

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Christoph Härtel**

**Charakterisierung von IL-9+ T-Zellen bei Patientinnen und  
Patienten mit Rheumatoider Arthritis**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Jana Severine Elisabeth Heim  
aus Würzburg**

**Würzburg, August 2021**

**Referentin:** Prof. Dr. Martina Prelog

**Korreferent:** Prof. Dr. Hans-Peter Tony

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 14.03.2022

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Rheumatoide Arthritis.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Interleukin-9 in der Pathogenese der RA.....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Interleukin 9 .....	2
1.2.2	Differenzierung von T-Helferzellen und Th9-Zellen .....	3
1.2.3	IL-9 Rezeptor .....	6
1.2.4	Funktion des IL-9.....	7
1.2.5	Wirkung des IL-9 auf Th17- und regulatorische T-Zellen .....	8
1.2.6	IL-9 und Th9-Zellen in der Pathogenese der RA.....	9
<b>1.3</b>	<b>Fragestellung und Ziel der Studie .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL, PROBANDINNEN UND PROBANDEN UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>12</b>
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	12
2.1.2	Reagenzien, Lösungen, gebrauchsfertige Kits, Stimulantien, Antikörper und Primer .....	15
<b>2.2</b>	<b>Probandinnen und Probanden .....</b>	<b>19</b>
2.2.1	RA-Patientinnen und -Patienten .....	19
2.2.2	Kontrollpersonen .....	19
<b>2.3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.3.1	Isolation von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation .....	20
2.3.2	Kryokonservierung.....	21
2.3.3	Magnetic Activated Cell Sorting (MACS).....	21
2.3.4	Bestimmung der Reinheit mittels Durchflusszytometrie .....	22
2.3.5	In vitro Zellkultur .....	23
2.3.6	Durchflusszytometrie.....	25
2.3.7	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	29
2.3.8	Real-Time-PCR.....	31
2.3.9	Statistik .....	35

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Studienkohorte</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der CD4+ Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion der Pat und HD</b> .....	<b>39</b>
3.2.1	Reinheit nach Zellseparation .....	39
3.2.2	Regulatorische T-Zellen.....	41
3.2.3	Zytokinproduktion und Expression des Chemokinrezeptors CCR6, des Proliferationsmarkers und des IL-9R.....	42
<b>3.3</b>	<b>In vitro: Stimulationsexperimente</b> .....	<b>46</b>
3.3.1	Stimulusabhängige Effekte .....	46
3.3.2	Einfluss von IL-9 .....	67
3.3.3	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	81
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>84</b>
<b>4.1</b>	<b>Phänotypisierung</b> .....	<b>84</b>
<b>4.2</b>	<b>Ähnliche Wirkung durch Th9- und Th17-Stimulation</b> .....	<b>86</b>
4.2.1	T-Zelldifferenzierung.....	86
4.2.2	Zytokinproduktion und Expression von IL-9R, CCR6 und Ki67 .....	87
4.2.3	Transkriptionsfaktor PU.1 .....	90
<b>4.3</b>	<b>Einfluss von IL-9 in proinflammatorischem Milieu</b> .....	<b>92</b>
4.3.1	Keine autokrine Regulation durch IL-9.....	92
4.3.2	Einfluss von IL-9 auf die IL-9R-Expression .....	92
4.3.3	Einfluss von IL-9 auf die Zytokinexpression in Tregs.....	93
4.3.4	IL-9-Blockade.....	94
<b>4.4</b>	<b>Methodische Einschränkungen</b> .....	<b>95</b>
4.4.1	Heterogenität der Pat-Kohorte .....	95
4.4.2	Geringe Zahl der Proben .....	95
4.4.3	Kurze Kulturzeit.....	95
4.4.4	Dosierung des Antikörpers gegen IL-9 .....	95
<b>4.5</b>	<b>Konklusion</b> .....	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>97</b>

5.1	Abstract.....	98
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	99
	APPENDIX.....	
I	Abkürzungsverzeichnis .....	
II	Abbildungsverzeichnis .....	
III	Tabellenverzeichnis .....	
IV	Danksagung.....	
V	Lebenslauf .....	
VI	Eigene Veröffentlichungen .....	
VII	Eigenleistung.....	

# 1 Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche, autoimmune Erkrankung. Weltweit ist sie die häufigste chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung [1]. Die Mehrheit der in Nordeuropa und Nordamerika durchgeführten Studien schätzen eine Prävalenz von 0,5-1% der Bevölkerung und eine jährliche Inzidenz von 0,02-0,05%. Frauen sind in den meisten Studien doppelt bis dreifach so häufig betroffen wie Männer [2].

Charakteristisch für die RA ist eine Entzündung der Synovia, der Gelenkschleimhaut, welche zu einer Zerstörung von Knorpel und Knochen und somit zu Bewegungseinschränkungen führt. Die RA ist eine systemische Erkrankung und betrifft ebenso extra-artikuläre Organe wie Augen, Herz, Lunge oder Gefäße [3]. Trotz großer Fortschritte im Verständnis der Ätiologie und in der Entwicklung neuer Therapieansätze, ist die RA weiterhin mit körperlichen Einschränkungen, systemischen Komplikationen und einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert [2, 4]. Die Ätiologie ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es konnten sowohl genetische, epigenetische als auch Umwelteinflüsse identifiziert werden, welche zum Ausbruch der Erkrankung beitragen [5]. Das klinische Bild der Gelenkentzündung wird hervorgerufen durch eine Infiltration der Synovia mit Zellen des angeborenen (Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, NK-Zellen und Neutrophile) und des erworbenen Immunsystems (T- und B-Zellen) sowie deren veränderter Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-17. Ein Ungleichgewicht im erworbenen Immunsystem zwischen regulatorischen Zellen und Effektorzellen führt zu einer abnormen Autoimmunantwort und scheint für die Entwicklung der RA mitverantwortlich zu sein. Unter diesen Effektorzellen finden sich an erster Stelle Th17-Zellen, deren Rolle in der Pathogenese vieler Autoimmunerkrankungen erwiesen ist. Welche Mechanismen zur Induktion dieser übermäßigen Th17-Expansion und deren Aufrechterhaltung führen, ist noch nicht abschließend geklärt [5]. Auch Auto-Antikörper wie Rheumafaktoren und Antikörper gegen das zyklisch citrullinierte Peptid (CCP-Antikörper) sind schon Jahre vor Ausbruch der RA nachweisbar und dienen als Biomarker und als prognostische Faktoren [6].

## 1.2 Interleukin-9 in der Pathogenese der RA

### 1.2.1 Interleukin 9

Interleukin 9 (IL-9) ist ein kontrovers diskutiertes Zytokin, welches in letzter Zeit immer mehr in den Fokus verschiedener Forschungsgruppen geraten ist. Seine physiologische Rolle und insbesondere seine Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen ist Bestandteil aktueller Forschung. In den letzten Jahren wurden mehrere Reviews zu diesem Thema verfasst, welche für die Zusammenfassung in diesem Übersichtskapitel als Ausgangspunkt dienen [7-11].

IL-9 wurde im Jahr 1988 erstmals unter dem Namen P40 aus dem Überstand einer Mäusezellkultur isoliert und beschrieben. Entdeckt wurde ein einkettiges Glykoprotein. Es wurde als T lymphocyte growth factor (TCGFIII) bezeichnet, weil der Überstand aus dem es isoliert worden war, ohne weitere Zugabe von IL-2, IL-4 oder Antigen-präsentierenden-Zellen, das Wachstum von T Helferzellen anregte [12, 13].

Heute ist bekannt, dass IL-9 von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen des Immunsystems produziert wird. Darunter befinden sich Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Arbeit beschäftigt sich vorrangig mit IL-9-produzierenden T-Helferzellen. Dies sind die T-Helferzellsubpopulationen Th2, Treg-Zellen und die jüngst beschriebene Subpopulation Th9 (siehe Kapitel 1.2.2) [7].

Der Kern des Proteins hat eine Molekülmasse von 14kDa, bestehend aus 144 Aminosäuren, wobei das Signalpeptid aus nur 18 Aminosäuren besteht [14, 15]. Im menschlichen Genom konnte das IL-9 Gen auf dem langen Arm des Chromosom 5 lokalisiert werden [16]. Ein spezifischer Transkriptionsfaktor für die IL-9-Produktion bzw. Th9-Zelldifferenzierung wie beispielsweise T-bet für die Th1-Zelldifferenzierung wurde bisher nicht beschrieben. Auf dem IL-9-Promotor finden sich unter anderen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren PU.1, IRF4, BATF und NF- $\kappa$ B [17-20]. Auch die Signalproteine Smad 2/3/4 und STAT 5/6 scheinen einen entscheidenden Beitrag zur IL-9-Transkription beizutragen, sind aber ebenfalls nicht spezifisch für IL-9 [20]. Die Expression des IL-9 setzt ein koordiniertes Zusammenspiel einer Vielzahl an Transkriptionsfaktoren voraus.

### 1.2.2 Differenzierung von T-Helferzellen und Th9-Zellen

Das Immunsystem des Menschen setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Das angeborene, nichtadaptive Abwehrsystem reagiert schnell, aber unspezifisch auf eindringende Pathogene und führt zu keiner dauerhaften Immunität. Dazu zählen, neben den Oberflächenepithelien des Körpers, insbesondere Phagozyten und lösliche Effektormoleküle. Viele Pathogene können bereits durch das angeborene Immunsystem abgewehrt werden. Pathogene, welche diese erste Barriere überwunden haben, lösen eine adaptive Immunantwort aus. Diese ist ausgezeichnet durch eine hohe Antigen-spezifität und die Ausbildung einer Immunität gegen den Erreger. Die Vermittler der adaptiven Immunität sind die Lymphozyten. B-Lymphozyten reifen im Knochenmark und sind verantwortlich für die Produktion antigenspezifischer Antikörper. T-Lymphozyten reifen im Thymus und werden anhand ihrer Oberflächenmarker CD8 (Cluster of Differentiation) und CD4 weiter unterteilt in zytotoxische T-Zellen und in T-Helferzellen. Während zytotoxische T-Zellen, auch T-Killerzellen genannt, spezifisch infizierte oder entartete Zellen erkennen und eliminieren können, nehmen die T-Helferzellen eine wichtige Vermittlerrolle in der adaptiven Immunabwehr ein [21]. Über die Sekretion von Zytokinen beeinflussen sie die Antikörperproduktion der B-Zellen, dirigieren CD8+ T-Zellen in der Immunabwehr, regulieren die Funktion der Makrophagen und unterdrücken andererseits eine überschießende Immunantwort [22].

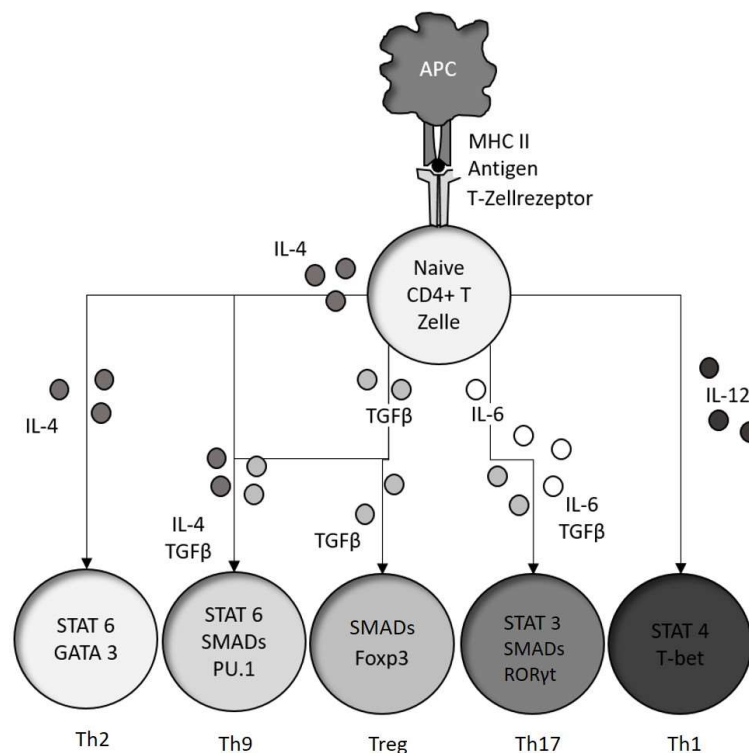
T-Helferzellen mit unterschiedlichen Funktionen entstehen durch Differenzierung aus naiven CD4+ T-Zellen. Voraussetzung für eine Differenzierung ist eine Antigenpräsentation durch eine Antigen-präsentierende Zelle über einen MHC-Klasse-II-Komplex (Major Histocompatibility Complex). Erkennt eine naive T-Zelle über ihren T-Zellrezeptor ein passendes Antigen, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt und die naive T-Zelle differenziert zu einem spezialisierten Phänotyp, der so genannten T-Helferzelle. Neben der Antigenerkennung spielen auch ko-stimulierende Faktoren und das vorherrschende Zytokinmilieu eine entscheidende Rolle für die Differenzierung [22].

Im Zuge der T-Zelldifferenzierung kommt es zum Verlust bzw. zur Veränderung von bestimmten Oberflächenmolekülen und zur Ausbildung unterschiedlicher Funktionseinheiten, den sogenannten T-Zellsubpopulationen. Die Bestimmung dieser Oberflächenmarker wird beispielsweise in der Durchflusszytometrie zur Untersuchung der einzelnen Subpopulationen genutzt. Vereinfacht beginnt die Differenzierung mit CD45RA+ CD27+ naiven T-Zellen. CD27 ist neben dem T-Zellrezeptor ein ko-



stimulierender Faktor für die T-Zelldifferenzierung, welcher mit zunehmender Differenzierung herunterreguliert wird [23]. CD45RA ist die Isoform des Leukocyte common antigen (LCA/CD45) welche auf naiven Zellen exprimiert wird, während auf reiferen Zellen eine Splicing-Variante, nämlich CD45R0 exprimiert wird und für eine effizientere Signalübertragung sorgt [24]. Naive Zellen differenzieren zu CD45R0+CD27+ Gedächtnis-Zellen, welche langlebig sind und für dauerhafte Immunität sorgen oder zu hochaktiven, kurzlebigen CD45R0+CD27- Effektor-Zellen. Eine Ausnahme bilden Terminal differenzierte T-Effektor Gedächtniszellen (TEMRA), welche durch ihre erneute CD45RA-Expression definiert sind [25].

Zunächst wurden Th1- und Th2-Zellen anhand ihrer Zytokinproduktion und der Expression ihrer Oberflächenmoleküle unterschieden [26]. In den letzten Jahren wurden weitere T-Helferzellen beschrieben (vgl. Abbildung 1). In Hinblick auf die RA wird im Folgenden auf Th17-Zellen, regulatorische T-Zellen (Tregs) und auf Th9-Zellen genauer eingegangen.



**Abbildung 1 Einfluss des Zytokinmilieus auf die T-Zelldifferenzierung.** Nachdem die naive CD4+ T-Zelle über ihren T-Zellrezeptor ein Antigen erkennt, welches von Antigenpräsentierenden Zellen über ihr MHC-Klasse-II-Molekül präsentiert wird, differenziert sie abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu zu einer reifen T-Helferzelle (Th2, Th9, Treg, Th17, Th1). Für die jeweilige Helferzelle sind neben den jeweiligen Transkriptionsfaktoren (GATA3, PU.1, Foxp3, RORγt, T-bet) auch die Signalwege über STAT und SMAD Moleküle dargestellt. Abbildung modifiziert nach [10].

Th17-Zellen sind eine pro-inflammatorische T-Zell-Subpopulation. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t, IL-17 und andere pro-inflammatorische Zytokine. Neben Zytokinrezeptoren findet sich auf der Oberfläche von Th17-Zellen auch der Chemokinrezeptor CCR6 hoch exprimiert. Über dessen Liganden CCL20 werden Th17-Zellen an den Ort der Entzündung gelockt [27]. Die Differenzierung von Th17-Zellen wird durch IL-6 und TGF- $\beta$  induziert und durch IL-21, IL-23 und IL-1 $\beta$  verstärkt. Physiologisch sind Th17-Zellen wichtig für die Abwehr gegen Pilze und extrazelluläre Bakterien [28]. Bei einem Ungleichgewicht zugunsten von Th17-Zellen gegenüber regulatorischen T-Zellen kommt es im Organismus zu Autoimmunerkrankungen, unter anderen zu RA [29], chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und Multiple Sklerose (MS) [28].

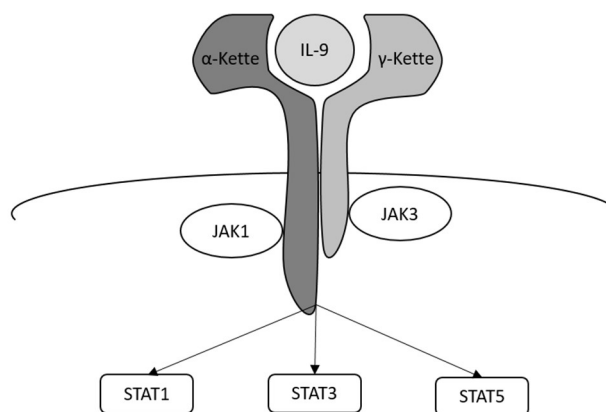
Regulatorische T-Zellen sind gekennzeichnet durch ihre supprimierenden Eigenschaften, welche eine überschießende Immunantwort unterdrücken und die Selbst-Toleranz erhalten können. Sie produzieren IL-10 und exprimieren den Transkriptionsfaktor Forkhead box P3 (FoxP3). Unterschieden werden natürliche, im Thymus gereifte, nTreg-Zellen von peripher induzierten iTreg-Zellen. Diese entwickeln sich aus peripheren naiven T-Zellen, welche induziert durch IL-2 und TGF- $\beta$ , immunsuppressive Eigenschaften erlangen [30].

