kit (BD Biosciences) und peroraler BrdU Gabe konnten proliferierende Zellen durchflusszytometrisch dargestellt werden; für die Permeabilisation des Nukleus dient hier der im Kit enthaltene *cytoperm plus buffer*. Der PE-konjugierte Antikörper zeigte im Vergleich zum Isotyp im Histogramm zwar die BrdU-Aufnahme von über 8% der Zellen, jedoch ließ sich damit keine klare Grenze zwischen BrdU-positiven und negativen Zellen darstellen. Dies gelang erst mit dem FITC-konjugierten BrdU-Antikörper, der zwei deutliche Peaks im Histogramm aufweist. Da beide Marker aus einem identischen Klon mit lediglich unterschiedlichen Fluorochromen gefertigt sind, kann man von einer ähnlich guten Antigen-Antikörper-Reaktion ausgehen. Die Wellenlänge maximaler Anregung unterscheidet sich nur unwesentlich, so dass FITC und PE vom selben Laser (488nm Wellenlänge) angeregt werden, dabei jedoch auf unterschiedlicher Wellenlänge Licht emittieren. Ein großer Unterschied ist jedoch die molekulare Masse des Fluorochroms, denn während PE mit seinen 23 Phycoerythrobilinen 240 kDa schwer ist, macht das FITC Pendant mit 389 Da nur einen Bruchteil dessen aus. Da ein IgG-Antikörper ohne Fluorochrom im Durchschnitt eine Molekularmasse von 144kDa aufweist, ist der PE-konjugierte Antikörper im Vergleich zum FITC-konjugierten beinahe dreimal so schwer, was eine schwerere Passage des Moleküls durch

## <<< Diskussion >>>

Zellbarrieren nahe legt. So ist es denkbar, dass der Antikörper zwar durch die permeabilisierte Zellmembran in das Zytoplasma gelangt, an der Nucleusmembran jedoch aufgrund der Masse scheitert. Auch wenn letztendlich die schwache Detektion des Signals PE-markierter Zellen nicht geklärt werden kann, so war die Funktion des modifizierten BrdU Flow Kits in Kombination mit oraler BrdU Substitution und dem FITC-konjugierten BrdU-Antikörper gewährleistet.

### **5.2. Proliferation CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen in der Homöostase**

Zu der starken Teilungsaktivität von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen gibt es bereits veröffentlichte Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe. Diese stammen jedoch ausschließlich aus *in vitro* Messungen in Kultur stimulierter Zellen (Poetzel et al., 2008). Die hierbei gezeigte Teilungsaktivität von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen wurde von mir anhand der Messung von CFSE und des Aktivitätsmarkers CD69 in T-Zellen aus der Milz erneut bestätigt. Über drei Tage in Kultur teilten sich  $34,7 \pm 11,7\%$  der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen gemessen anhand des abfallenden CFSE-Gehalts,  $33,6 \pm 1,0\%$  exprimierten CD69. Als problematisch sind bei *in vitro* Versuchen jedoch die Isolation von Zellen von umgebenden Strukturen und Zytokinen zu sehen, ebenso die fehlende Möglichkeit zur Migration und Interaktion mit anderen Zellen. Hinzu kommt die artifizielle, polyklonale T-Zellstimulation mit anti-CD3<sup>+</sup>-Antikörpern. Um diese Probleme zu vermeiden und näher am tatsächlichen Ablauf der Immunreaktion im Tier zu sein, wurde mittels der in 4.1 etablierten Methode der BrdU-Einbau im lebendigen Organismus und damit die Proliferation von Zellen *in vivo* gemessen. So konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen im Lymphknoten naiver Tiere eine deutlich höhere Proliferationsrate zeigen, als CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Zellen. Im Zeitraum von drei Tagen konnte ich in den Lymphknoten von C57BL/6I-OT-II Mäusen bei  $18,7 \pm 4,3\%$  der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen den Einbau von BrdU und damit eine Zellteilung nachweisen. In der Milz als weiterem sekundären Lymphorgan zeigte sich eine ähnlich hohe Zellproliferation. Unter Berücksichtigung der semikonservativen DNA-Synthese bei der Zellteilung kann also von der Proliferation ca. jeder 10ten CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zelle innerhalb des Zeitraums von drei Tagen ausgegangen werden. Dies stellt eine für T-Zellen ungewöhnlich hohe Teilungsrate dar, die in der Vergleichsgruppe der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Zellen bei weitem nicht erreicht werden konnte. Die niedrige Aktivität von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen in Ruhe deckt sich mit Ergebnissen von Roman et al., die in naiven Tieren mit Hilfe von BrdU ähnlich niedrige Proliferationsraten maßen (Román et. al., 2002) und unterstreicht die

### <<< Diskussion >>>

Funktionsfähigkeit der Messmethode. Zusammenfassend ist CCR6 innerhalb der CD4<sup>+</sup> Fraktion auch als Aktivitätsmarker teilender Zellen anzusehen.

