

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE

Direktor: Prof. Dr. H. J. Schlitt

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Default-Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen  
führt zu IL-25 produzierenden T-Zellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt

von Ekaterina Noeva

2014



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE

Direktor: Prof. Dr. H. J. Schlitt

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Default-Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen  
führt zu IL-25 produzierenden T-Zellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt

von Ekaterina Noeva

2014

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

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Florian Obermeier

Tag der mündlichen Prüfung: 07. November 2014

Meinem geliebten Ehemann



## Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1 Das Immunsystem	8
1.2 T Helfer Zellen	9
1.3 IL-25	15
1.4 Zielsetzung	15
<b>2 MATERIAL</b>	<b>16</b>
2.1 Geräte	16
2.2 Verbrauchsmaterial	16
2.3 Chemikalien, Kits und Reagenzien	17
2.4 Zytokine	19
2.5 Antikörper	19
2.5.1 Stimulationsantikörper für Zellkultur	19
2.5.2 Antikörper für Durchflusszytometrie	20
2.5.3 Antikörper für Western-Blot	20
2.6 RT-qPCR-Primer für murine Sequenzen	20
2.7 Herstellung Puffer, Medien, Lösungen, Gele	21
2.8 Software, Datenbanken	22
2.9 Tiere	23
<b>3 METHODEN</b>	<b>24</b>
3.1 Zellbiologische Methoden	24
3.1.1 Lymphozytenisolierung aus der Milz	24
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl	24
3.1.3 Isolierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen mittels MACS <sup>®</sup>	25
3.1.4 In vitro T-Zell Differenzierung	26
3.2 Durchflusszytometrie (FACS)	27
3.2.1 Analyse der Oberflächenantigenexpression	28
3.2.2 Analyse der intrazellulären Proteine	29
3.2.3 iTreg Induktion	29

## Inhaltsverzeichnis

3.2.4 Proliferationsassay	30
3.3 Molekularbiologische Methoden	30
3.3.1 RNA-Isolierung	30
3.3.2 RNA-Quantifizierung	31
3.3.3 Reverse Transkription	31
3.3.4 Primerdesign	32
3.3.5 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR, qPCR)	33
3.3.6 DNA-Gel-Elektrophorese	35
3.3.7 DNA-Isolierung durch Gel-Extraktion	36
3.3.8 DNA-Sequenzierung	36
3.4 Proteinbiochemische Methoden	37
3.4.1 Zelllyse zur Proteingewinnung	37
3.4.2 Protein-Quantifizierung	37
3.4.3 SDS-Gelelektrophorese	38
3.4.4 Western-Blot	40
3.5 Statistik	42
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
4.1 IL-25 Produktion unter T-Zell-Stimulation von naiven CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	43
4.2 Komplette „Default“ Stimulation als Notwendigkeit für Th25 Entstehung	45
4.3 Th25 produziert keine Zytokine der anderen T-Helfer-Zelllinien	47
4.4 Th25 Stimulationsbedingungen induzieren keine inhibitorischen Foxp3 <sup>+</sup> Treg	49
4.5 Klassische T-Helfer Transkriptionsfaktoren sind nicht für die Th25 Differenzierung verantwortlich	49
4.6 Th25 Zellen zeigen eine reduzierte Proliferationsrate	50
4.7 Th25 – Phänotyp anhand der Oberflächenantigene	51
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>53</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>
<b>QUELLENVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>64</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Abstammung der zellulären Blutbestandteile des Immunsystems	9
Abb. 2: T-Zell Aktivierung	11
Abb. 3: T-Zell-Differenzierung	14
Abb. 4: Stimulationsschema zur T-Zell-Differenzierung	26
Abb. 5: Funktionsweise einer Durchflusszytometrie	28
Abb. 6: Aufbau eines Westernblots	40
Abb. 7: (gleich Abb. 4) Stimulationsschema zur T-Zell-Differenzierung	43
Abb. 8: IL-25 Expression in unterschiedlichen T-Zell Populationen	44
Abb. 9: Westernblot: Expression von IL-25 in Th25 und in Th0	45
Abb. 10: Stimulationsschema „Default“-Stimulation	45
Abb. 11: mRNA IL-25, Stimulationskombination mit inhibierenden Antikörpern	46
Abb. 12A: Th1 und Th25 FACS-Analyse bezüglich IFN $\gamma$ Expression	47
Abb. 12B: IL-17 Produktion durch Th17 und Th25	48
Abb. 13: PCR-Genexpressionsanalyse der charakteristischen T Helper Zytokine	48
Abb. 14: FACS-Analyse zur Foxp3-GFP Expression der Th25 und der iTreg	49
Abb. 15: PCR-Expressionsanalyse von T-bet, Gata3 und Ror $\gamma$ t	50
Abb. 16: Proliferationsrate der T-Zell Populationen	51
Abb. 17: Charakteristisches Muster der Oberflächenantigene	52

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin (bowine serum albumine)
BSS	gepufferte Salzlösung (buffered salt solution)
CD	Differenzierungs-Cluster (cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre (copy) DNA
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
GFP	Green fluorescent protein
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>BIDEST</sub>	zweifach destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	zweifach destilliertes, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztes Wasser
IFN	Interferon
IL	Interleukin
M	molar (mol/l)
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF-kB	nuklearer Faktor kB
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Entwicklungsort des Kulturmediums)

## Abkürzungsverzeichnis

RT-qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (real-time quantitative polymerase chain reaction)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese
TEMED	N’N’N’N’-Tetramethylethylendiamin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
WB	Westernblot

## 1 Einleitung

Immunologie ist die Lehre über die komplexe Funktionsweise der Erkennungs- und Abwehrmechanismen eines Lebewesens gegenüber körperfremden und körpereigenen Pathogenen [3]. Dazu gehört auch der Ablauf einer Infektion und der Pathomechanismus des Entzündungsprozesses.

Diese junge Wissenschaft entstand im späten 18. Jahrhundert als Edward Jenner erkannte, dass eine relativ harmlose Erkrankung an Kuhpocken eine oft tödliche Pocken-Erkrankung verhinderte [4]. Im Laufe der Geschichte folgte neben der Pocken-Impfung die Entwicklung der modernen Impfungen gegen Tollwut, Tetanus, Diphtherie und viele weitere.

Im späten 19. Jahrhundert stellte Robert Koch fest, dass Infektionserkrankungen von Mikroorganismen ausgelöst werden, wobei ein jeweils bestimmter Mikroorganismus für eine spezifische Erkrankung verantwortlich ist [5].

Einer der Gründeräte der Immunologie, Elie Metchnikoff, entdeckte die zelluläre Komponente der Immunantwort und beschrieb als erster die Phagozytose, wofür er im Verlauf neben Paul Ehrlich, dem Entdecker der humoralen Komponente der Immunantwort, einen Nobelpreis erhielt [6], [7]. Als Folge von Emil von Behrings und Shibasaburo Kitasatos Entdeckung einer „Aktivität“ des Serums immuner Tiere, welche einen kurzzeitigen Schutz gegen Diphtherie- und Tetanustoxine im Menschen bietet, wurde der heutige Begriff „Antikörper“ geprägt [8].

Als rasch klar wurde, dass das Entstehen von Antikörpern nach Kontakt mit verschiedenen Substanzen induziert werden kann, wurden diese Substanzen unter dem Begriff Antigene (*antibody generation*) zusammengefasst. Auf dieser Antikörper-Antigen-Reaktion und Interaktion basiert die immunologische Forschung.

Die Errungenschaften der Immunologie sind es, die beispielsweise dazu führten, dass die Weltgesundheitsorganisation 1979 Pocken für eradiziert erklärte, dass nach Erkennung der Blutgruppen-Antigene Bluttransfusionen zu einer nebenwirkungsarmen Routinetherapie

gehören und dass Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen verhindert oder eingedämmt werden können [1].

## ***1.1 Das Immunsystem***

Das Immunsystem besteht aus einer angeborenen, unspezifischen Immunantwort, die ein breites Spektrum an Pathogenen bekämpfen kann, und einer adaptiven oder auch erworbenen Immunantwort, die spezifisch auf das einzelne Pathogen oder seine Bestandteile erfolgen kann. Dabei kann das immunologische Gedächtnis einen lebenslangen Schutz gegen Infektionen bieten.

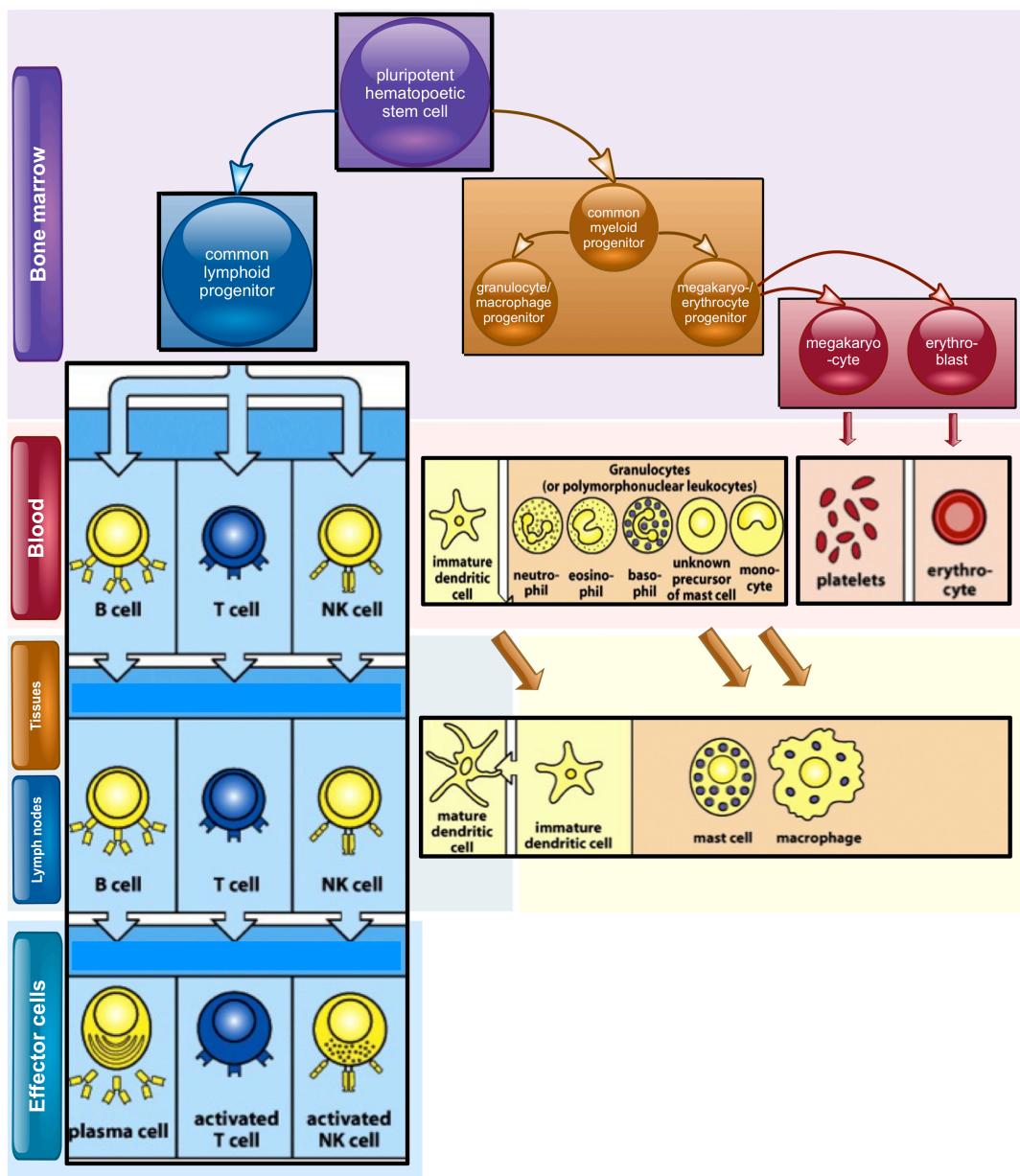
Dem Schutz durch das Immunsystem liegen vier Hauptaufgaben zu Grunde. Die immunologische Erkennung, welche durch Leukozyten des angeborenen Immunsystems mit einer sofortigen Antwort und durch Lymphozyten des erworbenen Immunsystems erfolgt, ist der erste Schritt. Der zweite Schritt ist das Aufhalten oder, wenn möglich, Eliminieren der Infektion, was durch Komplementsystem, Antikörper, Leukozyten und Lymphozyten gewährleistet wird. Gleichzeitig muss als dritte Aufgabe die Immunantwort kontrolliert und reguliert ablaufen, damit der eigene Organismus nicht angegriffen wird und es nicht zu überschießenden Reaktionen kommt. Die vierte Hauptfunktion ist das immunologische Gedächtnis, welches einen Schutz für eine zukünftige Infektion mit einer rascheren Antwort bietet [9], [2], [10].

Das angeborene Immunsystem hat neben der löslichen Komponente, bestehend aus Komplementfaktoren, Interferonen und anderen Proteinen auch eine zelluläre Ebene. Diese beruht auf den phagozytierenden weißen Blutkörperchen, wie z.B. den Makrophagen, die befähigt sind, Mikroorganismen unspezifisch zu verdauen, indem sie eine Vielzahl toxischer Chemikalien und Verdauungsenzyme produzieren [7], [2], [10]. Die angeborene Immunantwort ist eine sofortige Antwort auf einen infektiösen Organismus. Überlappend, jedoch Tage später, folgt die Antwort des adaptiven Immunsystems viel effizienter als die des angeborenen. Es beruht auf der Fähigkeit der Lymphozyten ein Antigen anhand von hochspezialisierten Antigenrezeptoren zu erkennen und spezifisch darauf zu antworten. Ermöglicht wird dies durch antigenpräsentierende Zellen (APCs), welche ein Antigen an eine Vielzahl von Lymphozyten präsentieren. Die Lymphozyten besitzen dabei ein riesiges

Repertoire an Antigenrezeptoren, um eine Antwort auf nahezu jedes mögliche Antigen, welchem ein menschlicher Organismus in seinem Leben begegnen könnte, zu gewährleisten [2], [10].

## **1.2 T Helper Zellen**

Die Zellen des Immunsystems nehmen ihren Ursprung aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Nachdem sie im Knochenmark und im Thymus differenzieren und reifen, wandern sie in peripheres Gewebe ab oder zirkulieren im Blutkreislauf bzw. im lymphatischen System. Während Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und Erythrozyten aus der myeloischen Linie abstammen, differenzieren B- und T-Lymphozyten sowie die natürlichen Killerzellen (NK) aus der lymphatischen Vorläuferzelle. Dabei ist die natürliche Killerzelle Teil des angeborenen Immunsystems, während die B- und T-Lymphozyten als Teil der antigenspezifischen Reaktionen zum adaptiven Immunsystem gehören [9], [2], [10].

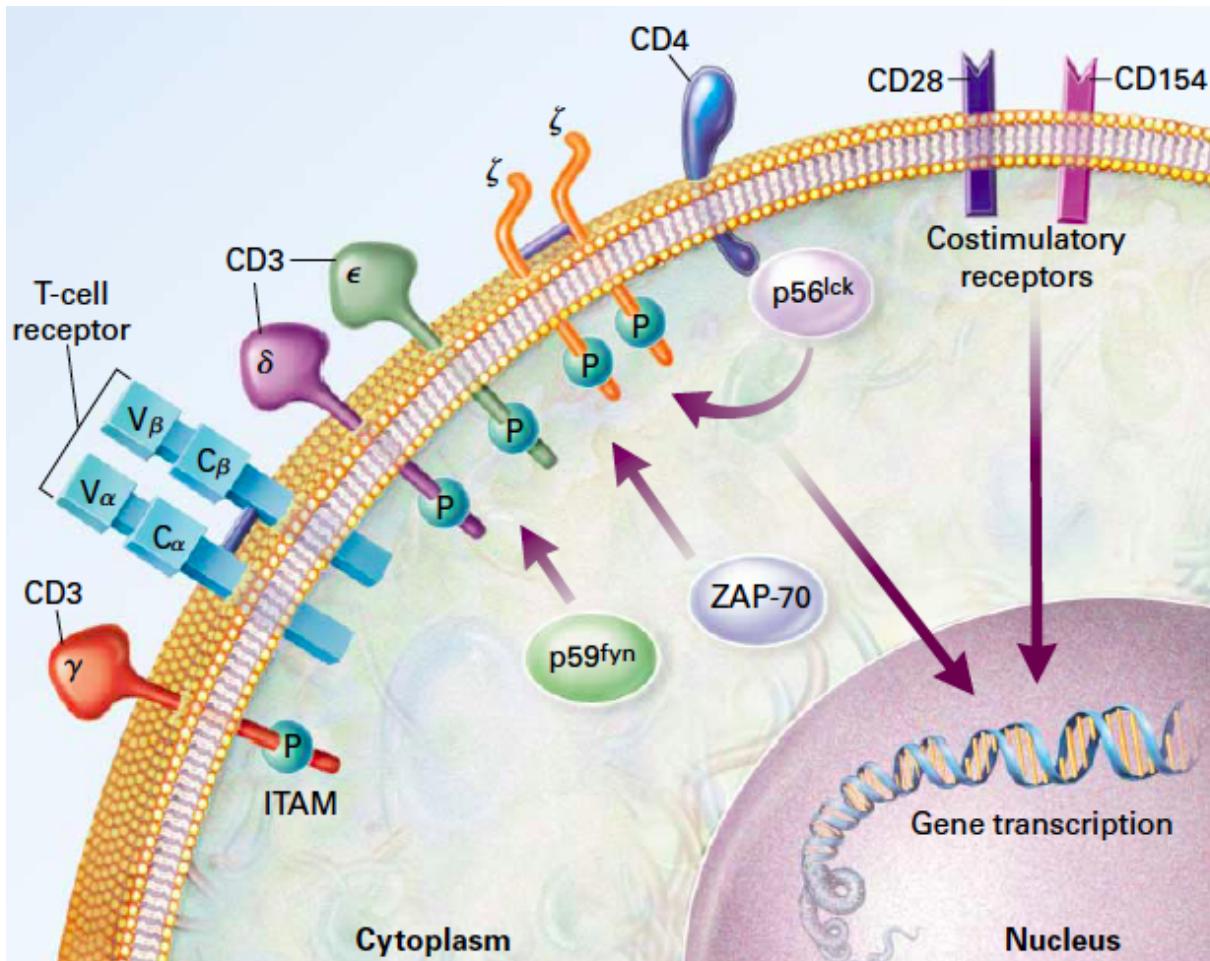


**Abb. 1 Abstammung der zellulären Blutbestandteile des Immunsystems.** Alle zellulären Blutbestandteile einschließlich der Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Diese pluripotenten Zellen teilen sich in zwei Stammzellarten: lymphatische Progenitorzelle und myeloische Progenitorzelle. Aus der lymphatischen Progenitorzelle (blauer Hintergrund) stammt die lymphatische Zelllinie der Leukozyten ab, welche die natürlichen Killerzellen sowie die T- und B-Lymphozyten beinhaltet. Aus der myeloischen Progenitorzelle entsteht die myeloische Zelllinie mit restlichen Leukozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten (Vorläuferzellen der Thrombozyten). T- und B- Lymphozyten unterscheiden sich von anderen Leukozyten durch den Besitz von Antigenrezeptoren. Untereinander unterscheiden sie sich durch den Ort der Differenzierung – den Thymus bzw. das Knochenmark. Nachdem sie auf ein Antigen treffen, differenzieren B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen, während T-Zellen in Effektor-T-Zellen mit einer Vielfalt an Funktionen differenzieren. Bild modifiziert nach [1]

Lymphozyten, die noch keinem Antigen begegnet sind, werden als naive Lymphozyten bezeichnet. Diejenigen, die ihrem Antigen bereits begegnet sind, werden aktiviert und differenzieren in voll funktionsfähige Lymphozyten auch bekannt als Effektor-Zellen.