Im Jahr 2008 wurde eine auf die Produktion von IL-9 spezialisierte T-Helferzellsubpopulation entdeckt und nach ihrer Funktion Th9 benannt [31]. Veldhoen et al. hatten Th2-Zellen mit TGF- $\beta$  stimuliert und anschließend die Expression der Zytokine und Transkriptionsfaktoren gemessen. Die Th2-Zellen verloren darunter ihr typisches Zytokinmuster (IL-4, IL-5, IL-13) und ihren Transkriptionsfaktor GATA-3 und exprimierten anstatt dessen IL-9. Weil sich diese Zellen in ihrem Zytokinmuster und in den exprimierten Transkriptionsfaktoren von den bekannten T-Helferzellen Th1, Th2, Th17 und Tregs unterschieden, wurden sie als eigenständige Subpopulation „Th9“ genannt. Durch diese Entdeckung wurde außerdem die Lehrmeinung, dass die T-Zell-Differenzierung ein irreversibler Prozess sei, in Frage gestellt. Auch die Stimulation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer Kombination aus TGF- $\beta$  und IL-4 führte zur Th9-Differenzierung [31]. Hierfür wird ein balanciertes Zusammenspiel der beiden Zytokine benötigt, denn jedes Zytokin für sich würde einen anderen Differenzierungsweg induzieren. TGF- $\beta$  zusammen mit ko-stimulierenden Signalen induziert in naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen den Transkriptionsfaktor Foxp3 und generiert somit iTreg-Zellen [32]. Naive CD4<sup>+</sup> Zellen unter Stimulation mit IL-4, differenzieren zu Th2-Zellen und produzieren IL-10, IL-5, IL-13 und nur sehr wenig IL-9. Erst die Kombination aus TGF- $\beta$  und IL-4 führt zu einer IL-9<sup>+</sup> Zellreihe [33].

### 1.2.3 IL-9 Rezeptor

Der IL-9 Rezeptor (IL-9R) setzt sich zusammen aus zwei heterodimeren Ketten, der IL-9R- $\alpha$ -Kette und der gemeinsamen  $\gamma$ -Kette [34]. Damit gehört IL-9 zur Familie der Interleukine, deren Rezeptor sich die gemeinsame  $\gamma$ -Kette teilen (engl.: common  $\gamma$ -chain-receptor cytokine family). Dazu gehören ebenfalls IL-4, IL-2, IL-7, IL-15 und IL-21 [35]. IL-9R hat keine eigene Tyrosinkinaseaktivität, sondern hat konstitutiv Janus Kinasen (JAK) gebunden. Dies sind JAK1 an der IL-9R- $\alpha$ -Kette und JAK3 an der  $\gamma$ -Kette. Durch Bindung des Liganden IL-9 an seinen Rezeptor kommt es zur gegenseitigen Phosphorylierung der JAK 1 und 3 und somit zur Aktivierung von STAT-Proteinen. STAT1, STAT3 und STAT5 formieren entweder Homo- oder Heterodimere und werden in den Zellkern transloziert, wo sie die Expression spezifischer Gene induzieren [7, 34]. Zur Veranschaulichung vgl. auch Abbildung 2.

IL-9R wird auf diversen Zelllinien exprimiert. Bereits 1993 konnte von Houssiau et al. IL-9R auf T-Zellen nachgewiesen werden [36]. Elyaman et al. zeigten eine IL-9R-Expression auf Tregs, nicht aber auf iTregs. Außerdem wurde IL-9R auf naiven Zellen nachgewiesen. Dagegen ist die relative Expression des IL-9R auf Th17-, Th2- oder Th1-Zellen niedrig [37]. Außer auf T-Zellen wurde IL-9R auf B-Zellen [38], Neutrophilen Zellen [39], Mastzellen, Makrophagen [40], Eosinophilen, dendritischen Zellen, Epithelzellen, NK-Zellen, NKT-Zellen und weiteren nachgewiesen [41].



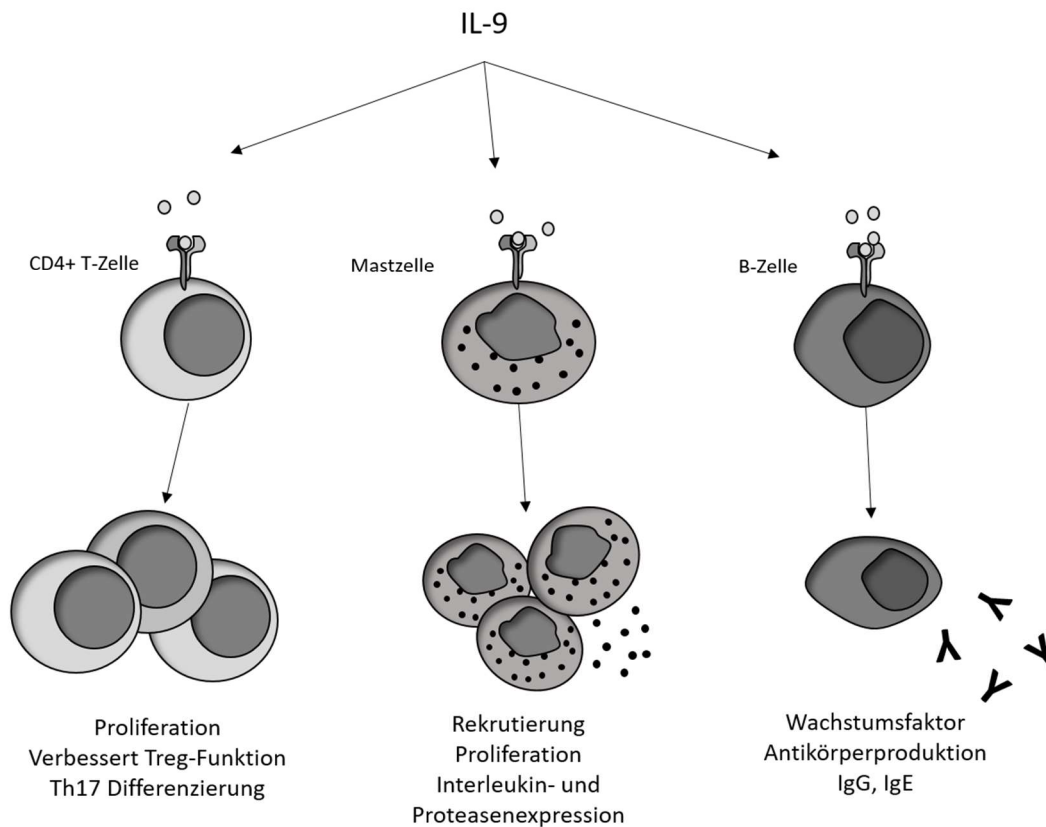
**Abbildung 2 IL-9R.** IL-9R besteht aus einer  $\alpha$ -Kette und der gemeinsamen  $\gamma$ -Kette. Nach Bindung von IL-9 wird der Signalweg über konstitutiv gebundene JAK in Gang gesetzt. Durch gegenseitige Phosphorylierung der JAKs werden STAT-Proteine aktiviert. Abbildung modifiziert nach [7].

#### **1.2.4 Funktion des IL-9**

Die Funktion des IL-9 in vivo ist schwierig vorherzusagen, da IL-9R auf diversen Zelllinien nachgewiesen werden konnte. In vitro und in Tierversuchen konnten einige Effekte von IL-9 gezeigt werden, siehe hierzu auch Abbildung 3. Zunächst wurde IL-9, wie in Kapitel 1.2.1 erläutert, als Wachstumsfaktor für T-Zellen beschrieben. Mittlerweile ist bekannt, dass IL-9 auch auf andere Zellen proliferative Effekte hat. Darunter befinden sich Mastzellen oder hämatopoetische Vorläuferzellen [11].

Eine physiologische Rolle hat IL-9 in der Abwehr von Parasiten durch vermehrte Rekrutierung und proliferative Wirkung auf Mastzellen [42]. Durch die Aktivierung der Mastzellen spielt IL-9 auf der anderen Seite eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen und des Asthma Bronchiale. IL-9 induziert die Expression von Interleukinen in Mastzellen, darunter IL-4, IL-5 und IL-13 [43]. Indirekt hat IL-9 über die Induktion dieser Interleukine eine proliferative Wirkung auf schleimproduzierende Becherzellen und führt zu einer lymphatischen und eosinophilen Entzündung in den Atemwegen [44-46].

Kontrovers ist die Rolle des IL-9 in der Immunregulation von Neoplasien. So hat IL-9 zum einen eine Anti-Tumor Wirkung auf solide Tumoren, insbesondere auf das Melanom [47]. Andererseits kann in vitro eine dysregulierte IL-9-Antwort über eine konstitutive Aktivierung des JAK-/STAT-Pathways zu autonomem Zellwachstum und maligner Transformation von lymphatischen Zellen führen. Eine Assoziation mit dem Hodgkin Lymphom wurde beschrieben [34]. IL-9 besitzt also sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Potenziale, abhängig von welchem Zelltyp oder in welchem Umgebungsmilieu es produziert wird [11].



**Abbildung 3 IL-9 Funktion.** IL-9 hat diverse Effekte auf unterschiedliche Zellen, in dieser Abbildung sind einige schematisch dargestellt. Abbildung modifiziert nach [48].

### 1.2.5 Wirkung des IL-9 auf Th17- und regulatorische T-Zellen

Auch die Wirkung auf T-Lymphozyten verdeutlicht die kontroverse Rolle des IL-9. IL-9 wirkt sowohl verstärkend auf die Differenzierung von Th17-Zellen als auch verstärkend auf regulatorische T-Zellen über die Aktivierung von STAT3 und STAT5 und setzt somit zwei parallel ablaufende, aber entgegengesetzte Signalwege in Gang [49].

IL-9 verstärkt die Differenzierung zu Th17-Zellen und die Expression von IL-17 und IL-6. Dies spricht für einen autokrinen Mechanismus, da Th17-Zellen selbst IL-9 produzieren [50]. In der Studie von Nowak et al. 2009 [50] wurden Mäuse mit einer experimentellen Enzephalomyelitis (EAE) mit einem neutralisierenden IL-9-Antikörper behandelt. EAE ist ein Modell für Multiple Sklerose, in welchem hauptsächlich Th17-Zellen für die beobachteten Symptome verantwortlich sind. Die Erkrankung brach verzögert aus, was mit einer geringeren Menge an IL-17 und IL-6 einherging, also einer reduzierten Th17-Antwort.

Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Studie, dass IL-9 die suppressive Funktion von regulatorischen T-Zellen verbesserte und im EAE-Modell ein Fehlen von IL-9 zu einer Verschlechterung der suppressiven Funktion der nTreg-Zellen und in der Folge zu einer Vermehrung von Effektorzellen und einer Verschlechterung der EAE führte [37].

### **1.2.6 IL-9 und Th9-Zellen in der Pathogenese der RA**

In den Jahren 2016 und 2017 sind drei große Reviews zum Thema der Th9-Lymphozyten und ihrer Rolle in Autoimmunerkrankungen beziehungsweise in rheumatischen Erkrankungen erschienen [49, 51, 52]. Die wichtigsten Erkenntnisse sollen hier nochmals zusammengefasst werden. Es gibt mehrere Studien, die zeigen, dass IL-9 bei RA-Patientinnen und -Patienten im Serum übermäßig exprimiert wird [53, 54]. Dantas et al. konnten ein erhöhtes Level an IL-9 im Serum von 67 RA-Patientinnen und -Patienten gegenüber gesunden Kontrollen nachweisen, fanden aber keine Assoziation zum Vorliegen von Auto-Antikörpern, körperlichen Einschränkungen oder radiologisch nachgewiesenen Erosionen [54]. Eine Studie zur Ätiologie der RA beschäftigte sich mit Verwandten ersten Grades von RA-Patientinnen und -Patienten, welche selbst (noch) nicht erkrankt waren aber entweder positive Rheumafaktoren (IgM, IgG oder IgA) oder CCP-Antikörper aufwiesen. Bei dieser Studienpopulation war IL-9, ebenso wie IL-6, im Vergleich zur Normalrisikogruppe, erhöht [55]. Eine Studie von 2015 untersuchte die Expression von IL-9, IL-9R, PU.1, IL-4 und TGF $\beta$  in Synovialgewebe von RA-Patientinnen und -Patienten im Vergleich zu Osteoarthrosepatientinnen und -Patienten. Es zeigte sich eine Überexpression von IL-9 im Synovialgewebe, welche mit dem Grad der inflammatorischen Infiltration korrelierte. Die IL-9+ Zellen konnten als CD3+ PU.1+ Zellen identifiziert werden. Außerdem konnte eine Überexpression von IL-9R, IL-4 und TGF- $\beta$  im Synovialgewebe nachgewiesen werden. Auch im peripheren Blut der RA-Patientinnen und -Patienten fand sich eine signifikant höhere, wenn auch sehr geringe (0,5% der PBMC vs. 0,017%), Prozentzahl an Th9-Zellen (IL-9+PU.1+) gegenüber gesunden Kontrollen. Die Th9-Zahl war bei Langzeit-RA-Patientinnen und -Patienten höher als bei kürzlich Erkrankten [56].

Eine weitere Studie von Chowdhury et al. [39] zeigte durchflusszytometrisch höhere Anteile CD4+IL-9+ (als Th9 bezeichnet) und CD4+IL-17+ Zellen (Th17) im peripheren Blut und in Synovialflüssigkeit von RA-Patientinnen und -Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen bzw. zu Osteoarthrosepatientinnen und -Patienten ebenso wie eine positive Korrelation mit der Krankheitsaktivität, gemessen anhand des DAS28-Scores [57]. In der Synovialflüssigkeit waren die Unterschiede besonders deutlich, was für eine Anreicherung zytokinexprimierender T-Helferzellen am Ort des pathologischen Geschehens spricht. Auch die Konzentration des löslichen IL-9 im peripheren Blut und in der Synovialflüssigkeit war signifikant höher bei RA-Patientinnen und -Patienten. Stimulationsexperimente mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) oder CD4+ Zellen zeigten durch Stimulation mit löslichem IL-9 einen größeren Anteil CD4+IL-17+ Zellen, eine höhere Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t und eine Phosphorylierung von STAT3, also insgesamt eine Induktion des Th17-Signalwegs. Aus Synovialflüssigkeit von RA-Patientinnen und -Patienten gewonnene T-Zellen zeigten nach Stimulation mit IL-9 eine höhere Expression der Zytokine IL-17, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  im Vergleich zu gesunden Kontrollen aber auch im Vergleich zu T-Zellen aus dem peripheren Blut. Diese Beobachtung wird gestützt durch eine höhere Expression des IL-9R auf T-Zellen der Synovialflüssigkeit von RA-Patientinnen und -Patienten [39].

### 1.3 Fragestellung und Ziel der Studie

IL-9 und Th9-Zellen und deren Rolle in der Pathogenese der RA werden kontrovers diskutiert. IL-9 scheint Potential zu haben, die Inflammation über die Induktion des Th17-Pathways zu induzieren und aufrecht zu erhalten [39]. In vorausgegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde durch Riekert et. al. [58] der antiinflammatorische Einfluss von Mesenchymalen Stammzellen (MSC) auf proinflammatorische T-Zellen in einer Ko-Kultur untersucht. Neben einer niedrigeren Proliferationsrate und einer Abnahme an hochaktiven Effektor-Zellen ergab sich eine reduzierte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-17 und IFN- $\gamma$  aber auch des IL-9. Hierdurch ergab sich die Vermutung, dass IL-9 in der Pathogenese der Inflammation bei der RA eine Rolle spielen und mit der Th17-Induktion assoziiert sein könnte.

Für die vorliegende Arbeit wurden daher folgende Ziele formuliert:

- Phänotypische Charakterisierung von naiven und nicht naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden Kontrollpersonen und RA-Patientinnen und -Patienten insbesondere in Hinsicht auf die IL-9-Produktion.
- Etablierung eines Protokolls zur Polarisierung von naiven und nicht naiven CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zu Th9-Zellen und Auswertung der Zellkulturen mit 3 verschiedenen Methoden (Durchflusszytometrie, ELISA, RT-PCR).
- Analyse der Unterschiede der Th9-Subpopulation zwischen RA-Patientinnen und -Patienten und gesunden Kontrollen in einem standardisierten, proinflammatorischen Zellkulturmilieu in Hinblick auf die Proportionen der T-Zell-Subpopulationen, Zytokinproduktion, IL-9R-Expression und die Expression von T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren.
- Analyse des Einflusses von IL-9 im proinflammatorischen Milieu (auf Proportionen von T-Zell-Subpopulationen, Zytokinproduktion, IL-9R-Expression und Expression von Transkriptionsfaktoren) durch Zugabe von löslichem IL-9 und Spezifitätsprüfung der Effekte durch spezifische Blockade mittels eines IL-9-Antikörpers.



