

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einflussfaktoren auf die IL-25-Produktion von  
CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Stefanie Nagel

2013



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einflussfaktoren auf die IL-25-Produktion von  
CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Stefanie Nagel

2013

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

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Fichtner-Feigl**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Florian Obermeier**

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2013

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	T-Zellen.....	2
1.2	Subpopulationen der T-Helfer-Zellen .....	5
1.2.1	Th1 .....	5
1.2.2	Th2 .....	6
1.2.3	Th9 .....	7
1.2.4	Th17 .....	8
1.2.5	Regulatorische T-Zelle .....	9
1.3	Rolle der Transkriptionsfaktoren T-bet, STAT6 und ROR $\gamma$ T in der T-Zell-Differenzierung.....	10
1.3.1	T-bet.....	10
1.3.2	STAT6 .....	11
1.3.3	ROR $\gamma$ T .....	12
1.4	Rolle von NF- $\kappa$ B bei Zelltod- und Überleben.....	13
1.4.1	Einführung zu NF- $\kappa$ B .....	13
1.4.2	NF- $\kappa$ B bei Zelltod- und Überleben .....	15
1.5	Interleukin-25 (IL-25).....	16
1.5.1	Einführung zu IL-25 .....	16
1.5.2	Wirkung des IL-25 .....	17
1.6	Die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle.....	18
1.7	Fragestellung .....	19
2	Methoden.....	21
2.1	Isolation von CD4 <sup>+</sup> -Zellen aus der Mäusemilz .....	21
2.2	Kultur und Stimulation der naiven CD4 <sup>+</sup> -Zellen.....	22

2.3	Western Blot .....	24
2.3.1	Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	24
2.3.2	Nachweis von IL-25 und $\beta$ -actin mittels Western Blot.....	24
2.4	Durchflusszytometrie (FACS).....	27
2.4.1	Nachweis von CD4 <sup>+</sup> /IL-25 <sup>+</sup> -Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	27
2.4.2	Toxizitätsassay bei verschiedenen Konzentrationen des NF- $\kappa$ B-Inhibitors Bay 11-7082 .....	29
2.5	Material .....	30
2.5.1	Geräte .....	30
2.5.2	Puffer und Zellkulturmedien.....	30
2.5.3	Selbst hergestellte Gele und Puffer .....	31
2.5.4	Chemikalien und Kits.....	32
2.5.5	Verbrauchsmaterialien.....	33
2.5.6	Antikörper.....	34
2.5.7	Versuchstiere .....	35
3	Ergebnisse .....	36
3.1	Nachweis der IL-25-Produktion bei Th2- und Th25/(33)-Zellen .....	36
3.2	Vergleich der IL-25-Produktion bei Wildtyp- und T-bet-defizienten Mäusen .....	37
3.3	Vergleich der IL-25-Produktion bei Wildtyp- und STAT6-defizienten Mäusen .....	39
3.4	Vergleich der IL-25-Produktion bei Wildtyp- und ROR $\gamma$ T-defizienten Mäusen .....	40
3.5	Einfluss von IL-21 auf die IL-25-Produktion .....	41
3.6	Wirkung der NF- $\kappa$ B-Inhibition auf die IL-25-Produktion bei Th0- und Th25/(33)-Zellen.....	42

3.6.1	Toxizitätsassay bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen an Th0-Zellen.....	42
3.6.2	IL-25-Expression bei Inhibition von NF- $\kappa$ B .....	43
4	Diskussion.....	50
4.1	Die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle als eigenständige Subpopulation .....	50
4.2	Einfluss von IL-21 auf die IL-25-Produktion der Th25/(33)-Zelle.....	52
4.3	Wirkung des NF- $\kappa$ B auf Th25/(33)-Zellen.....	54
4.4	Potentielle <i>in vivo</i> Funktionen der Th25/(33)-Zelle .....	56
4.4.1	Mögliche proinflammatorische Funktion der Th25/(33)-Zelle.....	56
4.4.2	Mögliche antiinflammatorische Funktion der Th25/(33)-Zelle .....	58
4.4.3	Möglicher Zusammenhang von NF- $\kappa$ B und der Th25/(33)-Zelle bei Inflammation .....	58
4.5	Ausblick.....	60
5	Zusammenfassung .....	62
6	Summary.....	64
	Abbildungsverzeichnis .....	IV
	Abkürzungsverzeichnis .....	V
	Literaturverzeichnis .....	VII
	Danksagung.....	XVI

## 1 Einleitung

Durch ein komplexes Zusammenspiel von Zellen, Proteinen und Organen erfolgt die Abwehr von Krankheitserregern, mit denen der Organismus tagtäglich konfrontiert wird. Diese Abwehr erfolgt durch das Immunsystem, das aus einer angeborenen, unspezifischen Immunabwehr und der adaptiven, spezifischen Abwehr besteht [1].

Das angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen Zellarten wie Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und Granulozyten sowie humoralen Bestandteilen; hier sind das Komplementsystem und die Interleukine zu nennen. Zusätzlich zählen mechanische Barrieren, die Krankheitserreger am Eindringen hindern, zur unspezifischen Immunabwehr. Eine schnelle Erstreaktion auf Krankheitserreger erfolgt nach Erkennung des Pathogens durch die angeborene Immunabwehr, erst sekundär wird die adaptive Abwehr aktiviert.

Die adaptive Abwehr kann spezifische Reaktionen auf Antigene ausüben und entwickelt zudem Gedächtniszellen, durch die bei Reinfektion eine schnelle und zugleich spezifische Immunantwort sichergestellt wird. Die Zellen der adaptiven Immunreaktion sind die Lymphozyten, deren Hauptvertreter die B- und T-Zellen sind. B-Zellen sind - vereinfacht gesagt - für die humorale, T-Zellen für die zellvermittelte Immunabwehr notwendig. Ein komplexes Zusammenwirken über aktivierende und inhibierende Botenstoffe, Antigenpräsentation durch Antigenpräsentierende Zellen (APCs) und direkte Zell-Zellkontakte verknüpft die angeborene mit der adaptiven Abwehr sowie die verschiedenen Zelltypen untereinander, wodurch die bestmögliche Abwehrreaktion auf ein bestimmtes Pathogen ermöglicht wird. Allerdings sind auch Überreaktionen des Immunsystems möglich, die zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Asthma oder chronisch-entzündlichen Darm-erkrankungen führen können [1].



Die eingewanderten, frühen Vorläuferzellen exprimieren weder CD4 noch CD8 und werden demnach als doppelt-negative Thymozyten bezeichnet. Im Verlauf werden die Zellen zur Expression beider Merkmale angeregt, es bilden sich doppelt-positive, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Zellen. Den doppelt-positiven Thymozyten werden körpereigene MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) präsentiert. Nur diejenigen Zellen, die mit genügender Affinität MHC der Klasse I oder II binden können, überleben, die Mehrheit der Zellen wird apoptotisch. Dies wird als positive Selektion bezeichnet. Durch die positive Selektion wird gleichzeitig der T-Zell-Typ festgelegt. Doppelt-positive Zellen, die MHC Klasse I binden, werden zu CD8<sup>+</sup>-Zellen, während Bindung an MHC Klasse II zur CD4<sup>+</sup>-Zelle, also einer einfach-positiven Zelle führt. CD4 und CD8 stellen wichtige Korezeptoren für die spätere Antigenbindung dar. Bei gleichzeitiger Bindung von T-Zell-Rezeptor und CD4 an den passenden Peptid/MHC II-Komplex erhöht sich die Sensitivität der T-Zelle für das gebundene Antigen auf das Hundertfache im Vergleich zu einer reinen T-Zell-Rezeptor/MHC II-Bindung [1]. Die positive Selektion stellt somit sicher, dass die T-Zellen Antigene erkennen, die auf MHC-Komplexen präsentiert werden.

Die positive Selektion bietet allerdings noch keinen Schutz vor Autoimmunität, dies erfolgt mit der negativen Selektion. Den überlebenden Zellen werden verschiedenste körpereigene Antigene präsentiert. Zellen mit zu starker Bindung an körpereigene Proteine bekommen wiederum Apoptosesignale, so dass letztendlich nur Zellen mit genügender MHC-Affinität und gleichzeitiger Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe überleben.

Die auf diese Weise entstandenen reifen, naiven CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verlassen den Thymus, treten in die Blutbahn ein und wandern in die sekundären lymphatischen Organe. Die naiven Zellen zirkulieren zwischen den peripheren lymphatischen Geweben, in denen ihnen von APCs Peptide angeboten werden und der Blutbahn. Zur Aktivierung einer naiven Zelle muss ihr das spezifische, zum T-Zell-Rezeptor passende Antigen auf einem MHC-Komplex präsentiert werden. Die Aktivierung und anschließende Differenzierung der naiven T-Zelle zur Effektor-T-Zelle oder Gedächtniszelle wird häufig ‚Priming‘ genannt [1]. Das ‚Priming‘ von

CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten führt zu zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen direkt töten können. CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten hingegen können sich abhängig von den Signalen während des Primings zu verschiedenen Effektorzellen entwickeln. Auf wichtige Subtypen wird im nächsten Kapitel genauer eingegangen. CD4<sup>+</sup>-Zellen wirken generell über die Ausschüttung von speziellen Zytokinen, die auf Zielzellen einwirken und die Immunreaktion steuern. Für die Differenzierung zur Effektorzelle ist die reine Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und dem Peptid/MHC-Komplex auf der APC allerdings nicht ausreichend, es müssen weitere Stimuli hinzukommen, die normalerweise von der gebundenen APC geboten werden.

Nach dem beschriebenen ersten Schritt der Aktivierung durch die T-Zell-Rezeptor/MHC-Bindung sowie der Bindung des Korezeptors CD4 oder CD8, muss im zweiten Schritt der CD28-Rezeptor auf der T-Zelle durch das B7-Molekül (CD80/CD86) aktiviert werden, wodurch die T-Zelle Überlebens- und Proliferations-signale erhält [3]. Das B7-Molekül gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und wird hauptsächlich von Antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen, exprimiert. Die CD28-Aktivierung führt zur vermehrten IL-2-Produktion sowie zur Hochregulation des IL-2-Rezeptors auf der Oberfläche der Zellen. IL-2 gibt den Zellen das Signal zum Eintritt in den Zellzyklus und ist somit ein wichtiger Proliferationsfaktor. Der dritte Schritt, die Differenzierung an sich, erfolgt schließlich durch das vorherrschende Zytokinmilieu [1].

CD4<sup>+</sup>-Zellen differenzieren sich zu verschiedenen Subtypen. Die ursprüngliche Einteilung in ein dichotomes System aus Th1- und Th2-Zellen [4, 5] wurde mit der Entdeckung der Th17-Zelle verlassen [6]. Seither wurden noch einige weitere Subtypen bekannt, so dass der momentane Stand die Th1, Th2, Th3, Th9, Th17, Th22, T<sub>fh</sub> (follicular B Helper T-cells) und die regulatorischen T-Zellen (Treg) umfasst [1, 7-12]. Die Zelllinien unterscheiden sich durch die zur Differenzierung notwendigen Signale, Oberflächenmerkmale, Regulationsfaktoren wie beispielsweise den Transkriptionsfaktoren und durch die produzierten Zytokine [1]. Ein Subtyp produziert im Normalfall ein charakteristisches Zytokinprofil, die einzelnen Zytokine dieses Profils sind für sich genommen allerdings nicht linienspezifisch.

Dieses klar erscheinende System aus verschiedenen Subtypen, die bestimmte, definierte Zytokine produzieren, ist allerdings weit komplexer als ursprünglich angenommen. Zum einen produzieren nicht alle Zellen einer bestimmten Linie dieselben Zytokine, es gibt innerhalb einer Linie verschiedene Zytokinprofile, wie z.B. für Th1-Zellen demonstriert wurde [13]. Die Heterogenität der T-Zellen zeigt sich außerdem durch Zytokinprofile, die nicht der klassischen Einteilung entsprechen [14]. Zum anderen wurde nachgewiesen, dass sich die T-Zellen nicht streng in eine Richtung differenzieren und eine gewisse Plastizität besitzen, also die Fähigkeit, sich von einer Linie in eine andere oder in einen gemischten Phänotyp umzuwandeln [14, 15]. Th2-Zellen können beispielsweise durch ein verändertes Milieu neue Eigenschaften entwickeln und Zytokine anderer Subtypen bilden [16]. Die genaue Bedeutung der einzelnen Subtypen in der Immunabwehr, die Regulation der Differenzierung und die Wechselbeziehungen untereinander sind in vielen Fällen noch ungenügend bekannt und deswegen ein wichtiger Teil der aktuellen Forschung.

## 1.2 Subpopulationen der T-Helfer-Zellen

### 1.2.1 Th1

Die Th1-Zelle gehört mit der Th2-Zelle zu den am längsten bekannten Subtypen [5]. Die Faktoren, die zur Th1-Differenzierung führen, sind IFN- $\gamma$  und IL-12. IL-12 wird durch dendritische Zellen und Makrophagen produziert [1], IFN- $\gamma$  durch Natürliche Killerzellen (NK-Zelle) und Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zelle), sowie nach Aktivierung ebenfalls durch Th1-Zellen und CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen Lymphozyten (CTL) [17]. Die zur Differenzierung benötigten Zytokine wirken über Rezeptoren auf intrazelluläre Signalwege ein, bei der Th1-Zelle werden dadurch vor allem STAT1 (signal-transducing activators of transcription) und STAT4 aktiviert. STAT1 wiederum aktiviert T-bet (siehe Kapitel 1.3.1), das die Gene für IFN- $\gamma$  und den IL-12-Rezeptor hochreguliert [18].

Die Hauptfunktion der Th1-Zellen ist die Förderung der zellulären Immunantwort, im Besonderen für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene. Ausgereifte Effektor-

Th1-Zellen produzieren nach Erkennung eines präsentierten Antigens verschiedene Zytokine, u.a. das ‚Markenzeichen‘ IFN- $\gamma$ , zudem TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ /LT $\alpha$  und IL-2 [1, 18].

Durch die genannten Zytokine wird zum einen die Immunantwort in Th1-Richtung verstärkt. IFN- $\gamma$  gibt das Signal zur vermehrten Th1-Differenzierung, das produzierte IL-2 verstärkt außerdem wie beschrieben die T-Zell-Proliferation an sich.

Zum anderen werden die Hauptzielzellen, die Makrophagen, durch IFN- $\gamma$  aktiviert. IL-2 und ein weiterer sezernierter Faktor, GM-CSF, beschleunigen zusätzlich die Makrophagendifferenzierung im Knochenmark. Eine weitere wichtige Aufgabe der Th1-Zellen ist die Rekrutierung von Makrophagen zur Infektstelle. Die Th1-Zellen wirken über TNF- $\alpha$ - und TNF $\beta$ /LT $\alpha$ -Ausschüttung auf Oberflächenproteine von Endothelzellen ein, so dass Monozyten im Blut stärker an das Endothel binden können und dadurch die Diapedese verbessert wird. Zudem wirkt ein weiteres Zytokin, CXCL2, chemotaktisch.

Insgesamt hat die Th1-Zelle also eine Phagozytose-fördernde Wirkung, hilft bei der Bekämpfung intrazellulärer Bakterien und Viren und verknüpft die angeborene und adaptive Immunabwehr [1].

### 1.2.2 Th2

In der ursprünglichen Einteilung in zwei Subtypen wurde angenommen, dass Th1 für die zellvermittelte- und Th2 für die antikörpervermittelte Immunreaktion verantwortlich ist [1]. Nach heutigem Wissensstand gestaltet sich das Gesamtbild jedoch wesentlich komplexer.

Der wichtigste Faktor für den Anstoß zur Differenzierung in Th2-Richtung ist IL-4. IL-4 aktiviert STAT6 in den naiven T-Helfer-Zellen, welches wiederum die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 bewirkt [19]. Es wird davon ausgegangen, dass das IL-4 bei Infektionen anfänglich von Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen ausgeschüttet wird, da diese Zellen durch bestimmte Polysaccharide in Helminthen und Pilzen aktiviert werden können [20]. Dadurch erfolgt dann die Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

## 1 Einleitung

---

Die typischen Effektorinterleukine der ausgereiften Th2-Zellen sind IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 [1]. Die Hauptfunktion der Th2-Zelle liegt in der Immunabwehr von Parasiten, speziell der Helminthen [1, 21]. Beispielsweise wurde gezeigt, dass IL-13, der IL-4-Rezeptor IL-4Ra und STAT6 für die Abwehr einer *Nippostrongylus brasiliensis* Infektion erforderlich sind [22]. Zugleich haben die Th2-Zellen einen entscheidenden Einfluss bei allergischen Reaktionen und bei der Pathogenese von Erkrankungen aus dem allergischen Formenkreis, wie z.B. bei Asthma [23].

IL-4 führt autoregulatorisch zur verstärkten Polarisierung in Th2-Richtung. Eine wichtige Funktion liegt zudem in der Beeinflussung der humoralen Immunantwort. So bewirkt IL-4 in B-Zellen einen Antikörperklassenswitch zu IgE und IgG1 und ist somit notwendig für IgE-abhängige Mastzellreaktionen [24]. IL-4 und IL-13 sind als proinflammatorische Proteine aber auch der Auslöser für allergische, IgE-vermittelte Reaktionen [25]. IL-5 bewirkt zusätzlich eine erhöhte Proliferation und Differenzierung von Eosinophilen.

Die Th1- und Th2-Immunantworten supprimieren sich gegenseitig, so hemmt z.B. IL-10 die Polarisierung in Th1-Richtung und die Zytokinausschüttung von Makrophagen [1].

### 1.2.3 Th9

Die erst vor wenigen Jahren entdeckte Th9-Zelle erhielt ihren Namen durch ihr Hauptzytokin, IL-9. Ursprünglich ging man davon aus, dass IL-9 ein Th2-assoziiertes Zytokin ist, da es ähnlich der Th2-Zelle bei der Immunantwort auf Infektionen mit Helminthen sowie bei allergischen Erkrankungen eine Rolle spielt [26, 27]. Der Nachweis, dass Th9 eine neue, eigenständige Linie ist, gelang durch Entdeckung des Transkriptionsfaktors Pu.1. Verminderte Pu.1 Expression beschädigt die IL-9-Produktion während eine ektopische Pu.1 Expression zur vermehrten IL-9-Bildung führt [28]. Zudem wurde gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren T-bet, ROR $\gamma$ t oder FOXP3, die unabdingbar für die anderen T-Helferzell-Subtypen sind, nicht notwendig für die Differenzierung zur Th9-Zelle sind [29]. Allerdings besteht zwischen der

Th2-Zelle und der Th9-Zelle eine enge Verwandtschaft; sichtbar daran, dass die Th9-Zelle ebenfalls STAT6 und GATA3 benötigt [8, 9].

Die zur Differenzierung dieses neuen Zelltyps nötigen Zytokine sind TGF- $\beta$  und IL-4. Th2-Zellen können sich zudem durch Stimulation mit TGF- $\beta$  in IL-9-produzierende Zellen umwandeln. Sie verlieren dabei das typische Zytokinmuster der Th2-Zelle und exprimieren vermindert GATA3 [8]. Die Regulation der Th9-Differenzierung beim Menschen ist komplex, verschiedene inflammatorische Zytokine verstärken die IL-9-Expression [30].

IL-9 wirkt auf verschiedene Zelltypen wie Mastzellen, T-Zellen, eosinophile Granulozyten und Epithelzellen. Neben IL-9 produziert die Th9-Zelle IL-10, ein Zytokin, das nicht linienspezifisch ist und auch von Th2- und unter bestimmten Umständen von Th1- und Th17-Zellen gebildet werden kann, sowie von anderen Zelltypen wie beispielsweise Makrophagen [8].

### 1.2.4 Th17

Die Entdeckung der Th17-Zelle änderte die traditionelle Anschauung, dass es zwei polare T-Helferzellarten gibt, von Grund auf [6]. Seither wurde deutlich, dass die T-Zell-Populationen um einiges vielschichtiger aufgebaut sind als ursprünglich angenommen.

Um naive T-Helfer-Zellen zur Effektor-Th17-Zelle zu polarisieren, wird ein dreistufiges Modell angenommen: TGF- $\beta$  plus IL-6 oder TGF- $\beta$  plus IL-21 zur Induktion der Differenzierung, IL-21 zur Amplifikation und letztendlich IL-23 zur Stabilisierung der Th17-Zelle [31]. Allerdings variieren die zur Polarisierung nötigen Zytokine je nach Aktivitätszustand der T-Zelle, da T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung aufgrund unterschiedlicher Rezeptorexpressionen verschieden auf Zytokinsignale reagieren [32].

Die wichtigsten bisher bekannten Transkriptionsfaktoren sind STAT3, ROR $\gamma$ T und ROR $\alpha$  [33-35]. Wie auch bei der Th9-Zelle wurde nachgewiesen, dass die Th17-Population unabhängig von den Transkriptionsfaktoren T-bet, STAT1, STAT4 und

STAT6 und somit ein eigenständiger Subtyp ist [6, 36]. Die ausgereifte Effektorzelle produziert IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22. Zusätzlich können weitere Zytokine wie CCL20, GM-CSF, IL-8, IL-26 und IL-10 gebildet werden [32].