Interessant ist dabei die Frage, wie trotz der starken Proliferation der Zellanteil von CCR6<sup>+</sup> Zellen innerhalb der T<sub>H</sub>-Lymphozytenpopulation unter 3% bleibt - immerhin würde sich die Zellzahl in der Maus so innerhalb von drei Wochen fast verdoppeln. Bisher wurde jedoch kein Anstieg der Population mit Zunahme des Lebensalters der Versuchstiere beobachtet. Eine Möglichkeit zur Erklärung der konstanten Fraktion ist, dass an der Oberfläche der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Population CCR6 nur bei der Zellteilung exprimiert und anschließend wieder internalisiert wird.

Dass Zellen ihren Chemokinrezeptorstatus ändern können, wurde bereits nachgewiesen (Allen et al., 2007). Diese These wurde in unsere Gruppe durch die Beobachtung untermauert, dass sich bei CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen nach einem Zelltransfer der Chemokinrezeptorstatus veränderte und sich ein erneutes Gleichgewicht zwischen CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>-Zellen einstellte (unveröffentlichte Daten). Umgekehrt exprimierten vormals CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Zellen nach dem Transfer CCR6 auf ihrer Oberfläche, so dass die Population instabil zu sein scheint. Mit Verlust des Oberflächenrezeptors ist sogar die Differenzierung in eine andere Subpopulation denkbar. Das Paradigma, dass Zellen im Laufe ihres Lebens nicht den Oberflächenstatus unterschiedlicher T<sub>H</sub>-Subpopulationen durchlaufen können (Lexberg et al., 2008) wurde insbesondere bei T<sub>H</sub>17-Zellen widerlegt. Zuletzt wurde die Plastizität von T-Zell-Subpopulationen mittels Zelltransfer in vivo untersucht und die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen zu einer vorübergehenden Population von IFN $\gamma$ -IL-17 Doppelproduzenten beschrieben, die auch aus T<sub>H</sub>1-Zellen differenziert werden konnte. (Kurschus et al., 2010)

So ist es letztendlich denkbar, dass T<sub>H</sub>17-Zellen ihre CCR6-Expression in Abhängigkeit des umgebenden Zytokinmilieus modulieren können.

Eine weitere Möglichkeit beschreibt neben der starken Zellteilung auch eine hohe Apoptoserate der Subpopulation, also ein Gleichgewicht mit letztendlich stabil niedriger Zellzahl. Aktuelle Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe fundieren diese These (unveröffentlichte Daten). So bestehen Hinweise darauf, dass eine Störung des Gleichgewichts mit deutlichem Anstieg der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Fraktion eine Auswirkung auf die Genese und Intensität von Autoimmunerkrankungen hat.

### 5.3 Das Verhalten von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen während der Immunreaktion

Dass T<sub>H</sub>17-Zellen sowohl als Auslöser von Autoimmunerkrankungen als auch als Abwehrzellen gegen pathogene Bakterien und Parasiten auftreten, ist eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass Krankheiten wie die Rheumatoide Arthritis, Chronische Darmerkrankungen oder Multiple Sklerose vorwiegend in der westlichen Welt auftreten, wo die Erregerbelastung unseres Körpers durch hohe Hygienestandards niedrig ist. Diese resultieren letztlich in einer unkontrollierten Vermehrung oder Aktivierung von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen im „unterforderten“ Immunsystem. In diesem Zusammenhang wurde die Proliferation der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen bei Reizung durch ein erregerähnliches Fremdantigen analysiert und mit der Proliferation in Ruhe verglichen. Hierbei verhielt sich die CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Population, also ein Großteil der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen, wie erwartet: Die Teilungsrate der Lymphknotenzellen in der Frühphase stieg auf über 30%, was die Wirksamkeit der Immunisierung beweist. Gleichzeitig konnte im Zuge dieser Arbeit erstmals die Antigen-abhängige Proliferation von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen *in vivo* demonstriert werden: Nach Immunisierung erhöhte sich die Teilungsrate der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen auf nochmals deutlich höhere Werte. Dieser Befund zeigt, dass CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen durch Fremdantigen aktiviert werden. Zwar erscheint der verfrühte Proliferationsabfall bereits an Tag 6 ungewöhnlich, da im Vorfeld veröffentlichte Daten diesen Zeitpunkt als Hochphase der Immunreaktion bezeichnen (Román et al., 2002). Hierbei wurde jedoch mit reproduktionsfähigen Viren gearbeitet, während meine Daten auf einer Stimulation mit Fremdantigen und CpG basieren, was eine schnellere Beseitigung der Stimulans nahe legt. Betrachtet man im Verlauf die absoluten Zellzahlen, so zeigt sich zum Zeitpunkt der stärksten Proliferation an Tag 3 auch ein überproportionales Anwachsen der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Population. Anders verhält es sich bei den CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Zellen. Eine mögliche Erklärung ist eine Steigerung der CCR6-Expression infolge der Aktivierung von T<sub>H</sub>-Zellen, die bereits *in vitro* gezeigt wurde (Ebert and McColl, 2002). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen bei Proliferation am Ort der Antigenpräsentation zurückbleiben, während andere T<sub>H</sub>-Zellen bereits zirkulieren. Für das als *trafficking* bezeichnete zielgerichtete Migrieren ist der Chemokinrezeptorstatus an der Zelloberfläche entscheidend, insbesondere der CCR7. Naive CCR7<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen wandern in die ableitenden Lymphknoten ein, wo sie durch Kontakt mit aktivierten APC großteils zu T<sub>H</sub>-Effektorzellen differenzieren, dabei ihren CCR7<sup>+</sup> Status verlieren durch sekundäre Lymphorgane zirkulieren (Jenkins et al., 2001). Wird CCR7 auch nach Antigenkontakt in hohem Maße exprimiert, so werden die Zellen ähnlich Zentralen