## **2 Material, Probandinnen und Probanden und Methoden**

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien und Geräte einschließlich Handelsnamen, Firmen und Katalog- oder Produktnummer tabellarisch aufgelistet. Im zweiten Teil erfolgt eine Beschreibung der Probandinnen und Probanden und in einem dritten Teil eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Methoden.

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

In Tabelle 1 werden zunächst die eingesetzten Geräte aufgelistet, in Tabelle 2 folgen diverse Verbrauchsmaterialien.

**Tabelle 1: Geräte**

	<b>Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Inkubator		Heraeus Instruments, Osterode, D	
RNA-Werkbank	Gelaire Air One Green	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, D	83507
Sterilbank	Gelaire BSBS 6A	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, D	11031
Zentrifugen	Universal 32R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D	1610
	Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Osterode, D	246592
	Rotanta/K	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D	5512
Kühlschränke	Comfort -20°C	Liebherr, Bulle, CH	
	Hera Freeze -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	1013508
Mikroskop	Wilovert S30	Hund, Wetzlar, D	1010335
Flowzytometer	FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	
Vortexer	RetschMixer	A.Hartenstein, Würzburg, D	
Pipetten	Research plus 10µl	Eppendorf, Hamburg, D	492499Z
	Research plus 100µl	Eppendorf, Hamburg, D	493057Z
	Research plus 200µl	Eppendorf, Hamburg, D	379067Z
	Research plus 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D	494528Z
	Easypet	Eppendorf, Hamburg, D	3033181
	Multipipette® plus	Eppendorf, Hamburg, D	4981000019
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	A.Hartenstein, Würzburg, D	ZK13
MACS System	VarioMACS™	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D	130090282
	QuadroMACS™	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D	130090976
Photometer	Tecan Spectra Classic	Tecan, Crailsheim, D	
Wasserbad		GFL, Burgwedel, D	1003
Spektral-photometer	Nanodrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	ND-2000
Gestelle für Zentrifugenröhrchen		A.Hartenstein, Würzburg, D	
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, D	5331

**Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Zellkulturplatten	CELLSTAR® Cell Culture Microplates, 96 well	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, D	655.180
	CELLSTAR® Cell Culture Microplates, 24 well	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, D	662.160
Petrischalen	CELLSTAR® Cell Culture Dishes 60x15mm	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, D	628.160
Reagenz-Röhrchen	5ml Polystyrene Round-Bottom Tube, snap cap	BD Falcon, Franklin Lakes, USA	352054
	5ml Polystyrene Round-Bottom Tube with Cell-Strainer Cap	BD Falcon, Franklin Lakes, USA	352235
	CELLSTAR® Centrifuge Tube, 15ml	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, D	188.271
	CELLSTAR® Centrifuge Tube, 50ml	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, D	227.261
Reaktionsgefäße	Reaktionsgefäß mit Deckel 0,5ml	A. Hartenstein, Würzburg, D	RK05
	SafeSeal Gefäß ,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, D	72.706
Schraubröhrchen	Mikro-Schraubröhre, 1,5ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht, D	72.692.005
Pipettenspitzen	Combitips plus 50ml	Eppendorf, Hamburg, D	S112451H
	Combitips advanced 5ml	Eppendorf, Hamburg, D	E161346K
	Biosphere Filter Tips 20	Sarstedt, Nümbrecht, D	70.760.210
	Biosphere Filter Tips 100	Sarstedt, Nümbrecht, D	70.760.212
	Biosphere Filter Tips 200	Sarstedt, Nümbrecht, D	70.760.211
	Biosphere Filter Tips 1000	Sarstedt, Nümbrecht, D	70.762.211
Glaspipetten	CELLSTAR® Pipette 10ml	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, D	607.180
Plastikpipetten	CELLSTAR® Pipette 10ml	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, D	607.180
Pipettierhilfe	Integra Pipetboy		
Einfrierröhrchen	Cryo Pure Tube 1,0ml	Sarstedt, Nümbrecht, D	72.377.002
Frosty Box	Cryo Freezing Container	Nalgene, Rochester, USA	51000001
Zellscraper	Cell Scraper 25cm	Sarstedt, Nümbrecht, D	5013400
Zentrifugenröhrchen	5ml Polystyrene Round-Bottom-Tube, No cap, non-steril	BD Falcon, Franklin Lakes, USA	352008
MACS Säulen	LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D	130-042-401
Pipettenspitzen RNase frei	Biosphere® Filter Tips 0,1-20µl	Sarstedt, Nümbrecht, D	701.114.210
	Biosphere® Filter Tips 2-200µl	Sarstedt, Nümbrecht, D	70.760.211
	Biosphere® Filter Tips 2-100µl	Sarstedt, Nümbrecht, D	70.760.212
96-Loch-Platte für RNA	Microplatte 96 well, PP, für PCR	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, D	652290
Reaktionsgefäße	Multiply®- µ-Strip Pro 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht, D	72.991.002
Klebefolie	Klebefolie optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, D	951.994
96-Loch-Platte	Corning Costar 9018	Affymetrix, eBiosciences, San Diego, USA	88-7958-86

## 2.1.2 Reagenzien, Lösungen, gebrauchsfertige Kits, Stimulantien, Antikörper und Primer

Verwendete Reagenzien sowohl für die Zellkultur als auch für die verschiedenen Messmethoden werden in Tabelle 3 aufgelistet. In Tabelle 4 kann die Rezeptur der verwendeten Lösungen nachgelesen werden. In Tabelle 5 werden die verwendeten, gebrauchsfertigen Kits aufgelistet. Die diversen Zytokine und Stimulanzen für die Zellkultur sind in Tabelle 6 aufgelistet und die fluoreszenzmarkierten Antikörper für die Durchflusszytometrie in Tabelle 7. In Tabelle 8 schließlich werden verwendete Primer aufgelistet.

**Tabelle 3 Reagenzien**

	<b>Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Phosphate buffered saline	-	life technologies, Carlsbad, USA	18912-014
Dimethylsulfoxid	-	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D	A994.2
Fixation Buffer	Cytofix	BioLegend, San Diego, USA	420801
Permeabilization Buffer	Cytoperm	BioLegend, San Diego, USA	421002
Bovines Serum Albumin	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A2058-1G
Ficoll	FicoLite-H (human)	Linaris, Wertheim-Bettingen, D	GTF1511KYA
Isotonische Kochsalzlösung	-	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D	14FA1014
Nährmedium	RPMI 1640 with L-glutamine	Lonza AG, Verviers, Belgium	BE12-702F
	Penicillin Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, D	A2213
FCS	FBS superior	Biochrom AG, Berlin, D	S 0615
Trypsin/EDTA	Trypsin-EDTA-Lösung	PAA, Linz, AU	L11-004
Aqua ad iniectabilia	-	B. Braun, Melsungen, D	114558061
Tween 20	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
$\beta$ -Mercaptoethanol		Stratagene	400711-111
Ethanol	Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	32205-1L
DNase		Machery-Nagel	D1429R
RNase free H <sub>2</sub> O		Machery-Nagel	65988
SYBR Green	iTaq SYBR® Green Supermix	BioRad	172-5125
Maxima Reverse Transkriptase	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	EP0743
Oligo(dT)primer	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	SO131
dNTP-Mix	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
5x RT Puffer	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	B91
Ribolock RNase Inhibitor	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	EO0381

**Tabelle 4 Lösungen**

Nährmedium Zellkultur	RPMI 1640 + 1% PenStrep + 10% FCS
Erythrozyten-Lyse-Puffer	8,26g Ammoniumchlorid + 1g Kaliumbicarbonat + 0,037g EDTA in 1l Aqua dest.
Einfríermedium	70% RPMI 1640 mit 1%PenStrep + 20% FCS + 10%DMSO
PBS	1 Tablette in 500ml Aqua dest.
FACS-Puffer	0,5% BSA + 0,01% Natriumazid in PBS
MACS-Puffer	0,5% BSA + 2mM EDTA in PBS

**Tabelle 5 Gebrauchsfertige Kits**

<b>Kit</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
MACS	CD4 <sup>+</sup> T-Cell Isolation Kit (human)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D	130-096-533
	Naive CD4 <sup>+</sup> T-Cell Isolation Kit (human)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D	130-094-131
IL-9 ELISA	Human IL-9 ELISA Ready-Set-Go!	eBioscience, San Diego, USA	88-7958-86
RNA Isolation Kit	NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel, Düren, D	740.955.250

**Tabelle 6 Zytokine und Stimulantien**

	<b>Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
IL-2	Recombinant Human Interleukin-2 (rh IL-2)	Immunotools, Friesoythe, D	11340025
IL-4	Recombinant Human Interleukin-4 (rh IL-4)	Immunotools, Friesoythe, D	11340043
IL-1 $\beta$	Recombinant Human Interleukin-1 beta (rh IL-1b)	Immunotools, Friesoythe, D	11340015
IL-23	Recombinant Human IL-23 (carrier-free)	BioLegend, San Diego, USA	574102
IL-6	Recombinant Human Interleukin 6 (rh IL-6)	Immunotools, Friesoythe, D	11340066
IL-9	Recombinant Human IL-9 (rhIL-9) Carrier Free	R&D Systems, Minneapolis, USA	209-IL/CF
TGF- $\beta$	Recombinant Human TGF- $\beta$ 1 (carrier-free)	BioLegend, San Diego, USA	580702
Anti IFN $\gamma$	LEAF <sup>TM</sup> Purified anti-human IFN- $\gamma$ Antibody	BioLegend, San Diego, USA	502403
Anti CD3	LEAF <sup>TM</sup> Purified anti-human CD3 Antibody	BioLegend, San Diego, USA	317303
Anti CD28	LEAF <sup>TM</sup> Purified anti-human CD28 Antibody	BioLegend, San Diego, USA	302913
Anti IL-9	Human IL-9 Antibody	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF209
PMA	PHORBOL 12-MYRISTATE 13-ACETATE	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P8139
Ionomycin	Ionomycin from Streptomyces conglobatus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	I0634
Brefeldin A	Brefeldin A from Penicillium brefeldianum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B6542

**Tabelle 7 Fluoreszenzmarkierte Antikörper**

Antikörper	Farbe	Hersteller	Klon	Bestellnummer
CD4	APC	BioLegend, San Diego, USA	0KT4	317416
CD3	FITC	BioLegend, San Diego, USA	HIT3a	300306
CD45R0	PerCP/Cy5.5	BioLegend, San Diego, USA	UCHL1	304222
CD27	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, USA	LG.3A10	124216
CD28	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, USA	CD28.2	302926
CD127	BV421	BioLegend, San Diego, USA	A019D5	351310
CD25	PE-Cy7	BioLegend, San Diego, USA	BC96	302612
CD8	APC-H7	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	SK1	560179
CCR6 (CD196)	APC	BioLegend, San Diego, USA	G034E3	353416
IL-9R (CD129)	PE	BioLegend, San Diego, USA	AH9R7	310404
IL-9	BV421	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	MH9A3	564254
IL-17A	Alexa Fluor 700	BioLegend, San Diego, USA	BL168	512318
FoxP3	PerCP Cy5.5	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	236a/E7	561493
IFN $\gamma$	FITC	BioLegend, San Diego, USA	4S.B3	502506
Ki67	FITC	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	B56	51-36524X
IL-10	APC	BioLegend, San Diego, USA	JES3-19F1	506807
Zombie	Zombie aqua™ Dye	BioLegend, San Diego, USA		77143

**Tabelle 8 Primer**

Primer	Sequenz (5'→ 3')	Hersteller
B2M F	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
B2M R	GATGCTGCTTACATGTCTCG	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
IL-9 F	GTGCTAATGTGACCAGTTGTCTC	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
IL-9 R	ATCTTGCCTTCTCATCCCTCTC	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
IL-9R F	CTAGAACCTTCACCTGCCTC	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
IL-9R R	GGTCCAGCTTAACGTGTCTC	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
PU.1 F	AGAGCCATAGCGACCATTA	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
PU.1 R	TATCGAGGACGTGCATCT	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
IL-17 F	CTCATTGGTGTCACTGCTACTG	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
IL-17 R	GGTGGATCGGTTGTAGTAATCTG	Eurofins Genomics, Ebersberg, D

## **2.2 Probandinnen und Probanden**

Die Studie wurde von der Ethikkommission (Ethikvotum 239/10) der Medizinischen Universität Würzburg genehmigt. Alle Patientinnen und Patienten und Kontrollpersonen wurden in einem ärztlichen Gespräch und schriftlich mittels eines Informationsblattes über die Inhalte der Studie aufgeklärt und unterzeichneten die Einverständniserklärung. Die Studie wurde entsprechend der Deklaration von Helsinki 2013 durchgeführt.

### **2.2.1 RA-Patientinnen und -Patienten**

Die untersuchte RA-Patientengruppe (n=7) wurde in der Abteilung für Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg und in der Klinik für Internistische Rheumatologie der Waldburg-Zeil Klinik in Oberammergau rekrutiert. Alle Patientinnen und Patienten waren volljährig und erfüllten die 2010 ACR / EULAR Kriterien [59] zur Diagnosestellung einer RA. Die Blutentnahme für die Studie erfolgte im Rahmen von Routineblutentnahmen. Anamnese und Krankheitsstadien (DAS28-Score, VAS) wurden aus den Krankenakten erhoben. Ausschlusskriterium war eine Therapie mit einem Biologikum, auch in der Vorgeschichte. Des Weiteren wurden RA-Patientinnen und -Patienten (Pat) mit einer klinisch relevanten Infektion in den letzten acht Wochen, vorangegangenen Impfungen in den letzten vier Wochen und mit Malignomen ausgeschlossen.

### **2.2.2 Kontrollpersonen**

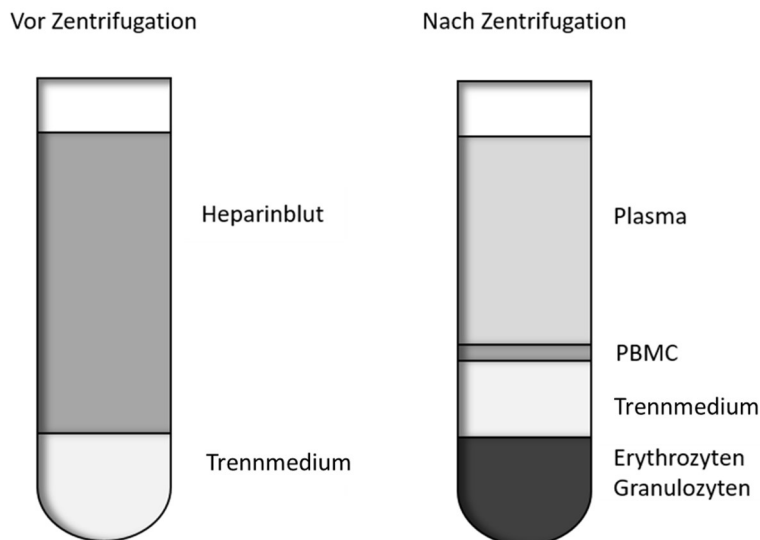
Die Kontrollpersonen (n=10) sind immunologisch gesund und haben keine Allergien oder Malignome in der Vorgeschichte. Kontrollpersonen (healthy donors, HD) mit klinisch relevanten Infektionen in den letzten acht Wochen oder vorangegangenen Impfungen in den letzten vier Wochen wurden ausgeschlossen.



## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Isolation von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation

Den Probandinnen und Probanden wurde jeweils 50ml Blut in NH<sub>4</sub>-Heparinmonovetten abgenommen. Zunächst wurden aus den Blutproben PBMC gewonnen. Dies geschah mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, durch welches verschiedene Blutbestandteile anhand ihrer Dichte unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte getrennt werden. Hierzu wird ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer als Trennmedium verwendet. PBMC, mit einer ähnlichen Dichte wie das Copolymer, bilden unter Zentrifugation einen makroskopisch sichtbaren Ring oberhalb des Trennmediums. Das Blutplasma sammelt sich oberhalb der PBMC, schwere Partikel wie Erythrozyten unterhalb der Trennschicht. Abbildung 4 soll dies verdeutlichen.