Durch die proinflammatorischen Eigenschaften der Hauptzytokine und der weiten Verbreitung von Rezeptoren für IL-17 und IL-22 kommt es bei Ausschüttung zu einer ausgedehnten Gewebereaktion. Eine wesentliche Bedeutung erlangt diese Eigenschaft zum einen bei Autoimmunerkrankungen durch die entstehende Gewebeentzündung, zum anderen bei der Immunantwort auf eine Infektion mit Pathogenen [37]. Autoimmunerkrankungen, bei denen Th17 eine Rolle spielt, sind unter anderem Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Asthma [32, 38]. Die Th17-Zellen sind allerdings auch wichtig für die Abwehr extrazellulärer Pathogene wie Klebsiellen und Candida [32]. Neuere Studien zeigen, dass Th17 zusätzlich eine protektive Rolle bei Tumorerkrankungen zukommen könnte [38, 39]. Verglichen mit anderen T-Helfer-Zellen wie Th1 und Th2 ist die Th17-Population relativ instabil, es können verschiedene Phänotypen während Entzündungsprozessen nachgewiesen werden [40]. Th17-Zellen weisen dementsprechend eine beachtliche Plastizität auf [32].

### 1.2.5 Regulatorische T-Zelle

Die regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) sind die Gegenspieler der proinflammatorischen Zellen und dafür zuständig, überschießende Immunreaktionen zu verhindern und Selbst-Toleranz zu gewährleisten.  $T_{reg}$  können die Aktivierung, Proliferation und die Effektorfunktion vieler Zelltypen, u.a.  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zellen, B-Zellen, NKT und APC supprimieren [41].

$T_{reg}$  werden zum einen im Thymus als reife Subpopulation produziert, zum anderen können sie peripher in naiven  $CD4^+$ -Zellen induziert werden [42, 43]. Hierzu werden bei *in vitro* Stimulation TGF- $\beta$  und IL-2 benötigt [44]. Interessanterweise differenzieren sich bei Gabe von TGF- $\beta$  und IL-6 wie beschrieben Th17-Zellen, die die Inflammation fördern.

T<sub>reg</sub> werden charakterisiert durch einen speziellen Oberflächenmarker, CD25. Der wichtigste Transkriptionsfaktor ist FoxP3 (forkhead box P3), der die Entwicklung und Funktion der T<sub>reg</sub> reguliert [42]. Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-Zellen können wiederum in verschiedene Subtypen untergliedert werden. Die Regulation und Funktion der T<sub>reg</sub> *in vivo* ist komplex und noch nicht vollständig verstanden, z.B. ist unklar, auf welchem Weg die Immunsuppression im Einzelnen abläuft [41].

### 1.3 Rolle der Transkriptionsfaktoren T-bet, STAT6 und ROR $\gamma$ T in der T-Zell-Differenzierung

#### 1.3.1 T-bet

T-bet (T-box expressed in T-cells), auch TBX21 genannt, ist ein Th1-spezifischer Transkriptionsfaktor [18]. Er gehört zur Familie der T-box-Transkriptionsfaktoren. Der Name wurde aufgrund seiner vorwiegenden Expression in Thymozyten und Th1-Zellen gegeben, allerdings spielt er auch in anderen Zelltypen wie NK-Zellen eine Rolle [45]. Die T-box-Transkriptionsfaktoren sind allgemein für diverse Entwicklungsprozesse wichtig [46, 47].

Durch Signale über den T-Zell-Rezeptor wird STAT1 aktiviert, das die T-bet-Expression während der initialen Polarisation hochreguliert. T-bet wiederum bindet direkt an *Ifng*, das die IFN- $\gamma$ -Produktion codiert. Außerdem erhöht es die Expression der IL-12-Rezeptoruntereinheit  $\beta$ 2. Die T-bet-Regulation nach der Initialphase erfolgt über einen IL-12/STAT4-Signalweg [48-50].

T-bet induziert durch vermehrte Expression von IFN- $\gamma$  die Th1-Entwicklung; IFN- $\gamma$  bewirkt dabei eine positive Rückkopplung mit verstärkter Th1-Bildung [1, 18]. Gleichzeitig supprimiert T-bet die Th2- und Th17-Differenzierung, u.a. über Suppression der IL-4-Produktion [18, 51, 52]. Die wesentliche Rolle von T-bet für die Th1-Differenzierung konnte vielfach belegt werden. Es wurde z.B. gezeigt, dass Effektor-Th2-Zellen nach Einbringen von T-bet durch Transduktion zu Th1-Zellen konvertieren [18]. Außerdem führt der Verlust von T-bet zur Differenzierung von

Th2- und Th17-Zelllinien, zudem haben T-bet-defiziente Mäuse eine gestörte Th1-Immunantwort [53, 54].

T-bet wirkt zusätzlich auf verschiedene andere Gene der Th1-Zelle, die für die Regulation der Transkription, Chemotaxis und Adhäsion zuständig sind [55].

### 1.3.2 STAT6

STAT6 ist notwendig für die Th2-Differenzierung [56]. Die Familie der STAT-Proteine (signal-transducing activators of transcription) ist eine weitere Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die für die Übertragung von zytokin-induzierten Signalen verantwortlich ist. Die Proteine liegen in einer latenten Form im Zytoplasma vor. Nach Rezeptoraktivierung durch ein spezifisches Zytokin erfolgt durch JAK (Janus-Kinase), eine Tyrosinkinase, die Phosphorylierung. Dadurch dimerisiert das ursprünglich einzeln vorliegende STAT-Protein, wandert in den Nucleus und bindet an seine spezifische DNA-Sequenz, wodurch die Genexpression reguliert wird [56, 57]. Bisher sind sieben Mitglieder der STAT-Familie bekannt [58].

STAT6 wird hauptsächlich durch IL-4, aber auch durch das strukturell verwandte IL-13 aktiviert. Außerdem wurden weitere, IL-4-unabhängige Signalwege beschrieben [59, 60]. IL-4, das von stimulierten T-Lymphozyten, Mastzellen und Basophilen ausgeschüttet wird, hat - wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben - verschiedenste Effekte, unter anderem bewirkt es über STAT6 die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th2-Zellen. STAT6 bindet nach Aktivierung an verschiedenste Genloci, die IL-4-vermittelte Funktionen codieren [59]. Unter anderem aktiviert es GATA3, das für die Expression der Th2-Effektor-Zytokine verantwortlich ist [19]. Studien mit STAT6-defizienten Mäusen zeigten, dass viele Effekte von IL-4 durch den STAT6-Verlust aufgehoben wurden. Beispielsweise waren die Bildung von Th2-Zellen und Th2-assoziierten Zytokinen sowie die T-Zell-Proliferation gestört, und die IgE- und IgG1-Produktion vermindert. [56, 61, 62].

### 1.3.3 ROR $\gamma$ T

ROR (retinoid-related orphan receptor) gehört zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren, einer Gruppe strukturell ähnlicher spezieller Transkriptionsfaktoren [63]. Die Untergruppe der ROR besteht aus ROR $\alpha$ , ROR $\beta$  und ROR $\gamma$  und spielt in vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle [64, 65]. ROR $\gamma$  wird in Leber, Niere, braunem Fettgewebe, Muskeln und Thymus exprimiert, die Variante im Thymus wird als ROR $\gamma$ T bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass ROR $\gamma$  unverzichtbar für die Organogenese von Lymphknoten und Peyer-Plaques ist, und die Zahl von CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten in ROR $\gamma$ -defizienten Mäusen wesentlich verringert ist [64]. ROR $\gamma$ T ist wie beschrieben einer der Schlüsseltranskriptionsfaktoren für Th17-Zellen [33, 34]. Überexpression von ROR $\gamma$ T führte zu einer erhöhten Th17-Differenzierung, während ein ROR $\gamma$ T-Defizit zu einem Th17-Defizit führte [34, 35].

Ein entscheidender Faktor der ROR $\gamma$ T-Aktivierung ist STAT3. Bei andauernder STAT3-Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-21 und TGF- $\beta$  wird die physiologische Suppression von ROR $\gamma$ T vermindert, die ROR $\gamma$ T-Expression erhöht und dadurch die Th17-Differenzierung induziert. IL-23 als ‚stabilisierendes‘ Zytokin bei der Th17-Polarisation verstärkt nochmals die STAT3- und somit ROR $\gamma$ T-Aktivierung [32]. Weitere Aktivierungsarten, wie beispielsweise ein rein TGF- $\beta$ -abhängiger Weg der Aktivierung sowie andere Wege wurden ebenfalls beschrieben [32, 66].

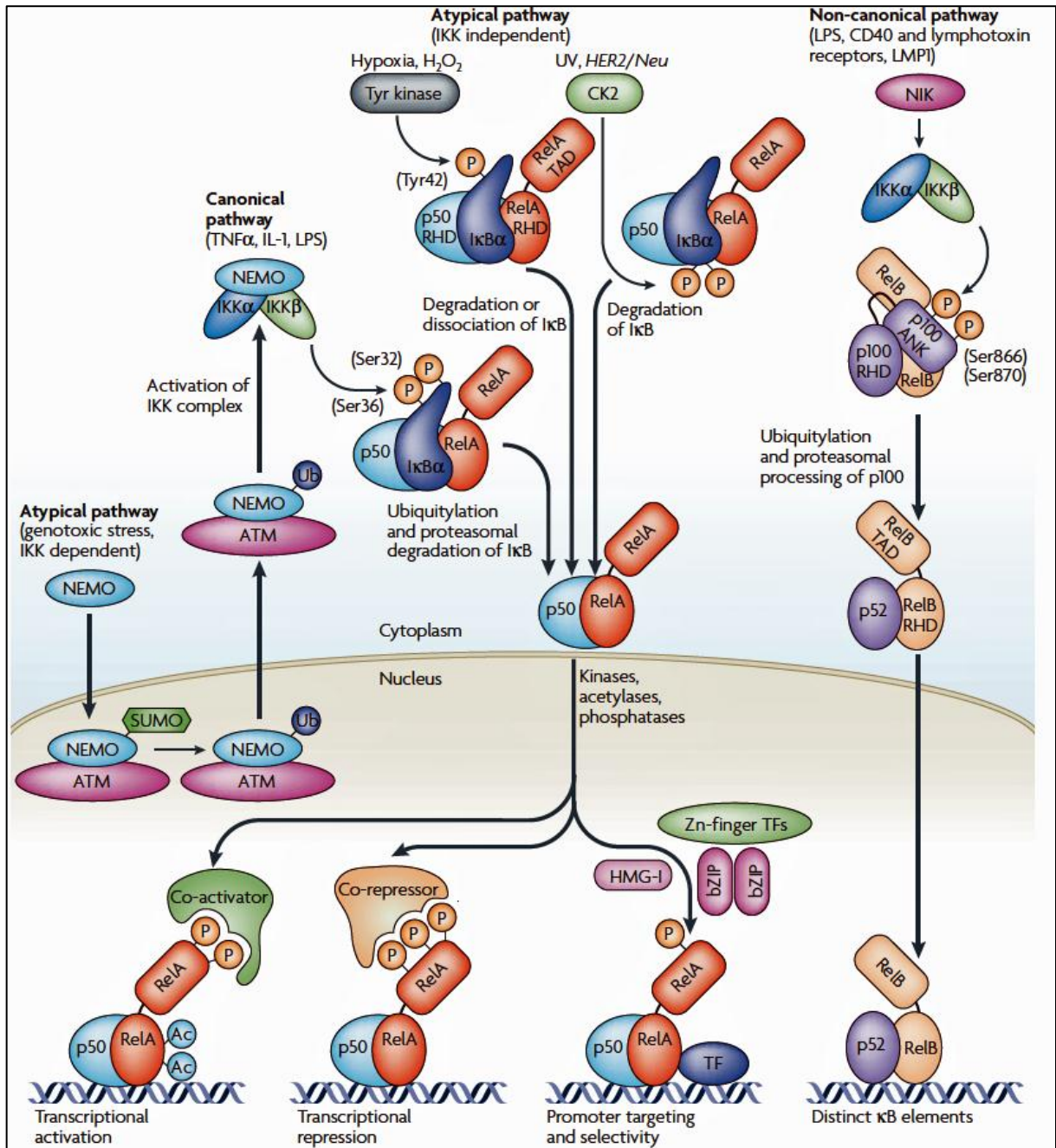
## 1.4 Rolle von NF- $\kappa$ B bei Zelltod- und Überleben

### 1.4.1 Einführung zu NF- $\kappa$ B

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert eine Vielzahl von Genen, die für Zellüberleben und Entzündungsreaktionen zuständig sind. NF- $\kappa$ B liegt als Homo- oder Heterodimer vor, und kann sich variabel aus fünf Untereinheiten zusammensetzen. Diese sind NF- $\kappa$ B1 (p50 und sein Vorläufer p105), NF- $\kappa$ B2 (p52 und sein Vorläufer p100), RelA (p65), RelB und c-Rel [67-69]. Das bekannteste und am meisten erforschte Dimer ist p65:p50. In ruhenden Zellen liegt NF- $\kappa$ B als inaktives Dimer im Zytoplasma vor. Es ist entweder durch die Inhibitoren I $\kappa$ B  $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$  oder dadurch, dass die Vorläuferproteine p105 oder p100 anstatt der aktiven Untereinheiten p50 und p52 vorliegen, inaktiviert. Als Antwort auf zahlreiche Stimuli wie zellulären Stress, Signale des angeborenen oder erworbenen Immunsystems oder andere wird NF- $\kappa$ B in kurzer Zeit durch den klassischen (kanonischen), den alternativen (nicht-kanonischen) oder einen der atypischen Wege aktiviert [67, 69].

Der klassische Weg wird durch Zytokine, Aktivierung des T-Zell-Rezeptors oder bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide aktiviert. Die Kinase IKK (inhibitory  $\kappa$ B kinase), aufgebaut als Heterotrimer aus je einer  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Untereinheit, phosphoryliert das Inhibitorprotein I $\kappa$ B $\alpha$  [69]. I $\kappa$ B $\alpha$  wird daraufhin ubiquitin-abhängig im Proteasom abgebaut, wodurch das zumeist in der p65:p50-Form vorliegende NF- $\kappa$ B freigesetzt wird, in den Zellkern wandert und die NF- $\kappa$ B-Zielgene aktiviert [68, 69].

Der alternative Weg wird nach Aktivierung durch CD40, Lymphotoxin- $\beta$  oder anderen Faktoren besprochen. Durch die Kinase NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) wird IKK $\alpha$  aktiviert, die daraufhin die Vorläuferuntereinheit p100 phosphoryliert. Das p100 wird ubiquitin-abhängig im Proteasom zu p52 prozessiert, das zusammen mit RelB als nun aktives Dimer ebenfalls die Transkription beeinflusst [69, 70]. Obwohl der klassische und der alternative Weg zusammen genommen den Hauptteil der physiologischen Aktivierung von NF- $\kappa$ B ausmachen, werden immer mehr atypische Wege mit alternativen Mechanismen gefunden [71].



**Abbildung 2: NF- $\kappa$ B-Aktivierungswege**

(Perkins et al, 2007, [69])

### 1.4.2 NF- $\kappa$ B bei Zelltod- und Überleben

Da es hunderte verschiedener Aktivatoren gibt, und NF- $\kappa$ B bei Säugetieren in allen Zelltypen gebildet wird, ist es nicht verwunderlich, dass NF- $\kappa$ B je nach Kontext unterschiedliche und sogar konträre Funktionen haben kann [72].

In Bezug auf Zelltod- und Überleben ist NF- $\kappa$ B vor allem für die antiapoptotische Funktion bekannt. Diese positive Wirkung auf das Zellüberleben basiert auf der verstärkten Expression antiapoptotischer Proteine wie c-FLIP, Bcl-2, Bcl-xl, cIAP2, und A1/Bfl-2 [73].

Neuere Erkenntnisse weisen aber auch auf eine proapoptotische Rolle unter bestimmten Voraussetzungen hin [71, 74, 75]. Hierzu zählen unter anderem atypische Wege der Aktivierung, beispielsweise kann RelA (p65) die Bildung antiapoptotischer Proteine wie Bcl-xl nach Aktivierung durch UV-C-Licht oder durch das Chemotherapeutikum Daunorubicin unterdrücken anstatt die Expression zu fördern [71, 76]. Zudem kann NF- $\kappa$ B für die Apoptose über den p53-Weg notwendig sein. Es wurde gezeigt, dass der Verlust oder die Inhibition von NF- $\kappa$ B die p53-induzierte Apoptose aufheben kann [77].

Auch bei T-Zellen kann NF- $\kappa$ B sowohl das Zellüberleben als auch den Zelltod fördern. Allgemein wird NF- $\kappa$ B in T-Zellen bei Bindung des T-Zell-Rezeptors mit gleichzeitigen kostimulatorischen Signalen von CD28 aktiviert. Bei dieser Aktivierung verstärkt NF- $\kappa$ B die Expression der genannten antiapoptotischen Proteine und ist somit wichtig für das Zellüberleben [74, 78]. Zudem beschleunigt es die Proliferation aufgrund der Induktion der Expression von IL-2 und dem Zytokin GM-CSF. Ein weiterer antiapoptotischer Weg läuft über die NF- $\kappa$ B-gesteuerte Suppression von p73. Das mit p53 verwandte p73 ist ein Apoptose-fördernder Faktor, durch die Verminderung kommt es daher zu vermehrtem Zellüberleben [79]. Eine Studie mit Fibroblasten zeigte im Kontrast dazu allerdings auch proapoptotische Effekte bei der Interaktion zwischen NF- $\kappa$ B und p73 nach DNA-Schädigungen [75].

Die apoptotische Wirkung von NF- $\kappa$ B spielt beim *activation-induced cell death* (AICD) eine entscheidende Rolle. Bei dieser Apoptoseform sterben reife T-Zellen bei Aktivierung des T-Zell-Rezeptors ohne gleichzeitige kostimulatorische Signale ab.

NF- $\kappa$ B löst hier durch direkte Aktivierung der Expression des Fas-Liganden (CD95) eine Apoptosekaskade aus [74, 80].

Zusammenfassend besitzt NF- $\kappa$ B eine komplexe Rolle in der Entscheidung über Zellüberleben oder Zelltod, die noch nicht abschließend verstanden ist.

### **1.5 Interleukin-25 (IL-25)**

#### **1.5.1 Einführung zu IL-25**

Interleukin-25 (IL-25), auch IL-17E genannt, gehört zur Interleukin-17-Familie, die aus sechs Mitgliedern (IL-17A bis IL-17E) besteht [81]. Die IL-17-Familie hat insgesamt eine hauptsächlich proinflammatorische Funktion.

IL-25 wird von verschiedensten Zellen ausgeschüttet: aktivierten Th-2-Zellen [82], der Th25/(33)-Zelle (siehe Kap. 1.6), Alveolarmakrophagen [83], aus dem Knochenmark stammenden Mastzellen [84], Eosinophilen und Basophilen nach Stimulation [85], Lungenepithelzellen nach Allergenexposition [86] und weiteren Zellarten [87].

Die genauen Regulationsmechanismen der IL-25-Produktion sind zwar noch unbekannt, es gibt aber einige Hinweise.

Ein Anhaltspunkt ist, dass durch inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 oder IL-6 die IL-25-Expression gesenkt werden kann [88]. Zudem wurde gezeigt, dass Mäuse unter sterilen Bedingungen sowie Mäuse unter antibiotischer Behandlung eine verminderte IL-25-Produktion im Darm aufweisen [87, 89]. Eine weitere Arbeit zeigte, dass virale Infektionen die IL-25-Expression in Lungengewebe induzieren kann [90]. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Signale der Pathogene selber die IL-25-Produktion regulieren können [81].

### 1.5.2 Wirkung des IL-25

Die Wirkung von IL-25 wird über den IL-17RB- und den IL-17RA-Rezeptor vermittelt. Obwohl IL-25 nicht an den IL-17RA-Rezeptor bindet, werden beide Rezeptoren für die IL-25-Aktivität benötigt [91].

Mögliche Zielzellen des Interleukins stammen sowohl aus dem angeborenen als auch aus dem adaptiven Immunsystem. Monozyten [85, 92], NKT- und invariantNKT-(iNKT) Zellen [93, 94] sind einige bekannte Beispiele hierfür. Außerdem wurde gezeigt, dass eine non-B/non-T-Zellpopulation nach IL-25-Stimulation die Th2-typischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 produziert [82]. Eine weitere, neu entdeckte Zellpopulation des angeborenen Immunsystems, die nach einer IL-25-Stimulation ebenfalls die Th2-typischen Zytokine exprimiert, wurde von mehreren Arbeitsgruppen zeitgleich entdeckt und  $MMP^{type2}$  (multipotent progenitor cells type 2) [95], Nuozyten [96] und Ih2 (innate type 2 helper cells) [97] benannt.

Bei den T-Helfer-Zellen fördert IL-25 die Differenzierung naiver T-Helfer-Zellen zu Th2-Zellen und verstärkt die Zytokinproduktion in Effektor- und Gedächtnis-Th2-Zellen [81, 86, 98]. In Th2-Zellen wurde eine hohe Expression der IL-17RB-mRNA nachgewiesen, die nicht in Th1- oder Th17-Zellen gefunden wurde [98]. Eine weitere wichtige Rolle hat IL-25 bei der Th9-Zelle. Die Th9-Zelle zeigt von allen T-Helfer-Zellen die höchste Expression des IL-17-RB-Rezeptors. Differenzierende Zellen reagieren mit einer verstärkten IL-9- und IL-10-Produktion auf eine IL-25-Stimulation [81, 99].