<<< Diskussion >>>

Gedächtniszellen vom Abwandern in extralymphatisches Gewebe abgehalten. Durch häufige Zellteilung werden die Zellen zunehmend negativ auf CCR7, während der Sphingosin-1-Phosphatrezzeptor-1 (S1P<sub>1</sub>) verstärkt in den Zellen nachgewiesen wird, so dass auch diese Zellen den Lymphknoten verlassen (Pham et al, 2008). So wäre die anfängliche Persistenz der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> Zellpopulation im Lymphknoten mit einem, langsamen, proliferationsassoziierten Verlust des CCR7-Rezeptors an ihrer Oberfläche erklärbar. Lim verglich T<sub>H</sub>17-Zellen mit anderen nicht naiven T-Zellen bezüglich der CCR7 Expression und kam hierbei auf keinen signifikanten Unterschied (Lim et al., 2008). Dennoch könnte eine umfassende Untersuchung des CCR7-Status von im Lymphknoten residierenden und auswandernden CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> im Verlauf der Immunreaktion zum Verständnis der hohen Proliferation und den schwankenden Zellzahlen beitragen.

Darüber hinaus konnte jedoch auch CCR6 mittlerweile eine wichtige Rolle für die Migration zugeordnet werden. Hierbei ist das von Synoviozyten aber auch anderen T<sub>H</sub>17-Zellen produzierte CCL20 als Ligand für CCR6 für die Immigration von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> Zellen an den Entzündungsherd verantwortlich und führt sogar zu einem Anwachsen ihrer Zellpopulation. Durch die Blockade von CCR6<sup>+</sup> mittels eines Antikörpers *in vivo* gelang darüber hinaus eine Reduktion der Immigration von T<sub>H</sub>17-Zellen, was zu einem symptomarmen Verlauf im Mausmodell der rheumatoide Arthritis führte (Hirota et al., 2007).

Erste Hinweise auf eine Migration von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> Zellen aus dem Lymphknoten in die Milz konnten durch die Beobachtung von Zellzahl und Proliferation in den beiden sekundären lymphatischen Organen gefunden werden. Nicht nur dass der Anteil dieser Zellen an allen T<sub>H</sub>-Zellen zuerst im Lymphknoten und erst später in der Milz anstieg, während er im Lymphknoten bereits wieder abnahm. Auch der zu Beginn deutlich ausgeprägte Unterschied der Proliferation zwischen Milz- und Lymphknoten glich sich im Verlauf der Immunreaktion deutlich an. Auch dies unterstreicht, dass zur akuten Erregerabwehr eine Aktivierung der Zellteilung in den betroffenen Lymphbahnen erfolgt, die verzögert zu einer Emigration der Zellen in weitere sekundäre Lymphorgane führt. Diese These konnte durch Messung von IL-17 in der Milz nach einer antigenspezifische Reaktivierung von vormals im Lymphknoten immunisierten T-Zellen erbracht werden. Hierzu passen auch Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe, bei dem die Produktion von IL-17 im ableitenden Lymphknoten zum Tag 6 hin rasch abnimmt (Poetzel et al., 2008), was in Zusammenschau mit den Ergebnissen aus der Milz die Zirkulation von aktivierten

### <<< Diskussion >>>

CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> Zellen unterstreicht. Die Methodik des Zytokinnachweises hatte zusätzlich den Vorteil, gleichzeitig die Effektortätigkeit dieser immigrierten Zellen zu bestätigen. Obwohl die IFN $\gamma$ - Produktion der T<sub>H</sub>1-Zellen sich sehr ähnlich verhält, also vorwiegend an d6 eine IFN $\gamma$  Induktion möglich ist, ist eine Aktivierung der T<sub>H</sub>17-Zellen durch IFN $\gamma$  produzierende Zellen sehr unwahrscheinlich. Zwar beschrieb kürzlich eine Arbeit eben diese These bei einer Gruppe von Psoriasispatienten - hierbei wurde durch die Produktion von IFN $\gamma$  durch T<sub>H</sub>1-Zellen APCs zur Produktion der Zytokine IL-1 und IL-23 stimuliert, die wiederum die Bildung von IL-17 produzierenden T-Lymphozyten förderten (Kryczek et al., 2008). Jedoch produzierten in den hierfür grundlegenden In-vitro-Versuchen bis zu 75% der IL-17 Produzenten auch IFN $\gamma$ , was im murinen Modell nicht der Fall ist. In den letzten 15 Jahren konnte durch eine Vielzahl von *in vitro* und *ex vivo* Untersuchungen ein von IFN $\gamma$  ausgehender suppressiver Effekt auf die Reifung von T<sub>H</sub>17- Zellen und die Produktion von IL-17 nachgewiesen werden (Murphy et al., 2003; Hirota et al., 2007; Kelchtermans et al., 2008), so dass letztendlich eine Stimulation durch T<sub>H</sub>1-Zellen sehr unwahrscheinlich ist. Will man dieses Szenario ausschließen, so ist dies nur durch einen aufwendigen Versuchsaufbau mit Zellsortierung und Zelltransfer unter der Einschränkung der Plastizität von T<sub>H</sub>-Subpopulationen möglich und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen. Letztendlich ist es mir gelungen, eine IL-17-Produktion durch antigenspezifische Restimulation in einem Organ zu erreichen, das nicht direkt an der Eintrittsstelle liegt und nur durch die Migration von T-Zellen zu erklären ist, was eine antigenspezifische Reaktivierung von T<sub>H</sub>17-Zellen nahe legt.