**Abbildung 4 Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation.** Abbildung modifiziert nach [60].

Unter sterilen Kautelen wurden zwei Teile Heparin-Blut in einem 50ml Zentrifugen-Röhrchen über ein Teil „Ficoll“ geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 25 Minuten bei 1700U/min. Der schmale PBMC-Ring wurde mit einer Pipette geerntet, in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt und anschließend mit 0,9% NaCl gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet mit 5ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert, um auch kleine Erythrozyten-Verunreinigungen zu beseitigen. Nach 5 Minuten folgte die Zugabe von 10ml Nährmedium mit 10% FCS und die erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500U/min. Zum Zählen wurden die isolierten Zellen in 5ml Nährmedium mit 10% FCS aufgenommen und ein kleiner Teil mit

Trypanblau in einem definierten Verhältnis gefärbt. 10µl der Suspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und zwei Großquadrate ausgezählt. Die Formel zur Berechnung der Zellzahl lautet:

Mittelwert der ausgezählten Großquadrate \*  $10^4$  \* Verdünnung \* Volumen (hier 5ml)

### **2.3.2 Kryokonservierung**

Alle Proben wurden vor der Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff (-196°C) kryokonserviert. Um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, wurden jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen in 1ml Einfriermedium (siehe Tabelle 4) in Einfrierröhrchen zunächst in Frosty-Boxen langsam auf -80°C herunter gekühlt. Nach frühestens 48 Stunden erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff. Eine Frosty-Box ermöglicht durch das eingefüllte Isopropanol eine kontrollierte Abkühlgeschwindigkeit von 1°C pro Minute. Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein Schutzmittel, welches die Kristallisationsgeschwindigkeit der extrazellulären Phase beeinflusst und die Zellen so vor Beschädigung bewahrt [61]. Zu beachten ist die in flüssigem Zustand toxische Wirkung von DMSO auf die Zellen, weshalb nach Kontakt auf ein schnelles Einfrieren geachtet wurde. Für die Weiterverarbeitung wurden die Zellen nach dem Auftauen in Nährmedium mit 10% FCS überführt und erneut wie beschrieben gezählt.

### **2.3.3 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)**

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) ist ein einfaches Verfahren, um PBMC durch magnetische Markierung bestimmter Oberflächenantigene in Fraktionen aufzutrennen. In einem ersten Schritt werden mit Hilfe des CD4+ T-Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec CD4+ T-Helferzellen aus den PBMC isoliert. Dafür werden alle Zellen die nicht CD4+ sind, also CD8+ T-Zellen, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile, B-Zellen, Dendritische Zellen, NK-Zellen, Granulozyten und Erythrozyten mit Biotin-konjugierten Antikörpern und dem CD4+ T Cell MicroBead Cocktail markiert (positive Selektion). Der Antikörpercocktail enthält Antikörper gegen CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR  $\gamma/\delta$  und CD235a. Die magnetisch markierten Zellen werden aussortiert, indem sie in einer MACS-Säule in dem starken magnetischen Feld eines MACS-Separators zurückgehalten werden, während die unmarkierten CD4+ Zellen ungehindert durch das Magnetfeld fließen können (negative Selektion). Die positive Selektion kann dann durch Entnahme der MACS-Säule aus dem magnetischen Feld ausgespült werden [62]. In einem zweiten Schritt werden die CD4+ Zellen mit Hilfe des

Naive CD4+ T Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec weiter fraktioniert in naive T-Zellen (CD4+CD45R0-) und nicht naive T-Zellen (CD4+CD45R0+). Die Fraktion der CD4+ Zellen wird dafür mit einem Antikörpercocktail, welcher zusätzlich zu den Biotin-markierten Antikörpern gegen CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma/\delta$ , HLA-DR, CD235a auch einen Antikörper gegen CD45R0 enthält, inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgen analog zum ersten Isolationsschritt [63].

Für die Zellsortierung wurden die Zellen (mindestens  $20 \times 10^6$ ) zunächst in einem 15ml Zentrifugen-Röhrchen mit 10ml gekühltem MACS-Puffer gewaschen und 10 Minuten bei 1500U/min zentrifugiert. Es folgte die Reinigung von toten Zellaggregaten in 1ml MACS-Puffer über einen 35 $\mu$ m Nylon-Mesh-Filter, um ein bestmögliches Ergebnis bei der Separierung zu erzielen. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten jeweils auf Eis. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet mit 40 $\mu$ l MACS-Puffer/ $10^7$  Zellen und 10 $\mu$ l CD4+ T Cell Biotin Antibody Cocktail/ $10^7$  Zellen resuspendiert und für 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 30 $\mu$ l MACS-Puffer/ $10^7$  Zellen und 20 $\mu$ l CD4+ T-Cell MicroBead Cocktail/ $10^7$  Zellen hinzugegeben, vorsichtig durchmischt und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1ml MACS-Puffer und 5 Minuten Zentrifugation bei 1500U/min. Das Zellpellet wurde dann in 500 $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen. Für die magnetische Isolation wurde die Säule in den QuadroMACS-Magneten eingehängt und mit 3ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde nun mittig in die Säule pipettiert und nach Abwarten des passiven Durchfließens dreimal mit jeweils 1ml MACS-Puffer gespült. Die so gewonnene negative Selektion wurde in einem Zentrifugen-Röhrchen aufgefangen. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld entfernt und die positive Selektion mit 2ml MACS-Puffer mit einem Kolben in ein Zentrifugen-Röhrchen gespült. Die Zellen wurden wie beschrieben gezählt. Die CD4+ Fraktion wurde dann dem zweiten, analogen Isolationsschritt zugeführt, bei dem das Naive CD4+ T Cell Isolation Kit verwendet wurde.

#### **2.3.4 Bestimmung der Reinheit mittels Durchflusszytometrie**

Um die Reinheit der isolierten Zellen zu bestimmen wurden  $0,2 \times 10^6$  naive (CD4+CD45R0-) und  $0,2 \times 10^6$  nicht naive Zellen (CD4+CD45R0+) wie in Kapitel 2.3.6.3 erläutert für 4 Stunden mit PMA (15ng/ml), Ionomycin (0,5 $\mu$ g/ml) und BFA (5 $\mu$ g/ml) in 200 $\mu$ l Nährmedium mit 10% FCS stimuliert. Anschließend wurde wie in den Kapiteln 2.3.6.1, 2.3.6.2 und 2.3.6.3 beschrieben sowohl eine Zombiemarkierung von toten Zellen, als auch eine extra- und intrazelluläre Fluoreszenzmarkierung durchgeführt. Die Messung ergab eine Reinheit der naiven Zellen von >95%.

### 2.3.5 In vitro Zellkultur

Nach Isolation wurden sowohl die naiven CD4+ Zellen (CD4+CD45R0-) als auch die nicht naiven CD4+ Zellen (CD4+CD45R0+) in Kultur gebracht. Die positive Selektion aus dem ersten Isolationsschritt, also die CD4- Zellen, wurden zu  $10 \times 10^6$  in 2ml Nährmedium mit 10% FCS aufgenommen und mit einer Gesamtdosis von 30Gy bestrahlt. Diese nicht mehr proliferationsfähigen Zellen wurden den Zellkulturen zur Antigenpräsentation (APC) in einem Verhältnis von 1:5 zugegeben [64]. Die Zellkultur wurde auf einer 96 Loch-Platte mit jeweils  $0,2 \times 10^6$  Zellen/Loch und  $0,04 \times 10^6$  APC/Loch in 200µl/Loch Nährmedium mit 10% FCS angelegt. Es wurden lösliche Antikörper gegen CD3 und CD28 in einer Dosierung von 1µg/ml zugegeben [65, 66]. Diese wirken über ihre Rezeptoren aktivierend und ermöglichen erst den Einfluss der additiven Zytokine auf die T-Zellen.

Um das proinflammatorische Milieu zu erzeugen wurde ein Teil der Zellen mit einem Th17-Stimulus inkubiert (siehe Tabelle 9). Dieser wurde aus den in Kapitel 1.3 beschriebenen Vorexperimenten übernommen. Der andere Teil der Zellen wurde mit einem Th9-Stimulus inkubiert. Ein Auszug der in der Literatur beschriebenen, erfolgreichen Stimuli für die Th9 Polarisierung findet sich in Tabelle 10, daraus wurde der in Tabelle 9 beschriebene Stimulus abgeleitet.

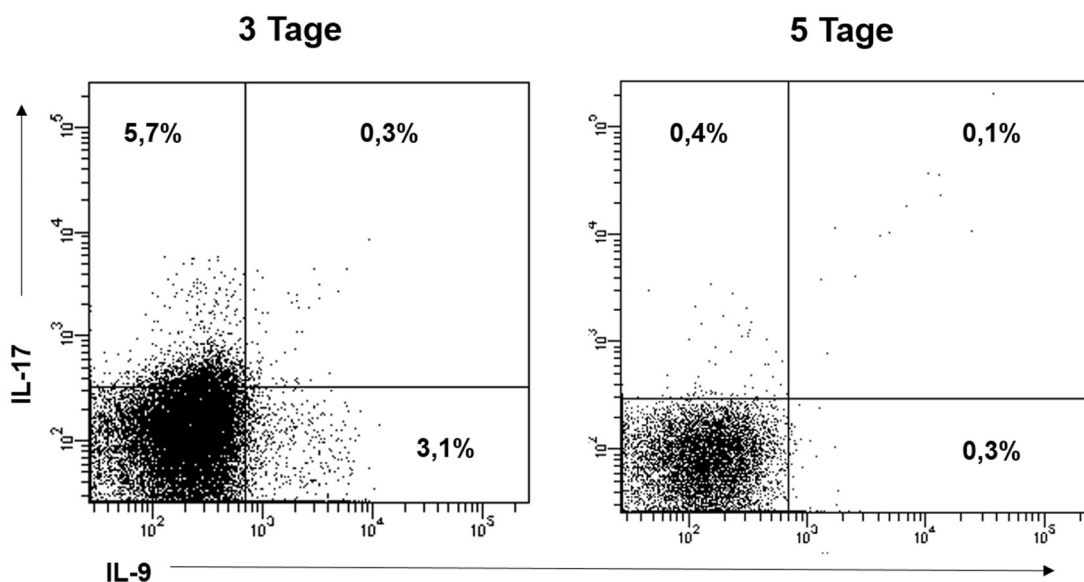
**Tabelle 9 Verwendete Stimuli**

Stimulus	Zytokine	Konzentration
Th17	TGFβ IL-6 IL-1β IL-23	5ng/ml 20ng/ml 10ng/ml 100ng/ml
Th9	IL-4 TGFβ IL-2 anti-IFNγ	20ng/ml 1ng/ml 5ng/ml 10µg/ml

**Tabelle 10 Th9-Stimuli in der Literatur**

Veldhoen et al. 2008 [31]	IL-4 TGF- $\beta$	10ng/ml 1ng/ml
Staudt et al. 2010 [19]	IL-4 IL-2 TGF- $\beta$	20ng/ml 100U/ml 1ng/ml
Jäger et al. 2014 [67]	IL-4 TGF- $\beta$	20ng/ml 3ng/ml
Goswami et al. 2012 [68]	IL-4 TGF- $\beta$ anti-IFN $\gamma$	20ng/ml 2ng/ml 10 $\mu$ g/ml

Die Stimulationszeit von 3 Tagen wurde nach Vorexperimenten mit Kontrollpersonen festgelegt. Ziel war es einen hohen prozentualen Anteil zytokinexprimierender (insbesondere IL-9 exprimierender) Zellen zu erzielen. Durchgeführt wurden Experimente zwischen 3-6 Tagen Kulturzeit. Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil IL-9+ Zellen an Tag 3 am höchsten war, weshalb diese Dauer für die weiteren Experimente gewählt wurde (vgl. Abbildung 5). In weiteren Ansätzen wurde zusätzlich zu den Th17- und Th9-stimulierenden Zytokinen IL-9 (20ng/ml) [69] oder ein Antikörper gegen IL-9 (10 $\mu$ g/ml) [33] zugegeben.



**Abbildung 5** Repräsentative Darstellung der prozentuale Zytokinproduktion nach 3 und nach 5 Tagen bei HD.

### 2.3.6 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können in kürzester Zeit Zellpopulationen analysiert werden. Allein durch die Eigenschaften Zellvolumen und Zellgranularität, welche in der Durchflusszytometrie durch das Vorwärtsstreulicht beziehungsweise das Seitwärtsstreulicht bestimmt werden können, lassen sich Lymphozyten von anderen Zellen abgrenzen. Durch vielzählige Kombinationsmöglichkeiten verschiedener fluoreszenzmarkierter Antikörper erhält man zusätzlich Informationen über exprimierte Oberflächenantigene sowie intrazelluläre Zytokine. Alle durchflusszytometrischen Messungen erfolgten an einem FACSCanto II der Firma BD Biosciences und wurden mit dem Programm BD FACSDiva ausgewertet.

#### 2.3.6.1 Vitalitätsnachweis

Um in der Durchflusszytometrie vitale Zellen von apoptotischen Zellen zu unterscheiden, wurde eine sogenannte Zombiefärbung durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit dem Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit der Firma BioLegend und nach deren Vorgaben. Der Farbstoff reagiert mit primären Aminen auf Proteinen. Lebende Zellen sind in der Lage die markierten Proteine über eine intakte Membran auszustoßen, so dass nur die Zelloberfläche markiert wird. Apoptotische Zellen hingegen erlauben über eine durchlässige Membran den vermehrten Eintritt des Farbstoffs in die Zelle, wodurch es zu einer vermehrten Proteinmarkierung kommt.

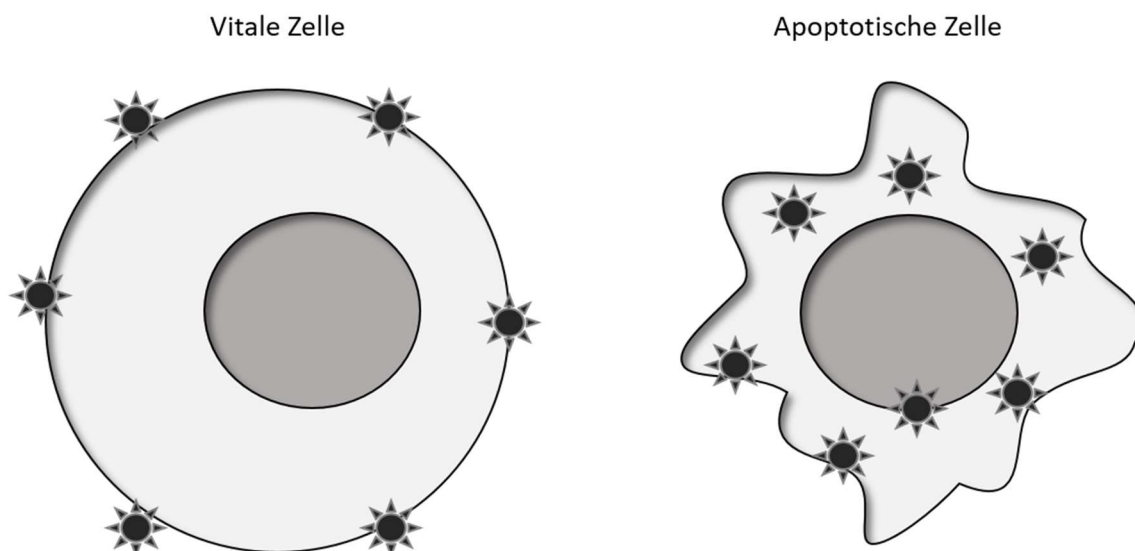


Abbildung 6 Prinzip der Zombiefärbung modifiziert nach [70]

Vor Gebrauch wurde das Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit wie vorgeschrieben in 100µl DMSO gelöst und lichtgeschützt gelagert. Für die Färbung wurde die Zellsuspension zunächst gleichmäßig auf 5ml FACS-Röhrchen verteilt und mit 1ml PBS-Puffer gewaschen. Der Zombiefarbstoff wurde im Verhältnis 1:500 mit PBS-Puffer verdünnt und anschließend wurden die Zellen mit jeweils 50µl der Lösung für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte die extrazelluläre Fluoreszenzmarkierung.

### 2.3.6.2 Extrazelluläre Fluoreszenzmarkierung

Um die Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle zu charakterisieren, wurden fluoreszenzmarkierte, monoklonale Antikörper gegen Oberflächenepitope verwendet. So wurden Naive-, Effektor- und Gedächtniszellen voneinander unterschieden (siehe Tabelle 11), aber auch Tregs bestimmt und Chemokinrezeptoren gemessen [71]. Die verwendeten Färbepanel zeigen Tabelle 12 und Tabelle 13. Für die Definition von TEMRA müsste eine CD45RA-Färbung erfolgen, welche hier aus Gründen der Kombinierbarkeit der fluoreszenzmarkierten Antikörper nicht möglich war. Da CD45R0-CD27-Zellen am ehesten dieser Population entsprechen, werden diese im Folgenden TEMRA genannt.

Für die Markierung wurde wie folgt vorgegangen. Zunächst wurde ein Mastermix angesetzt aus jeweils 50µl PBS-Puffer und 0,3µl Antikörper-Fluorochrom-Konjugat pro Röhrchen. Dieser wurde auf Eis zwischengelagert. Anschließend wurden 50µl des Mastermixes zu den mit Zombiefarbstoff inkubierten Zellen gegeben, gemischt und für weitere 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1ml PBS-Puffer wurden die Zellpellets für weitere 20 Minuten im Dunkeln mit 200µl Fixation Buffer inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig, um die Zellmembran zu fixieren, bevor diese permeabilisiert wird, um die Zellen für die intrazelluläre Färbung zugänglich zu machen. Anschließend folgte ein Waschschrift mit jeweils 1ml Permeabilization Buffer.