Entsprechend der Verstärkung der Th2-gesteuerten Immunantwort liegt die biologische Wirkung von IL-25 sowohl in der Abwehr von Parasiten, speziell der Helminthen, als auch in der Entwicklung von allergischen Erkrankungen [82, 86]. Beispielsweise induziert IL-25 in mit dem Wurmparasiten *Nippostrongylus brasiliensis* infizierten Mäusen eine Immunantwort zur Eliminierung des Parasiten [100]. Die Rolle in allergischen Erkrankungen ist vor allem bei der Lunge nachgewiesen: So führte Überexpression von IL-25 in Lungenepithelien zur verstärkten Mukussekretion, vermehrter Epithelhyperplasie, Infiltration mit Eosinophilen und Makrophagen und Stimulation der Th2-Zytokinproduktion [81, 86].

Im Gegensatz zur beschriebenen antreibenden Rolle bei allergischen Erkrankungen kann IL-25 auch eine protektive Wirkung haben. Dies ist der Fall bei Th1- und Th17-vermittelten Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Multiple Sklerose. In IL-25-defizienten Mäusen zeigte sich ein schwerer Krankheitsverlauf der EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis), eines Modells der Multiplen Sklerose in der Maus, als in Wildtypmäusen. In einem chronisch verlaufenden EAE-Modell unterdrückte die exogene IL-25-Zufuhr zu verschiedenen Zeitpunkten vollständig die Krankheit [101]. Die protektive Funktion des IL-25 konnte auch bei entzündlichen Darmerkrankungen und bei Diabetes nachgewiesen werden [87, 102, 103].

Insgesamt kann also von einer dualen Wirkung von IL-25 gesprochen werden. Auf der einen Seite steht die Förderung allergischer Erkrankungen durch die verstärkte Immunantwort in Th2-Richtung, auf der anderen Seite die Suppression entzündlicher Erkrankungen, die mit Th1 und Th17 assoziiert sind [87].

### **1.6 Die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle**

Die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle ist eine erst kürzlich entdeckte, vermutlich unabhängige T-Helferzell-Subpopulation.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine Stimulation naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mittels T-Zell-Rezeptoraktivierung und Kostimulation bei gleichzeitiger Blockade des Th1- und Th2-Differenzierungswegs zu einer IL-25-produzierenden T-Helfer-Zelle führt. Dies wurde ‚Default-Stimulation‘ benannt, da außer der reinen T-Zell-Aktivierung nur die Blockade bekannter Differenzierungswege, aber keine weiteren Stimulationsfaktoren für die Differenzierung notwendig sind.

Zusätzlich konnte bei späteren Versuchen, die nach Abschluss der Forschungsarbeit dieser Promotion stattfanden, eine IL-33-Produktion belegt werden. Es wurde nachgewiesen, dass die IL-25/(IL-33)-produzierende Zelle nur die beiden genannten und keine der sonstigen T-Zell-assoziierten Zytokine produziert. Sie kann dadurch von den weiteren bekannten Subtypen (siehe Kap. 1.2) unterschieden werden.

Die Analyse der IL-25/(IL-33)-produzierenden T-Zelle zeigte, dass sie sowohl in Mäusen als auch im Menschen vorkommt. Sie ist fähig, eine Th2- und Th9-Differenzierung zu induzieren, genauso wie die Vermehrung von MMP<sup>type2</sup> (multipotent progenitor cells type 2) zu bewirken. Es konnte belegt werden, dass die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle in Mäusen mit induzierter chronischer Kolitis sowie bei Patienten mit Morbus Crohn im Kolon zu finden ist.

### 1.7 Fragestellung

Die Entdeckung, dass aufgrund der beschriebenen ‚Default-Stimulation‘ ein vermutlich neuer T-Helferzell-Subtyp entsteht, wirft viele grundlegende Fragen auf.

Die erste wichtige Frage ist, ob die entdeckte Zelle wirklich eine neue, eigenständige Subpopulation darstellt oder eine Variante der bekannten Linien ist?

Ein wichtiger Schritt, nämlich die Abgrenzung zu den anderen Subpopulation Th1, Th2, Th9, Th17 und T<sub>reg</sub>, konnte durch das Fehlen der zelllinientypischen Zytokinprofile der genannten Subtypen von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (siehe Promotionsarbeit Ekaterina Noeva, Universität Regensburg).

Ein weiteres wichtiges Distinktionsmerkmal der T-Zelllinien untereinander stellt der jeweils spezifische Transkriptionsfaktor dar, beispielsweise STAT6/GATA3 bei der Th2-Zelle im Gegensatz zu ROR $\gamma$ T bei der Th17-Zelle. Somit ergaben sich die Fragen, ob die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle abhängig von einem der Transkriptionsfaktoren der bekannten Subtypen ist, und konsekutiv, welcher Transkriptionsfaktor für diese Zelle spezifisch ist?

Da T-Zellen allgemein einer komplexen Regulation unterliegen, stellte sich zusätzlich die Frage, welche Einflussfaktoren in Form von Zytokinen oder intrazellulären Faktoren auf die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle einwirken?

IL-21 kann von verschiedenen CD4<sup>+</sup>-Zellen gebildet werden und ist für die Th17-Differenzierung überaus wichtig [104-106] (siehe Kap. 1.2.4). Da IL-21 aufgrund der

## 1 Einleitung

---

steten Expression des IL-21-Rezeptors auf diversen Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems einen weitreichenden Einfluss auf das Immunsystem hat, kam die Frage auf, ob sich auch bei der IL-25/(IL-33)-produzierenden T-Zelle eine Wirkung nachweisen lässt?

Aufgrund der wichtigen Rolle von NF- $\kappa$ B bei Zellüberleben bzw. Zelltod von T-Zellen (siehe Kap. 1.4.2), war eine weitere Vermutung, dass NF- $\kappa$ B auch auf die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle einwirken könnte. Es stellte sich somit die Frage, ob NF- $\kappa$ B einen Einfluss hat, und wenn ja, ob es eher die Apoptose oder das Zellüberleben fördert?

Die beschriebenen Fragestellungen werden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Da zum Zeitpunkt der Versuche die zusätzlich zur IL-25- bestehende IL-33-Bildung der Zelle noch nicht bekannt war, konzentriert sich die Arbeit auf den Einfluss verschiedener Faktoren auf die IL-25-Produktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

## 2 Methoden

### 2.1 Isolation von CD4<sup>+</sup>-Zellen aus der Mäusemilz

Die Milzen wurden den direkt zuvor getöteten Mäusen entnommen und in HBSS gelagert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Milzen wurden mit dem Stempel einer 5ml Spritze zermahlen und die Zellen mit Hilfe von HBSS durch ein 70µm Sieb in einen Falcon gespült. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation mit 1500rpm auf 4°C wurde das entstandene Pellet in 1ml/Milz Erythrozytenlysepuffer (ACK Lysing Puffer) resuspendiert, um die zusammen mit den Lymphozyten gewonnenen Erythrozyten zu lysieren. Nach drei Minuten Inkubationszeit wurde nach Zugabe von 10ml HBSS erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, das Pellet wieder in HBSS aufgenommen und wiederum durch ein Sieb gegeben.

Die Zählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. 10µl einer 1:2 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau wurden in die Zählkammer gegeben und vier Quadranten ausgewertet.

Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet in 4µl MACS-Puffer/1 Mio. Zellen plus 1µl CD4-Cocktail/1 Mio. Zellen aufgenommen und 10 Minuten bei 4°C inkubiert, wodurch alle Zelltypen außer CD4<sup>+</sup>-Zellen mit dem Antikörpergemisch konjugiert wurden. Um die Nicht-CD4<sup>+</sup>-Zellen magnetisch zu markieren wurden als nächster Schritt 3µl MACS-Puffer/1 Mio. Zellen sowie 2µl Anti-Biotin Beads/1 Mio. Zellen zugegeben. Die magnetisch wirkenden Beads binden hierbei an die mit Antikörper besetzten Zellen. Die Suspension wurde 15 Minuten bei 4°C inkubiert, anschließend in MACS-Puffer aufgenommen und zentrifugiert.

Das Prinzip des *Magnetic activated cell sorting* (MACS) ist die Trennung der durch Biotin Beads markierten Zellen von nichtmarkierten Zellen, indem die markierten Zellen durch ein starkes magnetisches Feld am Durchlaufen einer Säule gehindert

werden. Hier handelt es sich um eine Positivselektion der nichtmarkierten Zellen, da die gewünschten CD4<sup>+</sup>-Zellen ungehindert durch die Säule laufen.

Die Zell-Antikörper-Suspension wurde erneut durch ein Sieb gegeben, auf die MACS Separation Column pipettiert und anschließend dreifach gespült, um die nichtmarkierten Zellen auszuwaschen.

Die erhaltenen CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen, in mit Penicillin/Streptomycin, Mercaptoethanol und FCS (fetal calf serum) versetztes RPMI-Medium gegeben und erneut in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

### **2.2 Kultur und Stimulation der naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen**

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die gewonnenen naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden je nach Versuchsanordnung in 6- oder 24-Well-Platten stimuliert. Die Platten waren mindestens 12 Stunden vor Versuchsbeginn mit Anti-Mouse-CD3, das zur T-Zell-Aktivierung benötigt wird, gecoatet und bei 4°C gelagert worden. Sie wurden nun zweifach mit PBS gespült und anschließend die Zellen zugegeben. In eine 6-Well-Platte wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen pro Well gegeben, bei einer 24-Well-Platte 3,5x10<sup>5</sup> Zellen pro Well.

Anschließend wurden je nach gewünschter Stimulation die in folgender Tabelle angegebenen Antikörper dazugegeben und die Platte für vier Tage in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Zelltyp	Antikörper	Endkonzentration
<b>Th0 / basic</b>	$\alpha$ -CD3	10 $\mu$ g/ml
	$\alpha$ -CD28	2 $\mu$ g/ml
<b>Th2</b>	$\alpha$ -CD3	10 $\mu$ g/ml
	$\alpha$ -CD28	2 $\mu$ g/ml
	IL-4	10ng/ml
	$\alpha$ -INF $\chi$	10 $\mu$ g/ml
	$\alpha$ -IL-12	10 $\mu$ g/ml
<b>Th9</b>	$\alpha$ -CD3	10 $\mu$ g/ml
	$\alpha$ -CD28	2 $\mu$ g/ml
	IL-4	10ng/ml
	TGF- $\beta$	5ng/ml
<b>Th17</b>	$\alpha$ -CD3	10 $\mu$ g/ml
	$\alpha$ -CD28	2 $\mu$ g/ml
	IL-6	20ng/ml
	TGF- $\beta$	5ng/ml
	$\alpha$ -IL-4	10 $\mu$ g/ml
	$\alpha$ -INF $\chi$	10 $\mu$ g/ml
<b>Th25/(33) (IL-25/(IL-33)- produzierende T-Zelle)</b>	$\alpha$ -CD3	10 $\mu$ g/ml
	$\alpha$ -CD28	2 $\mu$ g/ml
	$\alpha$ -IL-4	10 $\mu$ g/ml
	$\alpha$ -INF $\chi$	10 $\mu$ g/ml
	$\alpha$ -IL-12	10 $\mu$ g/ml

Zusätzlich wurden bei den Versuchen zum Einfluss von IL-21 auf die IL-25-Produktion der Hälfte der Wells 10ng/ml IL-21 zugegeben, bei den Versuchen zur NF- $\kappa$ B-Inhibition verschiedene Konzentrationen (100nM-10 $\mu$ M) des NF- $\kappa$ B-Inhibitors Bay 11-7082.

## **2.3 Western Blot**

### **2.3.1 Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration**

Um die in den Zellen vorliegenden Proteine zu extrahieren, wurde vier Tage nach der Aussaat unter sterilen Bedingungen das Medium abgesaugt und die Wells mehrfach mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zugabe von PBS wurden die Zellen abgekratzt und mit 2500rpm 8 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Um die Zellen zu lysieren, gleichzeitig aber die zytosolischen Proteine zu konservieren, wurde eine Mischung aus 100µl RIPA-Puffer, 1µl Phosphataseinhibitor und 1µl Proteinaseinhibitor hergestellt und je nach Pelletgröße zwischen 20 und 80µl der Mischung zugegeben. Die Zellen wurden 30 Minuten lang inkubiert, wobei alle 2 Minuten kurz gevortext wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 14.000rpm für 15 Minuten bei 4°C, wodurch der Zellschrott der lysierten Zellen von den freien Proteinen getrennt wurde. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Cups pipettiert, das aus dem Zellschrott entstandene Pellet verworfen.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BC Assay Protein Quantitation Kit. Hierzu wurden wenige Mikroliter der jeweiligen Proben 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt. In einer 96-Well-Platte erfolgte ein Doppelansatz aus je 9µl der verdünnten Proben zusammen mit 200µl der Mischung der zwei Reaktionslösungen A und B, sowie ein Doppelansatz eines Albuminstandards in verschiedenen Konzentrationen, um die Genauigkeit der Messung zu gewährleisten. Die Proben wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit einem Photometer bei 540nm analysiert. Mit Hilfe des Programms ‚Softmax‘ konnte aus der Standardkurve und den Mittelwerten der Proben die jeweilige Proteinkonzentration in den Proben bestimmt werden.

### **2.3.2 Nachweis von IL-25 und $\beta$ -actin mittels Western Blot**

Um die gewonnen Proteine auf das Vorhandensein von IL-25 zu untersuchen wurden Western Blots durchgeführt. Anhand der Immundetektion wurde dadurch auf IL-25

sowie zum Vergleich auf  $\beta$ -actin getestet.  $\beta$ -actin stellt ein konstitutiv in allen eukaryontischen Zellen gebildetes Protein dar und dient damit der Vergleichbarkeit der Proben.

Zunächst erfolgte die Proteinauftrennung durch Gel-Elektrophorese mittels eines diskontinuierlichen SDS-PAGE. Bei diesem Verfahren wird über einem Polyacrylamid-Gel ein elektrisches Feld erzeugt. Die aufgetragenen Proteine wandern hierin aufgrund von Größenunterschieden mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Netzstruktur des Polyacrylamids bewirkt, dass große Proteine zurückgehalten werden, während kleine Proteine das Gel schneller durchlaufen können. Durch die Zugabe von SDS wird die ursprüngliche Ladung der Proteine überdeckt, so dass alle Proteine eine ähnliche negative Ladung vorweisen, somit die gleichen elektrischen Kräfte in Richtung der Anode wirken und die Auftrennung allein anhand der Größe erfolgt.

Das diskontinuierliche System besteht aus einem Sammelgel, auf dem die Proteine zunächst aufkonzentriert werden, und einem Trenngel, in dem die eigentliche Trennung nach der Molekülgröße erfolgt.

Für die Gel-Elektrophorese wurde zunächst das Trenngel hergestellt und in die Laufkammer pipettiert. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Sammelgel hergestellt, auf das Trenngel pipettiert und mit Hilfe eines Kamms die Probenaschen geformt.

Von den Proben wurden jeweils 20ng Protein mit 5% SDS im Verhältnis 4:1 versetzt und 10 Minuten auf 95°C inkubiert. Durch die Hitzeeinwirkung werden die Proteine denaturiert und somit die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgebrochen. Gleichzeitig erfolgt durch das SDS die Aufhebung der Ladungsunterschiede.

Die Proben sowie der Proteinstandard V wurden auf das Sammelgel aufgetragen und das Gel dann in einer Western Blot-Kammer, die mit Laufpuffer gefüllt war, eingespannt. Anfangs erfolgte die Anreicherung der Proteine im Sammelgel durch Anlegen einer Spannung von 70 Volt, bei Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 140 Volt erhöht. Nach circa einer Stunde konnte durch visuelle

Beurteilung des Proteinmarkers die Elektrophorese beendet werden und das eigentliche Blotting erfolgen.

Beim Western Blot an sich wird das Gel einem senkrecht gerichteten elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch die aufgetrennten Proteine Richtung Anode auf eine Membran wandern.

Auf der Blotting-Maschine wurden in Transferpuffer getauchtes Whatman-Papier, die Membran und das Gel aufeinander geschichtet und 45 Minuten bei 0,15 Ampere geblottet. Anschließend wurde die Membran eine Stunde lang mit 5% Trockenmilch auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dann wurde der gewünschte Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreifach 10 Minuten lang mit TBS-Puffer gewaschen, der Sekundärantikörper dazugegeben und für eine Stunde inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Primärantikörper und dient der Chemolumineszenz. Bei diesem Verfahren ist ein Enzym an den Sekundärantikörper gebunden. Das Enzym kann ein bei der Entwicklung zugesetztes Substrat umsetzen, welches daraufhin detektiert werden kann.

Bei unseren Versuchen wurden im ersten Schritt 8µg des monoklonalen mIL-17E-Rat-IgG-Antikörpers in 8ml 5% Trockenmilch zugegeben, als Sekundärantikörper wurden 8µl Goat- $\alpha$ -Rat-HRP in 8ml Trockenmilch verwendet.

Nach erneutem Waschen, minimal vierfach 10 Minuten lang mit TBS-Puffer, konnte die Membran entwickelt werden. Hierzu wurde das Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit verwendet. Jeweils 500µl der zwei Komponenten des Kits wurden in einem 1:1 Verhältnis gemischt und eine Minute auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einer Dunkelkammer auf Röntgenpapier abgelichtet und sofort im Blot-Entwickler M35 X-Omat von Kodak entwickelt. Die Belichtungszeit war hierbei von der Stärke des Signals abhängig und betrug in den Versuchen zwischen 10 Sekunden und 3 Minuten. Die Stärke des Signals nach Entwicklung der Membran ist proportional zur gebundenen

Primärantikörpermenge und somit proportional zur Menge des vorhandenen Antigens.

Um weitere Färbungen durchführen zu können, müssen die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden, dies erfolgt durch das Stripping. Wir verwendeten die ReBlot Plus Mild Stripping Solution. 1ml der Stripping Solution wurde mit 9ml Millipore für 10 Minuten auf der Membran inkubiert und anschließend zweifach mit 5% Trockenmilch gewaschen.

Nach dem Strippen der Membran wurde sie über Nacht mit dem  $\beta$ -actin-Primärantikörper (Actin Goat Antibody) inkubiert. Das Verfahren am Folgetag entspricht dem Protokoll der ersten Färbung. Als  $\beta$ -actin-Sekundärantikörper verwendeten wir einen Donkey- $\alpha$ -goat-HRS Antikörper. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit der ECL-Entwicklungslösung.

Da Aktin in allen eukaryontischen Zellen reichlich gefunden wird, dient es zur Kontrolle ob jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden sowie ob das Blotting Verfahren an sich erfolgreich war.

## **2.4 Durchflusszytometrie (FACS)**

### **2.4.1 Nachweis von CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup>-Zellen mittels Durchflusszytometrie**

#### **2.4.1.1 Färbung**

Die für vier Tage inkubierten Zellen wurden mit 50ng/ml PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetat) und 500ng/ml Ionomycin sowie 1 $\mu$ g/ml Brefeldin A versetzt und für weitere vier Stunden bei 37°C inkubiert. Dies dient der unspezifischen Zellaktivierung sowie der Blockade intrazellulärer Transportprozesse. Anschließend wurden die Zellen abgekratzt, in FACS-Röhrchen gegeben und mit 1500rpm 5 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert.

Da die FACS-Färbungen lichtempfindlich sind, erfolgten alle Schritte zur Färbung unter Lichtabschluss. Zuerst erfolgte die Färbung auf CD4. Das Pellet wurde hierbei

durch Vortexen gelöst, 1µl des Anti-Mouse CD4-PE-Cy7 sowie 500µl MACS-Puffer zugegeben, für 20 Minuten inkubiert und dann zentrifugiert.

Um zusätzlich intrazelluläre Färbungen zu ermöglichen, wurde anschließend der Cytofix Fixation Buffer zur Fixierung der Zellen sowie der Phosflow Perm Buffer zur Permeabilisierung verwendet. Das entstandene Pellet wurde zunächst in 250µl Fixation Buffer gelöst und 20 Minuten unter mehrmaligem Vortexen bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation und Waschen mit 500µl Stain Buffer wurde das Pellet gevortext, 500µl Perm Buffer zugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Stain Buffer erfolgte die intrazelluläre Färbung mit Anti-Interleukin-17E (IL-25)PE. Hierfür wurden 10µl des Anti-IL-17E zugegeben und für 20 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Stain Buffer konnten die Zellen vermessen werden.

### **2.4.1.2 Fluoreszenzmessung von CD4 und IL-25**

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Analyse der markierten Zellen mittels Laser. Die Zellen passieren einzeln den Messbereich, aus der Streuung des Laserlichts können verschiedene Zelleigenschaften unterschieden werden. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter=FSC) ist ein Maß für das Zellvolumen, das Seitwärtsstreulicht (side scatter=SSC) gibt Auskunft über die Zellgranularität. Zudem können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden.

Die Zellen wurden in einem FACS Canto II Flow Cytometer gemessen, mit der FACS Diva Software 6.0 analysiert und mit der FlowJo Software (TreeStar) ausgewertet. In unseren Versuchen wurden jeweils etwa 100.000 Zellen vermessen. Anhand von FSC und SSC wurden zunächst Zellaggregate ausgeschlossen und die vitale Lymphozytenpopulation erfasst. Durch die Intensität des Fluoreszenzsignals der CD4-PE-Cy7- und Anti-IL-17E-Färbungen konnten die gesuchten CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup>-Zellen selektiert werden.