## **5.4 Die Fähigkeit der Gedächtnisbildung und Reaktivierung von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen**

Nachdem zuvor gezeigt werden konnte, dass CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen durch Fremdantigenpräsentation aktiviert werden, wurde im folgenden die Fähigkeit zur „Gedächtnisbildung“ untersucht. Bei anderen T-Zellen sie hierfür eigens Gedächtniszellen verantwortlich, die ein typisches Oberflächenprofil tragen, bei dem CD62L und CCR7 eine wichtige Rolle spielen. Diese Gedächtniszellen findet man in den sekundären lymphatischen Organen als T<sub>CM</sub> Zellen. Während die Arbeitsgruppe um Acosta-Rodriguez einen Großteil der CCR6<sup>+</sup> IL-17 Produzenten innerhalb der Population von zentralen T-Gedächtniszellen sieht,

### <<< Diskussion >>>

identifizieren Liu und Rohowsky-Kochan die typischen IL-17 Produzenten innerhalb der CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> Population (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Liu and Rohowsky-Kochan, 2008). Ich betrachtete im Zusammenhang mit der Migration der Zellen die Expression von CD62L und sah bei CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> Zellen im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> Zellen bei naiven Tieren in 4.3.3. eine auffällig niedrige Expression von CD62L, was den hohen Aktivitätsstatus unterstreicht. Dieses Ergebnis deckt sich mit Messungen in unserer Arbeitsgruppe, wobei diese Zellen im Lymphknoten auch nach Immunisierung ihren Oberflächenstatus bis Tag 22 beibehielten (Pötzl et al., 2008). In der Milz sah ich jedoch bei vorstimulierten Tieren eine deutlich höhere Expression von CD62L 22 Tage nach Immunisierung gepaart mit einer niedrigeren Teilungsrate. Diese Konstellation ist typisch für Zentrale Gedächtniszellen. Sie entstehen in peripheren Lymphknoten nach Aktivierung durch Fremdantigen und mehrfacher Zellteilung, exprimieren dann CD62L und wandern in sekundäre Lymphorgane aus, wo sie nahezu im Zellarrest auf eine Reaktivierung warten (Hengel et al., 2003).

Neben dem Nachweis der Migration wurde auch gezeigt, dass die Zellen wie Zentrale Gedächtniszellen antigenspezifisch reaktiviert werden können. Unter Hinzunahme der Messungen von CD69 und der Proliferationsmessung mittels CFSE wird erkenntlich, dass im *steady state* des Immunsystems nur bei immunisierten Tieren der Nachweis der IL-17 Produktion durch Restimulation erfolgte, nicht jedoch bei naiven Tieren. Auch bei Fehlen von Ovalbumin konnte keine Produktion von IL-17 in vorimmunisierten Lymphknotenzellen detektiert werden. Die sezernierte Menge betrug etwa die Hälfte von derjenigen, die in der Hochphase der Immunreaktion in der Milz gemessen wurde. Auch in der Proliferationsmessung mittels CFSE wurde der Nachweis einer gesteigerten Proliferation durch Restimulation erreicht. So sind CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen auch nach dem Ablauf der Immunreaktion in der Milz resident und lassen sich zu einem späteren Zeitpunkt restimulieren. Damit verhalten sich die Zellen wie T-Gedächtniszellen, die nach Aktivierung im Lymphknoten in die Milz wandern und dort mit reduzierter Proliferationsrate verweilen, bis sie reaktiviert werden.

## 5.5 Die Weiche zur Dysregulation

Zusammenfassend verhalten sich CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> Zellen auf eine Antigenexposition ähnlich wie T<sub>H</sub>1-Zellen. Sie steigern ihre Proliferation, zirkulieren durch sekundäre Lymphorgane und warten

### <<< Diskussion >>>

dort nach der akuten Entzündungsphase darauf, reaktiviert zu werden. Was sie jedoch deutlich von T<sub>H</sub>1-Zellen unterscheidet ist die starke Proliferation auch ohne Fremdantigen. Eine solche dauerhaft gesteigerte Zellteilung ist sicherlich schwerer zu kontrollieren, was die Zellen ganz abgesehen von den vielen veröffentlichten Zusammenhängen in den Kontext von Autoimmunerkrankungen bringt. Klar ist jedoch, dass die starke Proliferation per se keineswegs pathologisch im Sinne eines Hinweises auf beginnende oder ablaufende Autoimmunerkrankung ist, denn keines der Tiere in unseren Versuchen zeigte Krankheitssymptome. Der entscheidende Schritt von der physiologischen zu einer möglichen pathologischen Aktivität von CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>-Zellen ist also nicht in der starken Proliferation zu suchen, sondern verlangt weitere Untersuchungen: Insbesondere eine hohe Apoptoserate könnte die starke Zellteilung ausgleichen und eine Dominanz der Zellen verhindern. Daneben hängt eine erhöhte Zellteilung nicht zwangsläufig mit der Menge des produzierten Interleukins zusammen und letztendlich beschreiben die meisten Veröffentlichungen nicht eine hohe T<sub>H</sub>17-Zellzahl, sondern eine erhöhte Konzentration von IL-17 bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Teunissen et al., 1998, Lubberts et al., 2004, Fujino et al., 2003).