Nach Aktivierung der B-Zelle differenziert diese in eine Plasmazelle und produziert spezifische Antikörper - die Immunoglobuline.

Werden naive T-Lymphozyten mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) aktiviert, proliferieren und differenzieren sie in einen der unterschiedlichen funktionellen Subtypen der Effektor-T-Lymphozyten. Ihre Funktionen sind die drei groben Richtungen Töten, Aktivieren und Regulieren. Hierbei sind die zytotoxischen T-Zellen, die das Oberflächenprotein CD8 tragen, für das Beseitigen der mit Viren oder intrazellulären Pathogenen infizierten Körperzellen verantwortlich. Regulatorische T-Zellen supprimieren die Aktivität anderer Lymphozyten, kontrollieren damit die Immunantwort und schützen vor einer überschießenden Reaktion. Die Aufgabe der T-Helfer Zellen, die das Oberflächenantigen CD4 exprimieren, ist es, das Zusammenspiel der zellulären Bestandteile der Immunantwort zu koordinieren, z.B. antigen-stimulierte B-Zellen zur Differenzierung und Antikörperproduktion oder auch Makrophagen zu effizienterem Töten von Pathogenen anzutreiben [1], [2], [10].



**Abb. 2 T-Zell Aktivierung.** Die Aktivierung von T-Zellen involviert eine hochkomplexe Abfolge von Prozessen, die aus dem Cross-Linking des Antigenrezeptors an der Zelloberfläche resultieren. Da Antigenrezeptoren nur kurze zytoplasmatische Enden haben, sind sie mit CD3 und  $\zeta$ -Ketten-Signaltransduktion assoziiert. Das Initialstadium der Aktivierung beinhaltet außerdem das Binden des zytoplasmatischen Endes von CD4 (in T-Helfer-Zellen) oder CD8 (in zytoplasmatischen Zellen). Signale von ko-stimulierenden Rezeptoren wie CD28 oder CD154 müssen ebenfalls vorhanden sein, um den Lymphozyten zu aktivieren. [2]

Um ihre spezifischen Aufgaben auszuüben, können CD4<sup>+</sup> T Helperzellen (Th) in bestimmte Untergruppen polarisieren. Dies geschieht als Folge einer T-Zell-Rezeptor Aktivierung durch ein Antigen.

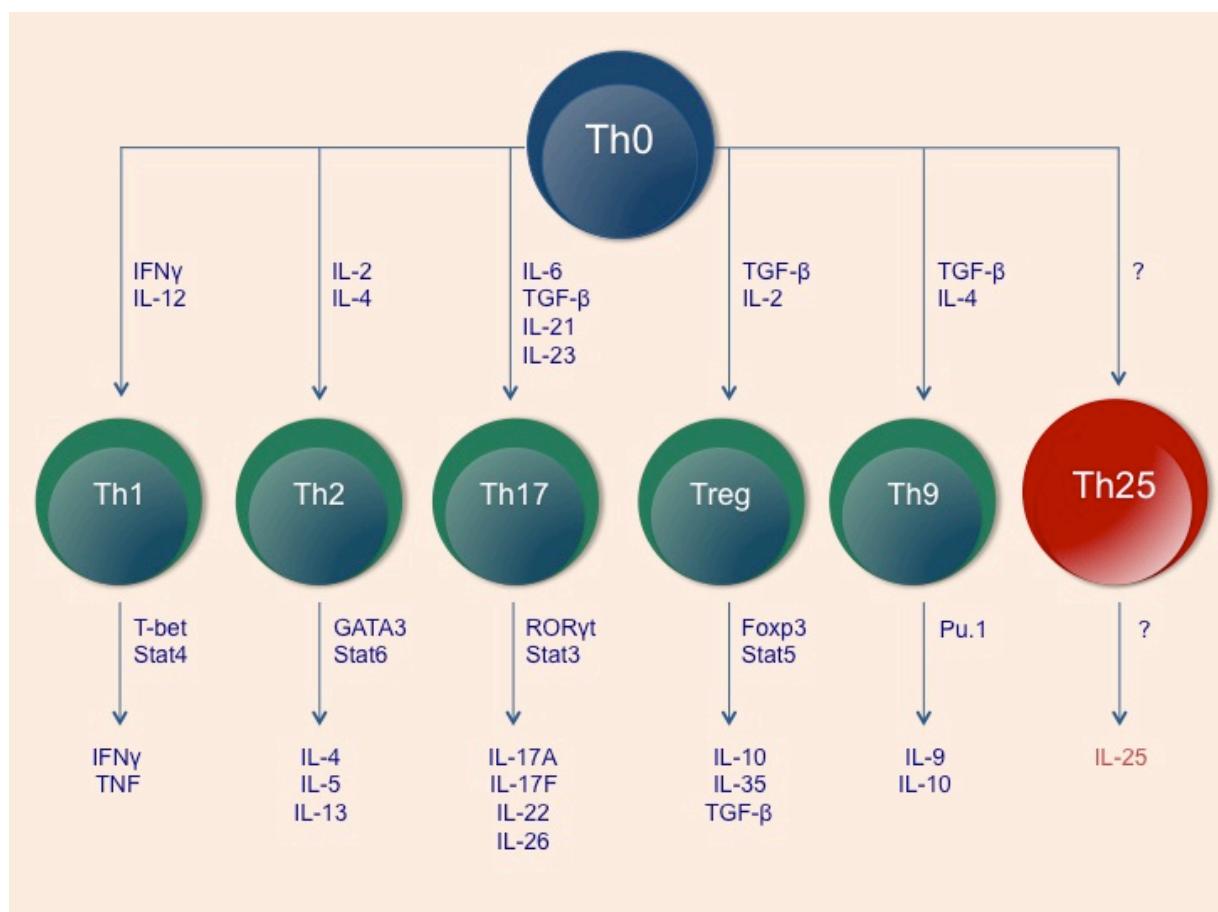
Etwa zwei Dekaden lang galt das Paradigma, dass T-Helfer Zellen in zwei funktionelle Gruppen – Th1 und Th2 – eingeteilt werden können. Th1 produzieren hauptsächlich IFN $\gamma$ , welches für die Aktivierung von Makrophagen sowie die Beseitigung intrazellulärer Pathogene wichtig ist. Th2 Zellen hingegen produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und sind für die IgE Produktion, die Rekrutierung von Eosinophilen und das Beseitigen von extrazellulären Parasiten verantwortlich [11], [12], [13], [14]. Im Laufe der letzten Jahre konnten eine Interleukin 17 (IL-17) produzierende Th17-Zell-Gruppe, eine Transforming Growth Factor –  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )-induzierte regulatorische T-Zellgruppe (iTreg) sowie eine IL-9-produzierende Th9 Zellgruppe identifiziert werden und damit das Portfolio der CD4<sup>+</sup> Effektor-Zellen erweitert werden [15], [16], [17], [18], [19], [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28].

Es wurde gezeigt, dass TCR-vermittelte Signale in Kombination mit spezifischer Zytokinstimulation eine direkte Differenzierung in eine bestimmte T-Zell-Richtung bewirken und damit eine Bestimmung dieser speziellen T-Zell-Population festlegen. Eine starre Polarisierung in eine T-Zell-Population wird *in vivo* jedoch normalerweise nicht beobachtet und so wurde in jüngster Vergangenheit eine funktionelle T-Helfer-Zell-Plastizität demonstriert [29], [30]. Folglich ist der funktionelle Unterschied der T-Helfer-Zellen assoziiert mit einer gewissen Flexibilität und wird durch eine Vielfalt von Faktoren der *in vivo* Mikroumgebung bestimmt, wie zum Beispiel durch die Ausprägung des initialen TCR Signals, durch Zytokine, durch epigenetische Faktoren und durch Interaktionen mit anderen Zelltypen [31].

Th1-Effektor-Differenzierung setzt die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors T-bet und des T-Zell stimulierenden Zytokins IL-12 voraus [32], [33]. Die Entstehung von Th2 Zellen wird durch den Transkriptionsfaktor Stat6 und das Zytokin IL-4 koordiniert und durch die Expression und Funktion des Transkriptionsfaktors Gata-3 determiniert. Fort et al. haben herausgefunden, dass unter den Voraussetzungen für die Entstehung von Th2-Zellen, naive

CD4<sup>+</sup> T Helper Zellen im Stande sind, das Zytokin IL-25 (auch bekannt unter IL-17E) zu produzieren [34].

Wie erwähnt, wurden neue Mitglieder der T-Zell Familie bereits beschrieben. Zum einen sind es die Th17 Zellen, die generiert werden, wenn naive CD4<sup>+</sup> T Zellen mit IL-6 und TGF- $\beta_1$  stimuliert werden und hierbei der determinierende Transkriptionsfaktor Ror $\gamma$ T heraufreguliert wird [15], [17], [18], [19], [20]. Um zum anderen zu IL-9 produzierenden T-Helfer-Zellen zu werden, müssen naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen den Zytokinen IL-4 und TGF- $\beta_1$  begegnen, was zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Pu.1 führt [25], [26], [27]. Das bisherige Portfolio wird komplettiert durch induzierte Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (iTreg), welche nach Stimulation naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit TGF- $\beta_1$  und IL-2 generiert werden [28], [35]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine gerichtete T-Zell-Differenzierung außer einer TCR Stimulation mit CD3 $\epsilon$  und CD28 Ko-Stimulation eine Signalkooperation spezifischer Zytokine erfordert, um eine distinkte T Helper Zell Population zu generieren [1], [36], [37].



**Abb. 3 T-Zell-Differenzierung** in unterschiedliche Effektorzellen mit charakteristischem Zytokin- und Transkriptionsfaktorprofil.

### 1.3 IL-25

Wie oben dargestellt, konnte gezeigt werden, dass polarisierte Th2 Zellen im Stande sind IL-25 zu produzieren [34]. Dieses Mitglied der IL-17 Zytokinfamilie spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Th2 und Th9 Antwort in vivo [38], [39], [40]. Somit hat IL-25 eine entscheidende Stellung in sowohl der Induktion eines Schutzes gegen Parasiten als auch in der Entwicklung einer allergischen Reaktion. Dies wird durch die Tatsache demonstriert, dass systemisches Verabreichen oder transgenetische Überexpression von IL-25 in erhöhter IL-4 und IL-13 Produktion resultiert und so auch zum erhöhten Serum-Immunoglobulin E führt [34]. Nachfolgend führt eine erhöhte IL-25 Expression zu pathogenetischen Veränderungen in der Lunge und im Darm mit eosinophilen Infiltraten, erhöhter Schleimproduktion sowie Epithezellhyperplasie [34]. Des Weiteren vermittelt IL-25 durch IL-17RB Effekte an Th9 Zellen, welche in hohem Maße IL-17RB exprimieren [38]. Eine weitere wichtige Wirkung von IL-25 liegt in der negativen Regulation der inflammatorischen Antwort. Beispielsweise konnte durch exogenes Verabreichen von IL-25 eine experimentelle Autoimmunenzephalitis bei Mäusen verhindert werden [41]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IL-25 während der Übergangsphase von der chronischen Entzündung des Darms zum Umbau in eine Kolon-Fibrose hochreguliert ist [42].

### 1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Produktion von IL-25 durch T-Helfer-Zellen zu untersuchen. Es werden folgende Ziele formuliert:

**Ziel 1:** Analyse der Zytokinproduktion durch T-Helfer-Zellen infolge kontinuierlicher TCR Stimulation samt Ko-Stimulation unter „Default“-Polarisation;

**Ziel 2:** Analyse der phänotypischen Eigenschaften der IL-25 produzierenden T Helfer Zellen;

**Ziel 3:** Analyse der Konditionen, unter denen CD4+ T Helfer Zellen IL-25 produzieren;

**Ziel 4:** Abgrenzung der Th25 von bisher bekannten T Helfer Zellpopulationen;

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Hersteller, Herkunft
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Blot-Entwickler M35 X-Omat Processor	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Blotting Gerät Trans-Blot Turbo	Bio Rad, München, Deutschland
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Chemikalienmixer Automixer II Plus	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Durchflusszytometer (FACS Aria)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophorese Mini Protein Tetra System	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese Wide mini sub cell GT	Bio-Rad, München, Deutschland
ELISA-Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Light Cycler	Roche, Mannheim, Deutschland
MACS Magnetvorrichtung	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Schubert & Weiss OMNILAB, München, Deutschland
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettboy	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipetten (5µl, 10µl, 20µl, 50µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Quarzküvette Suprasil 10 mm Schichtdicke	Hellma, Müllheim, Deutschland
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie	Scientific Industries, New York, USA
Wasserreinigungsanlage	Millipore, Schwalbach, Deutschland
X-Ray Kassette	SAI Global, Sydney, Australien
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland

### 2.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller, Herkunft
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Chromatography Paper 3MM Chr	Whatman, Maidstone, UK

---

Foto-Film (medical X-Ray)	AGFA, Köln, Deutschland
LightCycler® Capillaries	Roche, Mannheim, Deutschland
MACS-Magnetsäule	Myltenyi Biotec, Gladbach, Deutschland
Mikrotiterplatten (24-Well, Flachboden)	Costar, Corning., Kaiserslautern, Deutschland
Mikrotiterplatten (24-Well, Flachboden)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Mikrotiterplatten (96-Well, Flachboden)	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
Mikrotiterplatten (96-Well, Rundboden)	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
Parafinfilm M	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50 ml)	Corning, Kaiserslautern, Deutschland oder Greiner bio one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter	Molecular BioProducts, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Protran Nitrocellulose Membran 0,45 µm	Whatman, Maidstone, UK
Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzen (5ml)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Sterilfilter Steriflip	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Sterilsiebe (40µm, 70µm)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Zentrifugenrührchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg, Deutschland

---

### 2.3 Chemikalien, Kits und Reagenzien

---

Reagenzien, Kits	Hersteller, Herkunft
ACK Lysing Buffer	GIBCO, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
AffinityScript™ QPCR cDNA Synthesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Agarose: peqGOLD universal Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
BCA Assay Protein Quantitation Kit (Reagent A + B)	Uptima, Interchim, Montluçon Cedex, Frankreich
BD Golgi-Plug™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bis-Acryl-Amid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
BSA	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
CFSE	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

---

---

Dead cell Removal Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
DEPC behandeltes H <sub>2</sub> O	VWR, Darmstadt, Deutschland
DNA Ladder (100 bp)	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	Universität Regensburg, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FCS (Fetal calf serum)	Uptima, Interchim, Montluçon Cedex, Frankreich
Flow Cytometry Fixations & Permeabilization Kit	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Formaldehyd 1%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutamax	GIBCO, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
HBSS (Hank's buffered salt solution)	PAA, Cölbe, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
LightCycler <sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim, Deutschland
MACS <sup>®</sup> T-Cell Isolation kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mausserum (1%)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
NP40 Alternative	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
PeqGold Proteinmarker V	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
peqGold TriFast	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PMA	InvivoGen, San Diego, USA
Prestained Proteine Marker	NEB, Ipswich, UK
Protease-Inhibitor	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
QIAquick Gel extraction kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reblot Plus	Chemicon International, Temecula, USA

---

---

RNAlater®	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640	GIBCO, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Supersignal Westfemto	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Temed	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Merck, Darmstadt, Deutschland
TWEEN 20	Applichem, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	GIBCO, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

---

## 2.4 Zytokine

---

Zytokin	Hersteller, Herkunft
IL-2 (murin)	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
IL-6 (murin)	Peprotech, Hamburg, Deutschland
IL-12 (murin)	Peprotech, Hamburg, Deutschland
IL-21 (murin)	Peprotech, Hamburg, Deutschland
IL-23 (murin)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
IL-25 (murin)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
TGF-β (human)	Peprotech, Hamburg, Deutschland