### **2.4.2 Toxizitätsassay bei verschiedenen Konzentrationen des NF- $\kappa$ B-Inhibitors Bay 11-7082**

Der NF- $\kappa$ B-Inhibitor Bay 11-7082 wirkt in höheren Konzentrationen zelltoxisch. Um den Grenzwert für unsere Versuche herauszufinden, führten wir einen Assay mit Zugabe verschiedener Konzentrationen (100nM-10 $\mu$ M) des Inhibitors zu den nach Protokoll in Th0-Richtung stimulierten Zellen durch. Zur Messung der Toxizität wurde die 7-AAD Viability Staining Solution verwendet, die abgestorbene Zellen markiert. Vitale Zellen reichern sich dabei kaum mit dem Farbstoff an, da die Zellmembran deutlich weniger permeabel als bei abgestorbenen Zellen ist.

Die inkubierten Zellen wurden zunächst mit 50ng/ml PMA, 500ng/ml Ionomycin und 1 $\mu$ g/ml Brefeldin A versetzt. Das nach Lösen der Zellen entstandene Pellet wurde in 50 $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert, 10 $\mu$ l der 7-AAD Viability Staining Solution zugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 500 $\mu$ l MACS-Puffer erneut zentrifugiert, das Pellet in 500 $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen und konnte nun im FACS ausgewertet werden. Es wurden wiederum Zellaggregate ausgeschlossen und die Stärke der Fluoreszenzfärbung gemessen.

## 2.5 Material

### 2.5.1 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Blot-Entwickler M35 X-Omat Processor	Kodak, Stuttgart
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau
Chemikalienmischer Automixer II Plus	Kodak, Stuttgart
FACS Canto II flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Fastblot B34	Biometra, Göttingen
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop Leitz DM IL	Leica, Solms
Schüttler HS250	Janke&Kunkel (IKA-Gruppe), Staufen
Spannungsgeber Power Pac 300	Bio-Rad, München
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 1	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad SW20C	Julabo, Seelbach
X-Ray Kassette 13x18	Kisker, Steinfurt
Zählkammer Neubauer improved	Schubert und Weiss, München
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

### 2.5.2 Puffer und Zellkulturmedien

DMEM Glutamax	Gibco, Paisley, UK
HBSS (Hank's balanced salt solution)	PAA, Pasching, Österreich
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich, Steinheim
RPMI 1640	Gibco, Paisley, UK

### 2.5.3 Selbst hergestellte Gele und Puffer

<b>TBS (10x) (pH 7,5)</b>	0,5M Tris-Base 1,5M NaCl Aqua destilliert (auf 1l)	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
<b>TBST / TTBS</b>	TBS (1x) 0,1% Tween 20	Sigma, Steinheim
<b>RIPA-Puffer</b>	PBS 1% NP40 Alternative 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
<b>SDS-Sample-Puffer</b>	Aqua dest. 0,5M Tris-HCl (pH 6,8) Glycerol 10% (w/v) SDS $\beta$ -Mercaptoethanol 0,05 (w/v) Bromphenolblau	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
<b>Transferpuffer (pH 8,3)</b>	Aqua dest. 25mM Tris Base 192mM Glycerin 20% Methanol	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
<b>Laufpuffer</b>	1,92M Glycerin 0,5M Tris-Base 1% SDS	

<b>MACS-Puffer</b>	PBS	Merck, Darmstadt Biomol, Hamburg
	0,74g EDTA	
	5g BSA	

	<b>Trenngel (12%)</b>	<b>Sammelgel</b>
Aqua dest.	3,5 ml	6,1 ml
Tris-Base	2,5 ml von 1,5M Tris-Base (pH 8,8)	2,5 ml 0,5M Tris-Base (pH 6,8)
10% SDS	0,1 ml	0,1ml
30% Bis-Acrylamid	4 ml	1,3 ml
APS (Ammonium- peroxodisulfat)	0,1ml	0,08 ml
Temed	5 µl	5 µl

### 2.5.4 Chemikalien und Kits

7-AAD Viability Staining Solution	BioLegend, San Diego, USA
ACK Lysing Buffer	Gibco, Darmstadt
Albumin Standard	Thermo Scientific, Marietta, USA
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck, Darmstadt
Bay 11-7082 (NF-κB Activation Inhibitor)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
BC Assay Protein Quantitation Kit	Uptima, Montlucon, Frankreich
Bis-Acrylamid	Merck, Darmstadt
Brefeldin A Solution	BD Biosciences, Heidelberg
BSA (Albumin bovine serum)	Biomol, Hamburg
CD4 <sup>+</sup> T-Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

## 2 Methoden

---

Cytofix Fixation Buffer	BD Biosciences, Heidelberg
DEPC Wasser	Ambion, Foster City, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL Detection Reagents	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
EDTA 500mM	Merck, Darmstadt
Ethanol 75%	Merck, Darmstadt
FCS (Fetal calf serum)	Biochrom, Berlin
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, UK
Phosflow Perm Buffer III	BD Biosciences, Heidelberg
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Darmstadt
PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Darmstadt
ReBlot Plus Mild Stripping Solution	Millipore, Billerica, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Stain Buffer	BD Biosciences, Heidelberg
SuperSignal West Femto Chemiluminescent	Substrate Thermo Scientific, Rockford, USA
Temed	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tryptanblau 0,5%	Biochrom, Berlin
Tween 20 BioChemica	AppliChem, St. Louis, USA

### 2.5.5 Verbrauchsmaterialien

1,5ml Eppendorfgefäße	Corning, Kaiserslautern
2,0ml Eppendorfgefäße	Corning, Kaiserslautern
6-Well-Platte	Corning, Kaiserslautern
24-Well-Platte	Corning, Kaiserslautern

## 2 Methoden

---

96-Well-Platte	Corning, Kaiserslautern
Cell Lifter	Corning, Kaiserslautern
Cell Scraper 25mm	TPP, St. Louis, USA
Cell Strainer Sieb 70µm	BD Falcon, San Jose, USA
Einmalspritze 1ml/5ml Plastipak	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Tubes	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
MACS Separation Column 25LS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
PP Röhrchen 15ml (Falcon)	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
PP Röhrchen 50ml (Falcon)	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Protran Nitrocellulose Membran 0,45µm	Whatman, Maidstone, UK

### 2.5.6 Antikörper

Actin (C11) Goat Antibody	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Alexa Fluor 647 Mouse anti-NF-κB p65	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Interleukin-17E(IL25) PE Rat	US Biological, San Diego, USA
Anti-Mouse CD4-PE-Cy7	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Mouse CD28	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Mouse IFN $\chi$	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Mouse IL4	eBioscience, San Diego, USA
Anti-Mouse IL12	eBioscience, San Diego, USA
Donkey-Anti-Goat-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Goat-Anti-Rat-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Mouse IL-6 Recombinant Protein	eBioscience, San Diego, USA
Mouse IL-21 Recombinant Protein	eBioscience, San Diego, USA

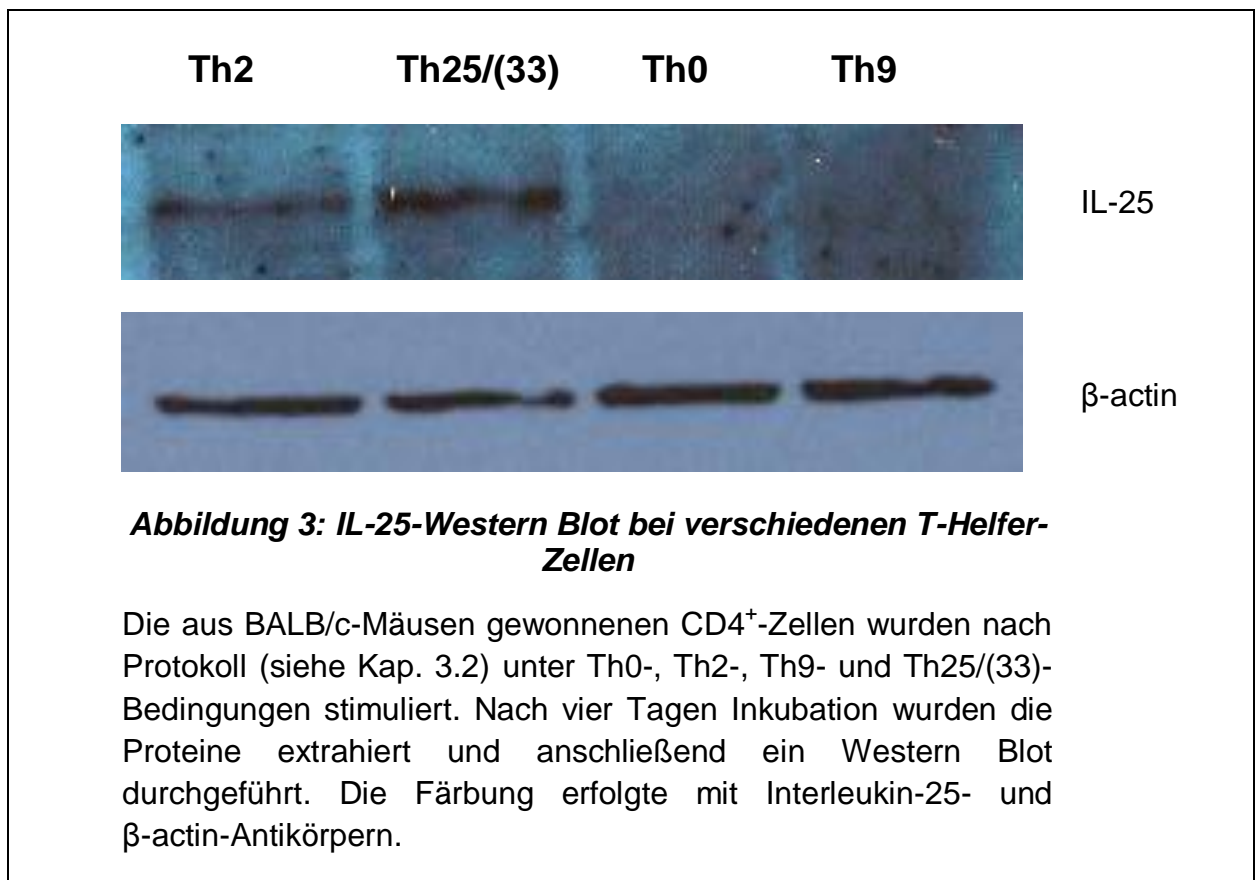
Mouse IL17E/IL25-Antibody Rat IgG2B	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
Purified Hamster Anti-Mouse CD3e	BD Biosciences, Heidelberg
Recombinant Mouse IL-4	eBioscience, San Diego, USA
Recombinant TGF- $\beta$ 1	PreproTech, Hamburg

### 2.5.7 Versuchstiere

BALB/c Maus	Charles River, Sulzfeld
C57Bl/6 Maus	Charles River, Sulzfeld
Rorc KO Maus (B6.129P2(Cg)-Rorc <sup>tm2<sup>Litt</sup>/J</sup> )	Jackson Laboratory, Maine, USA
STAT6 KO Maus (C.129S2-Stat6 <sup>tm1<sup>Gru</sup>/J</sup> )	Jackson Laboratory, Maine, USA
T-bet KO Maus (C.129S6-TBbx <sup>21 tm1<sup>Glm</sup> N10</sup> )	Taconic, Hudson, USA

### 3 Ergebnisse

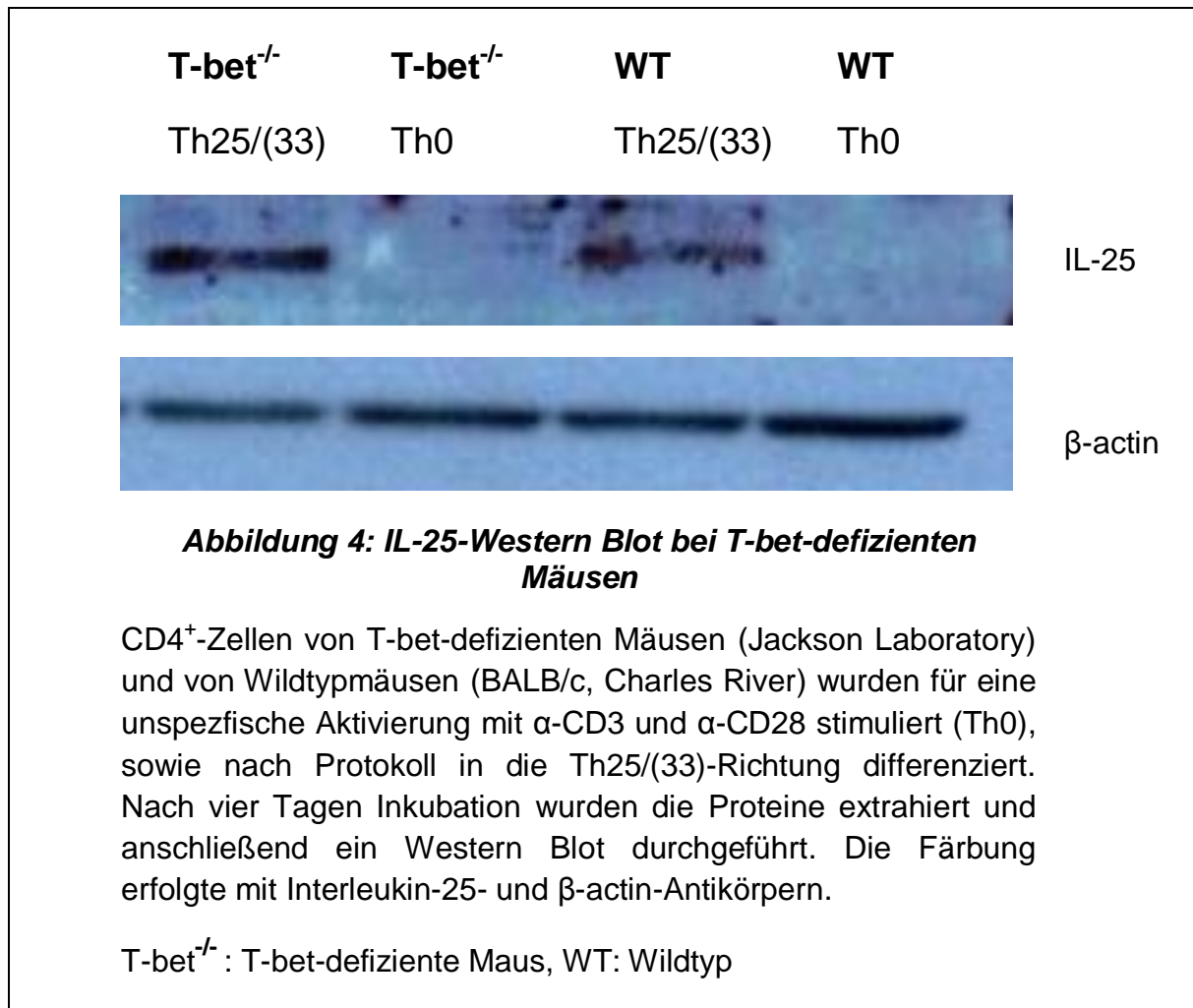
#### 3.1 Nachweis der IL-25-Produktion bei Th2- und Th25/(33)-Zellen



Als Grundlage für die Versuche wurde zunächst bei verschiedenen T-Helferzell-Populationen mittels Western Blot untersucht, ob eine IL-25-Bildung nachweisbar ist. Anhand obiger Abbildung wird deutlich, dass wie erwartet sowohl die Th2-Zellen als auch die Th25/(33)-Zellen eine deutliche IL-25-Produktion aufweisen, während bei der Th0- und Th9-Population keine IL-25-Bildung stattfindet. Die in Th1-Richtung stimulierten Zellen ergaben eine ungenügende Menge an Protein, um die Vergleichbarkeit mit den anderen Proben zu gewährleisten, weswegen auf das

Blotting dieser Probe verzichtet wurde. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass IL-25 nicht von Th1-Zellen gebildet wird [81].

### 3.2 Vergleich der IL-25-Produktion bei Wildtyp- und T-bet-defizienten Mäusen



Eine zentrale Fragestellung der Arbeit war, die Abhängigkeit der Th25/(33)-Zelle in Bezug auf die spezifischen Transkriptionsfaktoren der bekannten Subtypen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden CD4<sup>+</sup>-Zellen verschiedener spezieller Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen genommen, in Th0- und Th25/(33)-

### 3 Ergebnisse

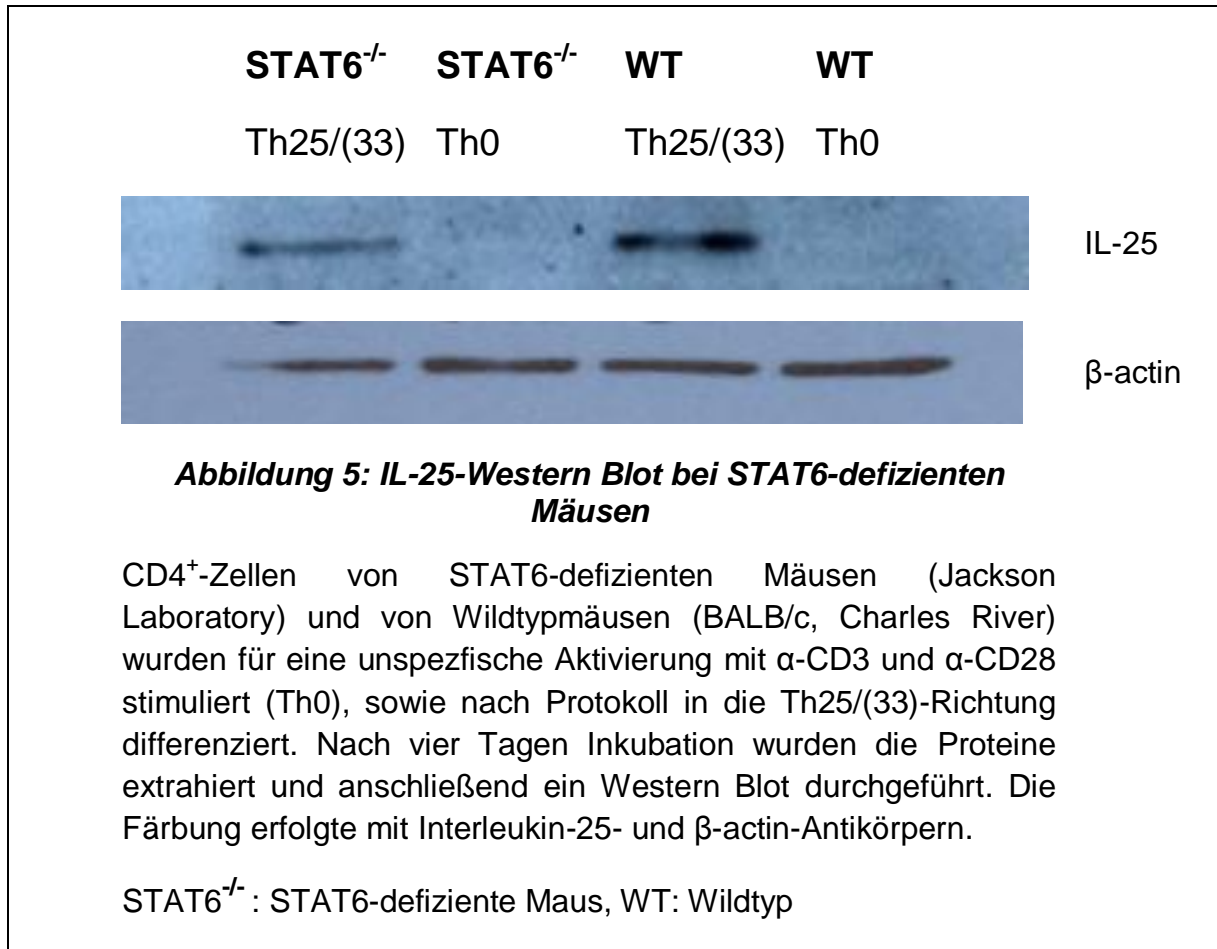
---

Richtung stimuliert und mittels Western Blot auf das Vorhandensein von IL-25 in den Proben getestet. Der Nachweis einer IL-25-Expression zeigt somit die Unabhängigkeit von dem jeweiligen Transkriptionsfaktor.

T-bet stellt einen der Schlüsseltranskriptionsfaktoren der Th1-Zelle dar (siehe Kap. 1.3.1). Es zeigt sich in der obigen Abbildung, dass sowohl bei den CD4<sup>+</sup>-Zellen der T-bet-defizienten Maus als auch bei denen der Wildtypmaus eine IL-25-Produktion nach Stimulation in die Th25/(33)-Richtung stattfindet.

Bei den Th0-Proben wurde sowohl bei der T-bet<sup>-/-</sup>-Probe als auch bei der Wildtypprobe wie erwartet keine IL-25-Bildung beobachtet.