**Tabelle 11 Charakterisierung der T-Zellsubpopulationen**

<b>T-Zellsubpopulation</b>	<b>Charakterisierende Oberflächenepitope</b>
Naive-Zellen	CD45R0- CD27+
Effektor-Zellen	CD45R0+ CD27-
Gedächtnis-Zellen	CD45R0+ CD27+
TEMRA	CD45R0- CD27-

### 2.3.6.3 Intrazelluläre Fluoreszenzmarkierung

Auf die extrazelluläre Markierung folgte die intrazelluläre Markierung von Zytokinen, aber auch von Transkriptionsfaktoren wie FoxP3. Damit zum Zeitpunkt der Messung in allen Zellen eine mess- und vergleichbare Menge an Zytokinen intrazellulär vorliegt, wurde die Produktion künstlich stimuliert und gleichzeitig die Proteinsekretion aus der Zelle gehemmt. Dies geschah, indem die Zellen mit den unspezifischen Stimulatoren Ionomycin und PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) inkubiert wurden. Ionomycin ist ein Calcium-Ionophor, welches über den vermehrten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  verschiedene calciumabhängige Signalwege in Gang setzt. Unter anderem wirkt Calcium synergistisch mit dem direkten Aktivator der Proteinkinase C, dem Phorbol-ester PMA. Die Proteinkinase C wiederum setzt diverse Signalwege in Gang und verstärkt auch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an eine Gruppe von Genen und führt somit zur vermehrten Produktion von Zytokinen [72]. Damit die Zytokine in der Zelle akkumulieren, musste die Proteinsekretion gehemmt werden. Hierzu wurde Brefeldin A (BFA) verwendet. BFA hemmt den Proteintransport aus dem endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat [73]. Vor der Fluoreszenzmarkierung wurden die Zellen für 4 Stunden mit PMA (15ng/ml), Ionomycin (0,5µg/ml) und BFA (5µg/ml) im Inkubator bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Die intrazelluläre Fluoreszenzmarkierung wurde an die extrazelluläre Fluoreszenzmarkierung angeschlossen. Es wurde wiederum ein Mastermix angesetzt. Pro Röhrchen wurden für jedes zu messende intrazelluläre Epitop 0,3µl Antikörperlösung in 50µl Permeabilization Buffer suspendiert. Danach wurden die Zellpellets mit jeweils 50µl des Mastermixes resuspendiert und für weitere 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 1ml Permeabilization Buffer. Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen in jeweils 200µl FACS-Puffer aufgenommen.



**Tabelle 12 Extra- und intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung zur Phänotypisierung**

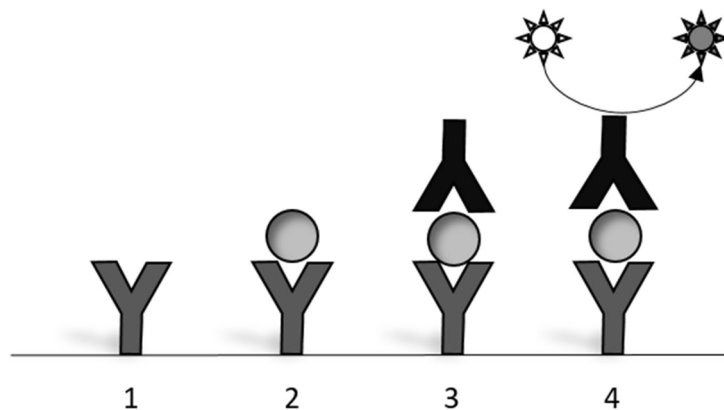
	APC	FITC	BV421	PE	AF700	Percpcy5.5	PE-cy7
Reinheit	CD4	CD3	IL-9	IL-9R	IL-17	CD45R0	CD27
Tregs	CD4	IFN $\gamma$	CD127	IL-9R	IL-17	Foxp3	CD25
Proliferation/ Chemokine	CCR6	Ki67	IL-9	IL-9R	-	-	-

**Tabelle 13 Extra- und intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung für Stimulationsexperimente**

	APC	FITC	BV421	PE	AF700	Percpcy5.5	PE-cy7
T-Zell- Subpopulationen	CCR6	IFN $\gamma$	IL-9	IL-9R	IL-17	CD45R0	CD27
Proliferation/ Chemokine	CCR6	Ki67	IL-9	IL-9R	IL-17	-	-
Tregs	IL-10	IFN $\gamma$	CD127	IL-9R	IL-17	Foxp3	CD25

### 2.3.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um die IL-9 Produktion über den gesamten Zeitraum der Zellkultur zu bestimmen, wurde ein IL-9 ELISA mit den Überständen aus der Zellkultur durchgeführt. Es wurde ein sogenannter Sandwich-ELISA angewendet. Das Prinzip beruht auf der Bindung des freien Antigens IL-9 an gebundene IL-9-Antikörper (Capture Antibody) auf dem Boden der Loch-Platte. Die ungebundenen Antigene und sonstigen Bestandteile im Überstand werden in einem Waschschrift entfernt und nur das gebundene IL-9 wird mit einem weiteren Antikörper (Detection Antibody) markiert. Dieser Antikörper wiederum kann durch ein Detektionsenzym, welches eine Farbreaktion auslöst, sichtbar gemacht werden. Die Farbreaktion wird im Photometer quantifiziert und durch den Vergleich mit einer Standardkurve wird die IL-9 Konzentration berechnet [74]. Zur Veranschaulichung der Methode dient Abbildung 7.



**Abbildung 7 Prinzip des Sandwich ELISA.** Abbildung modifiziert nach [75].

Es wurde das ELISA Ready-Set-Go!-Kit der Firma affymetrix eBioscience verwendet und der ELISA einem modifizierten Protokoll entsprechend durchgeführt. Zunächst wurde die 96-Loch-ELISA-Platte mit 50µl/Loch IL-9-Capture-Antibody über Nacht bei 4°C beschichtet (24µl Capture Antibody in 6ml 1x Coating Buffer). Am folgenden Tag wurde die Platte dreimal mit 200µl/Loch Waschpuffer (PBS 0,05% Tween-20) gewaschen und auf saugfähigem Papier getrocknet. Anschließend wurde die Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 200µl/Loch 1X ELISA Diluent geblockt. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten ebenfalls bei Raumtemperatur. Es wurden Verdünnungen der jeweiligen Überstände angefertigt, sowie eine Serienverdünnung durchgeführt um eine IL-9 Standardkurve zu generieren. Die Standardkurve hatte die IL-9-Konzentrationen 100pg/ml, 50pg/ml, 25pg/ml, 12,5pg/ml, 6,25pg/ml, 3,125pg/ml und 1,5625pg/ml. Nach einer Stunde wurde der Inhalt der Platte verworfen und es wurden

jeweils 50µl/Loch der Proben oder der Standardverdünnungen auf die Platte pipettiert und für 2 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde anschließend in drei Waschschritten entfernt. Nach dem Sandwichprinzip wurden nun 50µl/Loch Detection Antibody hinzugegeben (24µl Detection Antibody in 6ml 1X ELISA Diluent) und 2 Stunden inkubiert. Es folgten weitere drei Waschschrritte und anschließend die Inkubation mit 50µl/Loch Avidin-HRP (24µl Avidin-HRP in 6ml 1x ELISA Diluent) für 30 Minuten. Avidin-HRP ist das Detektions-Enzym, welches eine Bindestelle für den Detektionsantikörper besitzt. Es folgten 3 weitere Waschschrritte. Um die Farbreaktion in Gang zu setzen, wurde das Substrat für Avidin-HRP (50µl/Loch TMB Solution) hinzugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Sofort wurde ein mehr oder weniger intensiver Farbumschlag ins Blaue sichtbar. Um die Reaktion nach abgelaufener Zeit zu beenden, wurde 25µl/Loch Stop Solution hinzugegeben, was zu einem Farbumschlag ins Gelbe führte. Zum Schluss wurde die Platte in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen und die Daten analysiert.

### 2.3.8 Real-Time-PCR

Die Real-Time PCR (RT-PCR), auch quantitative PCR genannt, beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Das Besondere ist, dass die entstehenden DNA-Amplifikate mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes in Echtzeit quantifiziert werden und somit Rückschlüsse auf die relative Ausgangsmenge eines bestimmten Gentranskripts gezogen werden können [76, 77]. Zunächst muss aus der Zellpopulation mRNA (messenger RNA) isoliert und in cDNA (complementary DNA) transkribiert werden. Während der PCR wird DNA in vitro vervielfältigt. Dies geschieht mit Hilfe des thermostabilen Enzyms Taq-Polymerase aus dem hitzeresistenten Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) in drei zyklisch aufeinander folgenden Schritten. In der Denaturierungsphase werden DNA-Doppelstränge bei 94°-96° in Einzelstränge denaturiert. Als Startpunkt auf der DNA benötigt die Taq-Polymerase einen spezifischen Primer, ein Oligonukleotid, welcher komplementär ist zu den Rändern des gewünschten PCR-Produkts. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Anlagerung der Primer an die DNA erfolgt in der anschließenden Annealing-Phase bei 60°C. In der Elongationsphase werden (ebenfalls bei 60°C) aus freien Nukleotiden komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. In dieser Phase interkaliert der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green in die neu entstehende Doppelstrang-DNA, wodurch dessen Fluoreszenz ansteigt. Dieses Signal wird jeweils am Ende der Elongationsphase gemessen. Jeder Zyklus führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA und somit zu einem exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz.

Für die relative Quantifizierung der Zielgene wird eine Normalisierung durchgeführt. Hierzu werden die Ergebnisse in Bezug gesetzt zu der relativen Expression eines konstanten Gens, eines „Housekeeping-Gens“. Als Maß für die Quantifizierung wird der sogenannte CP-Wert (Crossing-Point) verwendet. Der CP-Wert entspricht der Anzahl der Zyklen, die notwendig sind, um ein definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Je höher die Ausgangsmenge eines Zielgens, desto niedriger der CP-Wert. Zugrunde gelegt wird, dass pro PCR-Zyklus die DNA-Produktmenge verdoppelt wird. Daher entspricht ein um eine Einheit geringerer CP-Wert einer doppelten Menge an eingesetzter cDNA. Für die Normalisierung wurde jeweils der CP-Werte des Housekeeping-Gens vom CP-Wert des Zielgens subtrahiert [78].

$$\Delta\text{CP} = \text{CP Zielgen} - \text{CP Referenzgen}$$

### 2.3.8.1 RNA-Isolation

Arbeiten mit RNA oder DNA wurden immer an einer RNase freien Hood durchgeführt. Es wurden ausschließlich RNase-freie Verbrauchsmaterialien verwendet. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNA isolation kit der Firma Machery Nagel nach deren Vorgaben [79]. Nach 3 Tagen in Kultur wurden die Zellen mitsamt des Überstandes in Eppendorf-Röhrchen (1,5ml) überführt. Nach Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und gesondert eingefroren. Die Zellpellets wurden mit je 350µl Lysepuffer (RA1 Buffer und 3,5µl β-Mercaptoethanol), welcher große Mengen an chaotropischen Ionen enthält, resuspendiert. Der Lyse-Puffer zerstört Zellstrukturen und inaktiviert gleichzeitig RNAsen, welche ubiquitär in biologischen Materialien vorkommen und sorgt für Bindungskonditionen, welche die spätere Bindung der RNA an die Siliziummembran verbessern. Das Lysat konnte bei -80°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet werden. Zur Weiterverarbeitung wurde das Lysat auf einen NucleoSpin Filter (violetter Ring) in einem 2ml Röhrchen pipettiert und 1 Minute bei 11000U/min zentrifugiert. Dadurch wurde die Viskosität vermindert und grobe Zellbestandteile ausgefiltert. Im Anschluss wurde die RNA-Bindungskonstitution optimiert, indem 350µl 70%iger Ethanol zu dem Lysat gegeben und 5mal hoch und runter pipettiert wurde. Darauf folgte die Überführung des Lysats auf eine Membran in einer NucleoSpin RNA Säule (blauer Ring) in einem 2ml Röhrchen. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 11000U/min war die RNA an die Siliziummembran im Zentrum der Säule gebunden. Um den Kontakt der Membran mit der abzentrifugierten Flüssigkeit zu vermeiden, wurde die Säule in ein neues Röhrchen überführt. Es folgte die Entsalzung durch Zugabe von 350µl Membrane Desalting Buffer und darauffolgende Zentrifugation für 1 Minute bei 11000U/min, um die Membran zu trocknen. Kontaminierende DNA, welche ebenfalls an die Membran gebunden war, wurde durch DNAsen verdaut. Für jede Isolation wurden jeweils 10µl rDNase mit 90µl Reaction Buffer angesetzt und gut durchmischt. Davon wurden jeweils 95µl in die Mitte der Siliziummembran pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun folgten 3 Waschschriffe mit anschließender Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes. Der erste Waschschriff diente der Inaktivierung der rDNase (je 200µl RAW2 Puffer). Der zweite und dritte Waschschriff (je 600µl/ 250µl RA3 Puffer) der Reinigung. Zum Trocknen der Membran wurde 2 Minuten bei 11000U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5ml Eppendorf- Röhrchen mit Deckel platziert und die reine RNA aus der Siliziummembran mit Hilfe von 60µl RNase freiem H<sub>2</sub>O durch 1 Minute Zentrifugation bei 11000U/min herausgelöst. Die RNA-Konzentration wurde anschließend mittels UV-Spektrophotometrie gemessen.

### 2.3.8.2 Transkription

Für die Transkription von mRNA in cDNA wurden Reagenzien der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet, unter anderen das Enzym Reverse Transkriptase. Wie die Taq-Polymerase benötigt auch die Reverse Transkriptase einen Primer als Startpunkt für die DNA-Synthese. Hierfür wurden unspezifische Oligo(dT)-Primer verwendet, welche komplementär sind zu den Poly-A-Schwänzen der mRNA. Für die Transkription benötigt die Reverse Transkriptase außerdem freie Nukleotide, welche mit dem dNTP-Mix zugegeben wurden. In die DNA wird anstelle von Uracil Thymin und anstelle des Zuckers Ribose Desoxyribose eingebaut.

Die Reaktionskomponenten wurden jeweils in einem sterilen, Nuklease-freien 250µl Eppendorf- Röhrchen, welches in einem PCR-Kühler gekühlt wurde, in folgender Reihenfolge angesetzt:

- |    |              |  |
|----|--------------|--|
| 1. | 12,5µl       | RNA (unabhängig von der Konzentration) |
|    | 1,0µl        | Oligo(dT)primer                        |
|    | 1,0µl        | dNTP Mix                               |
| 2. | 4,0µl        | 5X RT Buffer                           |
|    | 0,5 µl       | RiboLock RNAse Inhibitor               |
|    | <u>1,0µl</u> | <u>Maxima Reverse Transcriptase</u>    |
|    | 20µl         | Gesamtvolumen                          |

Die Reaktionskomponenten wurden vorsichtig durchmischt, so dass sich für jede Probe ein Volumen von 20µl ergab. Die Ansätze wurden im Thermocycler zunächst für 30 Minuten auf 50°C erhitzt gefolgt von 5 Minuten bei 85°C. Die cDNA-Konzentration wurde dann wiederum mittels UV-Spektrophotometrie gemessen.

### 2.3.8.3 RT-PCR - Durchführung

Um die Ergebnisse der RT-PCR miteinander vergleichen zu können, wurde in jedem Ansatz exakt die gleiche Menge DNA verwendet. Von jeder Probe wurden pro Ansatz 200ng cDNA in 8µl RNase freiem H<sub>2</sub>O verwendet. Im nächsten Schritt wurde für jede Probe ein Mastermix angesetzt:

Mastermix 1:

X+1\* 8µl cDNA-Lösung (200ng/8µl)

X+1\* 10µl SYBR Green

X+1\* 0,4µl RNase freies Wasser

X+1\* 18,4µl Gesamtvolumen

Wegen des einzuplanenden Pipettierfehlers wurde der Mastermix immer für die Anzahl der Ansätze plus 1 hergestellt (X+1). Der Mastermix wurde sehr gut gemischt. Aus Forward und Reverse Primer wurden ebenfalls Mastermixe angesetzt für die Anzahl der Messungen pro Gen (Y+1):

Mastermix 2:

Y+1\* 0,8µl Forward Primer

Y+1\* 0,8µl Reverse Primer

Y+1\* 1,6µl Gesamtvolumen

Nun wurden auf eine 96-Loch-Microplatte für PCR 18,4µl/Loch von Mastermix 1 und 1,6µl/Loch von Mastermix 2 pipettiert, so dass am Ende ein Volumen von 20µl/Loch bestand. Nun wurde die PCR-Platte mit einer Klebefolie abgedeckt und 1 Minute bei 1500U/min zentrifugiert. Anschließend wurde im qPCR Thermocycler das in Tabelle 14 angegebene Programm durchgeführt.