Erst kürzlich wurden Daten zur unterschiedlichen Aktivierung von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen durch dendritische Zellen (DC) veröffentlicht. Dabei zeigten T<sub>H</sub>17-Zellen eine starke Abhängigkeit von der Interaktion mit DCs über MHCII und steigerten nach Zugabe von CD40-Agonisten im Gegensatz zu T<sub>H</sub>1-Zellen ihre Zytokinproduktion – in diesem Fall IL-17 (Katzman et al., 2011). Dabei konnte bereits im Vorfeld gezeigt werden, dass die CD40/CD154-Interaktion zwischen Lymphozyten und dendritischen Zellen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von Antigentoleranz und Autoimmunität nehmen und damit ein Stimulus für eine unkontrollierte IL-17-Sekretion sein könnten (Quezada et al., 2004). Da sowohl T<sub>H</sub>17-Zellen als auch T<sub>H</sub>1-Zellen in Krankheiten wie der Rheumatoiden Arthritis oder Morbus Crohn zur Entzündungsreaktion beitragen und beide auf Interaktionen mit APCs angewiesen sind, werden auch dendritische Zellen als Quelle der Fehlregulation vermutet. Hierbei spielen insbesondere Autoantigene eine Rolle, die die CD40/CD154 Kaskade unkontrolliert ablaufen lassen. Von dieser Kaskade unabhängig wurden auch körpereigene Antigene ausfindig gemacht, die nach Präsentation auf DCs eine unkontrollierte IL-17-Produktion auslösen können, wie beispielsweise das in der Synovia vorkommende Tenascin C (Ruhmann et al., 2012). Auch wenn IL-17 ein Effektormolekül sein sollte, das weit entfernt von der eigentlichen Fehlerquelle im Immunsystem

<<< Diskussion >>>

letztendlich Krankheitssymptome auslöst, so ist eine Suppression dieses nicht weniger wichtig. Aus diesem Grund wird große Hoffnung in die neuen IL-17-Antikörper gesteckt, die sich aktuell in Dosisfindungs- und Zulassungsstudien befinden. Mit Vorsicht wird dabei auch die Beeinträchtigung des Immunsystems mit anti-IL-17-Antikörpern behandelter Patienten betrachtet insbesondere gegenüber Keimen, die mit Hilfe von  $T_{H17}$ -Zellen bekämpft werden. So lange der detaillierte Pathomechanismus der Beteiligung von  $T_{H17}$  Zellen an Autoimmunerkrankungen unklar ist, wird man diese Einschränkung hinnehmen müssen.

## **6. Zusammenfassende Beurteilung**

$T_{H17}$ -Zellen sind eine von vier T-Helfer-Subpopulationen und wurden seit ihrer Entdeckung mit der Auslösung von chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen über die Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin 17 in Verbindung gebracht. Diese Zellen sind ausschließlich  $CD4^+CCR6^+$ . Ziel meiner Arbeit war die Untersuchung der Fähigkeit dieser Zellen, auf Antigen mittels Proliferation oder Zytokinproduktion zu reagieren. Hierfür wurden Mäuse mit Ovalbumin geimpft und anschließend sowohl die Zellteilung *in vivo* mit Hilfe des Einbaus markierter Nukleotide durchflusszytometrisch bestimmt, als auch das Effektorzytokin IL-17 vor und nach Antigenstimulation quantifiziert. Hierbei konnte erstmalig *in vivo* gezeigt werden, dass  $CD4^+CCR6^+$  Zellen auf antigenspezifische Stimulation mit einer deutlichen Proliferationssteigerung reagieren und auch nach der akuten Phase der Immunreaktion die Fähigkeit beibehalten, den Stimulus wieder zu erkennen.

Zusammenfassend sind  $CD4^+CCR6^+$ -Zellen sowohl in Ruhe als auch im Ablauf der Immunreaktion sehr teilungsaktiv. Sie reagieren auf antigenspezifische Stimulation mit einer deutlichen Proliferationssteigerung und können auch nach der Immunreaktion und nach Zirkulation durch sekundäre Lymphorgane reaktiviert werden. Die Zellen verhalten sich somit weitgehend wie  $CD4^+CCR6^-$  Zellen, sie proliferieren jedoch deutlich aktiver. So könnten die Zellen als eine Art erste Barriere gegen fremde Erreger fungieren, da sie über engen APC Kontakt in kürzester Zeit aktiviert werden können und nicht auf eine länger währende Regulation über Zell-Zell-Kontakt und auf Zytokinebene angewiesen sind. Damit bergen die Zellen jedoch auch ein höheres Risiko, einer Fehlregulation zu unterliegen und symptomatische Autoimmunerkrankungen auszulösen.