---

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Stimulationsantikörper für Zellkultur

---

Antikörper	Host	Clon	Hersteller, Herkunft
anti-CD3ε	Hamster	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD28	Hamster	37.51	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
anti-IL4	Ratte	11B11	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
anti-IL12	Ratte	C18.2	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
anti-IFNy	Ratte	R4-6A2	eBiosciences, Frankfurt, Deutschland

---

## 2.5.2 Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Isotyp	Klon	Hersteller, Herkunft
CD4	PE-Cy5	RatIgG2a, κ	GK1.5	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD4	PE	RatIgG2a, κ	H129.19	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD25	APC	RatIgG1, λ	PC61.5	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD25	PE	RatIgG1, λ	PC61.5	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD45 RB	FITC	RatIgG2a, κ	C363.16A	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD62L	PE	RatIgG2a, κ	MEL-14	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD69	FITC	Armenian Hamster IgG	H1.2F3	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
CD134 (= OX40)	PE	RatIgG1, κ	OX-86	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
ICOS	PE-Cy5	RatIgG2b, κ	7E.17G9	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
IFN-γ	FITC	RatIgG1, κ	XMG1.2	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
IL-13	PE	RatIgG1, κ	eBio13A	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
IL-17	PE	RatIgG1, κ	eBio17B7	eBioscience, Frankfurt, Deutschland

## 2.5.3 Antikörper für Western-Blot

Antikörper	Host	Clon	Hersteller, Herkunft
anti-IL-17E (Primär-AK)	Ratte	207710	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
anti-Rat-HRP (Sekundär-AK)	Ziege	sc-2032	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-β-Aktin (Primär-AK)	Ziege	C-11	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-goat HRP (Sekundär)-AK	Esel	sc-2020	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

## 2.6 RT-qPCR-Primer für murine Sequenzen

Gen		Tm (°C)	GC-Gehalt	Produkt	Sequenz 5' → 3'
Aktin	forward	64°	55%	138 bp	AGAGGGAAATCGTGCCTGAC
	reverse		52,4%		CAATAGTGATGACCTGGCCGT
Foxp3	forward	56°	50%	185 bp	TTCATGCATCAGCTCTCCAC
	reverse		55%		CTGGACACCCATTCCAGACT
GATA-3	forward	56°	60%	160 bp	GGCTACGGTGCAGAGGTATC
	reverse		55%		GATGGACGTCTGGAGAAGG
IFNγ	forward	58°	50%	237 bp	ACTGGCAAAAGGATGGTGAC
	reverse		45%		TGAGCTCATTGAATGCTTGG

IL-4	forward	60°	55%	177 bp	TCAACCCCCAGCTAGTTGTC
	reverse		50%		TGTTCTCGTTGCTGTGAGG
IL-9	forward	56°	50%	241 bp	TGATTGTACCACACCGTGCT
	reverse		45%		GCTTTCTGCCTTGATCT
IL-10	forward	58°	45%	162 bp	CCAAGCCTTATCGGAAATGA
	reverse		45%		TTTCACAGGGGAGAAATCG
IL-13	forward	58°	55%	180 bp	CAGCATGGTATGGAGTGTGG
	reverse		45%		TGGGCTACTTCGATTTGGT
IL-17	forward	58°	55%	239 bp	TCCAGAAGGCCCTCAGACTA
	reverse		50%		AGCATCTTCTCGACCCTGAA
IL-25	forward	65°	60%	251 bp	CTACAGACAGGCTCCCACATGGACC
	reverse		58,3%		CCTGCTGCTTCAGGTAGGGCTTG
ROR $\gamma$ T	forward	57°	55%	154 bp	GC GGAGCAGACACACTTACA
	reverse		45%		GTTTGGCCAAGGTATTGGA
STAT-3	forward	56°	45%	215 bp	GACCCGCCAACAAATTAAGA
	reverse		50%		TCGTGGTAAACTGGACACCA
T-bet	forward	58°	60%	121 bp	GGTGTCTGGAAAGCTGAGAG
	reverse		50%		GAAGGACAGGAATGGAAACA

## 2.7 Herstellung Puffer, Medien, Lösungen, Gele

Puffer	Zusammensetzung
<u>Agarosegel (1%)</u>	H <sub>2</sub> O 67% TAE (1x) 1% (w/v) Agarose 0,007% Ethidiumbromid
<u>Laufpuffer (WB)</u>	192 mM Glycerin 0,5 M Tris 1% SDS
<u>MACS- Puffer (Zellsortierung)</u>	PBS 2 mM EDTA 75 $\mu$ M BSA
<u>RPMI 1640 (Zellkultur)</u>	RPMI 1640 10% FRC 1% Penicillin/Streptomycin 1% glutamin 0,1% $\beta$ -Mercaptoethanol

<u>RIPA (WB)</u>	PBS 1 % NP40 Alternative 0,5 % Natriumdesoxycholat 0,1% SDS
<u>SDS-Sample-Puffer (WB)</u>	H <sub>2</sub> O 62,5 mM Tris-HCL (pH 6,8) 10% Glycerin 2% SDS 1% $\beta$ -Mercaptoethanol 0,001% Bromphenolblau
<u>Sammelgel (WB)</u>	H <sub>2</sub> O 125 mM Tris (pH 6,8) 0,1% SDS 3,9% Bis-Acrylamid 0,8 g/l APS 0,1% Temed
<u>TAE (10x) (Gel-Elektrophorese)</u>	H <sub>2</sub> O 0,4 M Tris 0,01 M Essigsäure 0,2 M EDTA-Na <sub>2</sub>
<u>TBS (10-fach; pH 7,5) (WB)</u>	H <sub>2</sub> O 0,5 M Tris 1,5 M NaCl
<u>T-TBS (WB)</u>	TBS (1x) 0,1% Tween 20
<u>Transferpuffer (pH 8,3) (WB)</u>	H <sub>2</sub> O 25 mM Tris 192 mM Glycerin 20 % Methanol
<u>Trenngel (WB)</u>	H <sub>2</sub> O 375 mM Tris (pH 8,8) 0,1% SDS 7,5% Bis-Acrylamid 1 g/l APS 0,1% Temed

## 2.8 Software, Datenbanken

Cell Quest Pro	BD, Heidelberg, Deutschland
FlowJo 7.6.4	Tree Star Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
LightCycler 3 Version 3.5	Roche, Mannheim, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, Washington, USA

---

Pubmed Medline	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Pubmed Nucleotide	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore</a>
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3">http://frodo.wi.mit.edu/primer3</a>
SoftMax	Molecular Devices Corp, Sunnyvale, USA

---

## 2.9 Tiere

---

Spezies	Herkunft
Weibliche BALB/c Maus	Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA
Foxp3-GFP Maus	M. Oukka, Washington University, USA

---

Die Tierhaltung erfolgte vorschriftsmäßig und pathogenfrei. Raumtemperatur betrug 22 ± 2°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h. Es wurde Standard-Tierfutter verabreicht und die Tiere erhielten Wasser ad libitum.

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Arbeit mit Zellen wurde unter sterilen Bedingungen in Laminar Flow Sterilbank durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Zellen 5 min bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Die Zellsuspension wurde bis zur Weiterverarbeitung stets kühl gehalten.

#### 3.1.1 Lymphozytenisolierung aus der Milz

Ca. 10-12 Wochen alten weiblichen BALB/c Mäusen wurde in einer Laparotomie die Milz entnommen und in steriler Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) aufgenommen. Die Milz wurde dann mechanisch zerkleinert und durch einen 70µm Sieb filtriert. Dann wurde das Eluat in HBSS aufgenommen und 5 min lang bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zell-Pellet in 1 ml ACK Lysing Buffer zur Erythrozytenlyse aufgenommen und 3 min bei 4° inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit HBSS und erneutem Zentrifugieren sowie Resuspension in HBSS, wurden die Zellen erneut durch ein 70µm Sieb filtriert.

#### 3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Trypanblau-Ausschlusstest verwendet. Die Zellsuspension wurde zu gleichen Volumenanteilen mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Dann wurden die Zellen in eine Neubauer-Zählkammer aufpipettiert. Da Trypanblau abgestorbene Zellen dank der Durchlässigkeit der Zellmembran dunkelblau anfärbt, kann zwischen lebendigen und toten Zellen unterschieden werden. Die ungefärbten Zellen in den Großquadranten wurden gezählt und die Zahl mit dem Verdünnungsfaktor sowie  $10^4$  multipliziert. Damit erhielt man die Zahl der Zellen pro ml nach der Formel:

$$n \text{ [Zellzahl/ml]} = \text{Mittelwert d. Zellzahl pro Quadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### 3.1.3 Isolierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels MACS<sup>®</sup>

„Magnetic activated cell sorting“ (MACS<sup>®</sup>) wurde verwendet um CD4<sup>+</sup> Lymphozyten aus der Zellsuspension zu gewinnen. Bei dieser Methode werden MicroBeads, Separatoren sowie Säulen verwendet. MicroBeads sind ca. 50 nm große superparamagnetische Partikel, die aus bioabbaubarer Matrix und spezifischen Antikörpern bestehen und die Struktur oder die Form der markierten Zellen normalerweise nicht beeinflussen. Die Säule wird hierzu in einen starken Dauermagneten platziert. Dadurch wird ein Hochgradient-Magnetfeld in der Säulenmatrix erzeugt. Der Zellsuspension werden MicroBeads zugegeben, die markierten Zellen werden dann beim Durchfließen der Säule in der Matrix zurückgehalten. Unmarkierte Zellen passieren die Säule und werden aufgefangen. Dabei wird zwischen der positiven Selektion, bei der die markierten Zellen die Zielzellen sind, und der Isolation der „unberührten“ Zellen unterschieden, bei der unerwünschte Zellen magnetisch markiert werden und in der Säule zurückgehalten werden, während die Zielzellen aufgefangen werden. Zur Isolation von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten wurde die letztere Methode unter Zuhilfenahme von CD4<sup>+</sup>T Cell Isolation Kit von Miltenyi Biotec verwendet. Dabei wurden im ersten Schritt nicht-CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wie z.B. cytotoxische T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten und Erythroide Zellen mit einem Cocktail aus Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD8a, CD45R, DX5, CD11b und Ter-119 markiert. Hierzu wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 µl Biotin-Antibody Cocktail sowie 4 µl MACS<sup>®</sup> Puffer pro  $1 \times 10^6$  Zellen aufgenommen und 10 min bei 4°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurden 2 µl Anti-Biotin MicroBeads sowie 3 µl MACS<sup>®</sup> Puffer pro  $1 \times 10^6$  Zellen zugegeben und es wurde 15 min bei 4°C inkubiert. Hierbei wurden die magnetischen MicroBeads an die vorher Biotin-markierten Zellen gebunden. Anschließend wurde die Suspension in 20 ml MACS<sup>®</sup> Puffer aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und erneuter Resuspension im MACS<sup>®</sup> Puffer wurden die Zellen in die Separationssäule gegeben. Das Eluat bestehend aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde dann erneut zentrifugiert und in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von FCS, L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin sowie β-Mercaptoethanol zur Weiterverarbeitung aufgenommen.

### 3.1.4 In vitro T-Zell Differenzierung

Die naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden nach Schema in die T-Zell-Richtungen Th0, Th1, Th2, Th9, Th17, Th25 und iTreg stimuliert. Hierzu wurde eine 24-Well Flachboden-Mikrotiterplatte mit 10 µg anti-CD3ε pro 1 ml PBS versehen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Verwerfen des PBS-Überstandes und zweimaligem Waschen der Mikrotiterplatte mit PBS wurden nun je  $0,35 \times 10^6$  Zellen in 2 ml RPMI 1640 Medium unter Zusatz von FCS, Penicillin, Streptomycin und β-Mercaptoethanol je Well aufpipettiert. Die Stimulation erfolgte nach folgendem Schema:

Population	Zytokine/Antikörper	Konzentration
Th0	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
Th1	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
	IL-12	10 µg/ml
Th2	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	IL-4	10 ng/ml
	anti-IFNγ	10 µg/ml
Th9	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	IL-4	10 ng/ml
	TGF-β	5 ng/ml
Th17	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	TGF-β	5 ng/ml
	IL-6	20 ng/ml
Th25	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
	anti-IL-12	10 µg/ml
	anti-IFNγ	10 µg/ml
iTreg	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	TGF-β	5 ng/ml
	IL-2	10 ng/ml

Abb. 4 Stimulationsschema zur T-Zell-Differenzierung

Zur Auswertung der Zytokine auf der mRNA-Ebene wurden die Zellen für 3 Tage kultiviert.

Zur Auswertung auf der Protein-Ebene erfolgte die Kultivierung für 4 Tage. Dabei befanden sich die Zellen in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

Zur durchflusszytometrischen Analyse der intrazellulären Zytokine sowie zur Proteinexpressionsanalyse mittels SDS-PAGE und Westernblot wurden die Zellen am vierten Tag mit PMA (Phorbol myristate acetate) in einer Konzentration von 50 ng/ml und Ionomycin in einer Konzentration von 750 ng/ml restimuliert. Nach 2 h wurde dann mit BD GoldiPlug<sup>TM</sup>, welches Befeldin A beinhaltet, in einer Konzentration von 1 µl/ml behandelt.

Nach weiteren 2 h wurden die Zellen geerntet.

### **3.2 Durchflusszytometrie (FACS)**

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS für Fluorescence-activated Cell Sorter ist eine Technologie zum Detektieren und Zählen von individuellen Zellen, die in einem Strom einen Laserstrahl passieren. Dabei kann FACS nach Identifikation der unterschiedlichen Populationen auch zum Isolieren der einzelnen Populationen verwendet werden. Man kann die Eigenschaften der einzelnen Zellreihen unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenproteine oder intrazelluläre Proteine erforschen. Die Zellsuspension wird soweit in Puffer verdünnt, dass beim Aufsaugen in eine Düse die Zellen einzeln hintereinander aufgereiht sind. Während jede Zelle einzeln den Laserstrahl passiert, wird das Laserlicht von ihr gestreut, die an Zelloberfläche antikörpergebundenen Farbmoleküle werden angeregt und fluoreszieren. Die Streuung ist abhängig von der Größe der Zelle (Vorwärts-Streuung), der Granularität (Seitwärts-Streuung) sowie der Fluoreszenz der Farbmoleküle. Fotosensoren detektieren dann das gestreute Laserlicht und das emittierte Fluoreszenzlicht. Die Zellen mit den gleichen Eigenschaften können gezählt und verschiedenen Populationen zugeordnet werden, gegebenenfalls können die einzelnen Populationen isoliert werden.

Die detektierten Daten können dann als Histogramme bei Einzelparametern oder als Dot Plots bei Zweifachparametern dargestellt werden.

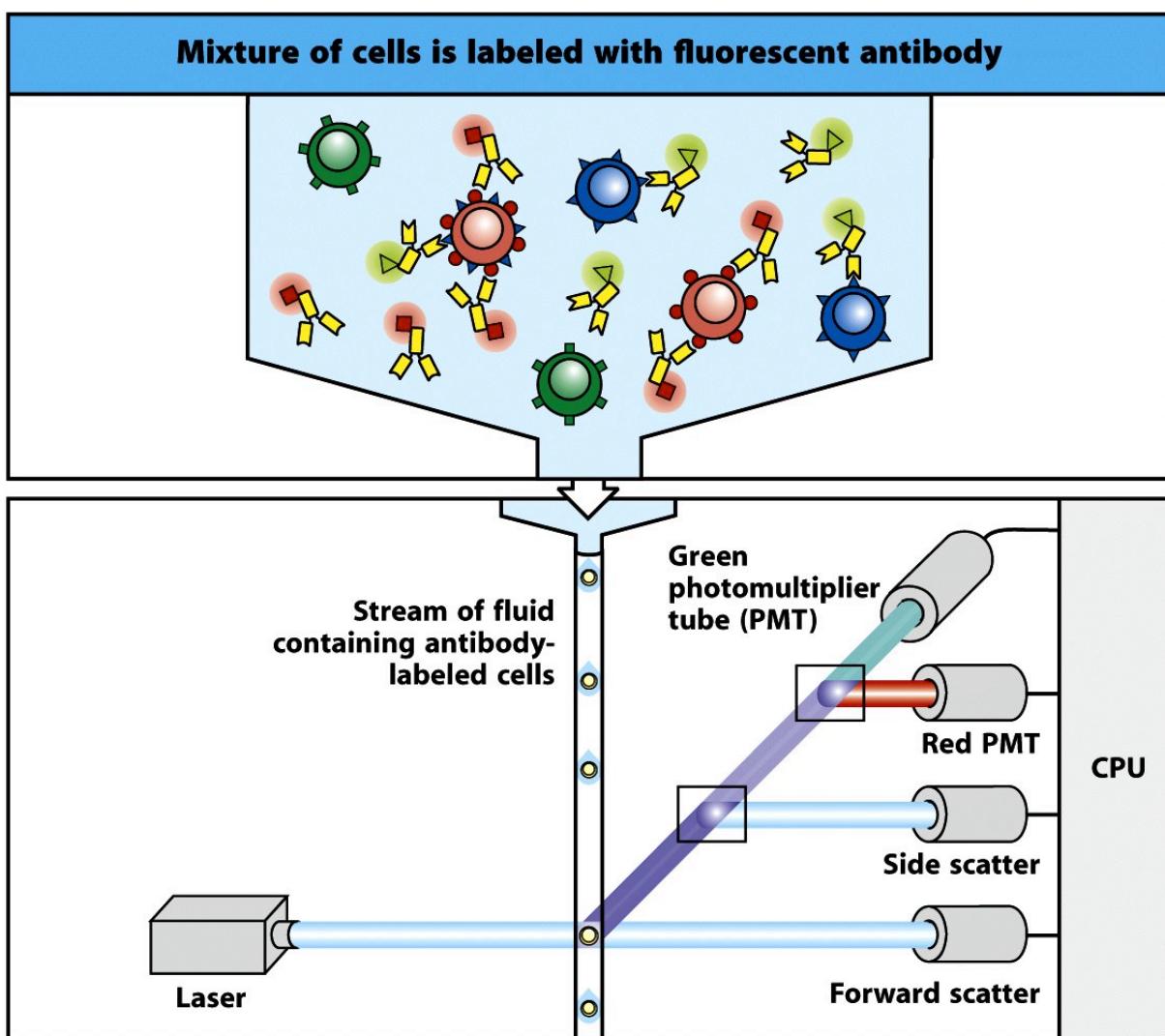


Abb. 5: Funktionsweise einer Durchflusszytometrie [1]

### 3.2.1 Analyse der Oberflächenantigenexpression

Nach 4 d Inkubation bei den unter 3.1.4 genannten Bedingungen wurden die Zellen mittels Zellschaber geerntet und in FACS-Röhrchen pipettiert. Nach Waschen der Zellen mit MACS Puffer wurde das Pellet in 30 µl 1% Mausserum pro  $1 \times 10^6$  Zellen suspendiert und 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Mit diesem Schritt wurden die unspezifischen Fc-Rezeptoren auf den Zelloberflächen blockiert. Es folgte das Waschen mit MACS Puffer. Anschließend erfolgte die Färbung mit fluoreszensmarkierten Antikörpern gegen CD4 (PE-Cy5), CD4 (PE), CD25 (APC), CD45-RB (FITC), CD62L (PE), CD69 (FITC), CD134 (PE), ICOS (PE-Cy5) sowie den zugehörigen Isotypkontrollen für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Nach der Inkubation wurde erneut mit MACS-Puffer gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen 20 min bei 4°C in

1%igem PFA (Paraformaldehyd) inkubiert, anschließend erneut in MACS-Puffer gewaschen und im Dunkeln bei 4°C höchstens 5 Tage gelagert.

Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer FACS Calibur der Firma BD Biosciences. Die Daten wurden mit Hilfe der Software FlowJo (Tree Star) ausgewertet.

### 3.2.2 Analyse der intrazellulären Proteine

Nach Zellernte folgten die gleichen Schritte wie bei 3.2.1. Vor dem Färben mit intrazellulären fluoreszenzkonjugierten Antikörpern musste die Lymphozytenmembran permeabilisiert werden. Hierzu erfolgte die Inkubation der Zellen in der Fix/Perm Working Solution des Flow Cytometry Fixation and Permeabilization Kits (R&D Systems) für 45 min bei 4°C im Dunkeln. Nach erneutem Waschen in MACS Puffer wurde zweimalig mit dem Permeabilisations-Puffer des o.g. Kits gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit fluoreszensmarkierten Antikörpern gegen CD4 (PE-Cy5), IFN $\gamma$  (FITC), IL-17A (PE), IL-13 (PE) sowie den zugehörigen Isotypkontrollen für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Nach der Inkubation wurde mit Permeabilisationspuffer und anschließend mit MACS-Puffer gewaschen. Die Fixierung und die Analyse wurden, wie oben beschrieben (Kapitel 3.2.1), durchgeführt.

### 3.2.3 iTreg Induktion

Bei einer Foxp3-GFP Maus ist das grüne fluoreszierende Protein an die amino-terminale Region des Transkriptionsfaktors Foxp3 gebunden. Foxp3 ist der Transkriptionsfaktor für die regulatorische T-Zelle (iTreg). Wird eine iTreg gebildet, kann das GFP darin mittels FACS-Analyse detektiert werden.

CD4 $^{+}$  Lymphozyten einer Foxp3-GFP Maus wurden mittels MACS<sup>®</sup> wie unter 3.1.1 bis 3.1.3 isoliert. Im nächsten Schritt wurde eine Oberflächenantigenfärbung mit Hilfe der Antikörper gegen CD4 (PE-Cy5) und gegen CD62L (PE), wie unter 3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in MACS Puffer und in PBS gewaschen und durch ein 40 $\mu$ m Sieb filtriert. Nachfolgend wurden GFP $^{-}$ CD4 $^{+}$ CD62L $^{+}$ - Zellen mit dem FACS Aria Gerät (BD Biosciences) isoliert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit RPMI Medium wurden die Zellen wie unter 3.1.4 ausplattiert und in die T-Zell-Differenzierungsrichtungen Th0, Th2, Th25 sowie iTreg stimuliert. Nach 4 Tagen Inkubation erfolgte die Zellernte, das Färben der

Zellen auf das Oberflächen-Antigen CD4 (PE-Cy5) und die FACS Analyse der jeweiligen Proben wie unter 3.2.1.

### **3.2.4 Proliferationsassay**

Die Proliferationsrate der Zellen kann unter Zuhilfenahme von CFSE analysiert werden. CFSE diffundiert passiv in die Zellen und wird bei Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Durch die Interaktion mit intrazellulären Esterasen wird ein fluoreszierendes Konjugat erzeugt. Das emittierte Licht kann dann mittels FACS gemessen werden. Jede nachfolgende Generation wird dabei durch einen Peak repräsentiert.

Zur Analyse der Proliferationsrate der einzelnen Zellpopulationen wurden  $CD4^+$  T-Lymphozyten wie unter 3.1.1 bis 3.1.3 isoliert. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 1 ml in HBSS aufgenommen. Zu der Zellsuspension wurden dann  $2,5 \mu\text{M}$  CFSE pro  $1 \times 10^6$  Zellen hinzugegeben und das Reagenzgefäß wurde unter Ausschluss von Licht 5 min kontinuierlich geschwenkt. Die Reaktion wurde mit 10%igem FCS abgestoppt, nach Inkubation für 3-5 min wurde die Suspension dann zentrifugiert und zweimalig mit RPMI-Medium gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie unter 3.1.4 ausplattiert und in die Th0, Th1, Th2, Th17 und Th25 Differenzierung stimuliert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen in üblicher Weise geerntet und mit Hilfe von FACS analysiert.

## **3.3 Molekularbiologische Methoden**

### **3.3.1 RNA-Isolierung**

Da die RNA sehr empfindlich gegenüber endogenen und exogenen RNAsen ist, wurde strikt mit Handschuhen, RNAsen-freien Gefäßen und Filterpipettenspitzen gearbeitet, um eine Kontamination zu verhindern. Sämtliche Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Alle Lösungen wurden ausschließlich mit einem RNase freiem DEPC behandeltem  $\text{H}_2\text{O}$  hergestellt.

Nach 3 Tagen Inkubation der naiven  $CD4^+$  Lymphozyten unter den bei 3.1.4 genannten Bedingungen wurden die Zellen mit 1 ml Trizol durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Danach wurden zu jeder Probe 200  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugeben und es

erfolgte ein ca. 15 sec langes Mischen unter ständigem Kippen der Proben in der Hand. Nach einer 5-minütigen Ruhephase auf 4°C wurden die Zellen 15 min lang bei 4°C und 12 000 rpm zentrifugiert. In diesem Schritt erfolgte die Phasentrennung der Substanzen mit unterschiedlichen Lösungsgraden. Die obere, wässrige Phase mit DNA und RNA wurde vorsichtig, soweit wie möglich vollständig abpipettiert und in ein anderes Gefäß überführt. Es wurde in etwa gleiches Volumen an Isopropanol (400 µl) hinzugeben, die Lösung durch Hin- und Herkippen gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut 15 min bei 4°C und 12 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abpipettiert und die so gefällte RNA wurde zur Erhöhung des Reinheitsgrades in 800 µl 75%igem Ethanol gewaschen. Nach 8-minütigem Zentrifugieren bei 4°C und 7 500 rpm wurde der Überstand erneut verworfen und das RNA-Pellet wurde 10-20 min luftgetrocknet. Anschließend wurde die RNA in 10-20 µl DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die RNA bei -20°C gelagert.

### 3.3.2 RNA-Quantifizierung

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in den Proben wurde eine photometrische Messung durchgeführt. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen. Bei einer optischen Dichte (OD) von 1,0 liegt eine Konzentration von 40 µg/ml RNA vor. Die Reinheit der RNA wird über das Verhältnis zu den in der Lösung noch vorhandenen Proteinen definiert. Hierbei liegt bei Proteinen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm vor. Bei reinen RNA-Lösungen beträgt der Quotient der beiden ODs ein Wert von 1,8.

Zur Messung wurde die isolierte RNA langsam auf Eis aufgetaut, 2 µl der Probe wurden 1:30 mit DEPC H<sub>2</sub>O verdünnt und in einem Photometer gemessen. Als valide wurden Reinheitsgrade zwischen 1,5 und 1,85 angenommen.

### 3.3.3 Reverse Transkription

Nach der Isolierung der RNA aus den einzelnen Proben musste diese zunächst mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) überführt werden. Dies wurde unter Zuhilfenahme eines qPCR cDNA Synthese Kits (Affinity script) durchgeführt. Die Methode

## Methoden

beruht auf der Grundlage der komplementären Basenpaarbildung. Die reverse Transkriptase nutzt dabei den Einzelstrang der mRNA als Matrize und kreiert komplementär zu den vorliegenden Basenpaaren eine Einzelstrang-DNA. Dabei nimmt die Reaktion ihren Anfang an Primern mit zufälliger Sequenz, an denen dNTPs aus einem Pool gebunden werden.

Zur mRNA-Expressionsanalyse im Vergleich zwischen den einzelnen Populationen wurde pro Versuch immer die gleiche Menge (500 – 1000 ng) mRNA je Probe umgeschrieben.

Hierzu wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut. Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

### Reaktionsansatz für die reverse Transkriptase

RNA (500 ng – 1000 ng)	x µl
RNAse freies H <sub>2</sub> O	12-x µl
First Strand Master Mix (2x)	20 µl
Oligo (dT) Primer	6 µl
AffinityScript RT/RNase Block Enzyme Mixture	2 µl

Es folgte dann eine 5-minütige Inkubation der Proben bei 25°C. In diesem Schritt lagern sich die Primer an die RNA-Sequenz an. Als Nächstes erfolgte die Inkubation bei 42°C für 15 min, während dieser Zeit findet die cDNA-Synthese statt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße 5 min lang bei 95°C inkubiert um die cDNA-Synthesereaktion zu beenden.

Die so entstandene cDNA wurde dann entweder gleich auf Eis platziert und zur qPCR verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

### 3.3.4 Primerdesign

Die Sequenz der genomischen DNA für das jeweilige Produkt wurde aus Pubmed Nucleotide bezogen, die Primer wurden mit dem *Primer3* kreiert. Es wurde auf eine möglichst ähnliche Schmelztemperatur des Forwards- und Reverse-Primers geachtet sowie auf einen GC-Gehalt von 55-60%, da die Wasserstoffbrücken eines GC-Basenpaares stabilisierend auf die Doppelhelix wirken. Die zu amplifizierende Sequenzlänge lag zwischen 100 und 300 Basenpaaren.

Die Effizienz der designten Primer sowie die optimalen Bedingungen wurden bei der Amplifikation einer Verdünnungsreihe getestet.

### 3.3.5 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR, qPCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die in-vitro-Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte im Genom. Grundsätzlich werden hierfür eine DNA-Matrize, eine thermostabile DNA-Polymerase, Forward- und Reverse-Primer, die spezifisch für die nachzuweisende Sequenz kreiert werden, dNTPs, Puffer und MgCl<sub>2</sub> benötigt.

Bei der quantitativen RT-PCR wird außerdem der Farbstoff SYBR® Green hinzugegeben, welcher in die doppelsträngige DNA interkaliert und in gebundenem Zustand fluoresziert. Da auf diese Weise fluoreszierende PCR-Produkte entstehen und die Fluoreszenz proportional zu der PCR-Amplifikation ansteigt, kann diese gemessen werden und erlaubt einen Rückschluss auf die Menge der cDNA und somit auch auf die der mRNA der gesuchten Sequenz. Gemessen wird hier nicht absolut, sondern relativ zu einem internen Standard.

Die RT-qPCR wurde im LightCycler® 2.0 von Roche unter Verwendung der LightCycler® 3 Software durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe des LightCycler® Fast Start DNA Master SYBR Green I Kits hergestellt. Dieses beinhaltet das PCR grade H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, LightCycler® Fast Start Enzyme sowie die LightCycler® Fast Start Reaction mix bestehend aus Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dATP, dGTP, dUTP, dCTP, MgCl<sub>2</sub> sowie SYBR Green I Farbe.

Zunächst wurde ein Mastermix aus H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, Forward- und Reverse-Primer sowie LightCycler® FastStart mit SYBR Green hergestellt. Dieser wurde dann zu je 18µl in eine LightCycler® Kapillare pipettiert. Dann wurden die jeweiligen Proben zu 2µl je Ansatz in Triplikaten in die Kapillaren pipettiert. Als Negativkontrolle wurde der Mastermix ohne cDNA verwendet.

Die PCR besteht aus einer Abfolge von Amplifikations-Zyklen, deren Anzahl sich aus der Menge der nachzuweisenden Sequenz ergibt. Vor der Amplifikation werden die Proben auf 95°C 10 min lang erhitzt, wobei hier die DNA Polymerase aktiviert und die DNA denaturiert wird. Dann folgt die Amplifikationsphase, in der jeder Zyklus aus 3 Teilen besteht. Zunächst wird die DNA bei 95°C 10 sec lang denaturiert. Dann folgt das Annealing, d.h. die

Hybridisierung der Primer, wobei sich jeder Primer an den komplementären Bereich des DNA-Einzelstrangs anlagert. Hier hängt die Temperatur (in der Regel 40°C bis 70°C) und die Dauer (0-10 Sekunden) der Phase vom GC-Gehalt, d.h. von der Anzahl der Wasserstoffbrücken der einzelnen Primer ab. Als nächstes folgt die DNA-Synthese (Elongation) bei 72°C. Hier werden die Primer an ihrem freien 3'-OH-Ende mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase verlängert, indem die freien vorliegenden dNTPs komplementär zur cDNA-Matrix angelagert werden. Die Dauer dieser Phase hängt von der Länge des Amplicons ab. Da die Taq Polymerase unter idealen Bedingungen 25 Basenpaare in einer Sekunde synthetisiert, errechnet sie sich aus:

$$\text{DNA-Synthese [sec]} = \text{Amplicon [Basenpaare]} \times 1/25$$

Für jeden der designten Primer wurden die optimalen PCR-Bedingungen etabliert:

Gen	Produkt	Annealing Temp	Synthesezeit
β-Aktin	138 bp	64°C	7 sec
Foxp3	185 bp	56°C	8 sec
GATA-3	160 bp	56°C	7 sec
IFN $\gamma$	237 bp	58°C	10 sec
IL-4	177 bp	60°C	8 sec
IL-9	241 bp	56°C	10 sec
IL-10	162 bp	58°C	7 sec
IL-13	180 bp	58°C	8 sec
IL-17	239 bp	58°C	11 sec
IL-25	251 bp	65°C	11 sec
ROR $\gamma$ T	154 bp	57°C	7 sec
STAT-3	215 bp	56°C	9 sec
T-bet	121 bp	58°C	5 sec

Bei der Elongation erfolgt auch die Messung der Fluoreszenz bei 500 nm, die bei Entstehung eines Doppelstrangs aufgrund des gebundenen SYBR<sup>®</sup> Green auftritt.

Nach der Amplifikation folgt schließlich die Schmelzkurvenanalyse, bei der die Temperatur kontinuierlich auf 95°C erhöht wird. Der Doppelstrang des Zielfragments denaturiert dann bei einer dafür spezifischen Schmelztemperatur und es wird erneut Fluoreszenz freigesetzt, die analysiert werden kann. In diesem Schritt kann zwischen Primerdimeren und den

spezifischen PCR-Produkten aufgrund unterschiedlicher Schmelzkurven differenziert werden.

Die amplifizierte DNA wurde mittels Gelelektrophorese aufgereinigt und isoliert (siehe Kapitel 3.3.6). Die Menge der vorliegenden DNA konnte mit Photometer ermittelt werden. Da die Quantifizierung relativ zu einem internen Standard erfolgt, wurde eine Verdünnungsreihe aus dem gelgereinigten Produkt der Zielsequenz (unverdünnt, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>, 1:10<sup>7</sup>, 1:10<sup>8</sup>, 1:10<sup>9</sup>) erstellt und hiermit eine RT-qPCR durchlaufen. Hieraus wurde dann eine Standardgerade gebildet. So konnte für jedes Genprodukt eine spezifische Standardgerade erstellt werden. Bei jeder qPCR-Messung wurden zwei Standardproben mitgeführt, bei welchen die absolute Menge des Genprodukts bekannt war. Daraus konnte dann ausgehend von der Steigung der Standardgeraden und relativ zur Standardprobe die Menge der cDNA in den analysierten Proben errechnet werden.

Die erhaltenen Produktmengen wurden dann in Microsoft Excel analysiert. Hierbei wurde der Mittelwert der Ziel-cDNA von Proben-Triplets errechnet, dieser wurde in Verhältnis zum Mittelwert des gleichen Proben-Triplets eines Referenzgens gesetzt und die so erhaltenen Mengen graphisch dargestellt. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin gewählt, da dieses proportional zum mRNA-Expressionsniveau in aktivierten Zellen steht. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des SEM.