**Tabelle 14 RT-PCR Zyklen**

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	40
60 °C	60 s	
60 °C	2 min	1
4 °C	x	

### **2.3.9 Statistik**

Für die statistische Auswertung wurden aufgrund der fehlenden Normalverteilung (Kolmogorow-Smirnow-Test) nichtparametrische Testverfahren verwendet. Für unverbundene Variablen (z.B. Zellkultur mit Th9-Stimulus vs. Th17-Stimulus) wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Für verbundene Variablen (z.B. Zellkultur vor und nach Stimulation) wurde der Wilcoxon-Rank Test verwendet. Auf Grund der explorativen Datenanalyse wurde auf eine Korrektur hinsichtlich multiplen Testens verzichtet. Das Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert von  $\leq 0,05$  festgelegt. Für die statistische Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Statistics Version 25 und 26 (Armonk, New York, USA) verwendet. Für die Erstellung von Diagrammen wurde das Programm GraphPad Prism Version 6 (San Diego, USA) verwendet.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Studienkohorte

In Tabelle 15 sind Charakteristika von Pat und HD gegenübergestellt. In Tabelle 16 und Tabelle 17 sind charakterisierende Eigenschaften der HD bzw. der Pat aufgelistet.

**Tabelle 15 Charakteristika der Pat und HD**

	Pat (N=7)		HD (N=10)	
	MW ± SD (Median; Min–Max)		MW ± SD (Median; Min – Max)	
<b>Alter (Jahre)</b>	59,9 ± 5,8 (62; 51-64)		51,3 ± 7,2 (52,5; 34-61)	
<b>Geschlecht</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Weiblich	4	57,1	9	90
Männlich	3	42,9	1	10

In der Tabelle werden Alter und Geschlecht der Pat und HD gegenübergestellt. Es sind jeweils der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben.

- Für die endgültigen Experimente wurden 7 Pat und 10 HD untersucht.
- Das durchschnittliche Alter der Pat lag mit 59,9 Jahren über dem der HD mit 51,3 Jahren, dies war nicht signifikant.
- Von den Pat waren 4 weiblich (57,1%) und 3 männlich (42,9%). Die Kohorte der HD bestand aus 9 weiblichen (90%) und 1 männlichen (10%) Person.

**Tabelle 16 Charakteristika der HD**

HD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<b>Charakteristika</b>									
<b>Geschlecht</b>	w	w	w	w	w	w	w	w	m	w
<b>Alter (Jahre)</b>	52	48	55	57	61	53	54	50	34	49

Mit insgesamt 10 Proben von HD wurde eine Zellkultur durchgeführt. Die Auswertung erfolgte bei den HD 1-3 und 8-10 mittels Durchflusszytometrie und bei den HD 4-7 mittels RT-PCR. Die HD 1-3 wurden jeweils mit den entsprechenden Pat 1-3 zeitgleich in einem Kulturansatz untersucht, die HD 4-7 mit den entsprechenden Pat 4-7.

**Tabelle 17 Charakteristika, Laborparameter, medikamentöse Therapie und Krankheitsaktivität der Pat**

Patient	1	2	3	4	5	6	7	
	<b>Charakteristika</b>							
<b>Geschlecht</b>	m	w	m	w	w	m	w	
<b>Alter (Jahre)</b>	62	51	64	64	52	64	62	
<b>Krankheitsdauer zum Zeitpunkt der Blutentnahme (Jahre)</b>	18	12	28	35	2	6	19	
<b>Gelenkerosionen</b>	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	
	<b>Labordiagnostik</b>							
	<b>RB</b>							
<b>RF (IU/ml)</b>	<20	<20	27,4	>40	n. d.	20	558	<11
<b>ANA Titer</b>	<1:100	n.d.	1:640	1:320	1:100	1:320	1:100	<1:100
<b>CCP-AK (IU/l)</b>	<7	0	23,0	7	n.d.	50	61	<0,4
<b>BSG (mm/h)</b>	<20	4	18	4	21	19	37	17
<b>CRP (mg/dl)</b>	<0,5	0,1	0,06	1,2	0,6	0,5	0,72	0,43
<b>Leukozyten (Tsd/<math>\mu</math>l)</b>	3,9-10,2	7,9	4,0	9,9	12,8	14,8	7,5	6,49
	<b>Medikamente</b>							
<b>MTX (mg/Wo)</b>	15	15	15	15	15	25	15	
<b>Prednisolon (mg/Tag)</b>	4	2,5	5	5	20	4	5	
<b>Leflunomid (mg/Tag)</b>	-	20	-	-	20	-	-	
<b>Sulfasalazin (mg/Tag)</b>	2000	-	-	-	-	-	-	
<b>Diclofenac (mg/Tag)</b>	75	-	-	-	-	-	-	
<b>Ibuprofen</b>	-	-	b. Bdf.	-	b. Bdf.	-	b. Bdf.	
<b>Etoricoxib (mg/Tag)</b>	-	-	-	-	-	90	-	
<b>Novaminsulfon</b>	-	-	-	-	-	b. Bdf.	-	
	<b>Krankheitsaktivität</b>							
<b>DAS 28</b>	2,04	2,02	<2	3,3	5,1	6	5,2	
<b>VAS (1-10)</b>	2	1	2	3	7-8	8	6	

Mit insgesamt 7 Pat wurde eine Zellkultur durchgeführt. Die Auswertung erfolgte bei den Pat 1-3 mittels Durchflusszytometrie und bei den Pat 4-7 mittels RT-PCR. Für alle Pat sind der Rheumafaktor (RF), der Titer der antinukleären Antikörper (ANA-Titer), der Antikörper gegen das zyklische citrullinierte Peptid (CCP), die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), das c-reaktive Protein (CRP) und die Leukozyten angegeben. M = männlich, w = weiblich, RB = Referenzbereich, n. d.= nicht dokumentiert, IU = international unit, ml = Milliliter, l = Liter, mm = Millimeter, h = Stunde, mg = Milligramm, dl = Deziliter, Tsd = Tausend,  $\mu$ l = Mikroliter. Alle Pat befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter immunsuppressiver Therapie mit Methotrexat (MTX) und Prednisolon, weitere Medikamente und die Bedarfsmedikation (b. Bdf.) sind angegeben. Die Krankheitsaktivität ist anhand des DAS28 angegeben: ein Wert zwischen 0-3,2 bedeutet eine fehlende bis geringe, ein Wert zwischen 3,2-5,1 eine mittlere und ein Wert >5,1 eine hohe Krankheitsaktivität. Das subjektive Schmerzempfinden der Pat wurde anhand einer visuellen Analogskala (VAS) erhoben (1 = kein Schmerz, 10 = unerträglicher Schmerz).

- Alle Pat standen zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter immunsuppressiver Therapie. Diese bestand bei allen aus Methotrexat und Prednisolon in unterschiedlicher Dosierung. Zusätzliche Medikamente sind in Tabelle 17 angegeben.
- Die HD 1-3 wurden mit den entsprechenden Pat-Proben 1-3 zeitgleich in einem Kulturansatz untersucht und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet während HD 4-7 mit den entsprechenden Pat-Proben 4-7 zeitgleich in einem Kulturansatz untersucht und mittels RT-PCR ausgewertet wurden. HD 8-10 wurden in jeweils einzelnen Kulturansätzen untersucht und durchflusszytometrisch ausgewertet.

## **3.2 Charakterisierung der CD4+ Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion der Pat und HD**

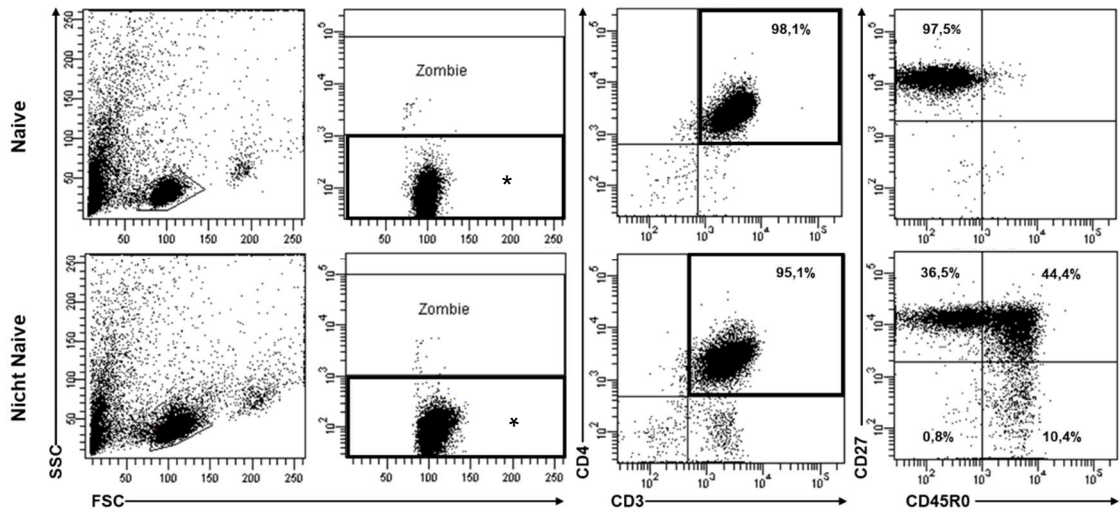
Bei den Pat 1-3 und den HD 1-3 sowie 8-10 erfolgte nach Zellseparation und vor Durchführung der Zellkultur eine durchflusszytometrische Messung zur Bestimmung der Reinheit. Außerdem wurden die T-Zellen auf ihre Zytokinproduktion, Chemokinexpression sowie auf ihre Proliferationsrate untersucht.

Untersucht wurden die isolierte Fraktion der CD4+ Naiven T-Zellen und die im Folgenden so genannte Fraktion der (CD4+) Nicht Naiven T-Zellen. Mit Nicht Naiven T-Zellen wurde die Fraktion bezeichnet, welche nach Isolation der Naiven Zellen aus der im ersten Separationsschritt isolierten Population der CD4+ Lymphozyten übrigblieben, also die positive, antikörpermarkierte Fraktion.

### **3.2.1 Reinheit nach Zellseparation**

Der erste Schritt der Zellseparation war mit einem durchflusszytometrisch bestimmten Anteil CD3+CD4+-Zellen von >95% des Lymphozytenfensters nach Aussortieren der toten Zellen in allen untersuchten Proben erfolgreich. Daher wird dieses Lymphozytenfenster im Folgenden „CD4+ Lymphozytengate“ genannt und die weiteren Parameter in Bezug auf dieses Fenster angegeben, vgl. Abbildung 8.

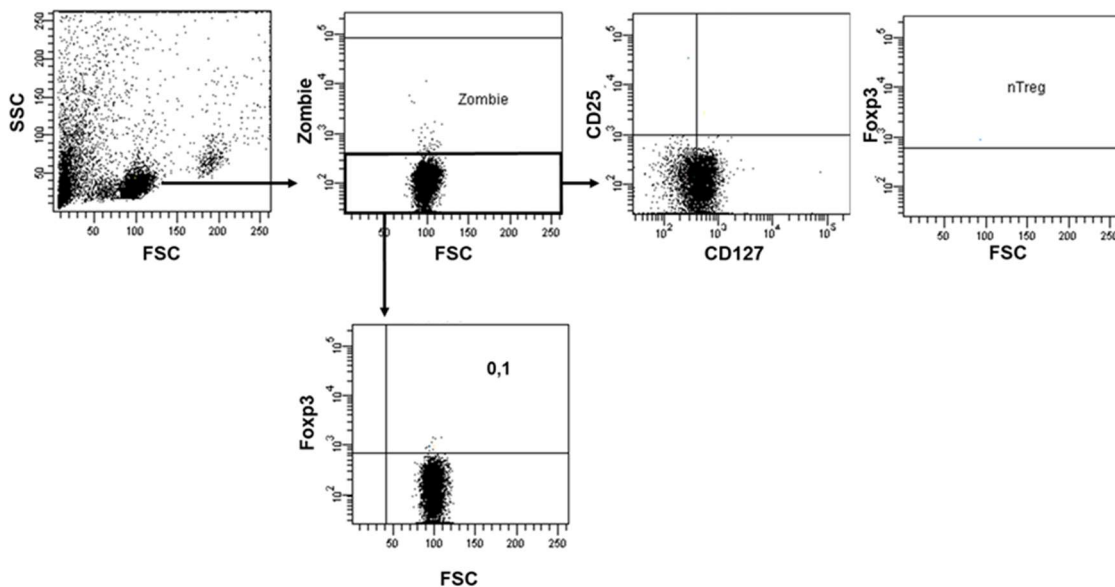
Die Reinheit der isolierten Naiven (CD45R0-CD27+) Zellen lag bei den HD im Mittelwert bei 96%, bei den Pat lag der Mittelwert bei einer Reinheit von 98%, vgl. Abbildung 8. Die Nicht Naive Fraktion, wie in Abbildung 8 ersichtlich, setzte sich zusammen aus Naiven, Gedächtnis- (CD45R0+CD27+), Effektorzellen (CD45R0+CD27-) und TEMRA (CD45R0-CD27-). Mit einem Anteil von >50% naiven Zellen in der Nicht Naiven T-Zellfraktion in einigen Proben ist die Reinheit ungenügend. Die Kulturansätze mit der Nicht Naiven Fraktion sollen als interne Kontrolle dienen. Da für die Zellseparation CD45R0 mit einem Antikörper markiert wurde, kann es sein, dass insbesondere Zellen, die CD45R0 nur niedrig exprimieren, in die CD45R0 negative Fraktion (Naive/ TEMRA) rutschen. Unterschiede zwischen HD und Pat bestanden nicht.



**Abbildung 8 Reinheit. Repräsentatives Beispiel für die Bestimmung der Reinheit durch die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD45R0 und CD27 anhand einer gesunden Kontrolle. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf das Lymphozytengate nach Aussortieren der toten Zellen durch die Zombiefärbung. Da durch die Isolation eine Reinheit von >95% CD4+ Zellen in allen Proben bestand wird \*dieses Fenster im Folgenden als CD4+ Lymphozytengate bezeichnet.**

### 3.2.2 Regulatorische T-Zellen

Der Antikörpercocktail für die Isolation der Naiven Zellen enthält einen Antikörper gegen CD25, einem Marker für T-regulatorische Zellen. Aufgrund der verwendeten Methode sind nur unter der positiven Fraktion, also der Nicht Naiven Fraktion, Tregs (CD25+CD127-FoxP3+) zu erwarten. Ein Nachweis von Tregs gelang weder in der Naiven noch in der Nicht Naiven Fraktion. In der Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen HD und Pat (vgl. Tabelle 18). Ein repräsentatives Beispiel des Gatings der Tregs und Foxp3+ Zellen ist in Abbildung 9 dargestellt. Eine etwas höhere Expression von Foxp3 fand sich in der Nicht Naiven Fraktion im Vergleich zur Naiven Fraktion, dies war nicht signifikant.



**Abbildung 9** Repräsentatives Beispiel des Gatings von Tregs bzw. Foxp3+ Zellen anhand einer gesunden Kontrolle in der Naiven T-Zellfraktion. Es wurden keine Tregs nachgewiesen.

**Tabelle 18:** Nachweis von Foxp3 in der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion

	Naive		Nicht Naive	
	HD (N = 6)	Pat (N = 3)	HD (N = 6)	Pat (N = 3)
	MW ± SD; (Median; Min – Max)		MW ± SD; (Median; Min – Max)	
<b>Foxp3</b>	2,1 ± 2,2 (1,5; 0,2 - 5,3)	1,8 ± 0,8 (1,5; 1,2 - 2,7)	2,9 ± 3,1 (1,4; 0,4 - 7,7)	2,9 ± 2,1 (1,8; 1,5 - 5,3)

Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der Foxp3-positiven Zellen am CD4+ Lymphozytengate in HD und Pat in der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion wieder. Es sind der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. Unterschiede zwischen HD und Pat sind nicht signifikant (Mann-Whitney-U Test).

### **3.2.3 Zytokinproduktion und Expression des Chemokinrezeptors CCR6, des Proliferationsmarkers und des IL-9R**

Im folgenden Kapitel werden die Naive und die Nicht Naive T-Zellfraktion anhand ihrer Zytokin-, Chemokin-, IL-9R-Expression und ihrer Proliferationsrate phänotypisiert und Unterschiede zwischen HD und Pat analysiert. Abbildung 11 zeigt ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Auswertung anhand einer HD- und einer Pat-Probe. Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Auswertung wurde die IL-9-Konzentration in den Seren der HD und Pat mittels ELISA gemessen. Die IL-9-Konzentration war in beiden Kohorten negativ.

#### **3.2.3.1 Zytokinproduktion und IL-9R-Expression**

Die Zytokinproduktion der CD4+ Naiven T-Zellen war insgesamt gering. Für IL-9 und IL-17 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen HD und Pat. Die IFN $\gamma$ -Expression der HD war in der Naiven T-Zellfraktion signifikant höher als der RA. Dieser Trend war auch in der Nicht Naiven T-Zellfraktion deutlich, aber nicht signifikant. Insgesamt war die Zytokinproduktion der Nicht Naiven T-Zellfraktion höher als der Naiven T-Zellfraktion. Bei der Expression des IL-9R ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen HD und Pat in beiden Fraktionen. Zur Verdeutlichung der Daten siehe Abbildung 10A und Tabelle 19.