## **7. Anhang**

### **7.1 Abkürzungen**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µ	mikro
APC	antigen presenting cell
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CCR	Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
CFSE	5,6-Carboxyfluorescein-succinimidylester
CpG	Cytosin-Guanosin Dinucleotid
d	Tag
DC	Dendritische Zelle
DNA	desoxyribonuclein acid
EAE	experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzym linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
h	Stunde
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
m	mini
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid

<<< Anhang >>>

MS	Multiple Sklerose
n.d.	nicht detektierbar
ODN	Oligodesoxythymidin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMA	phorbol myristate acetate
RNA	ribonucleid acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute buffer
s	Sekunde
s.c.	subkutan
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Zelle
TGF-β	transforming growth factor beta
TNF	tumor necrosis factor
U	unit
ZNS	Zentrales Nervensystem

<<< Anhang >>>

## 7.2. Publikationen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde folgender Beitrag publiziert:

**Tracing functional antigen-specific CCR6 Th17 cells after vaccination.**

Pötzl, J., Botteron, C., Tausch, E., Pedré, X., Mueller, A. M., Männel, D. N. and Lechner, A. PLoS ONE 3, e2951 (2008).

### 7.3 Quellen

- Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8, 639-646.
- Allen, S. J., Crown, S. E., and Handel, T. M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 787-820.
- Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55, 97-179.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., and Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875-1886.
- Ebert, L. M., and McColl, S. R. (2002). Up-Regulation of CCR5 and CCR6 on Distinct Subpopulations of Antigen-Activated CD4+ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 168, 65 -72.
- Emery, P., Keystone, E., Tony, H. P., Cantagrel, A., van Vollenhoven, R., Sanchez, A., Alecock, E., Lee, J., and Kremer, J. (2008). IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 1516-1523.
- Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R., and Neurath, M. F. (2004).

<<< Anhang >>>

Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol* 172, 5149-5153.

Fujimoto, M., Serada, S., Mihara, M., Uchiyama, Y., Yoshida, H., Koike, N., Ohsugi, Y., Nishikawa, T., Ripley, B., Kimura, A., et al. (2008). Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Arthritis Rheum* 58, 3710-3719.

Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70.

Gaffen, S. L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9, 556-567.

Genovese, M. C., McKay, J. D., Nasonov, E. L., Mysler, E. F., da Silva, N. A., Alecock, E., Woodworth, T., and Gomez-Reino, J. J. (2008). Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum* 58, 2968-2980.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol* 6, 1123-1132.

Hengel, R. L., Thaker, V., Pavlick, M. V., Metcalf, J. A., Dennis Jr., G., Yang, J., Lempicki, R. A., Sereti, I., and Lane, H. C. (2003). Cutting Edge: L-Selectin (CD62L) Expression Distinguishes Small Resting Memory CD4+ T Cells That Preferentially Respond to Recall Antigen. *The Journal of Immunology* 170, 28 -32.

Herold, G. Innere Medizin 2009 (Herold-Verlag).

<<< Anhang >>>

Hirota, K., Yoshitomi, H., Hashimoto, M., Maeda, S., Teradaira, S., Sugimoto, N., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ito, H., Nakamura, T., et al. (2007). Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J. Exp. Med.* 204, 2803-2812.

Hofstetter, H. H., Ibrahim, S. M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K. V., and Gold, R. (2005). Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.* 237, 123-130.

Homey, B., Dieu-Nosjean, M. C., Wiesenborn, A., Massacrier, C., Pin, J. J., Oldham, E., Catron, D., Buchanan, M. E., Müller, A., deWaal Malefyt, R., et al. (2000). Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J. Immunol.* 164, 6621-6632.

Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4+ alpha beta-TCR transgenic T cells is macrophage dependent. *Int. Immunol.* 5, 371-382.

Hymowitz, S. G., Filvaroff, E. H., Yin, J. P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., Maruoka, M., Mao, W., Foster, J., Kelley, R. F., et al. (2001). IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J.* 20, 5332-5341.

Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., and Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ T directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 $^{+}$  T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.

Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Itano, A., and Pape, K. A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 23-45.

<<< Anhang >>>

- Jones, C. E., and Chan, K. (2002). Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 26, 748-753.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med* 13, 1173-1175.
- Kelchtermans, H., Billiau, A., and Matthys, P. (2008). How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol* 29, 479-486.
- Kelly, M. N., Kolls, J. K., Happel, K., Schwartzman, J. D., Schwarzenberger, P., Combe, C., Moretto, M., and Khan, I. A. (2005). Interleukin-17/Interleukin-17 Receptor-Mediated Signaling Is Important for Generation of an Optimal Polymorphonuclear Response against Toxoplasma gondii Infection. *Infect Immun* 73, 617-621.
- Kesselring, R., Thiel, A., Pries, R., Trenkle, T., and Wollenberg, B. (2010). Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. *Br. J. Cancer* 103, 1245-1254.
- Kimura, A., and Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol* 40, 1830-1835.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol* 177, 566-573.
- Kryczek, I., Bruce, A. T., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Aphale, A., Vatan, L., Szeliga, W., Wang, Y., Liu, Y., Welling, T. H., et al. (2008). Induction of IL-17+ T cell trafficking and

<<< Anhang >>>

development by IFN $\gamma$ : Mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J Immunol* 181, 4733-4741.