### 3.3.6 DNA-Gel-Elektrophorese

Zur Herstellung eines Standards sowie zur Kontrolle der Gensequenz des mittels qPCR amplifizierten Produkts wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dies ist eine Methode zur Trennung geladener Teilchen, z.B. von DNA-Fragmenten. Dabei wandert die DNA aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatreste als Polyanion zur Anode. Die Gelmatrix trennt die Moleküle nach Größe, wobei die Agarosekonzentration umso größer sein muss, je kleiner die zu trennenden Teilchen sind. Die einzelnen Banden bestehen aus Fragmenten ähnlicher Länge.

Hierzu wurde ein Agarose-Gel aus 0,75 g Agarose, 50 ml TAE-Puffer und 20 ml Millipore gereinigtem H<sub>2</sub>O hergestellt. Das Gemisch wurde zweimalig bei 440 Watt in einer Mikrowelle aufgekocht und es wurden 1  $\mu$ l Ethidiumbromid hinzugefügt. Danach wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gegossen. Nach Aushärten des Gels nach ca. 40 min konnten die

vorher eingelegten Spacer entnommen werden und die Taschen mit Proben sowie Loading Buffer beladen werden. Als Größenmarker wurde dabei ein DNA-Ladder in eine separate Tasche hineinpippettiert. Die Proben wurden bei 50-55 Volt ca. 30 min laufen gelassen, als Laufpuffer wurde hierbei der TAE-Puffer verwendet.

Durch das Ethidiumbromid, welches fluoresziert und in die DNA interkaliert, wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar und konnten dann aus dem Gel ausgeschnitten werden.

### **3.3.7 DNA-Isolierung durch Gel-Extraktion**

Die bei der Elektrophorese im Agarose-Gel gewonnenen DNA-Banden wurden möglichst knapp am Rand ausgeschnitten. Zur Gewinnung der DNA wurden die Gelstücke mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits prozessiert. Die Gelstücke wurden zunächst gewogen und in dreifachem Volumen in Buffer QG aufgenommen. Dann wurden die Proben 10 min bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Im nächsten Schritt wurde ein einfaches Gel-Volumen Isopropanol zu den Proben hinzugegeben und die Suspension wurde in eine QIAquick Filtersäule pipettiert und 1 min zentrifugiert. Die DNA verblieb dabei im Filter und das Eluat wurde verworfen. Es wurden 0,5 ml Buffer QG zu der Säule hinzugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren für 1 min wurde das Eluat verworfen, 0,5 ml Buffer PE wurde hinzugegeben und nach fünfminütiger Inkubation wurde zweimalig für 1 Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Nachdem die Säule in ein sauberes Reaktionsgefäß platziert wurde, wurden 30 µl DEPC gereinigtes H<sub>2</sub>O auf die Membran der Säule aufpipettiert, 1 min inkubiert und danach bei 13 000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Eluat ergab die gelgereinigte DNA, deren Konzentration dann photometrisch analog zu RNA wie in Kapitel 3.3.2 gemessen wurde.

### **3.3.8 DNA-Sequenzierung**

Um zu kontrollieren, dass die kreierten Primer korrekte Produkte bilden, wurden das gelaufgerenigte Produkt sowie die Primer selbst zur Sequenzierung an die Firma GeneArt in einer Konzentration von 300 ng/µl versandt. Die ermittelte Sequenz wurde dann mit der zum Design verwendeten Gensequenz verglichen.

### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in Kombination mit Western-Blot wurde die Expression der Proteine analysiert. Diese Methode beruht einerseits darauf, dass das SDS sich an Proteine bindet und diese denaturiert, sodass Protein-Protein-Wechselwirkungen (Tertiär- und Sekundärstrukturen) verhindert werden, die einzelnen Proteine sich auffalten und sich folglich nur in ihrer Größe und Molekulargewicht unterscheiden. In einem Polyacrylamidgel können die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung nun zum Pluspol wandern. Die Auftrennung erfolgt nach Molekülgröße. Dabei wandern die kleinen Teilchen schneller durch die Maschen des Gels als große. Andererseits können die so aufgetrennten Proteine von dem Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen werden und hier spezifisch durch Antikörper gebunden und angefärbt werden.

#### 3.4.1 Zellyse zur Proteingewinnung

Nach der *in vitro* Differenzierung der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen wie unter 3.1.4 beschrieben, wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Zellschabern von den Böden der Mikrotiterplatten abgelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Waschen mit PBS und Zentrifugieren für 8 min bei 2500 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen. Die Zell-Pellets wurden dann jeweils in 30 µl RIPA Puffer unter Zugabe von 0,3 µl Phosphatase- und 0,3 µl Protease-Inhibitor durch Auf- und Abpipettieren aufgelöst. Danach wurden die Zellsuspensionen eine halbe Stunde lang auf Eis gehalten und währenddessen alle zwei Minuten gevortext. Nach dem Zentrifugieren für 15 min bei 4°C und 15 000 rpm wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

#### 3.4.2 Protein-Quantifizierung

Die Protein-Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Bicinchoninsäure-Tests (BCA) der Firma Uptima. Dieser Assay beruht auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> durch Proteine in alkalischem Medium. Die Bicinchoninsäure bildet dabei ein Chelatkomplex mit den Cu<sup>+</sup> Ionen und es entsteht ein violetter wasserlöslicher Komplex. Die Konzentration wird dabei photometrisch

zu einem definierten Zeitpunkt gemessen, da die Reaktion sich immer weiter fortsetzt. Die Absorption ist direkt proportional zu der Proteinkonzentration, welche dann mit Hilfe einer Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe bekannter Protein-Konzentrationen errechnet wird.

Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe des Bovinen Serumalbumins (BSA) verwendet. Die Proben wurden nach Protokoll des Herstellers mit den Reagenzien versetzt und in einer Mikrotiterplatte für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Software „Softmax“ bei einer Wellenlänge von 540 nm.

### 3.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der gewonnenen Proteine wurde das diskontinuierliche Laemmli-System verwendet, wobei das Trenngel eine Acrylamid-Konzentration von 12% und das Sammelgel von 5% aufwies.

Substanz	Trenngel 12 %	Sammelgel 5%
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,5 ml	6,1 ml
1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8; 181,65 g/l)	2,5 ml	-
0,5 M Tris-Puffer (pH 6,8; 60,55 g/l)	-	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml
Bis-Acrylamid (30%)	4 ml	1,3 ml
APS (0,1g/ml H <sub>2</sub> O)	0,1 ml	0,1 ml
Temed	5-10 µl	5-10 µl

Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

Nach Zusammenfügen der einzelnen Bestandteile wurde die Trenngel-Lösung in die Gelkammer gegossen. Das TEMED (N’N’N’N’-Tetramethylethylendiamin) diente hierbei als Polymerisationskatalysator. Das Gel wurde dann mit Isopropanol überschichtet, wobei stets darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen entstehen. Nach ca. 15 – 20 min war das Gel polymerisiert und das Isopropanol konnte abgegossen werden, das Gel wurde mit Vollelektrolytwasser gespült. Als Nächstes wurde die Sammelgel-Lösung zusammengestellt und in die Kammer auf das Trenngel gegossen. Zum Formen von Sammeltaschen wurde hier

ein Kunststoffkamm eingesetzt. Es wurde stets darauf geachtet, dass keine Luftbläschen in oder zwischen den Gelen entstehen.

Nach Polymerisieren des Sammelgels wurde die Gelkammer dann in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Laufpuffer<sup>1</sup> überschichtet.

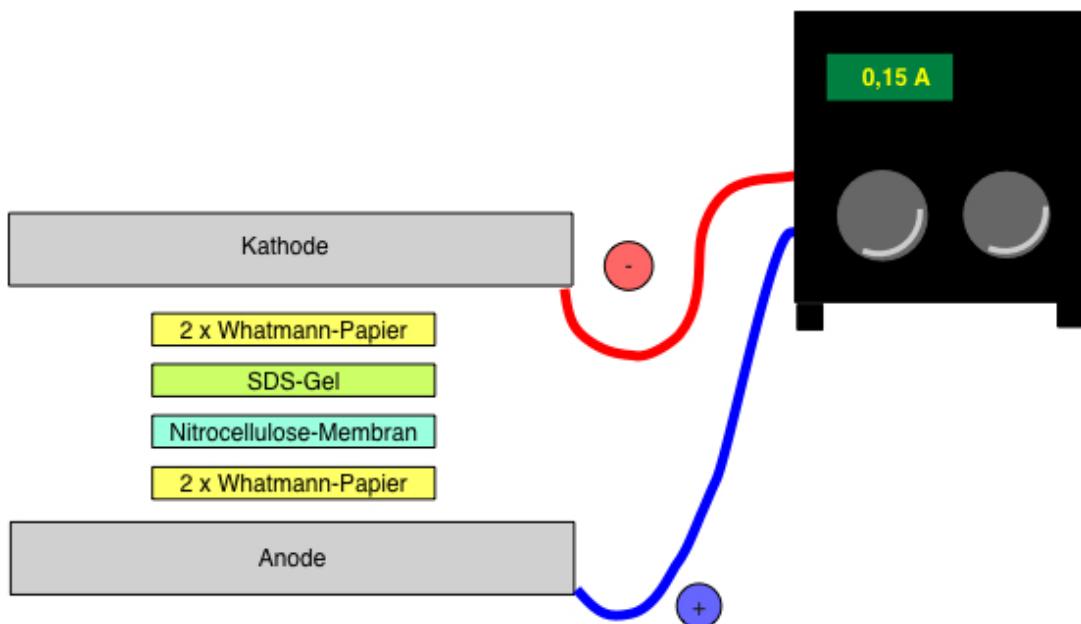
Die gleiche Masse von Proteinen je Probe wurde dann mit SDS-Proben-Puffer<sup>2</sup> in einem Volumen-Verhältnis von 1:1 versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das rekombinante IL25 (10ng/µl, 17,6 kDa) mitgeführt. Die Proben wurden dann in die Taschen aufgetragen. Außerdem wurde eine Tasche mit 7 µl des Proteinmarkers V (Paq Lab) zur Zuordnung des Molekulargewichts beladen.

Beim Durchlaufen des Sammelgels unter einer Spannung von 90 V wurden die Proteine aufkonzentriert. Nach Eintreffen der Proben im Trengel wurde die Spannung auf 170 V erhöht. Nach Erreichen d. Lauffront am unteren Rand des Gels wurde die Elektrophorese beendet. Es wurde stets darauf geachtet, dass ausreichend Laufpuffer<sup>1</sup> in der Kammer vorhanden war.

Puffer	Substanz	Menge
<sup>1</sup> Laufpuffer (10x)	Glycin	144,13 g
	Tris Base	60,55 g
	SDS	10 g
<sup>2</sup> SDS-Probenpuffer (5x)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	4 ml
	0,5 M Tris-HCL (pH6,8)	1 ml
	Glycerol	0,8 ml
	10% (w/v) SDS	1,6 ml
	2-β-Mercaptoethanol	0,4 ml
	5 % (w/v) Bromphenolblau	0,2 ml

### 3.4.4 Western-Blot

Nach Beenden der Elektrophorese wurden die Proteine mittels des Transblot-Turbo-Gerätes von Bio Rad auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Zunächst wurden hierfür die notwendigen Filterpapiere (Whatman), die Membran sowie das Gel im Transferpuffer<sup>3</sup> getränkt. Die Blotting-Kammer wurde wie folgt aufgebaut:



**Abb. 6: Aufbau eines Westernblots**

Es wurde eine Stromstärke von 0,15 A für 42 min angewandt. Währenddessen wanderten die Proteine aus dem Gel in die Nitrocellulose-Membran.

Anschließend wurde die Membran aus dem Blotsandwich entnommen und eine Stunde lang bei Raumtemperatur unter Schütteln in 5%-iger Trockenmilchlösung inkubiert. Hierbei erreichte man die Blockierung freier unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Membran. Nach Abkippen der Trockenmilchlösung wurde die Membran in Primär-Antikörper-Trockenmilch-Lösung, z.B. 16 µl Rat-anti-mouse IL-25 in 8 ml 5%-iger Trockenmilchlösung, über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran durch viermaliges Waschen mit T-TBS<sup>5</sup> für jeweils 10 min von nicht gebundenen Antikörpern befreit. Die Membran wurde dann mit der Sekundär-Antikörper-Trockenmilch-Lösung, z.B. Goat-Anti-Rat-HRP, eine Stunde lang unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen mit T-TBS<sup>5</sup> für jeweils 10 Minuten wurde die

## Methoden

Membran in der Westfemto-Entwickler-Lösung 5 min im Dunkeln inkubiert. Da der Sekundär-Antikörper an HRP (Meerrettich-Peroxidase) gebunden ist, lassen sich die Banden der Membran in herkömmlicher Filmentwicklungskammer mit Hilfe einer Entwicklungslösung und eines Photographie-Films darstellen. Dies geschah in einer Dunkelkammer. Die Membran wurde in einer Filmentwicklungskassette über eine Dauer von 5 sec bis 1 min belichtet.

Zur Quantifizierung der Proteine wurde als Referenzprotein das  $\beta$ -Aktin verwendet. Hierfür wurde die Membran nach der ersten Entwicklung zweimalig für 10 min unter Schütteln mit T-TBS gewaschen. Anschließend wurde der Primär-Antikörper-Sekundär-Antikörper-Komplex mit Hilfe der Reblot-Lösung von der Membran abgelöst, hierfür wurde 10 min unter Schütteln inkubiert. Nach anschließendem zweimaligen Waschen wurden wie o.g. die Antikörperreaktionen, diesmal gegen das Referenzprotein  $\beta$ -Aktin gerichtet, sowie der Nachweis mittels fotografischer Entwicklung durchgeführt.

Puffer/Lösung	Substanz	Menge
<sup>3</sup> Transferpuffer (pH 8,3)	25 mM Tris Base	3 g
	192 mM Glycin	14,4 g
	Methanol	200 ml
	$H_2O_{bidest}$	800 ml
<sup>4</sup> Trockenmilchlösung	Milchpulver	5 g
	T-TBS <sup>6</sup>	100 ml
<sup>5</sup> T-TBS (pH 7,6)	Tris Base	2,42 g
	NaCl	8 g
	Tween 20	1 ml
	$H_2O_{bidest}$	1 l
<sup>6</sup> Reblot Plus-Lösung	Reblot Plus	1 ml
	$H_2O_{bidest}$	9 ml

Zusammensetzung der für Westerblot benötigten Puffer und Lösungen

### **3.5 Statistik**

Zur statistischen Auswertung wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung des Mittelwerts (standard error of mean, SEM) berechnet. Die Durchführung der Berechnungen erfolgte mit Tabellenkalkulation Excel für Microsoft Windows XP<sup>®</sup> sowie Excel Microsoft Office für Mac OS X<sup>®</sup>. Signifikanzen zwischen zwei verschiedenen Ansätzen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism unter Anwendung des unpaired Student's t-Tests bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 IL-25 Produktion unter T-Zell-Stimulation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Abhängig von Molekülen in der Umgebung der naiven T-Zellen entwickeln sich diese in unterschiedliche Populationen und zeigen eine entsprechende Zytokinproduktion. Diese Entwicklung läuft T-Zell-Rezeptor vermittelt ab. Um aufzuklären, welche immunologischen Vorgänge der IL-25 Produktion in T-Zellen zu Grunde liegen und zu zeigen, dass die IL-25 Produktion dabei nicht aus den bereits bekannten T-Zell-Populationen entspringt, wurden naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit polyklonaler T-Zell-Rezeptor Stimulation und Ko-Stimulation aktiviert, während gleichzeitig die Differenzierung in gängige T-Zell-Richtungen blockiert wurde. Es wurde also die Hypothese aufgestellt, dass die IL-25 Produktion von einer eigenständigen T-Zell-Population ausgeht, die im folgenden Th25 genannt wird.

Hierfür wurden MACS<sup>®</sup> gesortete CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Mausmilzen 3 Tage unter differenzierenden Stimulationsbedingungen (siehe Abb. 7) in vitro kultiviert und eine mRNA-Expressionsanalyse mittels quantitativer PCR durchgeführt.

Population	Zytokine/Antikörper	Konzentration
Th0	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
Th1	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
	IL-12	10 µg/ml
Th2	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	IL-4	10 ng/ml
	anti-IFNγ	10 µg/ml
	anti-IL-12	10 µg/ml
Th9	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	IL-4	10 ng/ml
	TGF-β	5 ng/ml
Th17	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	TGF-β	5 ng/ml
	IL-6	20 ng/ml
Th25	anti-CD3ε	10 µg/ml

Ergebnisse		
	anti-CD28	2 µg/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
	anti-IL-12	10 µg/ml
	anti-IFN $\gamma$	10 µg/ml
iTreg	anti-CD3 $\epsilon$	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	TGF- $\beta$	5 ng/ml
	IL-2	10 ng/ml

Abb. 7: Stimulationsschema zur T-Zell-Differenzierung

Abbildung 8 zeigt die IL-25 Produktion der polarisierten Effektor T-Zellen, wobei Expression der IL-25-mRNA bei den Zellpopulationen, die in Th2-Richtung und in Th25-Richtung stimuliert wurden, um ein Vielfaches höher ist als bei den Th1, Th17 und Th9 Populationen. Auch die alleinige T-Zell-Rezeptor-Stimulation (Th0) und Co-Stimulation induzierte keine IL-25-Produktion (siehe Abb. 11).