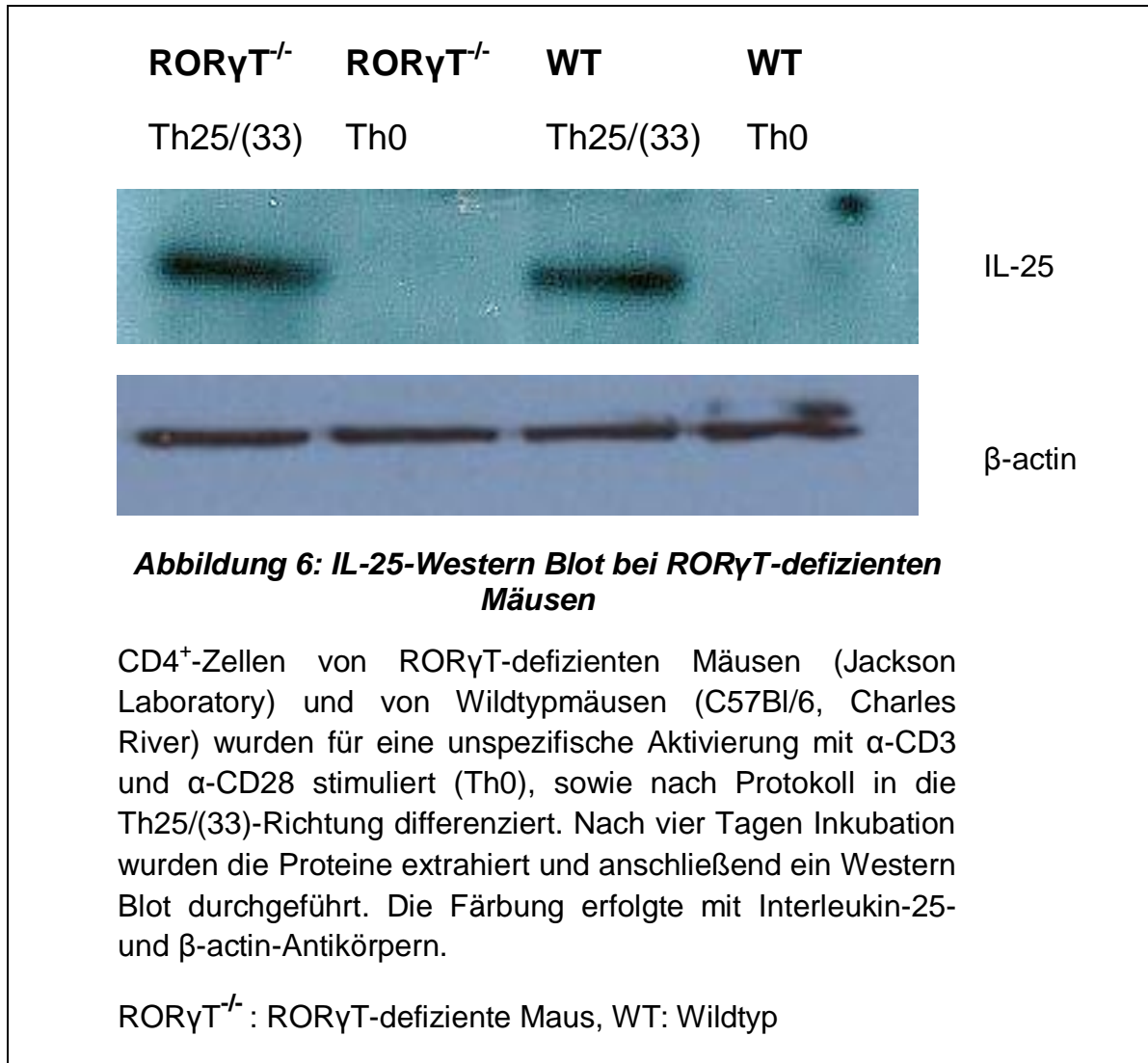
### 3.3 Vergleich der IL-25-Produktion bei Wildtyp- und STAT6-defizienten Mäusen



STAT6 stellt einen spezifischen Transkriptionsfaktor der Th2-Richtung dar (siehe Kap. 1.3.2). Um der Frage nachzugehen, ob die Th25/(33)-Zelle von diesem Faktor abhängig ist, wurde wiederum ein Western Blot mit IL-25- und β-actin-Färbung durchgeführt.

Es zeigt sich, dass bei STAT6-defizienten Mäusen die IL-25-Bildung nach Stimulation in die Th25/(33)-Richtung unverändert stattfindet. Wie erwartet zeigte sich auch bei der Wildtypmaus unter Th25/(33)-Stimulation eine IL-25-Produktion. Die Th0-Zellen zeigen in beiden Proben keine IL-25-Bildung.

### 3.4 Vergleich der IL-25-Produktion bei Wildtyp- und ROR $\gamma$ T-defizienten Mäusen

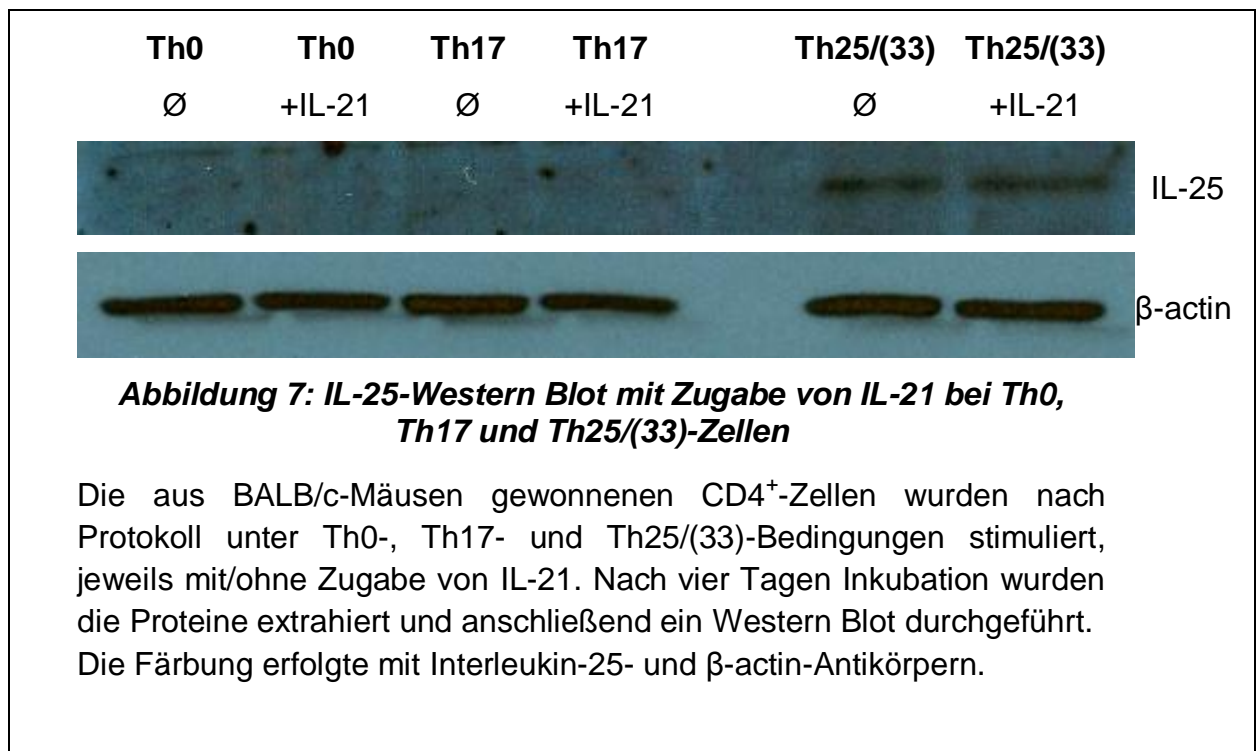


Entsprechend den vorherigen Versuchen wurde in diesem Versuch der Einfluss eines weiteren Schlüsseltranskriptionsfaktors auf die IL-25-Produktion untersucht, hier ROR $\gamma$ T als Faktor der Th17-Differenzierung (siehe Kap. 1.3.3).

Die Abbildung zeigt, dass bei ROR $\gamma$ T-defizienten Mäusen nach Stimulation in die Th25/(33)-Richtung IL-25 gebildet werden kann. Die Kontrollgruppe zeigt ebenfalls

eine IL-25-Produktion. Unter Th0-Stimulationsbedingungen produzierte wiederum keine der beiden Maustypen IL-25.

#### 3.5 Einfluss von IL-21 auf die IL-25-Produktion



IL-21 spielt in der Differenzierung von Th17-Zellen eine wichtige Rolle (siehe Kap. 1.2.4) und beeinflusst viele Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems. Um herauszufinden, ob IL-21 auch auf die Th25/(33)-Zelle Einfluss nimmt, wurden CD4<sup>+</sup>-Zellen in Th0-, Th17- und Th25/(33)-Richtung stimuliert mit bzw. ohne Zugabe von IL-21 zu je einer Probe.

Man erkennt in obiger Abbildung, dass nur die Th25/(33)-Zellen eine IL-25-Produktion aufweisen, bei Th0 und Th17 sind keine entsprechenden Banden sichtbar.

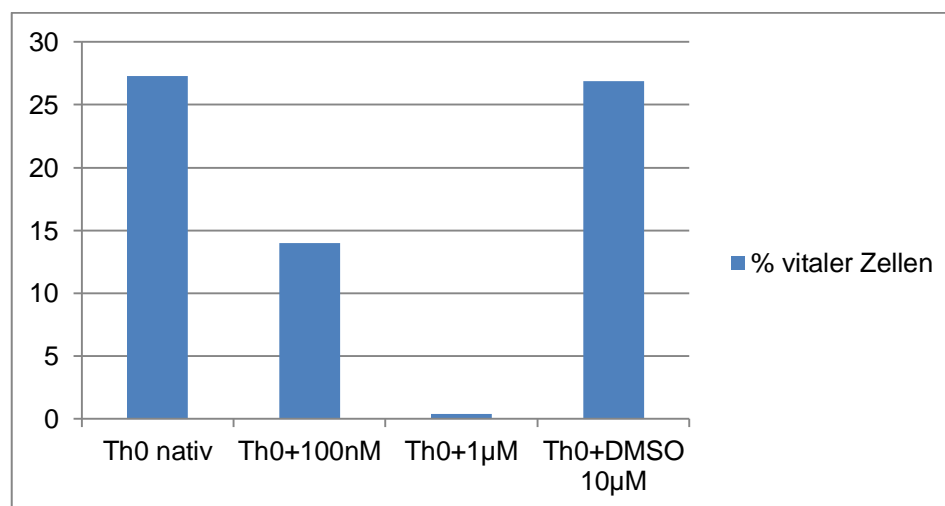
Die IL-25-Bande der Th25/(33)-Probe mit Zugabe von IL-21 unterscheidet sich dabei nicht wesentlich in der Intensität von der Probe ohne IL-21-Zugabe.

### 3.6 Wirkung der NF- $\kappa$ B-Inhibition auf die IL-25-Produktion bei Th0- und Th25/(33)-Zellen

#### 3.6.1 Toxizitätsassay bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen an Th0-Zellen

Da der NF- $\kappa$ B-Inhibitor Bay 11-7082 ab einer Grenzschwelle zelltoxisch wirkt, wurde zunächst diese Grenze anhand eines Toxizitätsassays mit Th0-Zellen bestimmt. Bei den mit  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-stimulierten Proben wurden 100nM, 1 $\mu$ M und 10 $\mu$ M des Inhibitors zugegeben, sowie Proben mit 1 $\mu$ M und 10 $\mu$ M DMSO, der Trägersubstanz des Inhibitors, angesetzt. Abgestorbene Zellen reichern sich aufgrund der erhöhten Zellwandpermeabilität im Gegensatz zu vitalen Zellen vermehrt mit der 7-AAD Viability Staining Solution an und können so detektiert werden. Die Proben wurden im FACS Canto Flow II ausgewertet.

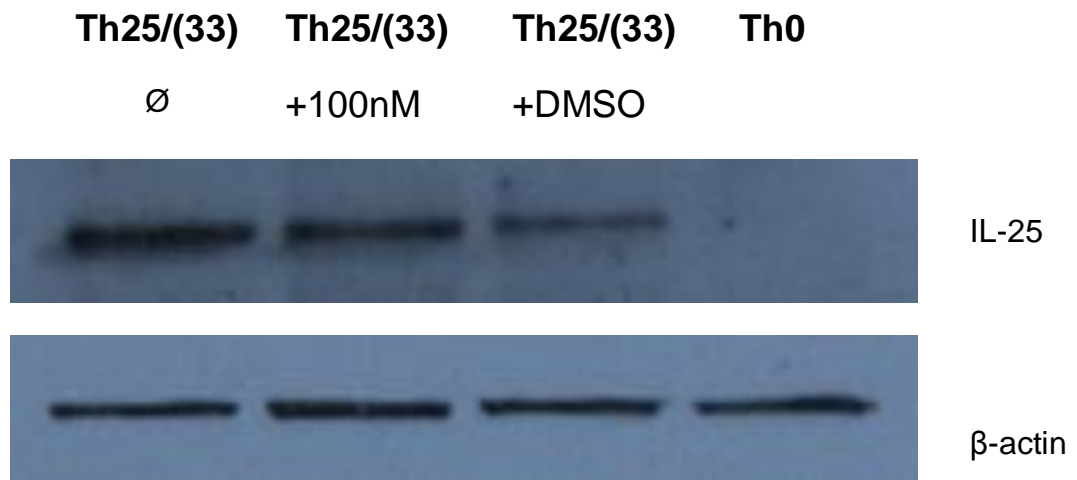
In Abbildung 8 wird ersichtlich, dass schon bei Zugabe von 100nM Inhibitor vermehrt Zellen absterben und dass bei 1 $\mu$ M Inhibitor fast keine vitalen Zellen mehr vorhanden sind. Die Probe mit 10 $\mu$ M Inhibitor konnte nicht ausgewertet werden, da zu wenige Zellen für eine ausreichende Messung überlebt hatten. DMSO an sich hat keine Auswirkung auf die Zellvitalität.



**Abbildung 8: Prozent vitaler Th0-Zellen bei Zugabe verschiedener Konzentrationen des NF- $\kappa$ B-Inhibitors**

### 3.6.2 IL-25-Expression bei Inhibition von NF- $\kappa$ B

#### 3.6.2.1 IL-25-Expression bei 100nM NF- $\kappa$ B-Inhibitor im Western Blot



**Abbildung 9: IL-25-Western Blot mit 100nM NF- $\kappa$ B-Inhibitor**

CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden nativ (ohne Zugabe des NF- $\kappa$ B-Inhibitor Bay 11-7082), mit 100nM des Inhibitors und mit 100nM DMSO, der Trägersubstanz des NF- $\kappa$ B-Inhibitors, in die Th25/(33)-Richtung sowie eine native Probe in die Th0-Richtung stimuliert. Nach vier Tagen Inkubation wurden die Proteine extrahiert und anschließend ein Western Blot durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit Interleukin-25- und  $\beta$ -actin-Antikörpern.

Da der Faktor NF- $\kappa$ B sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken kann, wurde zunächst ein Western Blot mit IL-25- und  $\beta$ -actin-Färbungen durchgeführt, um die grobe Richtung der Wirkung beurteilen zu können.

In Abbildung 9 erkennt man, dass die Banden der Proben ohne Zugabe des Inhibitors und bei Zugabe von 100nM Inhibitor sehr ähnlich ausgeprägt sind. Dies heißt, dass in beiden Proben ähnliche Mengen an IL-25 vorhanden sind. Auch bei der Probe mit DMSO-Zusatz ist eine deutliche IL-25-Bande zu erkennen, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt als bei den anderen beiden Th25/(33)-Proben. Die Th0-Probe zeigt wie üblich keine IL-25-Produktion.

3.6.2.2 IL-25-Expression bei 100nM und 500nM NF-κB-Inhibitor im FACS

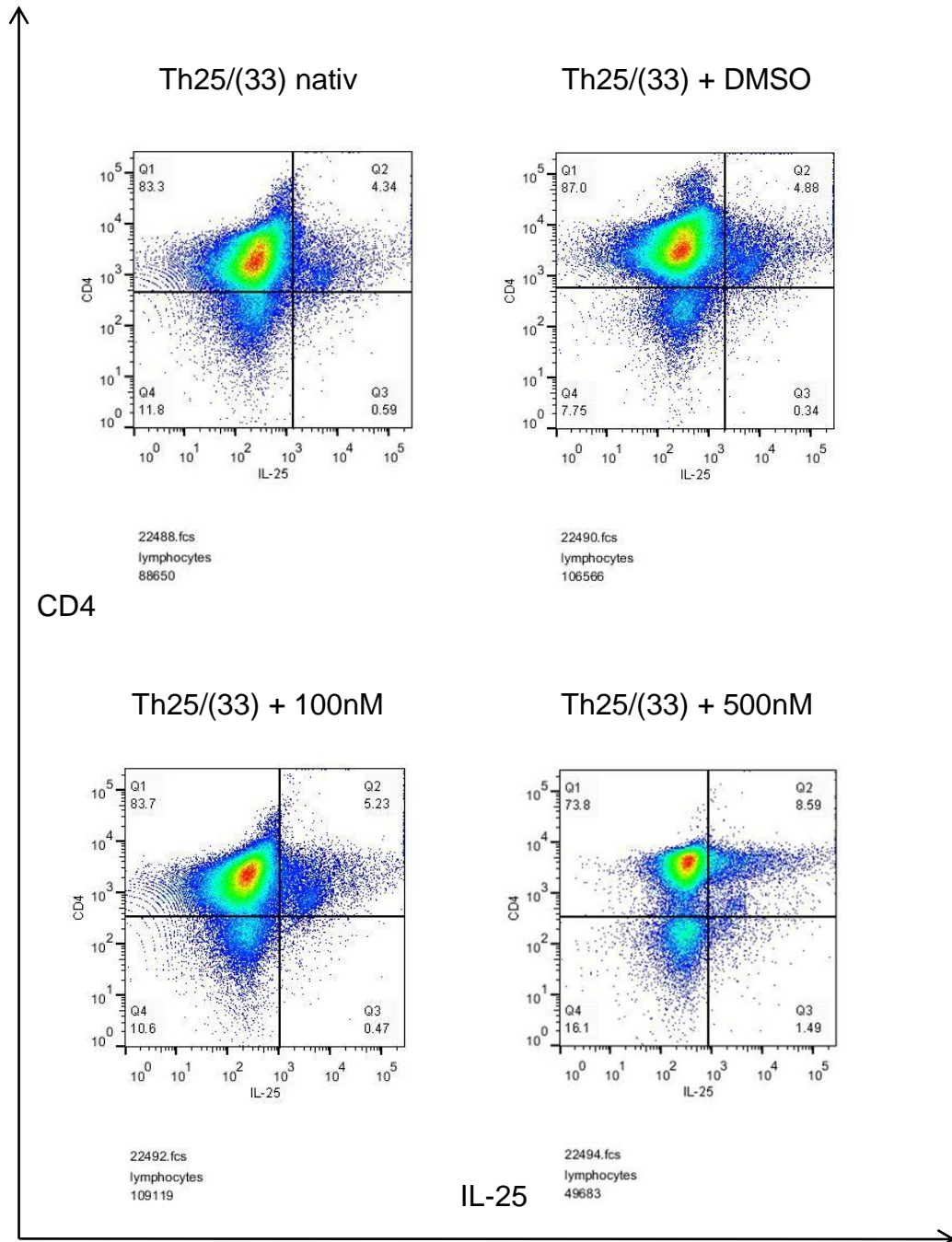


Abbildung 10: Durchflusszytometrie von Th25/(33) nativ, Th25/(33)+DMSO, Th25/(33)+100nM, Th25/(33)+500nM Inhibitor

### 3 Ergebnisse

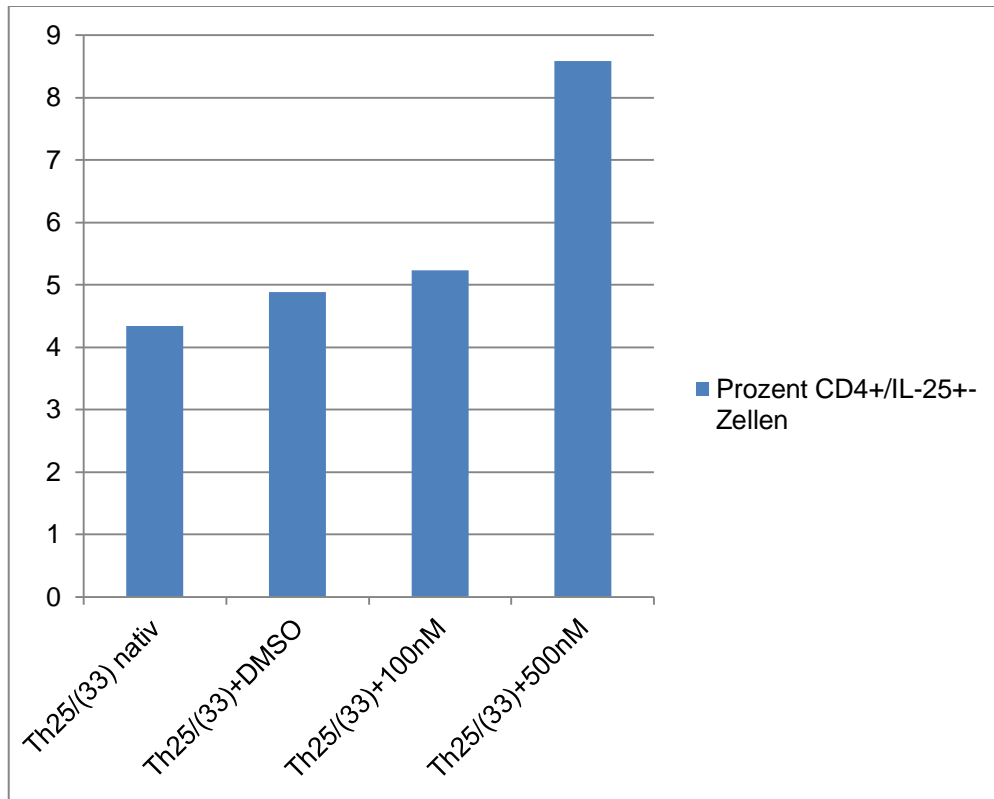
---

Um den Einfluss von NF- $\kappa$ B auf die IL-25-Expression genauer zu untersuchen, wurde eine Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. In diesem Versuch wurden zunächst CD4<sup>+</sup>-Zellen nach Protokoll in die Th25/(33)-Richtung stimuliert. Eine der Th25/(33)-Proben wurde nativ belassen, zu einer DMSO, die Trägersubstanz des NF- $\kappa$ B-Inhibitors zugegeben und zu je einer Probe 100nM bzw. 500nM des NF- $\kappa$ B-Inhibitors. Die entstandenen Th25/(33)-Zellen wurden mit einem CD4-PE-Cy7-Antikörper und nach Permeabilisierung intrazellulär mit einem IL-25-PE-Antikörper gefärbt und anschließend im FACS Canto II Flow Cytometer vermessen.