Kurschus, F. C., Croxford, A. L., P. Heinen, A., Wörtge, S., Ielo, D., and Waisman, A. (2010). Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype. *Eur. J. Immunol.* 40, 3336-3346.

Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastlein, R. A., and Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201, 233-240.

Leonardi, C., Matheson, R., Zachariae, C., Cameron, G., Li, L., Edson-Heredia, E., Braun, D., and Banerjee, S. (2012). Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N. Engl. J. Med.* 366, 1190-1199.

Levings, M. K., and Roncarolo, M. G. (2005). Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 293, 303-326.

Lexberg, M. H., Taubner, A., Förster, A., Albrecht, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A., and Chang, H. (2008). Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *Eur. J. Immunol.* 38, 2654-2664.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689.

Liang, S. C., Long, A. J., Bennett, F., Whitters, M. J., Karim, R., Collins, M., Goldman, S. J., Dunussi-Joannopoulos, K., Williams, C. M. M., Wright, J. F., et al. (2007). An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J. Immunol* 179, 7791-7799.

<<< Anhang >>>

- Lim, H. W., Lee, J., Hillsamer, P., and Kim, C. H. (2008). Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+ regulatory T cells. *J. Immunol* 180, 122-129.
- Liu, H., and Rohowsky-Kochan, C. (2008). Regulation of IL-17 in human CCR6+ effector memory T cells. *J. Immunol* 180, 7948-7957.
- Lowes, M. A., Kikuchi, T., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L. C., Haider, A. S., Bowman, E. P., and Krueger, J. G. (2008). Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J. Invest. Dermatol* 128, 1207-1211.
- Lubberts, E., Koenders, M. I., Oppers-Walgren, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C. J. J., Joosten, L. A. B., and van den Berg, W. B. (2004). Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50, 650-659.
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., and Weaver, C. T. (2006a). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- Marelli-Berg, F. M., Cannella, L., Dazzi, F., and Mirenda, V. (2008). The highway code of T cell trafficking. *J. Pathol* 214, 179-189.
- McAllister, F., Henry, A., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Ulrich, L., Steele, C., Finder, J. D., Pilewski, J. M., Carreno, B. M., Goldman, S. J., et al. (2005). Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J. Immunol* 175, 404-412.
- McKenzie, B. S., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2006). Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 27, 17-23.

<<< Anhang >>>

Moseley, T. A., Haudenschild, D. R., Rose, L., and Reddi, A. H. (2003). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 155-174.

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

Murphy, C. A., Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R. A., Sedgwick, J. D., and Cua, D. J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med* 198, 1951-1957.

Nagaraj, S., and Gabrilovich, D. I. (2012). Regulation of suppressive function of myeloid-derived suppressor cells by CD4(+) T cells. *Semin. Cancer Biol* 22, 282-288.

Nourshargh, S., and Marelli-Berg, F. M. (2005). Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol* 26, 157-165.

Papp, K. A., Leonardi, C., Menter, A., Ortonne, J., Krueger, J. G., Kricorian, G., Aras, G., Li, J., Russell, C. B., Thompson, E. H. Z., et al. (2012). Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N. Engl. J. Med* 366, 1181-1189.

Pham, T. H. M., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C. G., and Cyster, J. G. (2008). S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* 28, 122-133.

Pötzl, J., Botteron, C., Tausch, E., Pedré, X., Mueller, A. M., Männel, D. N., and Lechner, A. (2008). Tracing functional antigen-specific CCR6 Th17 cells after vaccination. *PLoS ONE* 3, e2951.

Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F., and Noelle, R. J. (2004). CD40/CD154 Interactions

<<< Anhang >>>

at the Interface of Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 307-328.

Román, E., Miller, E., Harmsen, A., Wiley, J., Von Andrian, U. H., Huston, G., and Swain, S. L. (2002). CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. *J. Exp. Med.* 196, 957-968.

Rot, A., and von Andrian, U. H. (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 891-928.

Rothaeusler, K., and Baumgarth, N. (2006). Evaluation of intranuclear BrdU detection procedures for use in multicolor flow cytometry. *Cytometry A* 69, 249-259.

Ruhmann, M., Piccinini, A. M., Kong, P. L., and Midwood, K. S. (2012). Endogenous activation of adaptive immunity: Tenascin-C drives interleukin-17 synthesis in murine arthritic joint disease. *Arthritis Rheum.* 64, 2179-2190.

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

Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M., and Fazekas de St Groth, B. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 176, 1091-1098.

Siveke, J. T., and Hamann, A. (1998). T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J. Immunol.* 160, 550-554.

Suri-Payer, E., Amar, A. Z., Thornton, A. M., and 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. *J. Immunol.* 160, 1212-1218.