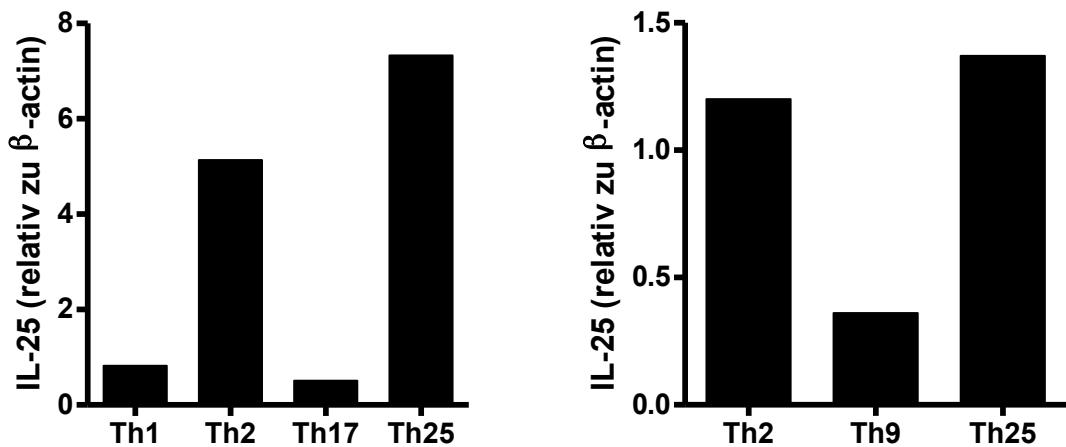


Abb. 8: IL-25 Expression in unterschiedlichen T-Zell Populationen (Th1, Th2, Th9, Th17, Th25)

Auf Proteinlevel konnte zusätzlich, wie in Abb. 9, gezeigt werden, dass die alleinige T-Zell-Rezeptor-Stimulation und Co-Stimulation keine IL-25 Produktion nach sich zieht, hingegen die T-Zell-Rezeptor-Stimulation in Gegenwart von anti-IL-4-, anti-IFN $\gamma$ - und anti-IL-12-Antikörpern, also unter den Th25-Stimulation-Bedingungen, eine IL-25 Produktion induziert. Hierfür wurden MACS<sup>®</sup> gesortete CD4 $^{+}$  T-Zellen aus Mausmilzen 4 Tage in vitro kultiviert, mit

PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brevendin-A zusätzlich stimuliert und die Proteinlysate der einzelnen Zellproben mit Hilfe des Western Blots analysiert.

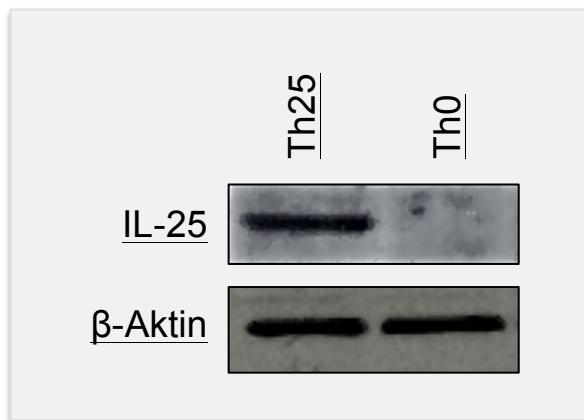


Abb. 9: Westernblot: Expression von IL-25 in Th25 und in Th0

#### 4.2 Komplette „Default“ Stimulation als Notwendigkeit für Th25 Entstehung

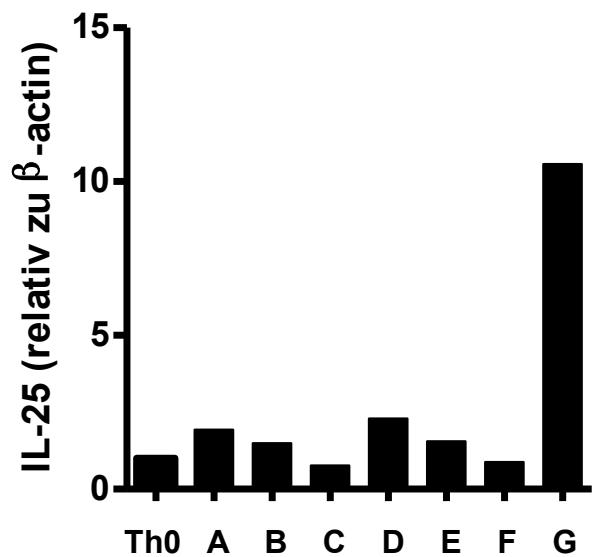
Es stellte sich die Frage, ob eine T-Zell-Rezeptor-Aktivierung mit Co-Stimulation in Kombination mit einem einzigen bestimmten blockierenden Antikörper zur Th25 Induktion führt, ob eine Kombination aus zweien dieser Antikörper notwendig ist oder ob tatsächlich ausschließlich eine komplett Inhibierung durch anti-IL-4, anti-IL-12 und anti-IFNy zu IL-25 produzierenden T-Zellen führen würde. Hierfür wurden MACS® gesortete CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Mausmilzen 3 Tage in vitro kultiviert, wobei die Stimulation in folgenden Kombinationen durchgeführt wurde:

Probe	Antikörper	Konzentration
<b>Probe A = Th0</b>	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
<b>Probe B</b>	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
<b>Probe C</b>	anti-IL-4	10 µg/ml
	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
<b>Probe D</b>	anti-IL-12	10 µg/ml
	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
<b>Probe E</b>	anti-IFNy	10 µg/ml
	anti-CD3ε	10 µg/ml

		Ergebnisse
	anti-CD28	2 µg/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
	anti-IL-12	10 µg/ml
<b>Probe F</b>	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
	anti-IFNγ	10 µg/ml
<b>Probe G</b>	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	anti-IL-12	10 µg/ml
	anti-IFNγ	10 µg/ml
<b>Probe H (=Th25)</b>	anti-CD3ε	10 µg/ml
	anti-CD28	2 µg/ml
	anti-IL-4	10 µg/ml
	anti-IL-12	10 µg/ml
	anti-IFNγ	10 µg/ml

**Abb. 10: Stimulationsschema „Default“-Stimulation mit unterschiedlichen Antikörper-kombinationen**

Es wurde eine mRNA-Expressionsanalyse mittels quantitativer PCR durchgeführt, bei der, wie in Abb. 11, gezeigt wurde, dass ausschließlich die Kombination aus den drei inhibierenden Antikörpern gerichtet gegen IL-4, IL-12 und IFNγ in Kombination mit T-Zell-Rezeptor Aktivierung und Ko-Stimulation zu einer Hochregulation der IL-25 auf mRNA-Ebene führt.



**Abb.11: mRNA IL-25 Expression, Stimulationskombination mit inhibierenden Antikörpern.** Ausschließlich die Stimulationskombination mit anti-CD3ε, anti-CD28, anti-IL4, anti-IL12 und anti-IFNγ führt zu IL-25 Produktion naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen

### 4.3 Th25 produziert keine Zytokine der anderen T-Helper-Zelllinien

T-Helper-Zellen werden durch Ihre Fähigkeit, bestimmte Zytokine zu produzieren, charakterisiert. Um die Th25 Zelle weiter zu beschreiben, musste nun analysiert werden, welche Zytokine von dieser Zellpopulation produziert werden. Mittels FACS und PCR Analyse wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu den Populationen Th1, Th2, Th9 oder Th17, die jeweils für sie charakteristische Zytokine exprimiert haben, die Th25 Stimulation nicht zu Induktion dieser Zytokine führt. Hierfür wurden  $CD4^+$  T-Zellen aus Mausmilzen 4 Tage unter differenzierenden Stimulationsbedingungen (siehe Abb. 7) kultiviert und anschließend mit Oberflächen- sowie intrazellulären fluoreszierenden Antikörpern gefärbt.

Abbildung 12A zeigt die FACS-Analyse von  $CD4^+$  T-Zellen, die in die Richtungen Th1 und Th25 Richtung stimuliert wurden. Th1 sind positiv für IFN $\gamma$ . Die Zellen der Th25-Reihe weisen dagegen wesentlich weniger Positivität für IFN $\gamma$  auf.

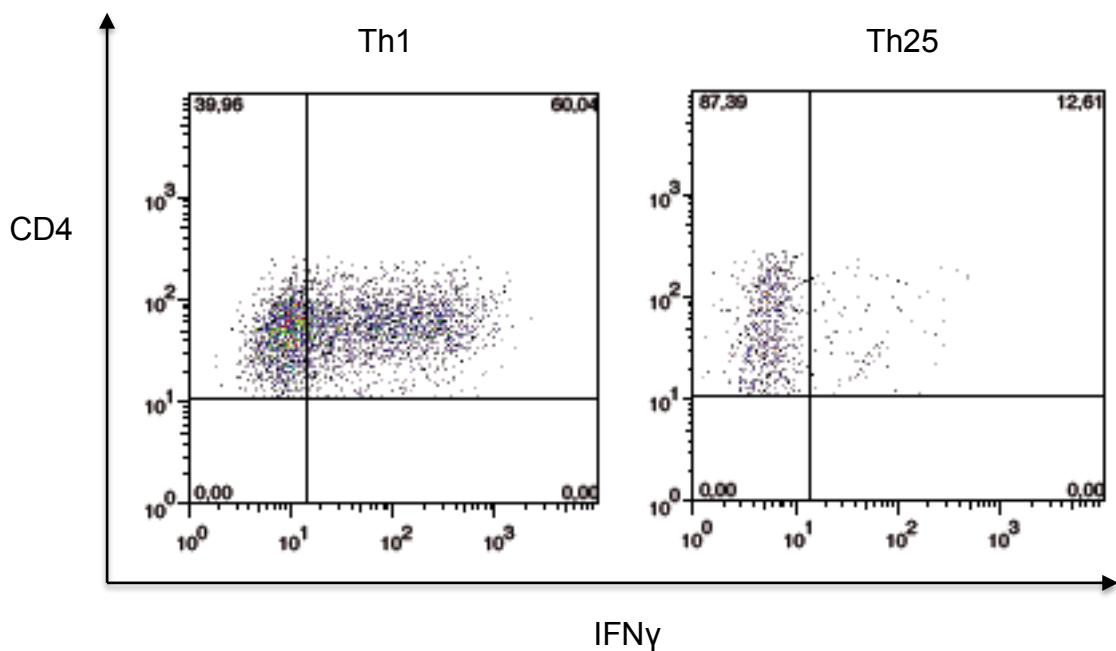


Abb. 12A: Th1 und Th25 FACS-Analyse bezüglich IFN $\gamma$  Expression

Aus Abb. 12B ist ersichtlich, dass mehr IL-17 in den Th-17 Populationen exprimiert wurde als in der Th25 Population.

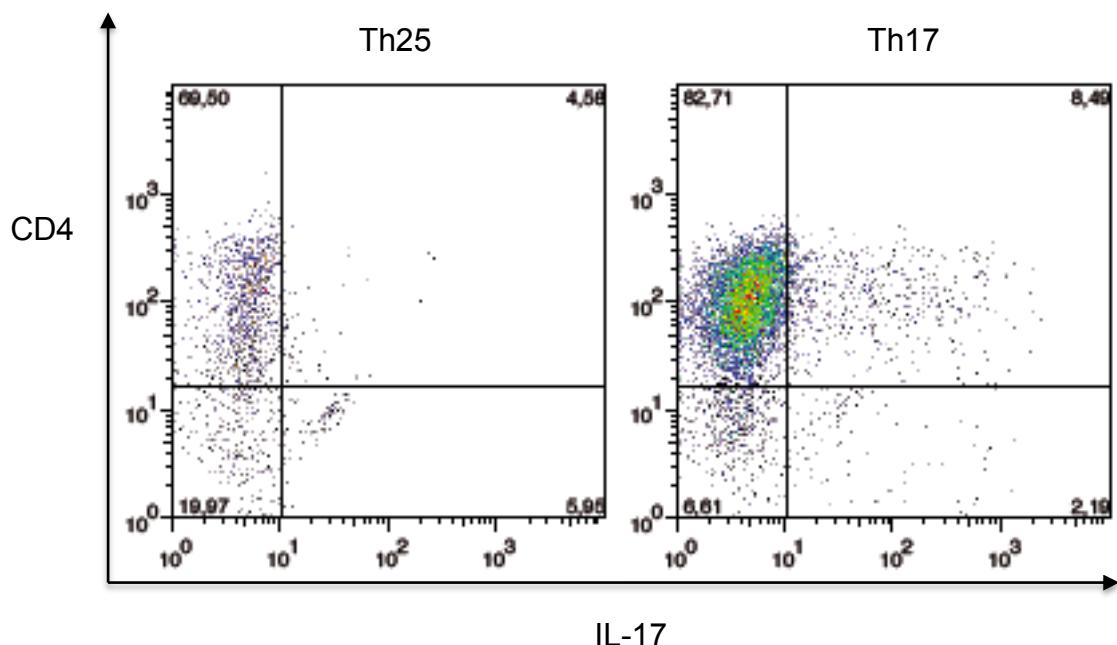


Abb.12B: IL-17 Produktion durch Th17 und Th25

Die Abbildung 13 zeigt eine PCR-Genexpressionsanalyse für die charakteristischen Zytokine der jeweiligen T-Helfer Populationen, d.h. IFN- $\gamma$  für Th1, IL-4 und IL-13 für Th2, IL-9 für Th9 und IL-17 für Th17. Es wird ersichtlich, dass die Th-25 Zellpopulation keine für die anderen Zellgruppen spezifischen Zytokine produziert.

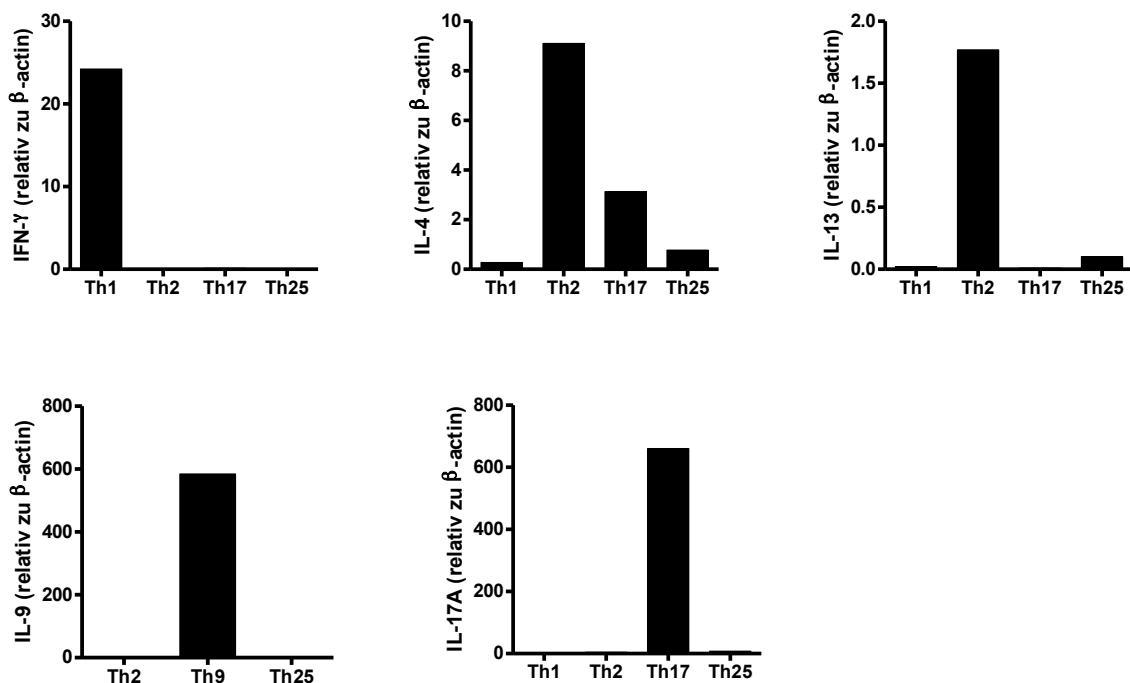


Abb. 13 PCR-Genexpressionsanalyse der charakteristischen T Helfer Zytokine

## 4.4 Th25 Stimulationsbedingungen induzieren keine inhibitorischen Foxp3<sup>+</sup>

### Treg

Um Th25 gegenüber den inhibitorischen Foxp3<sup>+</sup> Treg abzugrenzen, wurden mittels Durchflusszytometrie gewonnene naive CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Zellen aus der Foxp3-GFP Reporter-Maus in die Th25-Richtung sowie mit Hilfe von TGF- $\beta$ 1 in die iTreg-Richtung stimuliert. Dabei erzielt man unter TGF- $\beta$ 1 eine Polarisation der T-Zellen in einen inhibitorischen Phänotyp, welcher sich in seiner Funktion von den proinflammatorischen Th1, Th2, Th17 oder Th9 unterscheidet. Abb. 6 zeigt eine FACS-Analyse zur Foxp3-GFP Expression. Unter Th25 Stimulationsbedingungen konnte keine Foxp3-Expression induziert werden, wohingegen unter Zugabe von TGF- $\beta$ 1 die initial Foxp3<sup>-</sup> Zellen in Foxp3<sup>+</sup> Zellen konvertiert wurden.

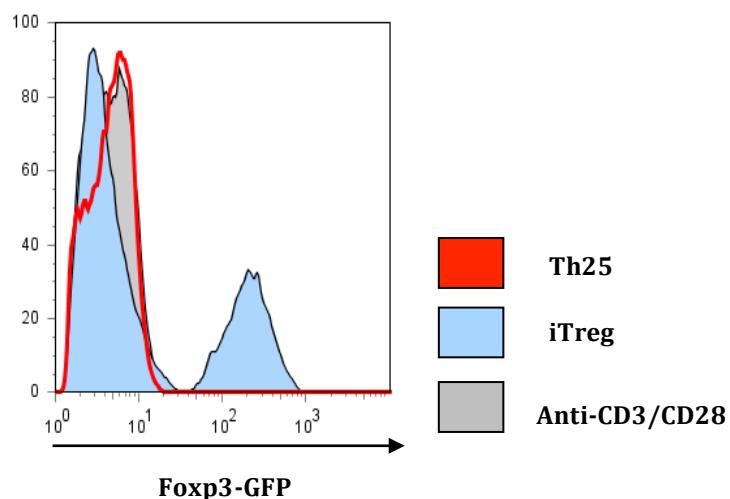


Abb. 14: FACS-Analyse zur Foxp3-GFP Expression der Th25 und der iTreg

## 4.5 Klassische T-Helfer Transkriptionsfaktoren sind nicht für die Th25 Differenzierung verantwortlich

T-Helfer Zellpopulationen werden neben der Produktion von einzelnen Zytokinen durch Expression von charakteristischen Transkriptionsfaktoren definiert.