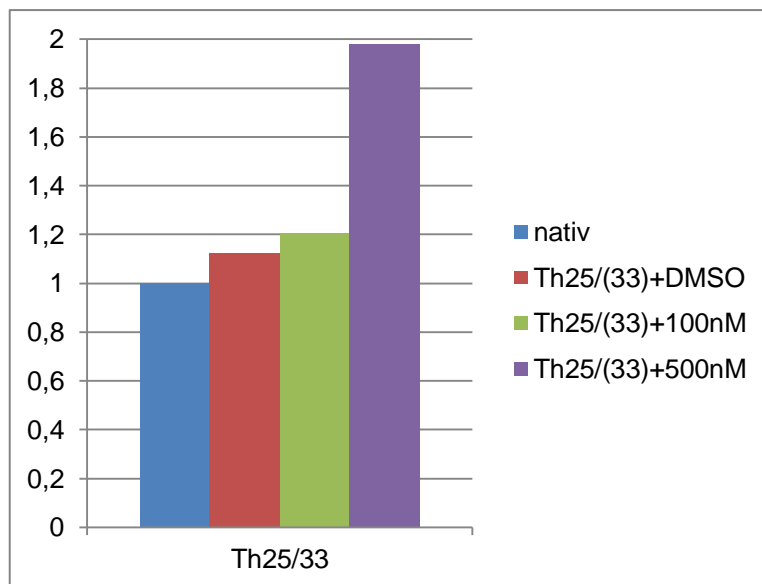
In den Diagrammen in Abbildung 10 sind die untersuchten Zellen nach Intensität des CD4- und des IL-25-Fluoreszenzsignals aufgetragen. Die gesuchten, CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup>-Zellen befinden sich im rechten oberen Quadranten der Diagramme.

Anhand des absoluten Vergleichs der Prozentzahlen zeigt sich in Abbildung 11, dass bei Zugabe des Inhibitors die Ausbeute an CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup>-Zellen deutlich erhöht wird. In Abbildung 12 wird deutlich, dass sich die Prozentzahl an CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup>-Zellen bei Zugabe von 500nM Inhibitor in Relation zur nativen Probe ohne Zugabe des Inhibitors fast verdoppelt.

### 3 Ergebnisse



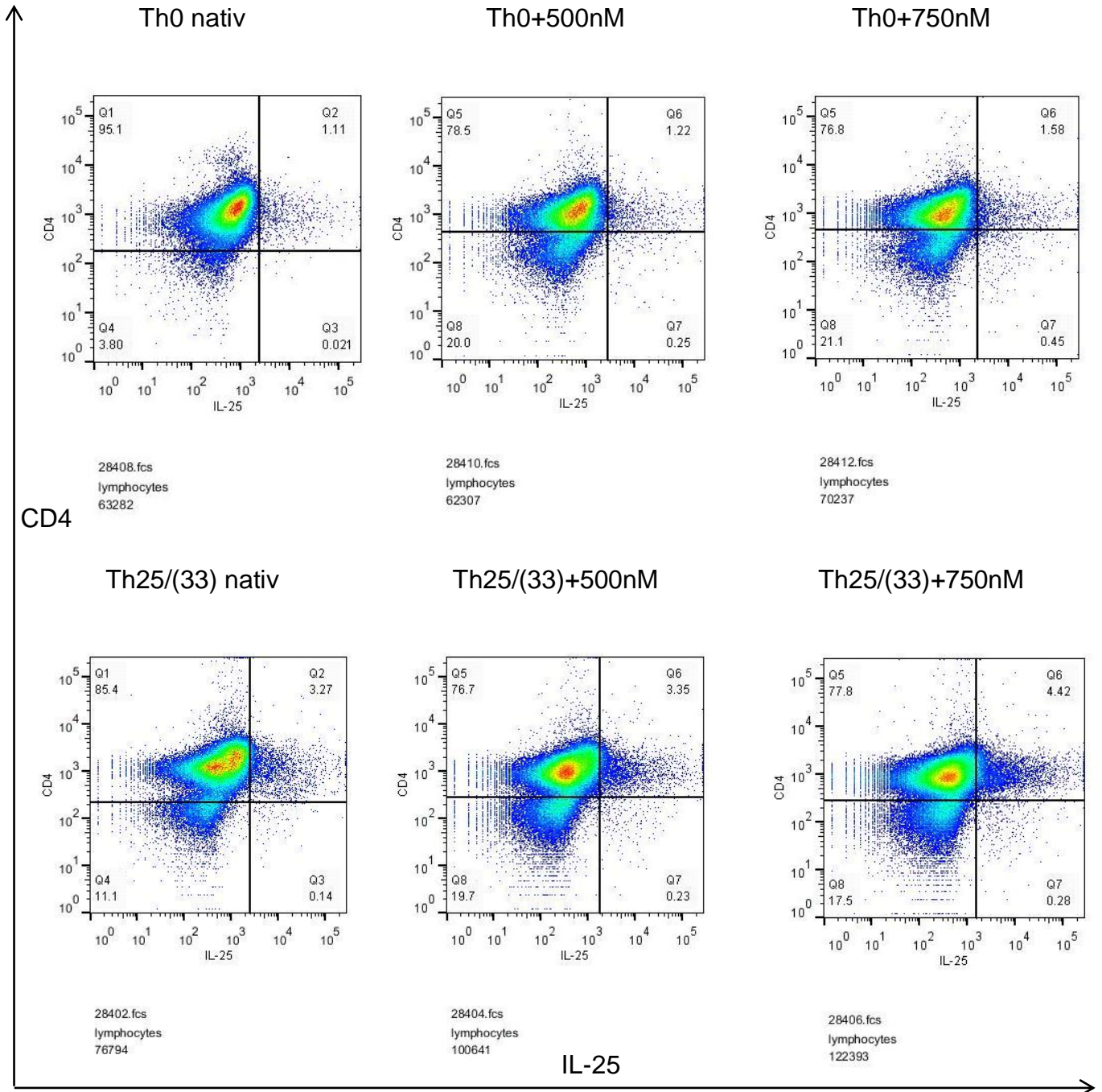
**Abbildung 11: Vergleich der absoluten Prozentzahlen CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup>-Zellen**



**Abbildung 12: Relative Prozentzahlen, bezogen auf die die native Th25/(33)-Probe**

### 3 Ergebnisse

#### 3.6.2.3 IL-25-Expression bei 500nM und 750nM NF- $\kappa$ B-Inhibitor im FACS



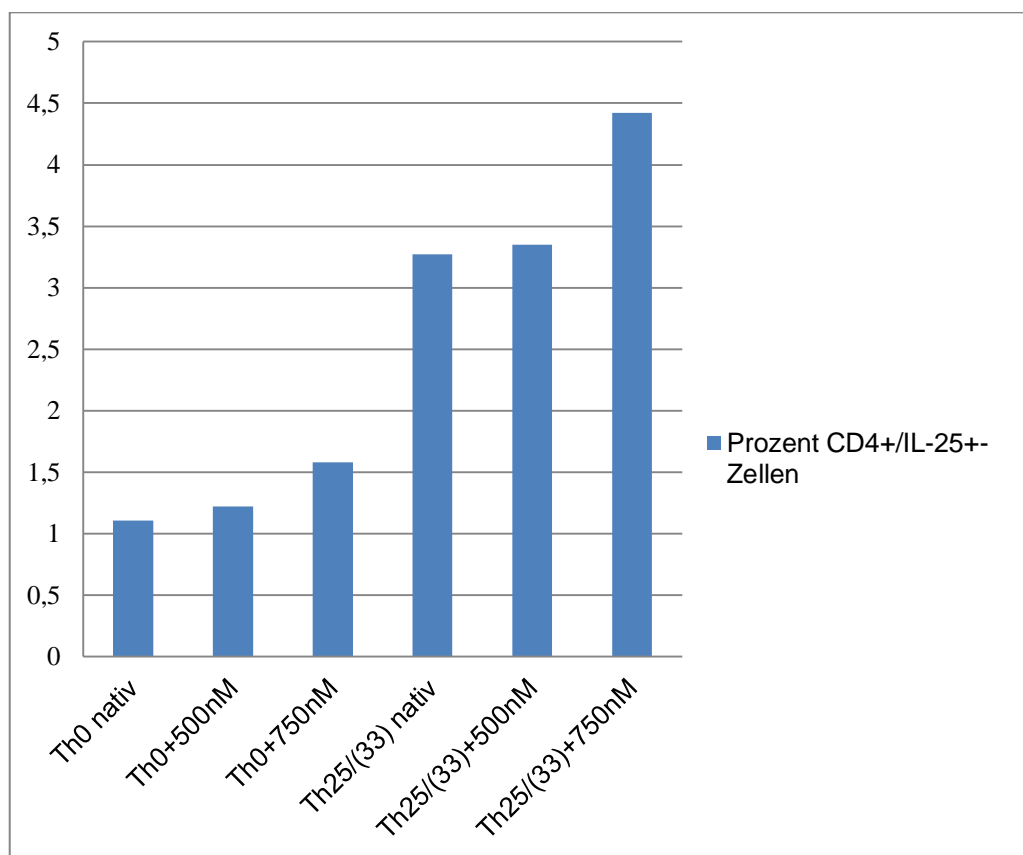
**Abbildung 13: Durchflusszytometrie von Th0 und Th25/(33) nativ, +500nM, +750nM Nf- $\kappa$ B-Inhibitor**

### 3 Ergebnisse

Um die Ergebnisse zu verifizieren und zusätzlich den Einfluss des NF- $\kappa$ B-Inhibitors auf die Th0-Population zu untersuchen, führten wir den vorherigen Versuch nochmals mit leicht veränderten Parametern durch.

Es wurden jeweils eine Th0- und eine Th25/(33)-Probe nativ, mit Zugabe von 500nM sowie mit Zugabe von 750nM NF- $\kappa$ B-Inhibitor vermessen. Die Stimulation erfolgte dabei nach Protokoll in die Th0-Richtung sowie in die Th25/(33)-Richtung.

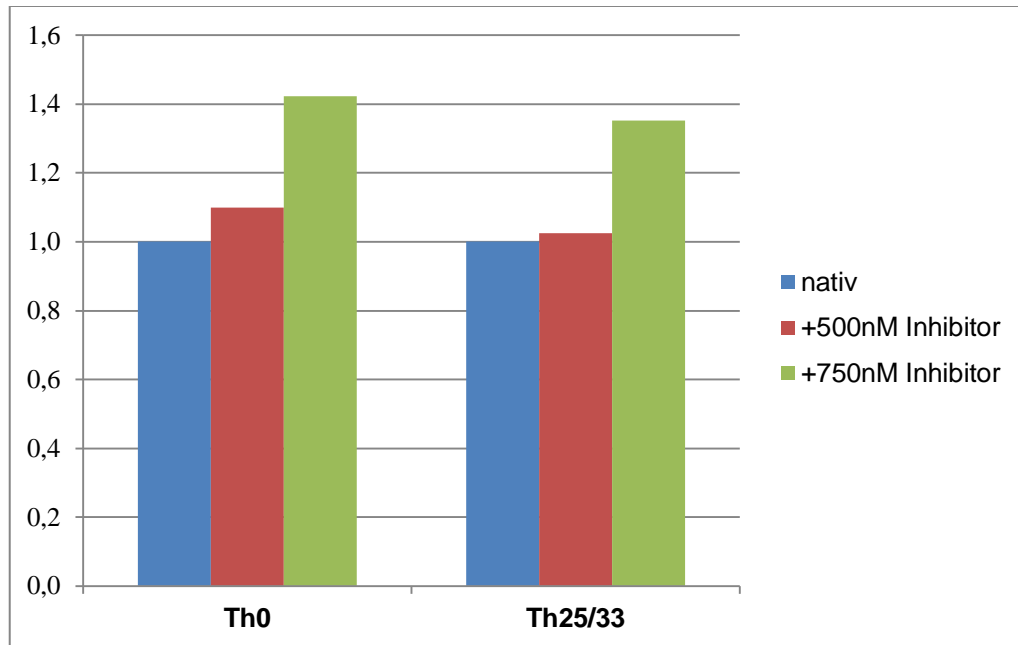
Man erkennt in Abbildung 14 sowohl bei den Th0- als auch bei den Th25/(33)-Proben, dass mit der Zunahme der Inhibitorkonzentration in der Probe auch die Prozentzahl der CD4<sup>+</sup>/IL25<sup>+</sup>-Zellen ansteigt. In Abbildung 15 wird deutlich, dass bei Steigerung der Inhibitorkonzentration eine ähnliche relative Zunahme der CD4<sup>+</sup>/IL25<sup>+</sup>-Zellen sowohl bei den Th25/(33)- als auch bei den Th0- Proben besteht.



**Abbildung 14: Vergleich der absoluten Prozentzahlen CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup>-Zellen**

### 3 Ergebnisse

---



**Abbildung 15: Relative Prozentzahlen, bezogen auf die die native Th0- bzw. Th25/(33)-Probe**

## 4 Diskussion

T-Helfer-Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems. Sie lassen sich in verschiedene Unterformen einteilen, unter anderem in Th1, Th2, Th9, Th17, regulatorische T-Zellen und in die neu entdeckte Th25/(33)-Zelle. Auf weitere Formen, wie die Th3-, Th22- und T<sub>fh</sub>-Subpopulationen, wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

Allen T-Helfer-Zellen gemeinsam ist der T-Zell-Rezeptor und CD4 als Korezeptor zur Antigenbindung. Die Funktion der einzelnen Subtypen unterscheidet sich anhand der ausgeschütteten Zytokine, wobei die einzelnen Unterformen ‚typische‘ Zytokinprofile aufweisen. Die Beziehungen zwischen den verschiedenen Zelllinien und die Interaktionen mit anderen Zellen des Immunsystems durch Botenstoffe oder Zell-Zell-Kontakte sind sehr komplex. Es gibt verschiedenste hemmende und fördernde Faktoren, die zur Ausbildung einer Immunantwort führen [1]. Die Unterscheidung der verschiedenen Subpopulationen erfolgt üblicherweise anhand der sezernierten Zytokine, Oberflächenmerkmale, den zur Differenzierung benötigten Signalen und den durch diese Signale aktivierten Transkriptionsfaktoren.

### 4.1 Die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle als eigenständige Subpopulation

Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine ‚Default-Stimulation‘ zur Ausbildung einer IL-25- und IL-33-produzierenden Zelle führt. Diese ‚Default-Stimulation‘ erfolgt zum einen durch Stimulierung der naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen durch Aktivierung des T-Zell-Rezeptors mittels plattengebundenem CD3-Antikörper und Kostimulation durch CD28-Antikörper. Zum anderen wird gleichzeitig die Th1- und Th2-Differenzierung durch IL-12- und INF- $\gamma$ - sowie IL-4-Antikörper blockiert. Es wurde

von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass nur die Kombination dieser drei Faktoren zur Ausbildung der IL-25/(IL-33)-produzierenden Zelle führt.

Zusammengefasst bedeutet das, dass eine reine Aktivierung naiver T-Zellen mit Blockade der Differenzierungswege zu anderen Linien ausreicht, damit sich eine neuartige T-Zelle ausbildet. Bemerkenswert daran ist, dass im Gegensatz zu bisher bekannten Subtypen [1, 5, 8, 31] keine weiteren stimulierenden Faktoren für die Differenzierung nötig sind, weshalb der Name ‚Default-Stimulation‘ gegeben wurde.

Es wurde in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass die IL-25/(IL-33)-produzierende Zelle keine der typischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-17A, IL-9 sowie weiterer T-Zell-assoziiierter Zytokine wie IL-2, IL-5, IL-10, IL-22 produziert, sondern nur die beiden namensgebenden Interleukine. Die zusätzliche IL-33-Produktion der Zelle konnte erst nach Abschluss der Versuche dieser Arbeit nachgewiesen werden, weshalb sich die Versuche auf IL-25 konzentrieren.

Neben dem Nachweis des spezifischen, neuen Zytokinprofils mit IL-25 (und IL-33) war es wichtig, die Abhängigkeit oder Unabhängigkeit der IL-25/(IL-33)-produzierenden T-Zelle von den Transkriptionsfaktoren der bekannten Subtypen zu untersuchen. In unserer Arbeitsgruppe wurde zunächst gezeigt, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA3 und ROR $\gamma$ T in der IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle nicht hochreguliert ist.

In dieser Arbeit wurden daraufhin aus verschiedenen Knockout-Mäusen, die die gewünschten Transkriptionsfaktoren nicht exprimieren können, naive CD4<sup>+</sup>-Zellen isoliert, im Vergleich zu Zellen aus Wildtypmäusen stimuliert und im Western Blot untersucht.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle unabhängig von den Transkriptionsfaktoren T-bet, STAT6 und ROR $\gamma$ T entwickelt, und somit unabhängig von den Th1-, Th2- oder Th17-Zelllinien ist, da der jeweilige Faktor unabdingbar für die Differenzierung zum spezifischen Subtyp ist [18, 19, 34, 56]. Zusätzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle keine Charakteristika regulatorischer T-Zellen aufweist.

Diese verschiedenen Aspekte – die ungewöhnlichen Stimulationsbedingungen, das individuelle Expressionsprofil der Zytokine und die Unabhängigkeit von Transkriptionsfaktoren der bekannten Subtypen – führen zu der Annahme, dass es sich bei der IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle um einen eigenständigen und neuartigen Subtyp der T-Helfer-Zellen handelt. Aufgrund der üblichen Nomenklatur wurde sie daher vorläufig Th25/(33)-Zelle benannt.

Interessanterweise wurde die Existenz einer IL-25-produzierenden Zelle bereits 2006 vorhergesagt [107]. Da im Intestinum eine IL-25-Expression in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen gefunden wurde, jedoch nicht bei verschiedenen untersuchten Zellen des angeborenen Immunsystems, wurde die Vermutung aufgestellt, dass es eine Effektor-T-Zelle geben könnte, die selektiv IL-25 produziert und dadurch eine spezifische Rolle in der mukosalen Abwehr haben könnte [107, 108].

### **4.2 Einfluss von IL-21 auf die IL-25-Produktion der Th25/(33)-Zelle**

Interleukin-21 (IL-21) ist ein Zytokin mit vielfältigen Effekten auf das angeborene und das adaptive Immunsystem. Es wird von NKT- und CD4<sup>+</sup>-Zellen gebildet [109, 110]. Die stärkste Expression findet sich in Th17- und T<sub>fh</sub>-Zellen, aber auch Th1 und Th2 können IL-21 bilden [104-106].

IL-21 wirkt auf verschiedenste Zellen proinflammatorisch, so bewirkt es beispielsweise eine verstärkte Aktivität von CD8<sup>+</sup>-Zellen und NK-Zellen oder gibt Signale zur Proliferation und zum Antikörperklassenwechsel von B-Zellen [111-113]. Gleichzeitig kann es aber auch die Immunantwort dämpfen, z.B. kann IL-21 abhängig vom Kontext als proapoptisches Signal auf B-Zellen wirken und die Antigen-Präsentation von dendritischen Zellen vermindern [114, 115].

Auch bei T-Zellen hat IL-21 vielfältige Effekte. Besonders hervorzuheben ist die Bedeutung für die Th17-Zelle, hier hat IL-21 gemeinsam mit anderen Faktoren eine induzierende und amplifizierende Wirkung auf die Th17-Differenzierung. Die Induktion von IL-21 in Th17-Zellen führt zu einer autokrinen Hochregulation der IL-21-Bildung

[31, 116], da IL-21 ebenso wie IL-23 über STAT3 eine gesteigerte Expression von ROR $\gamma$ T bewirkt [35, 116].

Ein weiterer Effekt von IL-21 zeigt sich bei T<sub>reg</sub>-Zellen. Reziprok zur Entwicklung von Th17-Zellen inhibiert IL-21 hier die durch TGF- $\beta$  gesteuerte Entwicklung von FoxP3<sup>+</sup>-T<sub>reg</sub> [37, 117]. Im Gegensatz dazu differenzieren sich Th1- und Th2-Zellen unabhängig von IL-21, interessanterweise kommt es unter IL-21-Stimulation aber zu einer verminderten Expression von IFN- $\gamma$  in Th1-Zellen [118, 119].

Aufgrund der weiten Verbreitung des IL-21-Rezeptors hat IL-21 verschiedenste biologische Funktionen, die noch nicht vollständig erforscht sind. Es wurden antitumorale Effekte bei verschiedenen Tumorerkrankungen nachgewiesen, aber ebenso eine krankheitsfördernde Rolle bei Autoimmunerkrankungen [106, 120-122].

IL-21 hat auf verschiedene Transkriptionsfaktoren einen Einfluss: wichtig zu nennen sind STAT3 und ROR $\gamma$ T aufgrund der Rolle für die Th17-Zelle, aber auch STAT1, STAT5, Bcl-6, cMaf und weitere werden durch IL-21 beeinflusst [33, 35, 123-125].