<<< Anhang >>>

- Teunissen, M. B., Koomen, C. W., de Waal Malefyt, R., Wierenga, E. A., and Bos, J. D. (1998). Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol* 111, 645-649.
- Tran, E. H., Prince, E. N., and Owens, T. (2000). IFN $\gamma$  Shapes Immune Invasion of the Central Nervous System Via Regulation of Chemokines. *The Journal of Immunology* 164, 2759 - 2768.
- Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M., and Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol* 172, 146-155.
- van de Veerdonk, F. L., Gresnigt, M. S., Kullberg, B. J., van der Meer, J. W. M., Joosten, L. A. B., and Netea, M. G. (2009). Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* 42, 776-787.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.
- Wan, Q., Kozhaya, L., ElHed, A., Ramesh, R., Carlson, T. J., Djuretic, I. M., Sundrud, M. S., and Unutmaz, D. (2011). Cytokine signals through PI-3 kinase pathway modulate Th17 cytokine production by CCR6+ human memory T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 1875 -1887.
- Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D. M., Zeng, D., and Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med* 206, 1457-1464.
- Weninger, W., Crowley, M. A., Manjunath, N., and von Andrian, U. H. (2001). Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J. Exp. Med* 194, 953-966.

<<< Anhang >>>

Woodland, D. L., and Kohlmeier, J. E. (2009). Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol* 9, 153-161.

Wu, Q., Martin, R. J., Rino, J. G., Breed, R., Torres, R. M., and Chu, H. W. (2007). IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect* 9, 78-86.

Yamazaki, T., Yang, X. O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, H. S., Ma, L., Panopoulos, A. D., et al. (2008). CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J. Immunol* 181, 8391-8401.

Yang, D., Chertov, O., and Oppenheim, J. J. (2001). The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell. Mol. Life Sci* 58, 978-989.

Yao, Z., Painter, S. L., Fanslow, W. C., Ulrich, D., Macduff, B. M., Spriggs, M. K., and Armitage, R. J. (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol* 155, 5483-5486.

Ye, P., Rodriguez, F. H., Kanaly, S., Stocking, K. L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., et al. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med* 194, 519-527.

Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M. W., Ivanov, I. I., Min, R., Victora, G. D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y. P., Rudensky, A. Y., et al. (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* 453, 236-240.

<<< Anhang >>>

## 7.4 Danksagungen

Ich danke meiner zukünftigen Ehefrau Karin für das Teilen der fröhlichen und traurigen Stunden nach einem ereignisreichen Labortag, die mentale und kulinarische Unterstützung während der langen Phase des „Zusammenschreibens“ und das Korrekturlesen um fünf vor zwölf.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich dabei unterstützt haben.

Ich danke vor allem aber auch Anja Lechner für die geduldige Betreuung, das Mutmachen in der sechswöchigen Tiefphase zu Beginn der Arbeit und die zuverlässige halbjährige Erinnerung an etwas, das es abzuschließen galt. Ich wünsche Dir, liebe Anja, für Deine Karriere als erfolgreiche PD alles Gute! Großer Dank gilt Prof. Dr. Daniela Männel für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor. Sven Mostböck habe ich entscheidende Tipps bei der in vivo BrdU-Färbung zu verdanken. Daneben bedanke ich mich für die hilfsbereite und freundliche Atmosphäre im Labor, zu der auch Catherine Botteron und Hannes Pötzl maßgeblich beigetragen haben.

<<< Anhang >>>

## 7.5. Lebenslauf

### Vorschulzeit und Schullaufbahn:

1991 – 1997	Grundschule Aichach, Gymnasium Aichach
1997 - 2003	Gymnasium Augsburg mit Erlangung d. allg. Hochschulreife, Note: 1,6

### Freiwilliges Soziales Jahr:

07/2003 – 08/2004	Ausbildung zum Rettungsdiensthelfer an der Malteserschule Aachen mit Beschäftigung in den Bereichen Rettungsdienst und Krankentransport der Malteser Augsburg
-------------------	---

### Universitärer Werdegang:

10/2004 – 11/2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
10/2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
08/2009 – 08/2010	Praktisches Jahr an der Universität Regensburg
11/2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,5

### Praktische Ausbildung im Rahmen des Praktischen Jahrs:

08/2009 – 12/2009	Institut für Röntgendiagnostik, Universitätsklinikum Regensburg (Prof. Dr. S. Feuerbach)
12/2009 – 04/2010	Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg (Prof. Dr. H-J. Schlitt)
04/2010 – 08/2010	Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum Regensburg (Prof. Dr. J. Schölmerich)

### Beruflicher Werdegang:

seit 02/2011	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Hämatologie/Onkologie der Universitätsklinik Ulm
--------------	--

### Promotion/Publikationen:

Seit 08/2007	Promotion an der Klinik für Immunologie, Universitätsklinikum Regensburg (Direktorin Prof. Dr. Männel) mit dem Thema „Charakterisierung IL-17 produzierender CCR6 <sup>+</sup> T-Helfer-Zellen nach Immunisierung.“ <u>Veröffentlichung im Rahmen der Arbeitsgruppe:</u> „Tracing functional antigen-specific CCR6 Th17 cells after vaccination“, Pötzl J, Botteron C, Tausch E, Pedré X, Mueller AM, Männel DN, Lechner A. <i>PLoS One</i> , August 2008
--------------	--