In PCR-Expressionsanalysen fanden wir heraus, dass die Transkriptionsfaktoren T-bet, Gata-3 bzw. Ror $\gamma$ T unter den jeweiligen Differenzierungsbedingungen respektive Th1, Th2 oder Th17 hochreguliert waren. Keiner dieser Faktoren war jedoch in der Th25 Population signifikant hoch exprimiert, wie in Abb. 15 gezeigt.

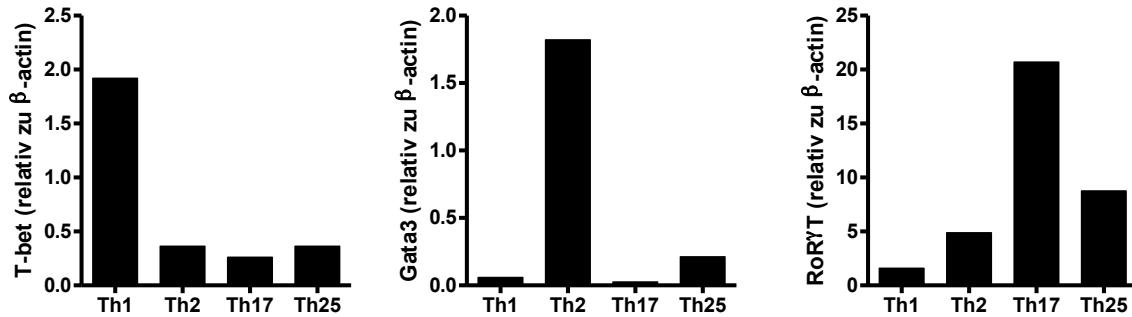


Abb. 15: PCR-Expressionsanalyse von T-bet, Gata3 und Ror $\gamma$ T

#### 4.6 Th25 Zellen zeigen eine reduzierte Proliferationsrate

Des Weiteren untersuchten wir die Auswirkung der „Default-Stimulation“ naiver CD4 $^{+}$  T Zellen auf ihre Proliferationsfähigkeit. Dabei trat eine wichtige Eigenschaft der Th25 Zellen zu Tage. Sie zeigten nämlich eine signifikant geringere Proliferationsrate im Vergleich zu anderen T Zellpopulationen. Hierzu wurde, wie in 3.2.4 beschrieben, ein Proliferationsassay mit Hilfe von CFSE durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (Abb. 16)

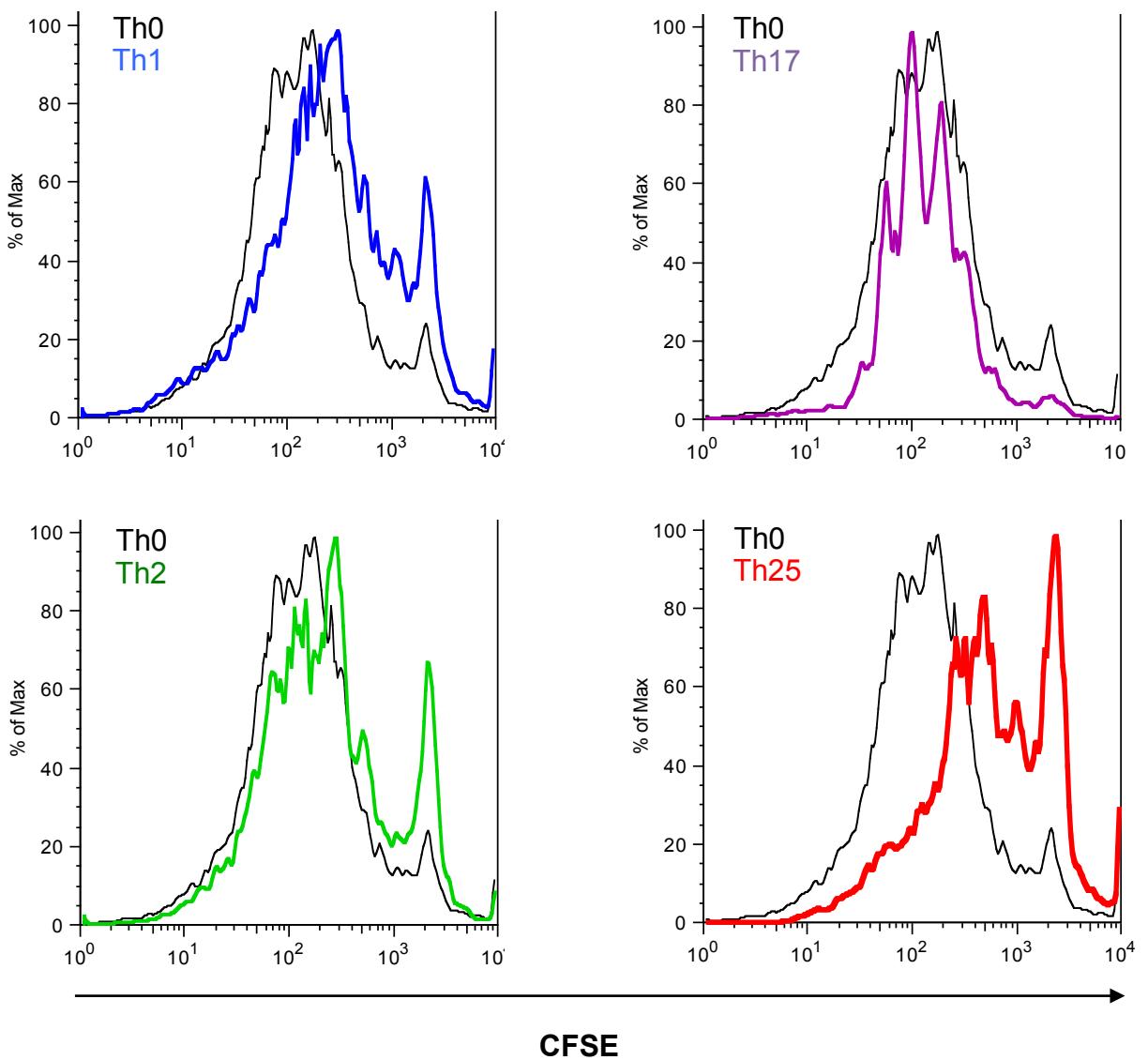
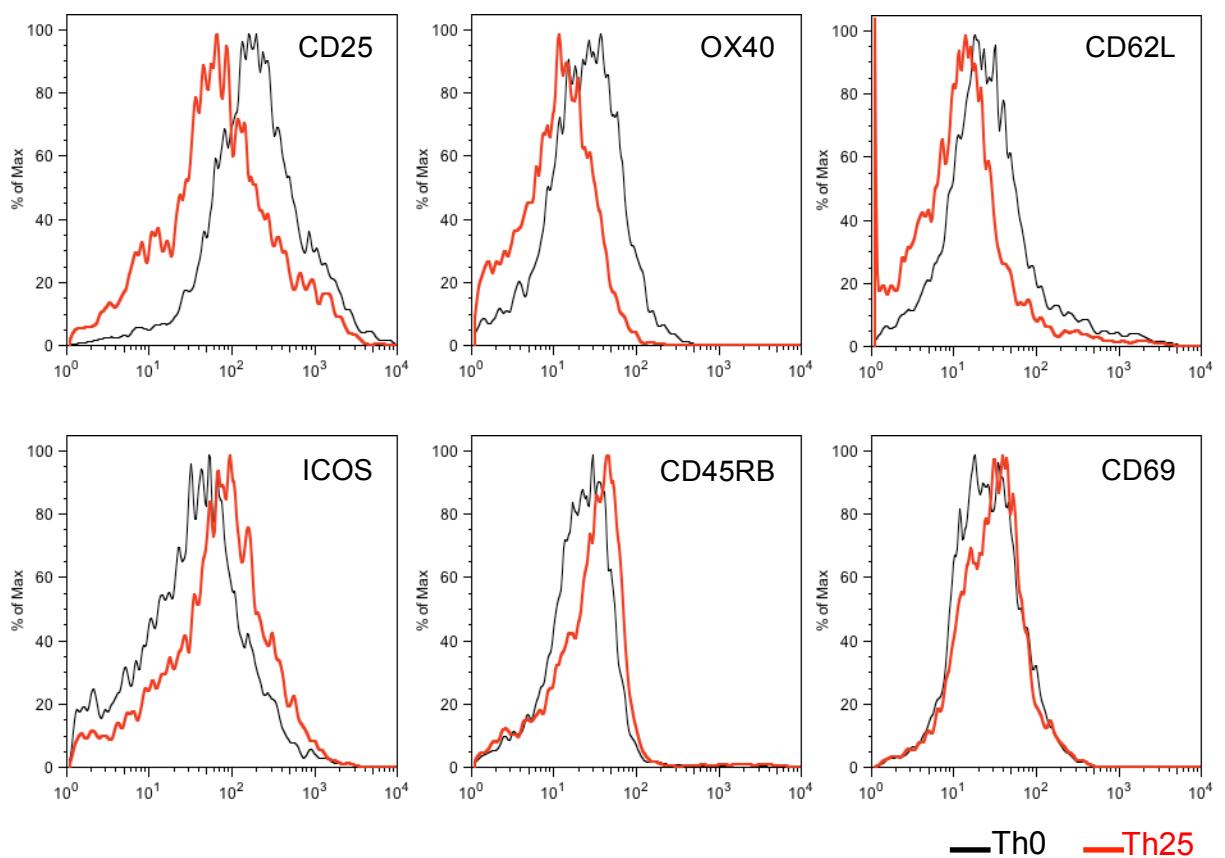


Abb. 16: Proliferationsrate der T-Zell Populationen

#### 4.7 Th25 – Phänotyp anhand der Oberflächenantigene

Wenn eine naive  $CD4^+$  T-Zelle stimuliert wird, finden charakteristische Veränderungen der Oberflächenantigene statt, die den Aktivitätsstatus der T-Helfer-Zellen repräsentieren. Auch die Stimulationsbedingungen für die Th25 Zelle führten zu Veränderungen der Oberflächenantigene. Abbildung 17 zeigt, dass die Th25 Population im Vergleich zur Th0 Population (naive  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen unter T-Zell-Rezeptorstimulation und Ko-Stimulation) eine niedrigere Antigen-Expression der Oberflächenmarker CD25, CD62L und OX 40 hatte. Andererseits war ICOS bei Th25 Zellen etwas höher reguliert. CD69 und CD45RB blieben größtenteils unverändert.

## Ergebnisse



**Abb. 17: Charakteristisches Muster der Oberflächenantigene**

## 5 Diskussion

T-Helper-Zellen sind Hauptakteure der Immunantwort. Das Wissen über die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen in Th1, Th2, Th7, Th9 und regulatorische Treg sowie über die Kontrollmechanismen, die diese Differenzierung herbeiführen, wirft die Frage auf, ob auch weitere T-Helper Populationen existieren. Forschungsergebnisse der letzten Jahre geben Anhalt zu der Annahme, dass eine solche CD4<sup>+</sup> T Helper Population IL-25 produziert und eine selbstständige Linie, nämlich die Th25 darstellt [43], [44]. Bisher konnten allerdings diese Zellen weder eindeutig identifiziert werden, noch konnten die Bedingungen, unter welchen es zu einer Differenzierung der naiven T-Helper-Zellen in die Th25 Richtung kommt, beschrieben werden. Die vorliegende Arbeit definiert nun die in vitro Voraussetzungen für die Entstehung der IL-25 produzierenden T-Helper-Zellen.

T-Helper-Zellen werden durch die Produktion ihrer spezifischen Zytokine gekennzeichnet. So produzieren Th1 IFN- $\gamma$  sowie IL-2. Th2 Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-13 sowie IL-10. Bei Th17 werden gleichzeitig IL-17A, IL-17F, IL-21 sowie weitere Zytokine erzeugt [30]. Um zu beweisen, dass Th25 eine eigenständige T-Zelllinie ist, wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass diese Zellpopulation keine derjenigen Zytokine produziert, die charakteristisch für andere T-Helper-Zellen sind.

Die ersten T-Helper-Zellen, von denen bekannt wurde, dass sie nach Stimulation IL-25 produzieren können, waren Th2 [34]. Zum einen ist die IL-25 mRNA bei Th25 wesentlich höher exprimiert als bei Th2, zum anderen scheinen die Th25 Zellen im Gegensatz zu Th2 Zellen ausschließlich IL-25 zu produzieren. Dies unterscheidet Th-25 Zellen von anderen T-Helper Zellpopulationen, bei denen die simultane Produktion von Zytokinen häufig ist.

IL-25 Produktion durch naive T-Zellen wird durch die Stimulation des TCR und Kostimulation sowie simultaner Inhibition von Zytokinsignalen induziert. Im Speziellen erfolgt neben der generellen Aktivierung der T Zellen eine Hemmung der Differenzierung in Richtung Th1 und Th2. Die in dieser Arbeit aufgezeigten Daten führen zu dem Schluss, dass die Polarisierung von naiven T-Zellen in das Stadium der Th25 Zellen nur möglich ist, wenn alle anderen T-Helper Polarisationsrichtungen blockiert werden. Beachtenswert ist es, dass ein anti-IFN- $\gamma$

Antikörper notwendig ist um Th25 Zellen zu generieren. Das Inhibieren von IFN- $\gamma$  mittels Anti-IFN- $\gamma$  Antikörper ist aber für die Polarisation in Th1, Th2, Th17, Th9 oder iTreg Richtungen nicht von Nöten. Folglich lässt die Unentbehrlichkeit des anti-IFN- $\gamma$  Antikörpers darauf schließen, dass (möglicherweise autokrine) IFN- $\gamma$ -vermittelte Effekte blockiert werden müssen, damit eine naive T-Zelle in die Th25 Zelle differenzieren kann.

Neben einem spezifischen Zytokin-Profil, sind T-Helper-Zellen anhand der Abhängigkeit von spezifischen Transkriptionsfaktoren charakterisiert. Bisher gilt es noch aufzuklären, welcher Transkriptionsfaktor für das Entstehen von Th25 Zellen verantwortlich ist. Die Tatsache, dass weder T-bet, noch Gata3/Stat-6 noch Ror $\gamma$ t zur Entwicklung einer ausschließlich IL-25 produzierenden T-Helper Zellpopulation beitragen, untermauert aber die Annahme, dass diese spezielle T-Helper-Zelle ein neues Familienmitglied der polarisierten T-Helper-Zellen darstellt. Es wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Pu.1 entscheidend für die Entstehung von Th9 Zellen ist [27]. Es scheint eher unwahrscheinlich, dass Pu.1 auch für die Produktion von IL-25 durch „Default“ stimulierte naive CD4 $^+$ T Zellen verantwortlich ist, denn Th25 produziert weder IL-9 noch IL-10, welche die charakteristischen Th9 Zytokine sind.

Ursprüngliche Beobachtungen haben gezeigt, dass IL-25 mRNA in den polarisierten Th2 Zellen hoch exprimiert wird. Nun wird offensichtlich, dass auch andere Zellen IL-25 produzieren können. Darunter sind zum Beispiel Mast-Zellen, die primär aus dem Knochenmark stammen, alveolare Makrophagen, stammzellfaktorstimulierte Eosinophile und Basophile sowie Epithelzellen der Lunge nach Stimulation durch ein Allergen [40], [45], [46], [47], [48]. Außerdem wird IL-25 von intestinalen Epithelzellen und Endothelzellen der Gehirnkapillaren produziert [49], [50]. Indes sind die zugrunde liegenden Mechanismen, die die IL-25 Produktion kontrollieren, noch nicht verstanden worden. Diese Arbeit zeigt, dass eine spezielle T-Helper-Zell Population befähigt ist, IL-25 zu produzieren. Dies eröffnet eine neue Denkweise bezüglich der Produktion von IL-25 durch T-Zellen und ihrer möglichen Beteiligung an der Entwicklung von allergischen Erkrankungen oder der Regulation von inflammatorischen Prozessen – beides Funktionen, die IL-25 zugeschrieben werden.

Die Frage, warum unter Stimulationsbedingungen, die eine Polarisation der T-Helper-Zellen in Th1, Th2, Th17, Th9 oder iTreg Richtung verhindern, eine Induktion von IL-25 produzierenden T Zellen erfolgt, bleibt offen. Unpublizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe

zeigen, dass Th25 Zellen *in vivo*, in murinen Modellsystemen und humanen Erkrankungen vorkommen. Es bedarf weiterer Forschung um die genaue Funktion dieser T-Zell Differenzierungsreihe bei humanen Erkrankungen darlegen zu können.

Da T-Helfer-Zellen prinzipiell in hohen Mengen vorhanden sind und IL-25 eine breite Wirkung auf verschiedene Zelltypen in unterschiedlichen Organen hat, wäre es nicht überraschend, wenn Th25 Zellen für die Koordination einer Immunantwort *in vivo* zuständig wären.