Da IL-21 eine so weitreichende Wirkung im Immunsystem hat, war eine Vermutung, dass IL-21 auch auf die Th25/(33)-Zelle einen Effekt haben könnte.

Hypothetisch bestanden drei Möglichkeiten: Zum einen gab es die Möglichkeit, dass IL-21 eine Hochregulation analog der Th17-Zelle bewirkt, zum anderen dass es ähnlich der T<sub>reg</sub> inhibierend auf die Entwicklung wirkt. Die dritte Möglichkeit, nämlich dass kein Einfluss von IL-21 auf die IL-25-Produktion der Th25/(33)-Zelle besteht, wurde hier nachgewiesen. Es konnte im Western Blot gezeigt werden, dass unabhängig von der IL-21-Zugabe ähnliche Mengen an IL-25 gebildet wurden.

Unser Ergebnis, dass IL-21 keinen Einfluss auf die Th25/(33)-Zelle hat, sollte mit weiteren Methoden verifiziert werden. Eine Möglichkeit wäre beispielsweise, aus IL-21-defizienten Mäusen CD4<sup>+</sup>-Zellen zu gewinnen und die IL-25-Produktion nach Stimulation in die Th25/(33)-Richtung zu untersuchen.

### 4.3 Wirkung des NF- $\kappa$ B auf Th25/(33)-Zellen

NF- $\kappa$ B ist ein Protein mit vielfältigen physiologischen Effekten auf Zellen.

Generell wird NF- $\kappa$ B eine Wirkung bei Inflammation, Zellüberleben, Onkogenese und bei der Immunregulation zugeschrieben [69, 74]. So kann es abhängig vom Kontext und dem Weg der Aktivierung sowohl Apoptose- als auch Überlebensfördernde Signale an Zellen geben (siehe Kap. 1.4), genauso wie es sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken kann [126]. Apoptose und Inflammation stehen in einem engen Zusammenhang mit der Tumorgenese, wodurch die Beobachtung, dass NF- $\kappa$ B auch bei Tumoren suppressiv oder fördernd wirken kann, gut erklärbar ist [71].

Auch bei T-Zellen sind die dichotomen Funktionen von NF- $\kappa$ B mit anti- und proapoptotischen Signalwegen beschrieben worden (siehe Kap. 1.4). Auf der einen Seite kommt es nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors mit simultaner Kostimulation zum verlängerten Zellüberleben durch Bildung antiapoptotischer Proteine wie bcl-xl und bcl-2 sowie zur Proliferation aufgrund der NF- $\kappa$ B-induzierten Expression von IL-2 und GM-CSF. GM-CSF ist ein Zytokin das u.a. als Leukozytenwachstumsfaktor dient. Ein weiterer Weg kann über p73 führen, einem proapoptotischen Faktor, der durch NF- $\kappa$ B supprimiert wird [74, 78, 80]. Außerdem zeigte eine erhöhte Expression des mit I $\kappa$ B verwandtem bcl-3 ein erhöhtes Zellüberleben. Bcl-3 interagiert im Nucleus mit NF- $\kappa$ B und reguliert die Transkription NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene [127].

Auf der anderen Seite steht die Apoptose-fördernde Wirkung. Bei ausgereiften T-Zellen kann NF- $\kappa$ B über erhöhte Expression des Fas-Liganden (CD95) die Apoptose auslösen. Dies geschieht im Rahmen des *activation-induced cell death* (AICD) bei Aktivierung des T-Zell-Rezeptors ohne simultane Kostimulation [74, 80]. Generell gibt es weitere Formen der NF- $\kappa$ B-abhängigen Apoptose. Häufig führt eine atypische Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalwege zum verstärkten Zelltod. Hier scheint NF- $\kappa$ B die Zellen für Apoptosesignale zu sensitivieren, der letztendliche Anstoß muss dann über Faktoren wie TNF (Tumornekrosefaktor), DNA-Schädigungen oder den Tumorsuppressor p53 erfolgen [71, 128].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es bei Zugabe des NF- $\kappa$ B-Inhibitor Bay 11-7082 während der Stimulation sowohl bei Th25/(33)- als auch bei Th0-Zellen zu einem deutlichen Anstieg der CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup>-Zellen kommt, die fast zu einer Verdopplung der Zellzahlen im Vergleich zur nativen Population führt.

Bay 11-7082 ist ein Inhibitor der I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung und inhibiert somit den klassischen Weg. I $\kappa$ B $\alpha$  ist wie beschrieben das Inhibitorprotein, das NF- $\kappa$ B im Zytoplasma inaktiviert hält. Zusätzlich ist Bay 11-7082 laut Herstellerangaben ein Inhibitor von IKK $\alpha$ , das mit der Aktivierung des alternativen Wegs assoziiert wird [69]. Neueren Forschungsergebnissen zufolge kann IKK $\alpha$  neben den NF- $\kappa$ B-Untereinheiten wohl noch weitere Substrate phosphorylieren, die Funktion scheint deshalb genauso wie auch bei IKK $\beta$  nicht auf den NF- $\kappa$ B-Weg beschränkt zu sein [69]. Es zeigte sich in einer Studie mit Makrophagen, dass Bay 11-7082 nicht nur den NF- $\kappa$ B-Weg, sondern auch andere Signalwege wie den ERK/JNK/AP-1- oder den JAK-2/STAT-1-Weg, die mit Inflammation assoziiert sind, inhibieren kann [129]. Die Bedeutung dieser beiden zusätzlichen Wirkungen von Bay 11-7082 ist noch unklar, der Fokus liegt weiterhin auf der Inhibition der NF- $\kappa$ B-Freisetzung.

Eine mögliche Deutung unserer Ergebnisse ist, dass NF- $\kappa$ B in Th25/(33)-Zellen die Apoptose fördert oder auslöst. Durch die Zugabe des Inhibitors wird die Apoptosekaskade allerdings verhindert, weswegen mehr Zellen überleben. Ob die NF- $\kappa$ B-abhängige Apoptose hier über eine Variation des AICD oder über einen anderen, eventuell atypischen Weg führt, bleibt eine interessante Frage.

Die Durchflusszytometriemessung mit einer NF- $\kappa$ B-Färbung für den Nachweis von freiem NF- $\kappa$ B in den Zellen war im Verlauf dieser Arbeit leider nicht erfolgreich. Ein weiterführender Ansatz wäre deshalb, die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den Th25/(33)-Zellen im Vergleich zu anderen T-Helferzell-Subtypen messbar zu machen. Zusätzlich wäre es interessant, freies NF- $\kappa$ B im Verlauf des Zellzyklus der Zellen zu messen, um herauszufinden, ob NF- $\kappa$ B hier wirklich eine Apoptose-fördernde Rolle zukommt.

Zusammengefasst hat sich in unseren Versuchen die Zugabe des NF- $\kappa$ B-Inhibitors bewährt, da die Ausbeute an vitalen CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup>-Zellen deutlich erhöht ist.

Die zugrunde liegende Ursache hierfür bleibt jedoch vorerst spekulativ.

### 4.4 Potentielle *in vivo* Funktionen der Th25/(33)-Zelle

#### 4.4.1 Mögliche proinflammatorische Funktion der Th25/(33)-Zelle

Die Induktion der Th25/(33)-Zelle führt wie beschrieben zur Bildung von IL-25 und IL-33. Beide Zytokine haben *in vivo* bei der Regulation von Inflammationsprozessen und bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen eine Bedeutung.

IL-25 wird unter anderem von Th2-Zellen [82], Alveolarmakrophagen [83], Mastzellen [84], Eosinophilen und Basophilen nach Stimulation [85] und Lungenepithelzellen [86] gebildet. Es verstärkt vornehmlich eine Th2-Antwort und wirkt stimulierend auf die IL-9- und IL-10-Produktion von Th9-Zellen. Dadurch hilft IL-25 bei der Abwehr von parasitären Infektionen, verstärkt aber auch Th2-assoziierte Autoimmunerkrankungen. Im Kontrast dazu hat es bei Th1- und Th17-vermittelten Immun-erkrankungen eine protektive Wirkung (siehe Kap. 1.5) [81, 82, 87, 99].

IL-33 wird unter anderem von Stromazellen wie Endothel- und Epithelzellen, Osteoblasten und Adipozyten exprimiert [130, 131]. Eine IL-33-Produktion wurde zudem in Th17-Zellen nachgewiesen, die mit IL-23 in Abwesenheit von TGF- $\beta$  stimuliert worden waren [132]. Bisher war das die einzig nachgewiesene Produktion von IL-33 in T-Zellen. IL-33 wirkt über die Rezeptoren ST2 (IL-1RL1) und IL-1RAcP (IL-1 receptor accessory protein), die bei vielen Zellarten exprimiert werden, speziell aber bei Th2-Zellen und bei Zellen des angeborenen Immunsystems [133, 134]. Interessanterweise scheint IL-33 nicht nur ein klassisches Zytokin zu sein, sondern auch ein intrazellulärer Faktor, der die Transkription beeinflussen kann [135].

Die Hauptfunktion von IL-33 ist die Verstärkung einer Th2-Immunantwort. Es kann naive T-Helfer-Zellen in Th2-Richtung dirigieren und verstärkt die Produktion Th2-typischer Zytokine wie IL-5 und IL-13 [136, 137]. Zusätzlich wirkt IL-33 als Chemokin

auf Th2-Zellen [138]. Eine weitere Funktion ist die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Mastzellen, Basophile und Eosinophile, bei denen IL-33 verschiedene Wirkungen auf Degranulation, Reifung, Zellüberleben und Bildung proinflammatorischer Zytokine hat [139-141].

Dadurch bekommt IL-33 ebenso wie IL-25 eine Bedeutung bei Parasiteninfektionen, die mit einer Th2-gesteuerten Immunantwort bekämpft werden. Es wurde gezeigt, dass IL-33 bei diversen Parasiteninfektionen hochreguliert ist, beispielsweise bei einer Infektion mit *Trichuris muris* [142]. Durch die Förderung der Th2-Immunantwort wird analog zur IL-25-Wirkung die Pathogenese Th2-assoziiierter Immunerkrankungen wie Asthma gefördert [143]. IL-33 spielt eine zentrale Rolle bei Immunantworten in Barrieregeweben wie Intestinum oder Haut [130, 134]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IL-33 ebenso wie IL-25 auf die MMP<sup>type2</sup>-Zellen wirkt und hier die Proliferation verstärkt [96, 130]. Eine zusätzliche interessante Funktion ist, dass IL-33 wohl auch als ‚Alarm‘ für Immunzellen funktioniert. Bei Nekrosen wird IL-33 funktionsfähig aus den absterbenden Zellen freigesetzt und kann dadurch Immunzellen zum Ort der Nekrose rekrutieren und stimulieren. Bei einer Apoptose hingegen spalten Caspasen der Apoptosekaskade das IL-33 und inaktivieren es, wodurch die Immunreaktion ausbleibt [144, 145].

Aufgrund der beschriebenen Funktionen der beiden Zytokine IL-25 und IL-33 kann eine *in vivo* Funktion der Th25/(33)-Zelle bei der Regulation der Th2-Immunantwort und auch der Th9-Antwort angenommen werden, die Zelle würde somit Einfluss auf Entzündungsprozesse haben. Vorstellbar ist eine proinflammatorische Funktion bei verschiedenen Th2-assoziierten Parasiteninfektionen, aber auch eine Förderung von Autoimmunerkrankungen durch die Einflüsse beider Zytokine auf Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems.

### 4.4.2 Mögliche antiinflammatorische Funktion der Th25/(33)-Zelle

Allerdings ist auch eine antiinflammatorische Funktion denkbar. Es wurde nachgewiesen, dass während einer chronischen intestinalen Entzündung die intestinale Fibrose abhängig von einer Antwort über IL-13 ist [146]. Bekanntermaßen ist das Organ-Remodeling durch Organfibrose bei chronisch verlaufenden Entzündungen häufig der einzige Ausweg, die Entzündungsreaktion einzudämmen, sichtbar beispielsweise bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Es wurde gezeigt, dass bei induzierter Kolitis die Produktion von IL-13 durch Inhibition der IL-25-Produktion von CD4<sup>+</sup>-Zellen verhindert wird, d.h. die IL-13-Produktion ist hier abhängig von IL-25 [146]. Daraus kann gefolgert werden, dass die Th25/(33)-Zelle zumindest teilweise bei der Umwandlung einer chronischen Entzündung im Darm hin zu einer Organfibrose mitbeteiligt sein könnte.

Dies könnte die Beobachtung erklären, dass eine ‚Default-Stimulation‘, also die Inhibierung der anderen T-Helferzell-Subtypen, nötig ist, damit sich die Th25/(33)-Zelle differenzieren kann. Es ist denkbar, dass bei einer chronischen Entzündung, die durch proinflammatorische T-Helfer-Zellen wie Th17 angetrieben wird, erst diese Zellen inhibiert werden müssen, um die Heilung der Inflammation durch Fibrogenese zu ermöglichen. Die Th25/(33)-Zelle könnte also das Bindeglied zwischen Entzündung und Fibrose darstellen.

### 4.4.3 Möglicher Zusammenhang von NF-κB und der Th25/(33)-Zelle bei Inflammation

Einen weiteren Hinweis auf die biologische Funktion der Th25/(33)-Zelle bei Inflammation könnte die Bedeutung von NF-κB auf die Th25/(33)-Zelle liefern.

NF-κB hat neben den in Kap. 4.3 beschriebenen Wirkungen auf die Apoptose ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf Entzündungsreaktionen. Eine allgemeine proinflammatorische Funktion ist bekannt. Beispielsweise werden bei Aktivierung des klassischen (kanonischen) Wegs durch bakterielle Bestandteile oder inflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF-α proinflammatorische und anti-

apoptotische Gene in den Zielzellen aktiviert [68, 74, 147]. Der klassische Weg ist mit Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, Asthma oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert [69, 126, 148].

Entsprechend den dichotomen Mechanismen bei Apoptose und Tumorgenese kann NF- $\kappa$ B auch bei Inflammationen das Gegenteil bewirken. In späteren Stadien einer Entzündung induziert NF- $\kappa$ B antiinflammatorische Gene und fördert den Zelltod [71, 149]. Studien zeigten, dass NF- $\kappa$ B direkt die Expression proinflammatorischer Gene inhibieren und die Expression oder Aktivität entzündungshemmender Zytokine wie IL-10 verändern kann [126, 150, 151]. So scheint es, dass NF- $\kappa$ B zu Beginn einer Entzündung proinflammatorisch wirkt, im Verlauf jedoch auch die Entzündungsreaktion begrenzen kann [126].

Diese duale Rolle wirft die Frage auf, inwieweit NF- $\kappa$ B in Zusammenhang mit der Th25/(33)-Zelle auf Entzündungsprozesse einwirkt?

Aufbauend auf dem vermuteten Zusammenhang mit der Fibrogenese und der damit verbundenen antiinflammatorischen Rolle der Th25/(33)-Zelle bei chronischen Entzündungen ist eine mögliche These, dass die Th25/(33)-Zellen während aktiven Entzündungen durch NF- $\kappa$ B in die Apoptose getrieben werden. NF- $\kappa$ B wäre in diesem Fall ein Faktor für die Aufrechterhaltung der Inflammation und würde diejenigen Zellen, die der Entzündung entgegenwirken, supprimieren. Die Inhibition von NF- $\kappa$ B würde dann zu vermehrtem Zellüberleben der Th25/(33)-Zelle führen, was unsere Ergebnisse erklären könnte.

Andersherum gesehen aktivieren IL-25 und IL-33 wiederum NF- $\kappa$ B-assoziierte Signalwege in Immunzellen. IL-25 kann in Eosinophilen über Aktivierung des NF- $\kappa$ B- und des p38-MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Wegs zur Produktion inflammatorischer Proteine wie IL-6, IL-8 oder MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) führen und hat somit Anteil an allergischen Reaktionen [152].

Ebenso wirkt IL-33 unter anderem über NF- $\kappa$ B. Nach Bindung an den Rezeptor wird eine Signalkaskade initiiert, die den NF- $\kappa$ B- und den MAPK-Weg aktiviert und dadurch ebenfalls die Produktion inflammatorischer Faktoren fördert [134].

Über diese Aspekte ließe sich, unabhängig von unseren Versuchen, wiederum eine proinflammatorische Rolle der Th25/(33)-Zelle erklären.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die Th25/(33)-Zelle vielfältige Funktionen in der Regulation von Immunreaktionen hat. Wahrscheinlich kann sie, genau wie andere T-Helferzell-Subtypen und analog zu der Funktion der beiden produzierten Interleukine, je nach Kontext und Milieu Immunreaktionen fördern oder inhibieren. Die spannende Frage bleibt, inwieweit die Th25/(33)-Zelle zu den hier diskutierten Funktionen beiträgt und welche weiteren Funktionen sich im Laufe der Forschungen noch zeigen werden?

### 4.5 Ausblick

Die Existenz der Th25/(33)-Zelle führt zu einer Vielzahl von Forschungsansätzen. Ein erster wichtiger Punkt ist es, den spezifischen Transkriptionsfaktor der Th25/(33)-Zelle zu finden. Zwar ist die in dieser Arbeit bewiesene Unabhängigkeit von den Schlüsseltranskriptionsfaktoren der bekannten Subpopulationen ein wichtiger Anhaltspunkt, um die Eigenständigkeit der Zelllinie letztendlich zu beweisen muss jedoch ein Th25/(33)-spezifischer Transkriptionsfaktor gefunden werden.

In dieser Arbeit wurden reine *in vitro* Versuche gemacht. Der nächste konsequente Schritt ist also, bei *in vivo* Versuchen zu untersuchen, ob die Zelle zum einen *in vivo* stabil ist und zum anderen, in welchen physiologischen und/oder pathologischen Prozessen sie sich differenziert.

Außerdem können weitere Versuche über die Funktion der Th25/(33)-Zelle erfolgen, um die Bedeutung der Zelle bei Reaktionen des Immunsystems sowohl im Mausmodell als auch nachfolgend im Menschen zu verstehen.

Letztendlich muss das Zusammenspiel zwischen der neuen Th25/(33)-Zelle, den anderen bekannten Subtypen und den Zellen des angeborenen Immunsystems geklärt werden. Hinweise darauf sind durch die fördernde Wirkung von IL-25 und IL-33 auf Th2- und Th9-assoziierte Immunreaktionen sowie die inhibierende Wirkung

## 4 Diskussion

---

auf Th1- und Th17-gesteuerte Immunreaktionen gegeben (siehe Kap. 1.5 und 4.4.1). Es wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Th25/(33)-Zelle fähig ist, eine Th2- und Th9-Differenzierung zu induzieren, weitere Interaktionen mit anderen Zelltypen sind jedoch noch zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Die T-Helfer-Zellen sind eine heterogene Gruppe von Zellen des adaptiven Immunsystems, die in mehrere Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen eingeteilt werden können. Insgesamt werden den T-Helfer-Zellen regulatorische, ‚helfende‘ Funktionen bei Immunantworten zugeschrieben. Sichtbar wird die Bedeutung der T-Helfer-Zellen unter anderem bei der Infektion mit HIV (human immunodeficiency virus), bei der es zu schwersten Störungen der Immunantwort kommt.

Durch das zum Zeitpunkt der Differenzierung vorherrschende Zytokinmilieu wird die Polarisation von naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen zu bestimmten Subtypen wie Th1-, Th2- oder anderen Zellen festgelegt. Kürzlich wurde entdeckt, dass sich bei einer ‚Default-Stimulation‘, also der Blockade der Differenzierungswege bekannter Subtypen mit gleichzeitiger TCR-Stimulation und Kostimulation, eine IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle differenziert, die keine weiteren typischen T-Zell-Interleukine produziert.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Frage untersucht, ob die Differenzierung der IL-25/(IL-33)-produzierenden T-Zelle abhängig von Schlüsseltranskriptionsfaktoren der bekannten Subtypen ist, oder ob eine neue, unabhängige Subpopulation vorliegt. Dazu wurde mittels Western Blot auf das Vorhandensein einer IL-25-Bildung getestet. CD4<sup>+</sup>-Zellen aus Wildtypmäusen und aus Knockout-Mäusen für den jeweiligen untersuchten Transkriptionsfaktor wurden durch die beschriebene ‚Default-Stimulation‘ in Richtung der IL-25/(IL-33)-produzierenden T-Zelle polarisiert und die IL-25-Produktion im Western Blot verglichen. Es zeigte sich, dass die IL-25/(IL-33)-produzierende T-Zelle unabhängig von den Transkriptionsfaktoren T-bet, STAT6 und ROR $\gamma$ T und damit unabhängig von den Th1-, Th2- und Th17-Zelllinien ist.

Daher gehen wir von einer eigenständigen T-Helferzell-Subpopulation aus, die vorläufig Th25/(33)-Zelle benannt wurde.

Zusätzlich wurde der Einfluss weiterer Faktoren auf die Th25/(33)-Zelle untersucht. Anhand von Western Blots mit IL-25-Färbungen konnte kein Einfluss von IL-21, einem unter anderem in der Th17-Differenzierung wichtigen Interleukin, auf die Th25/(33)-Zelle gefunden werden. Sowohl mit als auch ohne zusätzliche IL-21-Stimulation zeigte sich eine deutliche IL-25-Produktion, die sich in der Intensität nicht wesentlich unterschied.