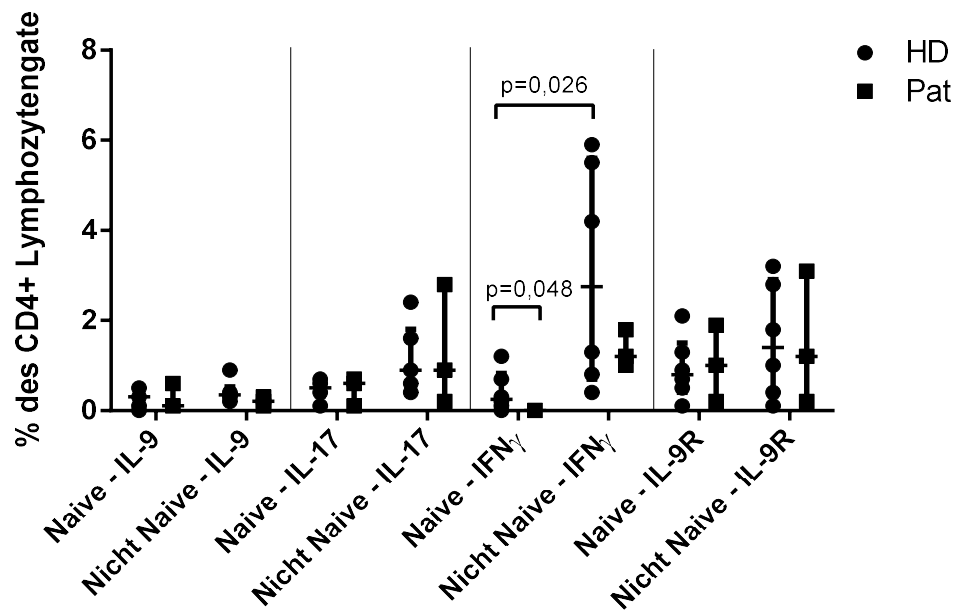
#### **3.2.3.2 Proliferationsrate**

Anhand der Ki67-Expression wurden die proliferativen Eigenschaften der Proben untersucht. Die Proliferationsrate war sowohl in der Naiven als auch in der Nicht Naiven Fraktion gering. Signifikante Unterschiede zwischen HD und Pat ergaben sich nicht. Es zeigte sich ein Trend zu einer geringeren Proliferationsrate der Pat-Proben, vgl. Abbildung 10B und Tabelle 19.

#### **3.2.3.3 Expression des Chemokinrezeptors CCR6**

Verglichen wurde die CCR6-Expression als Marker für Th17- aber auch Th9-Zellen in HD- und Pat-Proben. Abbildung 10 und Tabelle 19 zeigen keinen relevanten Unterschied der CCR6-Expression zwischen HD und Pat-Proben. Der proportionale Anteil CCR6+ Zellen war in der Nicht Naiven höher als in der Naiven T-Zellfraktion.

### A Zytokin- und IL-9R-Expression in Naiven und Nicht Naiven



### B Expression von CCR6 und Ki67 in Naiven und Nicht Naiven

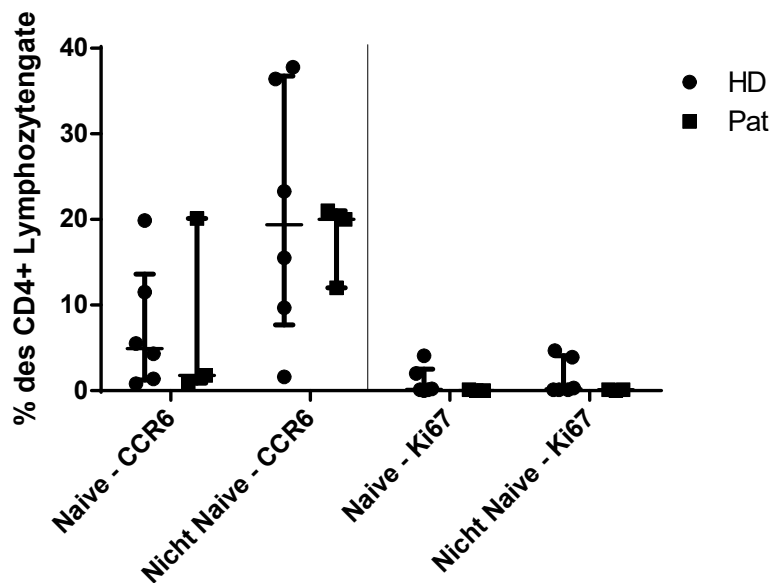


Abbildung 10 Unterschiede in der Produktion von (A) IL-9, IL-17, IFN $\gamma$  und IL-9R und (B) CCR6 und Ki67 zwischen Pat und HD in der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion. Darstellung in Prozent des CD4+-Lymphozytengate als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Naive T-Zellen der HD zeigen eine signifikant höhere Produktion von IFN $\gamma$  als die der Pat. Vergleich HD vs. Pat mittels Mann-Whitney-U Test. Signifikante p-Werte sind angegeben.



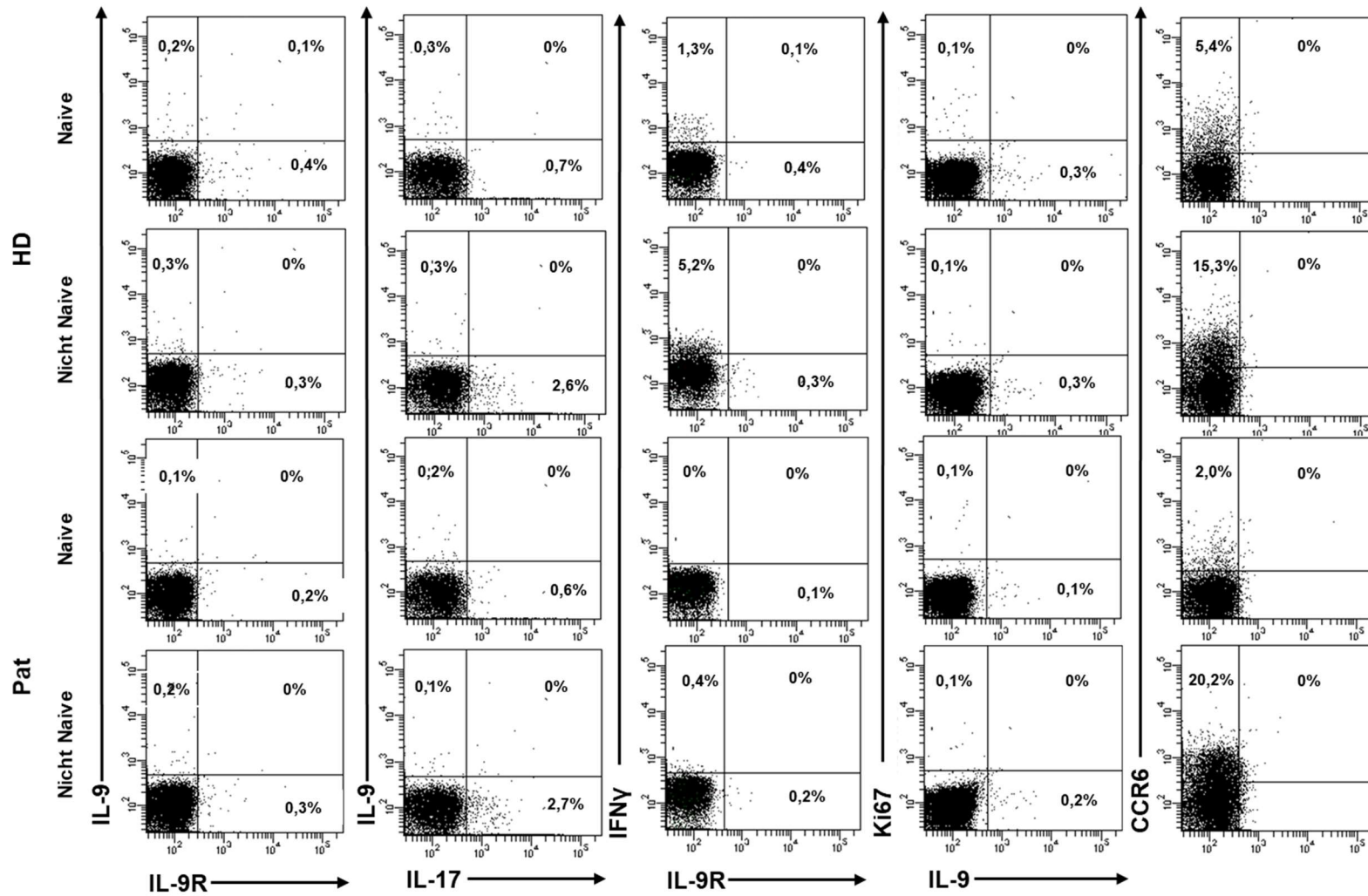


Abbildung 11 Repräsentative Beispiele der Zytokin-, IL-9R-, Ki67- und Chemokinexpression in HD und Pat in der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion. Die Prozentangaben beziehen sich auf das CD4<sup>+</sup> Lymphozytengate.

**Tabelle 19 Zytokinproduktion und Expression des Chemokinrezeptors CCR6, des Proliferationsmarkers und des IL-9R der Naiven- und der Nicht Naiven-T-Zellfraktion von HD und Pat**

	Naive		Nicht Naive	
	HD	Pat	HD	Pat
	MW ± SD; (Median; Min – Max)		MW ± SD; (Median; Min – Max)	
<b>IL-9</b>	0,3 ± 0,2 (0,3; 0,0 - 0,5)	0,3 ± 0,3 (0,1; 0,1 - 0,6)	0,4 ± 0,2 (0,4; 0,2 - 0,9)	0,2 ± 0,1 (0,2; 0,1 - 0,3)
<b>IL-17</b>	0,5 ± 0,2 (0,5; 0,1 - 0,7)	0,5 ± 0,3 (0,6; 0,1 - 0,7)	1,1 ± 0,7 (0,9; 0,4 - 2,4)	1,3 ± 1,3 (0,9; 0,2 - 2,8)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	0,4 ± 0,5 (0,3; 0,0 - 1,2)*.a	0,0 ± 0,0 (0,0; 0,0 - 0,0)*	3,0 ± 2,5 (2,8; 0,4 - 5,9) <sup>a</sup>	1,3 ± 0,4 (1,2; 1,0 - 1,8)
<b>IL-9R</b>	0,9 ± 0,7 (0,8; 0,1 - 2,1)	1,0 ± 0,9 (1,0; 0,2 - 1,9)	1,6 ± 1,3 (1,4; 0,1 - 3,2)	1,5 ± 1,5 (1,2; 0,2 - 3,1)
<b>Ki67</b>	1,1 ± 1,7 (0,2; 0,0 - 4,1)	0,0 ± 0,1 (0,0; 0,0 - 0,1)	1,5 ± 2,2 (0,2; 0,1 - 4,7)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0 - 0,1)
<b>CCR6</b>	7,2 ± 7,3 (4,9; 0,8 - 19,9)	7,6 ± 10,8 (1,8; 0,9 - 20,1)	20,7 ± 14,6 (19,4; 1,6 - 37,8)	17,7 ± 4,9 (20,2; 12,1 - 20,9)

Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der IL-9-, IL-17-, IFN $\gamma$ -, IL-9R-, Ki67- und CCR6-positiven Zellen am CD4+-Lymphozytengate in der Naiven- und der Nicht Naiven T-Helferzell-Fraktion von HD (N=6) und Pat (N=3) wieder. Es sind der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben.

\* Vergleich HD vs. Pat: \*=0,048 (Mann-Whitney-U-Test).

<sup>a</sup> Vergleich Naive vs. Nicht Naive: a=0,026 (Mann-Whitney-U Test).

### **3.3 In vitro: Stimulationsexperimente**

Nachdem in den nicht stimulierten Proben nur geringe Anteile zytokinexprimierender Zellen nachgewiesen wurden, wurden die Zellen in ein artifizielles, standardisiertes Milieu versetzt, um das Verhalten der Zellen auf proinflammatorische Reize zu untersuchen. Wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben wurde zum einen ein Th9-induzierender und zum anderen ein Th17-induzierender Zytokincocktail genutzt. Nach dreitägiger Kultur erfolgte die Auswertung mittels Durchflusszytometrie, ELISA und RT-PCR.

#### **3.3.1 Stimulusabhängige Effekte**

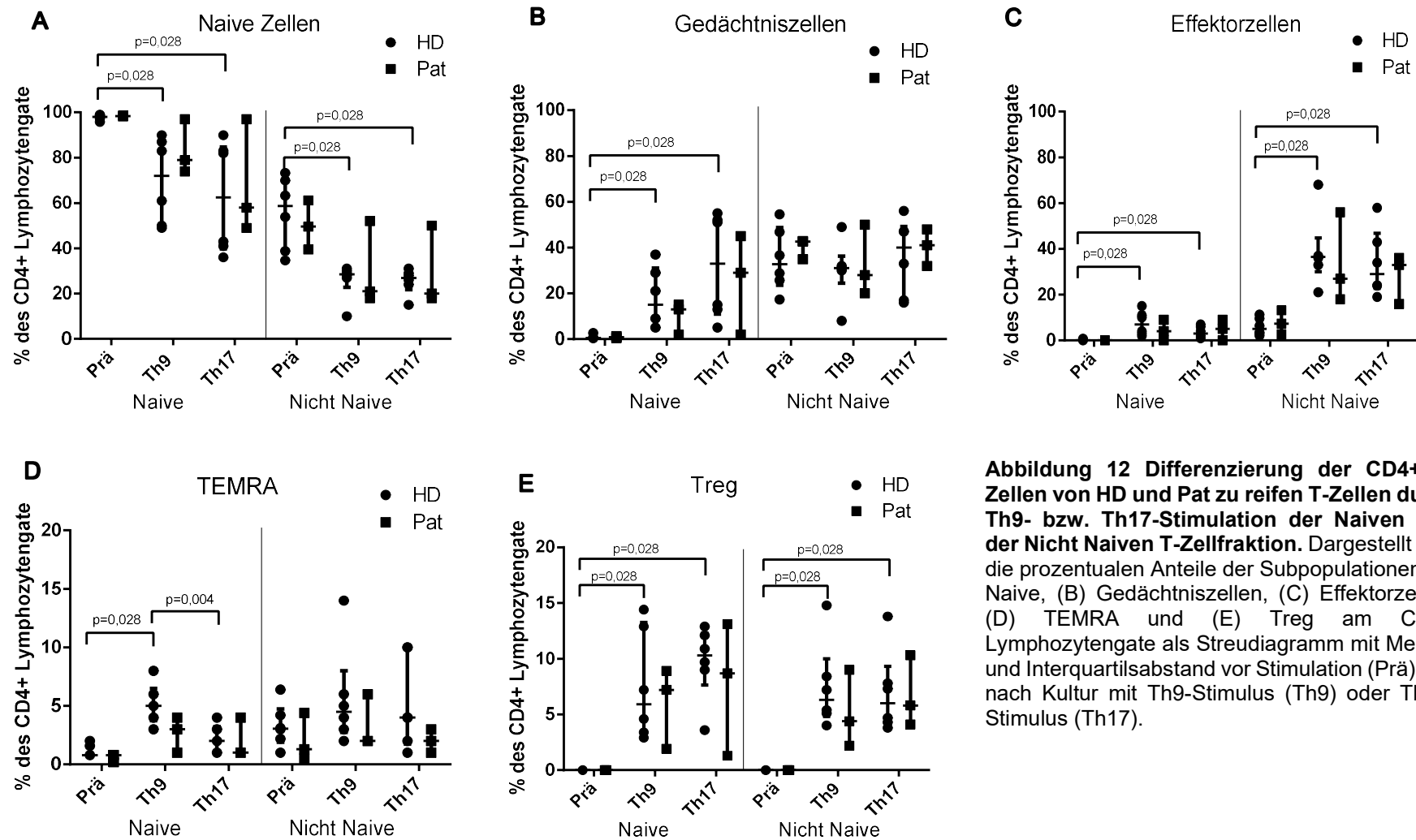
Im folgenden Abschnitt soll der Einfluss der Th9- und Th17-Stimuli auf die T-Zelldifferenzierung, die Zytokinproduktion und die Chemokinexpression in HD und Pat analysiert werden.

##### **3.3.1.1 Differenzierung der CD4+ Lymphozyten durch Th9- bzw. Th17-Stimulation**

In der Naiven T-Zellfraktion induzierte sowohl der Th9- als auch der Th17-Stimulus eine Differenzierung der naiven Zellen zu Gedächtnis- und Effektorzellen, ebenso wie zu Tregs. Der Th9-Stimulus führte zu einer signifikant vermehrten Differenzierung zu TEMRA im Vergleich zum Th17-Stimulus (vgl. Abbildung 12D).

In der Nicht Naiven Fraktion kam es ebenfalls zu einer signifikanten Differenzierung zu Effektorzellen und Tregs, die Gedächtniszellen hingegen blieben unverändert. Die Differenzierung zu TEMRA war durch die Th9-Stimulation betont, aber ohne signifikanten Unterschied zur Th17-Stimulation. Signifikante Unterschiede der T-Zelldifferenzierung zwischen HD und Pat wurden nicht festgestellt. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 12 und Tabelle 20 wiedergegeben.

Abbildung 13 zeigt eine repräsentative HD- und Pat-Probe in der durchflusszytometrischen Auswertung.