Beispielsweise konnte man zeigen, dass IL-25 zum einen eine Typ-2-Zytokin abhängige Immunreaktion gegenüber einer gastrointestinale parasitären Infektion fördert, indem die Expression von IL-5 und IL-13 heraufreguliert wird. Zum anderen konnte eine Limitierung der proinflammatorischen Zytokinproduktion und chronischer intestinaler Entzündung beobachtet werden [44]. Eine Aktivierung des NF-κB durch IL-25 konnte eruiert werden [51]. Mit Darmparasiten infizierte Mäuse, die NF-κB1 (p50) defizient sind, entwickeln eine schwere intestinale Entzündung [52]. Daraus lässt sich möglicherweise schließen, dass IL-25 induzierte NF-κB Aktivierung eine kritische Komponente zur Bekämpfung einer Entzündung sowie zur Erhaltung der Integrität einer Schleimhautbarriere darstellt [44].

Es wurde bereits gezeigt, dass intestinale Fibrose der Initiierung einer IL-13-abhängigen fibrogenen Antwort folgt, welche auf einer chronischen intestinalen Entzündung beruht [42]. Diese fibogene Reaktion führt letztendlich zu TGF- $\beta_1$  Produktion und zu Ablagerung von extrazellulärem Kollagen. In der Untersuchung des Mechanismus, wie der Umbau vom chronisch-entzündlichen Prozess in Richtung Organfibrosierung stattfindet, wurde in einer *ex vivo* Analyse gezeigt, dass die Inhibition von IL-25, welches von CD4 $^+$  T Zellen produziert wird, die Produktion von IL-13 verhinderte [53] [54]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, wie IL-25 die Entwicklung aus chronischer Entzündung in Organfibrose beeinflusst und zu Verlust von Organfunktion führt. Da Gewebsfibrose oft der einzige Ausweg des Organismus ist, eine selbstunterhaltene chronische Entzündung zu beenden, könnte Th25 möglicherweise eine zelluläre Komponente sein, die zumindest teilweise für diesen Umbauprozess von Entzündung in Fibrose des Kolons verantwortlich ist.

## Diskussion

Was die Fibrogenese betrifft, welche eine Folge von kontinuierlicher, oft selbst unterhaltener Organentzündung ist, wäre eine Hypothese, dass, um die Entzündung zu beenden, das Organ zunächst umgebaut werden muss. Der Anfang dieser Terminierungsaktion mag die Inhibition weiterer proinflammatorischer T-Helfer-Zell-Differenzierung und folglich Th25-Generierung sein. Da IL-25 der Anfang eines Fibroseprogramms sein könnte, indem es IL-13 induziert, wäre die Hemmung der Differenzierung der proinflammatorischen T-Helfer-Zellen der erste Schritt, um die fortwährende chronische Gewebszerstörung zu beenden.

## 6 Zusammenfassung

Naive T-Helfer-Zellen sind Teil der erworbenen Immunantwort und können in unterschiedliche Effektor T-Zellen differenzieren. Das Paradigma des Dualsystems von Th1 und Th2 nahm in den letzten Jahren sein Ende, als weitere T Zell Populationen, nämlich Th17, Th9 und regulatorische Treg beschrieben wurden.

Charakterisiert werden T-Helfer-Zellen durch eine für sie spezifische Zytokinproduktion. So bilden Th1 Zellen typischerweise IFNy, Th2 bilden IL-4, IL-5 und IL-13. Bei Th17 Zellen entsteht das namensgebende IL-17A, bei Th9 ist es neben dem IL-9 das IL-10. Treg Zellen zeichnen sich durch IL-10 und TGF- $\beta$  aus.

Neben dem speziellen Zytokinprofil werden die unterschiedlichen T-Helfer-Zellen durch spezifische Transkriptionsfaktoren determiniert. So transkribieren T-bet und Stat 4 für Th1, GATA3 und Stat6 für Th2, ROR $\gamma$ t und Stat3 für Th17, Foxp3 und Stat5 für Treg und Pu.1 für Th9.

Bisher galt, dass das IL-25, ein Interleukin der IL-17 Familie, neben Th2 Zellen von Mastzellen und Epithelzellen produziert wird. In vorliegender Arbeit wurde eine IL-25 produzierende Zellgruppe identifiziert, die sich von anderen T-Helfer-Zellen abgrenzen lässt - die Th25 Zellen. Diese Zellen produzieren keines der für andere T-Helfer-Zellen typischen Interleukine und sie werden auch nicht durch Transkriptionsfaktoren bestimmt, die charakteristisch für bereits etablierte T-Helfer Populationen sind.

Die durchgeführten Experimente mittels Zellkultur, quantitativer PCR, Durchflusszytometrie, Western Blot sowie Proliferationsassay definieren die in vitro Voraussetzungen, die für das Entstehen der IL-25 produzierenden T-Helfer-Zellen notwendig sind. Durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors sowie CD28 Kostimulation und einer Kombination aus inhibitorischen Antikörpern gegen IL-4, IL-12 und IFNy, die eine Differenzierung in Th1 und Th2 verhindern, wird eine naive CD4 $^{+}$  T-Zelle in die Th25 Richtung getrieben. Die durch „Default-Stimulation“ entstandene Zellpopulation zeichnet sich durch eine weitaus höhere Produktion von IL-25 als Th2 aus. Dies kann sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Wie in einer FACS-Analyse gezeigt werden konnte, exprimieren Th25 Zellen im Gegensatz zu den regulatorischen T-Zellen kein Foxp3 und sind somit von diesen abzugrenzen.

Neben Zytokinproduktion und Transkriptionsfaktorexpression wird eine T-Zelle durch ihren molekularen Phänotyp charakterisiert. Th25 Zellen zeigen eine langsamere Proliferation als Th1, Th2 oder Th17. Des Weiteren zeigen Th25 eine geringere Expression von CD25, CD62L und OX40 sowie eine höhere Expression von ICOS und etwa gleich viel CD69 und CD45RB im Vergleich zu naiven T-Helfer-Zellen.

IL-25 spielt eine Rolle in der Immunantwort auf Parasiten und bei allergischen Reaktionen und ist in der Übergangsphase intestinaler Entzündung zu Fibrogenese hoch exprimiert.

In weiterer Forschungsarbeit gilt es herauszufinden, unter welchen Bedingungen es zum Entstehen der Th25 Zellpopulation in vivo kommt, welcher Funktion diese Zellen in einer Immunantwort und den Pathologien wie Allergien, Organfibrose und chronischer Entzündung nachkommen und wie dies als therapeutischer Angriffspunkt zu nutzen ist.

## Quellenverzeichnis

1. Murphy KT, P.; Walport, M.; *Janeway's Immunobiology*: Garland Science; 2007.
2. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000, **343**:37-49.
3. In: *Pschyrembel, klinisches Wörterbuch*. 259 ed. Berlin: Walter de Gruyter; 2001. pp. 781-782.
4. Mörner KAH. *Award Ceremony Speech*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company; 1908.
5. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *Int J Infect Dis* 2010, **14**:e744-751.
6. Metchnikoff E, Binnie FG. *Immunity in infective diseases*. Cambridge,: University Press; 1905.
7. Metchnikoff E. *On the Present State of the Question of Immunity in Infectious Diseases*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company; 1908.
8. Grunbacher FJ. Behring's discovery of diphtheria and tetanus antitoxins. *Immunol Today* 1992, **13**:188-190.
9. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001, **357**:1777-1789.
10. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000, **343**:108-117.
11. Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1987, **166**:1229-1244.
12. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989, **170**:2081-2095.
13. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986, **136**:2348-2357.
14. Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol* 2003, **4**:616-623.

15. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007, **19**:652-657.
16. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008, **453**:1051-1057.
17. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:485-517.
18. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007, **19**:362-371.
19. McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 2008, **28**:445-453.
20. O'Connor W, Jr., Zenewicz LA, Flavell RA. The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. *Nat Immunol* 2010, **11**:471-476.
21. Venuprasad K, Kong YC, Farrar MA. Control of Th2-mediated inflammation by regulatory T cells. *Am J Pathol* 2010, **177**:525-531.
22. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:313-338.
23. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009, **30**:616-625.
24. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 2009, **10**:689-695.
25. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, 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**:1341-1346.
26. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, 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**:1347-1355.
27. Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, 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**:527-534.
28. Ziegler SF. Regulatory T cells and inflammation: better late than never. *Immunity* 2008, **29**:5-7.
29. Zhu J, Paul WE. CD4+ T cell plasticity-Th2 cells join the crowd. *Immunity* 2010, **32**:11-13.

30. Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010, **20**:4-12.
31. O'Shea JJ, Hunter CA, Germain RN. T cell heterogeneity: firmly fixed, predominantly plastic or merely malleable? *Nat Immunol* 2008, **9**:450-453.
32. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 2000, **21**:479-483.
33. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996, **383**:787-793.
34. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001, **15**:985-995.
35. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 2008, **29**:429-435.
36. Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 2002, **109**:901-912.
37. Letourneur F, Klausner RD. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* 1992, **255**:79-82.
38. Angkasekwinai P, Chang SH, Thapa M, Watarai H, Dong C. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nat Immunol* 2010, **11**:250-256.
39. Angkasekwinai P, Srimanote P, Wang YH, Pootong A, Sakolvaree Y, Pattanapanyasat K, et al. IL-25 promotes efficient protective immunity against *T. spiralis* infection by enhancing antigen-specific IL-9 response. *Infect Immun* 2013.
40. Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, 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**:1837-1847.
41. Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM, et al. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2007, **204**:161-170.
42. Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Young CA, Watanabe T, Geissler EK, Schlitt HJ, 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**:5859-5870.
43. Tato CM, Laurence A, O'Shea JJ. Helper T cell differentiation enters a new era: le roi est mort; vive le roi! *J Exp Med* 2006, **203**:809-812.

44. Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, Guild KJ, McClanahan T, Miller HR, *et al.* Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2006, **203**:843-849.
45. Monteleone G, Pallone F, Macdonald TT. Interleukin-25: a two-edged sword in the control of immune-inflammatory responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010, **21**:471-475.
46. Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, *et al.* Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* 2003, **101**:3594-3596.
47. Kang CM, Jang AS, Ahn MH, Shin JA, Kim JH, Choi YS, *et al.* Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005, **33**:290-296.
48. Dolgachev V, Petersen BC, Budelsky AL, Berlin AA, Lukacs NW. 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**:5705-5715.
49. Zaph C, Du Y, Saenz SA, Nair MG, Perrigoue JG, Taylor BC, *et al.* Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine. *J Exp Med* 2008, **205**:2191-2198.
50. Sonobe Y, Takeuchi H, Kataoka K, Li H, Jin S, Mimuro M, *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**:31834-31842.
51. Lee J, Ho WH, Maruoka M, Corpuz RT, Baldwin DT, Foster JS, *et al.* IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. *J Biol Chem* 2001, **276**:1660-1664.
52. Artis D, Shapira S, Mason N, Speirs KM, Goldschmidt M, Caamano J, *et al.* Differential requirement for NF-kappa B family members in control of helminth infection and intestinal inflammation. *J Immunol* 2002, **169**:4481-4487.
53. Fichtner-Feigl S, Strober W, Geissler EK, Schlitt HJ. Cytokines mediating the induction of chronic colitis and colitis-associated fibrosis. *Mucosal Immunol* 2008, **1 Suppl** 1:S24-27.
54. Fichtner-Feigl S, Young CA, Kitani A, Geissler EK, Schlitt HJ, Strober W. IL-13 signaling via IL-13R alpha2 induces major downstream fibrogenic factors mediating fibrosis in chronic TNBS colitis. *Gastroenterology* 2008, **135**:2003-2013, 2013 e2001-2007.



## Danksagung

An allererster Stelle möchte ich dem besten Doktorvater und Betreuer danken, den man sich als medizinischer Doktorand vorstellen kann. Seine wissenschaftliche Expertise, seine Geduld, seine konstruktive Kritik sowie Kreativität ermöglichen das Zustandekommen dieser Arbeit. Vor allen Dingen ist es aber der Mensch **Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl**, der hinter dem Wissenschaftler, Arzt, Chef und Mentor steckt, der anstatt der Frustration über misslungene Versuche und statt dem Stress der Zeitnot eine freundschaftliche und witzige und angenehme Atmosphäre schafft. Herzlichen Dank auch über die einzigartige Möglichkeit, die Arbeit in Japan auf dem ICI2010 vorstellen zu dürfen. Über die Jahre, und das waren einige, ist eine treue Freundschaft entstanden, der Wertschätzung welcher Worte nicht gebührend Ausdruck verleihen können. Danke!

Mein herzlicher Dank gilt der gesamten Fi-Fei Arbeitsgruppe. Ganz besonderer Dank geht dabei an **Manuela Kovács-Sauter**, ohne die diese Arbeit unmöglich gewesen wäre. Nicht nur hat sie mir - wie einem Kleinkind das Gehen - alles beigebracht, was man im Labor wissen muss. Sie hat mich auch immer professionell angeleitet und von manch so einer Gedankensackgasse befreit. Sie hat mich motiviert und hat mit mir zu ‚Sky and Sand‘ mitten im Labor den Frust weggetanzt um dann einfach weiterzumachen.

Vielen Dank natürlich an **Rebecca Kesselring**, die dieses Projekt erst zu dem gemacht, was es jetzt ist und es mit noch mehr Herzblut weitergeführt, expandiert und perfektioniert hat. Nicht zu vergessen sind natürlich **Stefanie Nagel, Maria Martin, Stefan Brunner** und **Gabriela Schiechl**, die stets mit Rat und Tat und guter Laune an meiner Seite waren.

Ein besonderer Dank geht selbstverständlich an Freund und „Leidensgenossen“ **Dominik Jauch**, der manch eine Nacht im Labor an meiner Seite pipettiert hat, die Versuche mitgestaltet hat und meinen „Tränensee“ bei Missglücken ertragen hat. Vielen Dank auch an meine treuen Freundinnen und rat- und tatkräftige Unterstützer **Franziska Schwan** und **Bernadette Neueder**.

Ein nicht in Worte zu fassender Dank gilt den wichtigsten Menschen in meinem Leben - meiner Familie. Meine Eltern **Boris Noev** und **Elizaveta Noeva** und meine Schwester **Marina**

## Danksagung

**Tsatskis**, die das Schicksal unserer Familie und unserer Zukunft in die Hand genommen haben, um den mutigen Schritt zu wagen, ein neues Leben in einem fremden Land anzufangen. Sie haben mich immer ermutigt, mein Bestes zu geben und nach dem Größten zu streben. Meine Eigenständigkeit, hoffentlich Anständigkeit sowie meinen Willen habe ich nur ihrer selbstlosen Erziehung und bedingungsloser Liebe zu verdanken.

Der größte Dank und die Widmung meiner Arbeit aber geht an meinen geliebten Ehemann **Alexander Utschitel**, der unmenschliche Geduld, grenzenlose Liebe, eine Menge Taschentücher, Blumen und Pralinen aufgebracht hat, um mich durch mein Studium, durch die Arbeit im Labor und durch das Fertigstellen dieses Manuskripts zu bringen. Er ist es, an dem tagtäglich meine Launen abprallen, dessen Ruhe mich wieder ins Gleichgewicht und dessen Witz und Humor mich zum Lachen bringen. Спасибо, любимый!

# Curriculum vitae

## E k a t e r i n a   N o e v a

### Persönliches

Name: Ekaterina Noeva  
Geburtsdatum: 26. Oktober 1983  
Geburtsort: Leningrad (RUS)  
Familienstand: verheiratet mit Alexander Utschitel, Rechtsanwalt

### Ausbildung

11/2011 Erlangung der Approbation als Ärztin  
10/2005 – 11/2011 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg  
09/1995 – 06/2004 Werner-von-Siemens Gymnasium, Regensburg  
08/2001 – 07/2002 Groversville High School, Groversville, NY, USA

### Promotion

Seit 07/2008 „Default-Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt zu IL-25 produzierenden T-Zellen“ unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg

### Facharztweiterbildung

Seit 02/2012 Assistenzärztin, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg

### Praktisches Jahr

06/2011-07/2011 Institut für Röntgendiagnostik, Universitätsklinikum Regensburg  
04/2011-06/2011 Interventional Radiology and Body-CT, Department of Radiology, University of California San Diego, USA  
12/2010-04/2011 Innere Medizin, Universitätsklinikum Regensburg  
10/2010-12/2010 Chirurgie am Princess Margaret Hospital, University of the West Indies, Nassau, Bahamas  
08/2010-10/2010 Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg

### Famulaturen

03/2010 Abteilung für Plastische und Handchirurgie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg

# Curriculum vitae

## E k a t e r i n a   N o e v a

---

09/2009	Department of Plastic and Hand Surgery, Wythenshawe University Hospital, Manchester, UK
02/2009-03/2009	Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinik Regensburg
03/2008-04/2008	Institut für Überdruckmedizin, Regensburg

### Stipendien

04/2011-06/2011	Stipendium des Studentischen Austauschprogramms zwischen der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg und der University of Clifornia San Diego, USA
10/2010-12/2010	Reisestipendium des Programms zur Steigerung der Mobilität von Studierenden (PROMOS), Universität Regensburg
08/2001-07/2002	Stipendium des Deutschen Bundestages und des Kongresses der Vereinigten Staaten von Amerika für Deutsch-Amerikanischen Jugendaustausch

### Kongressteilnahmen

09/2010	Vortrag „IL-25 producing T-cell - a new T-cell?“ im Rahmen der 14. Chirurgischen Forschungstage der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Rostock
08/2010	Poster „IL-25 producing T-cell - a new T-cell?“ im Rahmen des 14. International Congress of Immunology in Kobe, Japan

### Sprachkenntnisse

Muttersprache:	Deutsch, Russisch
Fließend:	Englisch
Grundkenntnisse:	Französisch, Italienisch

### Hobbys und Interessen, Mitgliedschaften

Photographie, Reisen  
AFS Interkulturelle Begegnungen e.V.

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Regensburg, den \_\_\_\_\_

(Ekaterina Noeva)