Bei dem zweiten untersuchten Faktor, NF- $\kappa$ B, ließ sich hingegen ein deutlicher Einfluss belegen. Durch Zugabe eines NF- $\kappa$ B-Inhibitors während der Stimulation zur Th25/(33)-Zelle zeigte sich in der Durchflusszytometrie ein deutlich verbessertes Zellüberleben der CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup>-Zellen, was vermutlich auf die Inhibition der NF- $\kappa$ B-assoziierten Apoptose zurückzuführen ist. Es war eine signifikante Steigerung an vitalen Th25/(33)-Zellen zu erkennen.

Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass es neben den bekannten Subpopulationen einen weiteren unabhängigen T-Helferzell-Subtyp gibt, der IL-25 und IL-33 produziert. Die Inhibition von NF- $\kappa$ B in den Th25/(33)-Zellen führt zu vermehrtem Zellüberleben. Diese Fakten können Hinweise auf die Funktion der Th25/(33)-Zelle geben, so wäre eine proinflammatorische Rolle bei Th2- und Th9-assoziierten Immunreaktionen genauso wie eine antiinflammatorische Rolle bei der Ausheilung chronischer Entzündungen denkbar.

## 6 Summary

T-helper cells are a heterogeneous group of cells of the adaptive immune system, which can be divided in several subsets with different functions. All in all, the function of T-helper cells is the regulation of immune responses. Amongst others, this can be seen in HIV (human immunodeficiency virus) infection, where severe dysfunctions of T cell associated immune responses develop.

Depending on the cytokine milieu at the time of activation, naïve CD4<sup>+</sup> T cells differentiate into distinct subtypes like Th1-, Th2- or other cell types. Lately, Fichtner-Feigl et al. discovered that ‘default stimulation’, i.e. TCR activation and costimulation combined with blocking of the differentiation paths to Th1 and Th2 subtypes can lead to an IL-25/(IL-33)-producing T helper cell subset, that doesn’t produce any other T cell-associated cytokines, initially termed Th25/(33) cell.

In this dissertation the dependence of Th25/(33) cells on master transcription factors of already established T helper cell subsets (Th1, Th2 and Th17) was explored to fuel the question if the Th25/(33) cells are a new, distinct T helper cell lineage. CD4<sup>+</sup> T cells from wild type mice and from transcription factor specific knockout mice (Tbet, STAT6 and ROR $\gamma$ T) were polarised to Th25/(33) cells through the mentioned ‘default stimulation’, then the IL-25 production was assessed by Western Blot. It was shown that the Th25/(33) cells are independent of the transcription factors T-bet, STAT6 and ROR $\gamma$ T and thus independent of the Th1-, Th2- und Th17-cell lineages. Therefore we assume that Th25/(33) cell are a new distinct T helper cell lineage.

In addition, the influence of further components like cytokines and transcription factors on the differentiation of Th25/(33) cells was explored.

Stimulation of naïve T cells with default stimulation and IL-21 yields no influence of IL-21 on Th25/(33) differentiation. IL-21 is – amongst others – important in Th17-differentiation. Both with and without additional IL-21 stimulation a considerable IL-25 production was seen in Western Blotting, with almost identical intensity.

## 6 Summary

---

In contrast the transcription factor, NF- $\kappa$ B, showed a significant influence on the Th25/(33) cell differentiation. Adding a NF- $\kappa$ B inhibitor to stimulation conditions for the Th25/(33) cell lineage, a considerably improved cell survival of CD4<sup>+</sup>/IL-25<sup>+</sup> cells could be seen by flow cytometry. It is possible that this results from the inhibition of the NF- $\kappa$ B-associated apoptosis. All in all, a significant increase of vital Th25/(33) cells was detected.

In summary, our results show that another distinct T-helper cell subtype exists besides the known T-cell lineages, that produces IL-25 and IL-33. The inhibition of NF- $\kappa$ B in Th25/(33) cells leads to improved cell survival. These results can give hints on the physiological function of the Th25/(33) cell, as a pro-inflammatory role in Th2- and Th9-associated immune reactions as well as an anti-inflammatory role in termination of chronic inflammatory processes can be assumed.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: T-Zell-Rezeptor/CD3 .....	2
Abbildung 2: NF- $\kappa$ B-Aktivierungswege .....	14
Abbildung 3: IL-25-Western Blot bei verschiedenen T-Helfer-Zellen.....	36
Abbildung 4: IL-25-Western Blot bei T-bet-defizienten Mäusen .....	37
Abbildung 5: IL-25-Western Blot bei STAT6-defizienten Mäusen .....	39
Abbildung 6: IL-25-Western Blot bei ROR $\gamma$ T-defizienten Mäusen.....	40
Abbildung 7: IL-25-Western Blot mit Zugabe von IL-21 bei Th0, Th17 und Th25/(33)-Zellen.....	41
Abbildung 8: Prozent vitaler Th0-Zellen bei Zugabe verschiedener Konzentrationen des NF- $\kappa$ B-Inhibitors .....	42
Abbildung 9: IL-25-Western Blot mit 100nM NF- $\kappa$ B-Inhibitor.....	43
Abbildung 10: Durchflusszytometrie von Th25/(33) nativ, Th25/(33)+DMSO, Th25/(33)+100nM, Th25/(33)+500nM Inhibitor .....	44
Abbildung 11: Vergleich der absoluten Prozentzahlen CD4 <sup>+</sup> /IL-25 <sup>+</sup> -Zellen.....	46
Abbildung 12: Relative Prozentzahlen, bezogen auf die die native Th25/(33)-Probe	46
Abbildung 13: Durchflusszytometrie von Th0 und Th25/(33) nativ, +500nM, +750nM Nf- $\kappa$ B-Inhibitor .....	47
Abbildung 14: Vergleich der absoluten Prozentzahlen CD4 <sup>+</sup> /IL-25 <sup>+</sup> -Zellen.....	48
Abbildung 15: Relative Prozentzahlen, bezogen auf die die native Th0- bzw. Th25/(33)-Probe.....	49

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen presenting cells
BSA	Albumin bovine serum
CD	Cluster of differentiation
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FSC	Forward scatter
HBSS	Hank's balanced salt solution
Ih2	Innate type 2 helper cells
IKK	Inhibitory $\kappa$ B kinase
IL	Interleukin
IL-1RAcP	IL-1 receptor accessory protein
iNKT	Invariant natural killer t-cell
JAK	Januskinase
Kap.	Kapitel
KO	Knockout
MACS	Magnetic activated cell sorting
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCH	Major histocompatibility complex
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MMP <sup>type2</sup>	Multipotent progenitor cells type 2
NK/NKT	Natürliche Killerzelle/ Natürliche T-Killerzelle
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetat

RIPA	Radio immunoprecipitation assay
ROR	Retinoid-related orphan receptor
RPM	Revolutions per minute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	Side scatter
STAT	Signal-transducing activators of transcription
T-bet	T-box expressed in T-cells
TCR	T-cell receptor
T <sub>fh</sub>	Follicular B Helper T-cells
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle

## Literaturverzeichnis

1. Murphy, K., *Janeway's Immunobiology*. 8th edition ed. 2012: Garland Science, Taylor&Francis Group.
2. Clevers, H., et al., *The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble*. *Annu Rev Immunol*, 1988. **6**: p. 629-62.
3. Linsley, P.S. and J.A. Ledbetter, *The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen*. *Annu Rev Immunol*, 1993. **11**: p. 191-212.
4. Mosmann, T.R., et al., *Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells*. *Immunol Rev*, 1991. **123**: p. 209-29.
5. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 145-73.
6. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
7. Weiner, H.L., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells*. *Immunol Rev*, 2001. **182**: p. 207-14.
8. Veldhoen, M., et al., *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(12): p. 1341-6.
9. Dardalhon, V., et al., *IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(12): p. 1347-55.
10. Trifari, S., et al., *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(8): p. 864-71.
11. Fazilleau, N., et al., *Follicular helper T cells: lineage and location*. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 324-35.
12. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(4): p. 331-7.
13. Darrah, P.A., et al., *Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major*. *Nat Med*, 2007. **13**(7): p. 843-50.
14. Zhu, J. and W.E. Paul, *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. *Cell Res*, 2010. **20**(1): p. 4-12.
15. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4+ T cell plasticity-Th2 cells join the crowd*. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 11-3.
16. Hegazy, A.N., et al., *Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)/T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions*. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 116-28.

17. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. Adv Immunol, 2007. **96**: p. 41-101.
18. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
19. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. **89**(4): p. 587-96.
20. Reese, T.A., et al., *Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy*. Nature, 2007. **447**(7140): p. 92-6.
21. Turner, J.D., et al., *Th2 cytokines are associated with reduced worm burdens in a human intestinal helminth infection*. J Infect Dis, 2003. **188**(11): p. 1768-75.
22. Urban, J.F., Jr., et al., *IL-13, IL-4, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite Nippostrongylus brasiliensis*. Immunity, 1998. **8**(2): p. 255-64.
23. Barrett, N.A. and K.F. Austen, *Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 425-37.
24. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
25. Galli, S.J., M. Tsai, and A.M. Piliponsky, *The development of allergic inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 445-54.
26. Faulkner, H., et al., *Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode Trichuris muris*. Infect Immun, 1998. **66**(8): p. 3832-40.
27. Soussi-Gounni, A., M. Kontolemos, and Q. Hamid, *Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(4): p. 575-82.
28. Chang, H.C., et al., *The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation*. Nat Immunol, 2010. **11**(6): p. 527-34.
29. Ma, C.S., S.G. Tangye, and E.K. Deenick, *Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(6): p. 621-3.
30. Wong, M.T., et al., *Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(6): p. 624-31.
31. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
32. Maddur, M.S., et al., *Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies*. Am J Pathol, 2012. **181**(1): p. 8-18.
33. Yang, X.O., et al., *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9358-63.
34. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 29-39.

35. Ivanov, I., et al., *The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
36. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
37. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
38. Wilke, C.M., et al., *Deciphering the role of Th17 cells in human disease*. Trends Immunol, 2011. **32**(12): p. 603-11.
39. Kryczek, I., et al., *Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments*. Blood, 2009. **114**(6): p. 1141-9.
40. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
41. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 490-500.
42. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
43. Shevach, E.M., *Regulatory T cells in autoimmunity\**. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 423-49.
44. Chen, W., et al., *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, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
45. Szabo, S.J., et al., *Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells*. Science, 2002. **295**(5553): p. 338-42.
46. Papaioannou, V.E., *T-box family reunion*. Trends Genet, 1997. **13**(6): p. 212-3.
47. Smith, J., *Brachyury and the T-box genes*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(4): p. 474-80.
48. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
49. Mullen, A.C., et al., *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection*. Science, 2001. **292**(5523): p. 1907-10.
50. Schulz, E.G., et al., *Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 673-83.
51. Lazarevic, V., et al., *T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR $\gamma$* . Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 96-104.
52. Djuretic, I.M., et al., *Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 145-53.
53. Bettelli, E., et al., *Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2004. **200**(1): p. 79-87.

54. Neurath, M.F., et al., *The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease*. J Exp Med, 2002. **195**(9): p. 1129-43.
55. Jenner, R.G., et al., *The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17876-81.
56. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 313-9.
57. Ihle, J.N., *Cytokine receptor signalling*. Nature, 1995. **377**(6550): p. 591-4.
58. O'Shea, J.J. and P.J. Murray, *Cytokine signaling modules in inflammatory responses*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 477-87.
59. Wurster, A.L., T. Tanaka, and M.J. Grusby, *The biology of Stat4 and Stat6*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2577-84.
60. Kohler, I., et al., *Human interleukin-13 activates the interleukin-4-dependent transcription factor NF-IL4 sharing a DNA binding motif with an interferon-gamma-induced nuclear binding factor*. FEBS Lett, 1994. **345**(2-3): p. 187-92.
61. Shimoda, K., et al., *Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene*. Nature, 1996. **380**(6575): p. 630-3.
62. Takeda, K., T. Kishimoto, and S. Akira, *STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions*. J Mol Med (Berl), 1997. **75**(5): p. 317-26.
63. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
64. Kurebayashi, S., et al., *Retinoid-related orphan receptor gamma (RORgamma) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10132-7.
65. Novac, N. and T. Heinzel, *Nuclear receptors: overview and classification*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2004. **3**(4): p. 335-46.
66. Ichiyama, K., et al., *Transcription factor Smad-independent T helper 17 cell induction by transforming-growth factor-beta is mediated by suppression of eomesodermin*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 741-54.
67. Pereira, S.G. and F. Oakley, *Nuclear factor-kappaB1: regulation and function*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(8): p. 1425-30.
68. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
69. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 49-62.
70. Wertz, I.E. and V.M. Dixit, *Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(3): p. a003350.
71. Perkins, N.D. and T.D. Gilmore, *Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 759-72.
72. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
73. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221-7.

74. Kucharczak, J., et al., *To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis.* *Oncogene*, 2003. **22**(56): p. 8961-82.
75. Martin, A.G., et al., *Activation of p73 and induction of Noxa by DNA damage requires NF-kappa B.* *Aging* (Albany NY), 2009. **1**(3): p. 335-49.
76. Campbell, K.J., S. Rocha, and N.D. Perkins, *Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B.* *Mol Cell*, 2004. **13**(6): p. 853-65.
77. Ryan, K.M., et al., *Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death.* *Nature*, 2000. **404**(6780): p. 892-7.
78. Zheng, Y., et al., *Combined deficiency of p50 and cRel in CD4+ T cells reveals an essential requirement for nuclear factor kappaB in regulating mature T cell survival and in vivo function.* *J Exp Med*, 2003. **197**(7): p. 861-74.
79. Wan, Y.Y. and J. DeGregori, *The survival of antigen-stimulated T cells requires NFkappaB-mediated inhibition of p73 expression.* *Immunity*, 2003. **18**(3): p. 331-42.
80. Kasibhatla, S., et al., *DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1.* *Mol Cell*, 1998. **1**(4): p. 543-51.
81. Reynolds, J.M., P. Angkasekwina, and C. Dong, *IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity.* *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. **21**(6): p. 413-23.
82. Fort, M.M., et al., *IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo.* *Immunity*, 2001. **15**(6): p. 985-95.
83. Kang, C.M., et al., *Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. **33**(3): p. 290-6.
84. Ikeda, K., et al., *Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation.* *Blood*, 2003. **101**(9): p. 3594-6.
85. Dolgachev, V., et al., *Pulmonary IL-17E (IL-25) production and IL-17RB+ myeloid cell-derived Th2 cytokine production are dependent upon stem cell factor-induced responses during chronic allergic pulmonary disease.* *J Immunol*, 2009. **183**(9): p. 5705-15.
86. Angkasekwina, P., et al., *Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses.* *J Exp Med*, 2007. **204**(7): p. 1509-17.
87. Monteleone, G., F. Pallone, and T.T. Macdonald, *Interleukin-25: a two-edged sword in the control of immune-inflammatory responses.* *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. **21**(6): p. 471-5.
88. Sonobe, Y., et al., *Interleukin-25 expressed by brain capillary endothelial cells maintains blood-brain barrier function in a protein kinase C epsilon-dependent manner.* *J Biol Chem*, 2009. **284**(46): p. 31834-42.
89. Zaph, C., et al., *Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine.* *J Exp Med*, 2008. **205**(10): p. 2191-8.
90. Siegle, J.S., et al., *Early-life viral infection and allergen exposure interact to induce an asthmatic phenotype in mice.* *Respir Res*, 2010. **11**: p. 14.

91. Rickel, E.A., et al., *Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 4299-310.
92. Caruso, R., et al., *Inhibition of monocyte-derived inflammatory cytokines by IL-25 occurs via p38 Map kinase-dependent induction of Socs-3*. Blood, 2009. **113**(15): p. 3512-9.
93. Terashima, A., et al., *A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity*. J Exp Med, 2008. **205**(12): p. 2727-33.
94. Stock, P., et al., *Induction of airway hyperreactivity by IL-25 is dependent on a subset of invariant NKT cells expressing IL-17RB*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 5116-22.
95. Saenz, S.A., et al., *IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1362-6.
96. Neill, D.R., et al., *Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1367-70.
97. Price, A.E., et al., *Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(25): p. 11489-94.
98. Wang, Y.H., et al., *IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1837-47.
99. Angkasekwinai, P., et al., *Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling*. Nat Immunol, 2010. **11**(3): p. 250-6.
100. Fallon, P.G., et al., *Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 1105-16.
101. Kleinschek, M.A., et al., *IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 161-70.
102. Emamaullee, J.A., et al., *Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice*. Diabetes, 2009. **58**(6): p. 1302-11.
103. Caruso, R., et al., *Interleukin-25 inhibits interleukin-12 production and Th1 cell-driven inflammation in the gut*. Gastroenterology, 2009. **136**(7): p. 2270-9.
104. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
105. Chtanova, T., et al., *T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 68-78.
106. Spolski, R. and W.J. Leonard, *Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 57-79.
107. Tato, C.M., A. Laurence, and J.J. O'Shea, *Helper T cell differentiation enters a new era: le roi est mort; vive le roi!* J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 809-12.
108. Owyang, A.M., et al., *Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 843-9.
109. Coquet, J.M., et al., *IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2827-34.

110. Parrish-Novak, J., et al., *Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 57-63.
111. Jin, H., et al., *Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 657-65.
112. Casey, K.A. and M.F. Mescher, *IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7640-8.
113. Brady, J., et al., *IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2048-58.
114. Mehta, D.S., et al., *IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4111-8.
115. Brandt, K., et al., *Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(6): p. 1379-82.
116. Zhou, L., et al., *IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 967-74.
117. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
118. Wurster, A.L., et al., *Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells*. J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 969-77.
119. Ozaki, K., et al., *A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production*. Science, 2002. **298**(5598): p. 1630-4.
120. He, H., et al., *Combined IL-21 and low-dose IL-2 therapy induces anti-tumor immunity and long-term curative effects in a murine melanoma tumor model*. J Transl Med, 2006. **4**: p. 24.
121. Moroz, A., et al., *IL-21 enhances and sustains CD8+ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 900-9.
122. Vollmer, T.L., et al., *Differential effects of IL-21 during initiation and progression of autoimmunity against neuroantigen*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2696-701.
123. Asao, H., et al., *Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 1-5.
124. Bauquet, A.T., et al., *The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 167-75.
125. Ozaki, K., et al., *Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5361-71.
126. Lawrence, T., *The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a001651.

127. Mitchell, T.C., et al., *Stronger correlation of bcl-3 than bcl-2, bcl-xL, costimulation, or antioxidants with adjuvant-induced T cell survival.* Ann N Y Acad Sci, 2002. **975**: p. 114-31.
128. Campbell, K.J. and N.D. Perkins, *Regulation of NF-kappaB function.* Biochem Soc Symp, 2006(73): p. 165-80.
129. Lee, J., et al., *BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets.* Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 416036.
130. Miller, A.M., *Role of IL-33 in inflammation and disease.* J Inflamm (Lond), 2011. **8**(1): p. 22.
131. Kurowska-Stolarska, M., et al., *Interleukin-33: a novel mediator with a role in distinct disease pathologies.* J Intern Med, 2011. **269**(1): p. 29-35.
132. Ghoreschi, K., et al., *Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling.* Nature, 2010. **467**(7318): p. 967-71.
133. Chackerian, A.A., et al., *IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex.* J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2551-5.
134. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines.* Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-90.
135. Carriere, V., et al., *IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(1): p. 282-7.
136. Rank, M.A., et al., *IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response.* J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 1047-54.
137. Kurowska-Stolarska, M., et al., *IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4.* J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4780-90.
138. Komai-Koma, M., et al., *IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells.* Eur J Immunol, 2007. **37**(10): p. 2779-86.
139. Cherry, W.B., et al., *A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(6): p. 1484-90.
140. Iikura, M., et al., *IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells.* Lab Invest, 2007. **87**(10): p. 971-8.
141. Smithgall, M.D., et al., *IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells.* Int Immunol, 2008. **20**(8): p. 1019-30.
142. Humphreys, N.E., et al., *IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes.* J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2443-9.
143. Lloyd, C.M., *IL-33 family members and asthma - bridging innate and adaptive immune responses.* Curr Opin Immunol, 2010. **22**(6): p. 800-6.
144. Lamkanfi, M. and V.M. Dixit, *IL-33 raises alarm.* Immunity, 2009. **31**(1): p. 5-7.
145. Luthi, A.U., et al., *Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases.* Immunity, 2009. **31**(1): p. 84-98.
146. Fichtner-Feigl, S., et al., *Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis.* J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5859-70.

147. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
148. Tak, P.P. and G.S. Firestein, *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 7-11.
149. Lawrence, T., et al., *Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1291-7.
150. Tomczak, M.F., et al., *NF-kappa B is required within the innate immune system to inhibit microflora-induced colitis and expression of IL-12 p40*. J Immunol, 2003. **171**(3): p. 1484-92.
151. Erdman, S., et al., *Typhlocolitis in NF-kappa B-deficient mice*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1443-7.
152. Wong, C.K., et al., *Interleukin-25-induced chemokines and interleukin-6 release from eosinophils is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor-kappaB*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(2): p. 186-94.

## **Danksagung**

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Stefan Fichtner-Feigl, für die spannende Möglichkeit zur Promotion und für die immer geduldige und ermutigende Betreuung besonders danken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden unserer Arbeitsgruppe für die sehr schöne gemeinsame Zeit mit viel fachlicher und persönlicher Unterstützung. Besonders danke ich Manuela Kovács für das geduldige Einlernen in die (sterile) Laborarbeit und die vielen Ratschläge, und Dr. Rebecca Kesselring für die großartige Betreuung und Hilfestellung während allen Phasen der Versuche und der Promotion. Mein großer Dank gilt auch Maria Martin und Gabriela Schiechl, die immer mit Rat, Tat und Motivation zur Seite standen.