**Abbildung 12 Differenzierung der CD4+ T-Zellen von HD und Pat zu reifen T-Zellen durch Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion.** Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Subpopulationen (A) Naive, (B) Gedächtniszellen, (C) Effektorzellen, (D) TEMRA und (E) Treg am CD4+ Lymphozytengate als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand vor Stimulation (Prä) und nach Kultur mit Th9-Stimulus (Th9) oder Th17-Stimulus (Th17).

**Tabelle 20 Zusammensetzung der CD4+ Lymphozyten nach Th9- bzw. Th17 Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion**

		Naive		Nicht Naive	
		HD	Pat	HD	Pat
		MW ± SD; (Median; Min – Max)		MW ± SD; (Median; Min – Max)	
<b>Naive</b> CD45R0- CD27+	Prä	97,8 ± 1,1 (98,1; 95,8- 98,9) <sup>a,b</sup>	98,5 ± 0,2 (98,4; 98,3 - 98,7)	55,7 ± 16,1 (58,6;34,7-73,3) <sup>a,b</sup>	50,1 ± 10,9 (49,6;39,5-61,2)
	Th9	70,0±18,7 (71,7;49,2-90,1) <sup>a</sup>	83,1±12,4 (78,5;73,6-97,1)	25,6 ± 7,8 (28,2; 10,1 - 30,8) <sup>a</sup>	30,1 ± 18,8 (21,0;17,6-51,8)
	Th17	62,4±24,8 (62,7;35,8-89,8) <sup>b</sup>	68,2 ± 25,3(58,4; 49,3- 97,0)	25,4 ± 5,5 (26,7; 15,1 - 30,8) <sup>b</sup>	29,6 ± 17,9 (20,2;18,3-50,2)
<b>Gedächtnis</b> CD45R0+ CD27+	Prä	0,9 ± 0,9 (0,6; 0,3 - 2,7) <sup>a,b</sup>	0,9 ± 0,4 (0,9; 0,5 - 1,3)	35,0 ± 13,9 (32,7; 17,3- 54,6)	40,1 ± 4,5 (42,6;34,9 - 42,9)
	Th9	17,6 ± 13,5 (15,0; 4,5 - 36,5) <sup>a</sup>	10,0 ± 6,9 (13,3; 2,1 - 14,6)	30,1 ± 13,2 (30,7; 7,8 - 49,2)	32,7 ± 15,5 (27,9;20,1-50,0)
	Th17	31,8 ± 23,1 (33,1; 4,6 - 55,2) <sup>b</sup>	25,3 ± 21,6 (28,9; 2,1 - 44,8)	35,9 ± 16,7 (40,1; 16,3- 55,5)	40,2 ± 8,2 (41,0;31,7 - 48,0)
<b>Effektor</b> CD45R0+ CD27-	Prä	0,2 ± 0,3 (0,0; 0,0 - 0,7) <sup>a,bb</sup>	0,1 ± 0,1 (0,0; 0,0 - 0,2)	6,0 ± 3,8 (5,0; 2,1 - 11,3) <sup>a,b</sup>	7,7 ± 5,3 (7,3; 2,7- 13,2)
	Th9	7,3 ± 5,3 (6,6; 2,0 - 15,0) <sup>a</sup>	4,5 ± 4,3 (4,3; 0,3 - 8,8)	38,7 ± 15,8 (36,2; 20,6- 68,2) <sup>a</sup>	33,9 ± 20,1 (27,4;17,9-56,4)
	Th17	3,8 ± 2,4 (3,2; 1,4 - 7,4) <sup>bb</sup>	4,5 ± 4,1 (4,6; 0,4 - 8,6)	33,6 ± 14,7 (28,9; 19,0- 58,2) <sup>b</sup>	28,3 ± 10,5 (32,6;16,4-36,0)
<b>TEMRA</b> CD45R0- CD27-	Prä	1,1 ± 0,5 (0,8; 0,8 - 2,0) <sup>a</sup>	0,6 ± 0,3 (0,8; 0,2 - 0,8)	3,3 ± 1,8 (3,1; 1,0 - 6,4)	2,1 ± 2,1 (1,3; 0,5 - 4,4)
	Th9	5,1 ± 1,8 (5,1; 3,3 - 8,3) <sup>a,c</sup>	2,5 ± 1,9 (2,6; 0,5 - 4,3)	5,6 ± 4,3 (4,2; 2,3 - 13,9)	3,4 ± 2,3 (2,4; 1,7 - 6,0)
	Th17	2,0 ± 0,9 (1,6; 1,2 - 3,5) <sup>c</sup>	2,0 ± 1,8 (1,4; 0,6 - 4,1)	5,2 ± 4,1 (3,9; 1,2 - 10,3)	1,9 ± 0,9 (1,7; 1,1 - 2,9)
<b>Treg</b> CD25+ CD127-FoxP3+	Prä	0.0 ± 0.0 (0.0; 0.0 - 0.0) <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 (0.0; 0.0 - 0.0)	0.0 ± 0.0 (0.0; 0.0 - 0.1) <sup>a,b</sup>	0.0 ± 0.0 (0.0; 0.0 - 0.0)
	Th9	7,6 ± 5,0 (5,9; 2,9 – 14,4) <sup>a</sup>	6,0 ± 3,7 (7,2; 1,9 – 8,9)	7,5 ± 3,9 (6,3; 4,0 – 14,8) <sup>a</sup>	5,2 ± 3,5 (4,4; 2,2 – 9,0)
	Th17	9,7 ± 3,3 (10,3; 3,6 – 12,9) <sup>b</sup>	7,7 ± 6,0 (8,7; 1,3 – 13,1)	7,0 ± 3,7 (6,0; 3,8 – 13,8) <sup>b</sup>	6,7 ± 3,2 (5,8; 4,1 – 10,3)

Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der Subpopulationen (Naive, Gedächtnis, Effektor, TEMRA und nTreg) am CD4+ Lymphozytengate in der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion vor (Prä) und nach spezifischer Stimulation mit Th9- bzw. Th17-Stimulus in HD (N=6) und Pat (N=3) wieder. Es sind der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben.

<sup>a</sup> Vergleich Prä vs. Th9-Stimulation: a=0,028 (Wilcoxon-Rank Test).

<sup>b</sup> Vergleich Prä vs. Th17-Stimulation: b=0,028, bb= 0,027 (Wilcoxon-Rank Test).

<sup>c</sup> Vergleich Th9- vs. Th17-Stimulation: c=0,004 (Mann-Whitney-U Test).

Vergleich HD vs. Pat: keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U Test).

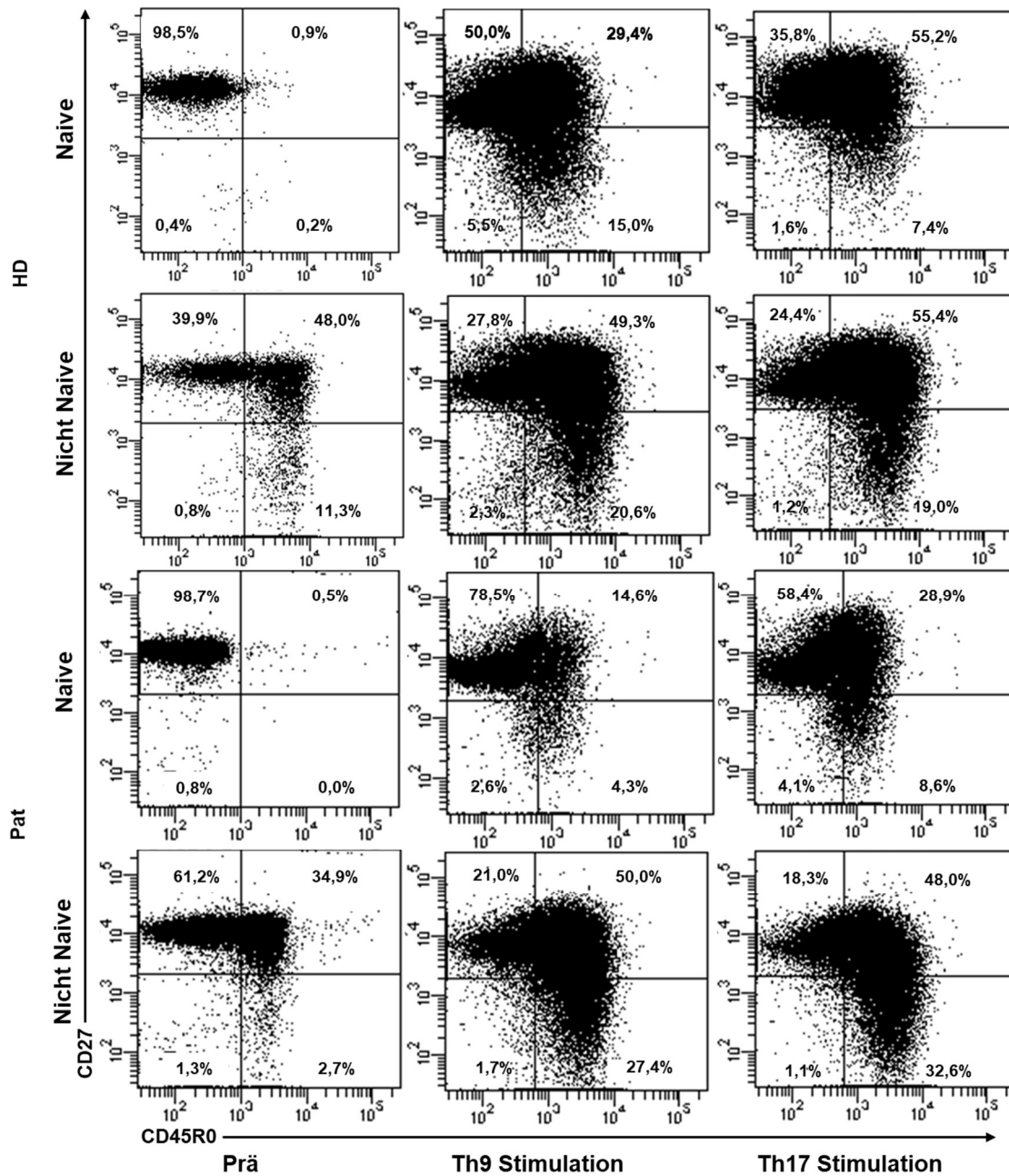


Abbildung 13 Repräsentative Darstellung der Verteilung der Subpopulationen in Prozent des CD4<sup>+</sup> Lymphozytengates anhand der Oberflächenmarker CD27 und CD45R0 vor Stimulation (Prä) und nach Th9- bzw. Th17-Stimulation in einer HD- und einer Pat-Probe.

### **3.3.1.2 Zytokinproduktion und Expression des Chemokinrezeptors CCR6, des IL-9R und des Proliferationsmarkers durch Th9- bzw. Th17-Stimulation (Durchflusszytometrie)**

In einem weiteren Schritt wurde die Zytokinproduktion und die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 und des IL-9R sowie die Proliferationsrate nach Th9- und Th17-Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion durchflusszytometrisch untersucht. Ein Überblick über die Zahlenwerte gibt Tabelle 21, veranschaulicht werden die Daten in Abbildung 14 A-F. Abbildung 15 zeigt eine repräsentative HD- und Pat-Probe in der durchflusszytometrischen Auswertung.

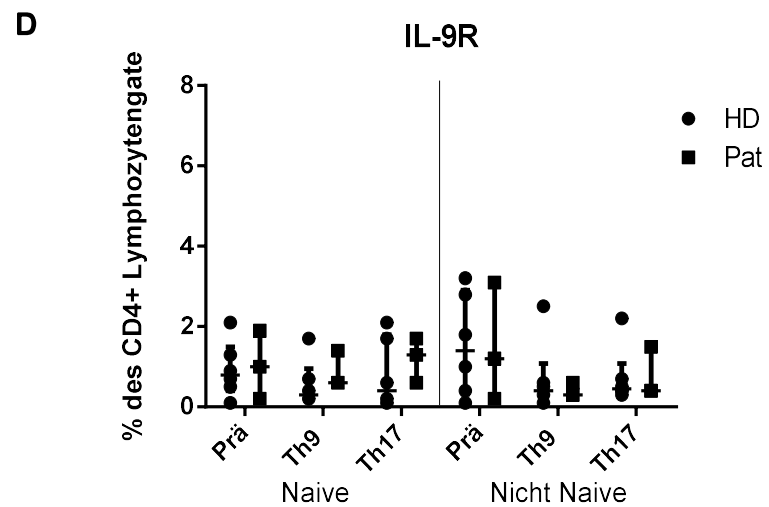
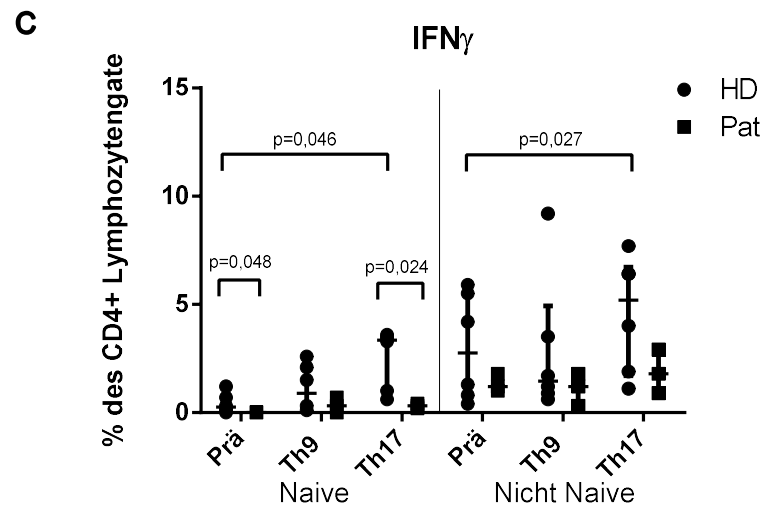
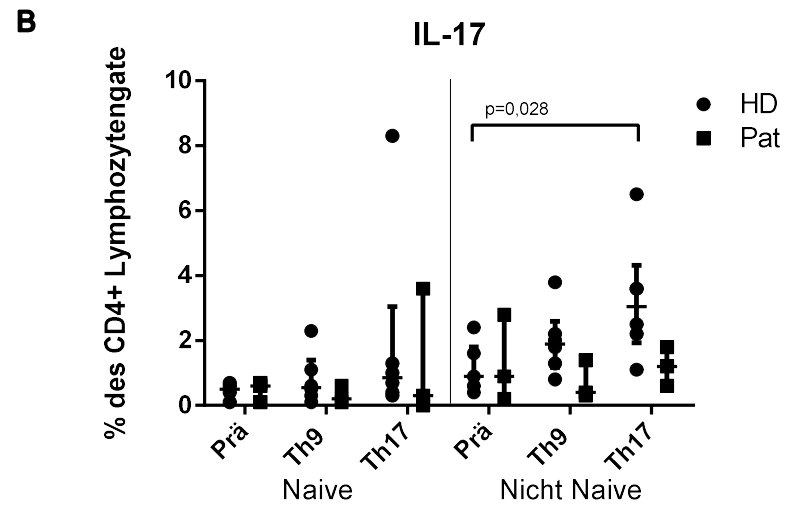
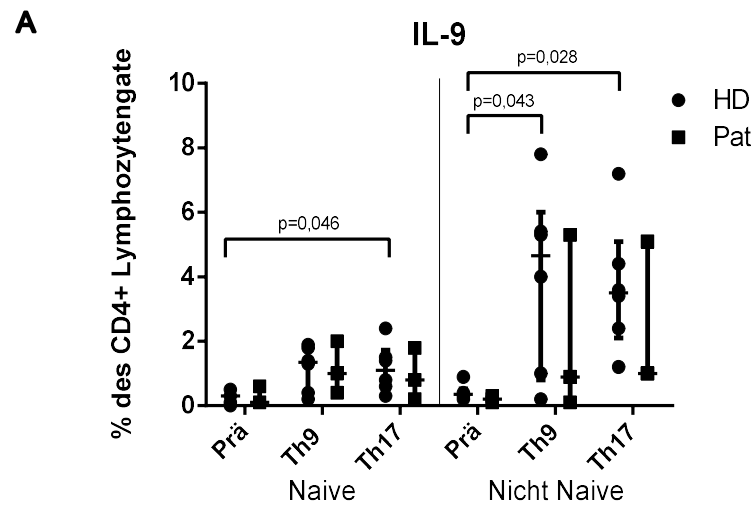
Bei den HD zeigte sich nach 3-tägiger Kultur sowohl unter Th17-induzierenden als auch unter Th9-induzierenden Zytokinen eine Zunahme des Anteils IL-9+ Zellen. In der Nicht Naiven T-Zellfraktion war dies durch beide Stimuli signifikant, in der Naiven T-Zellfraktion nur durch den Th17-Stimulus. Der Anteil der IL-9+ Zellen nach Kultur der Nicht Naiven T-Zellfraktion der Pat war tendenziell geringer als nach Kultur der HD, vgl. Abbildung 14A.

Durch die Th17-Stimulation der HD kam es zu einer signifikanten Zunahme der IL-17+ Zellen in der Nicht Naiven T-Zellfraktion und einer signifikanten Zunahme der IFN $\gamma$ + Zellen in beiden Fraktionen. Beides war bei den Pat geringer ausgeprägt, vgl. Abbildung 14B, C.

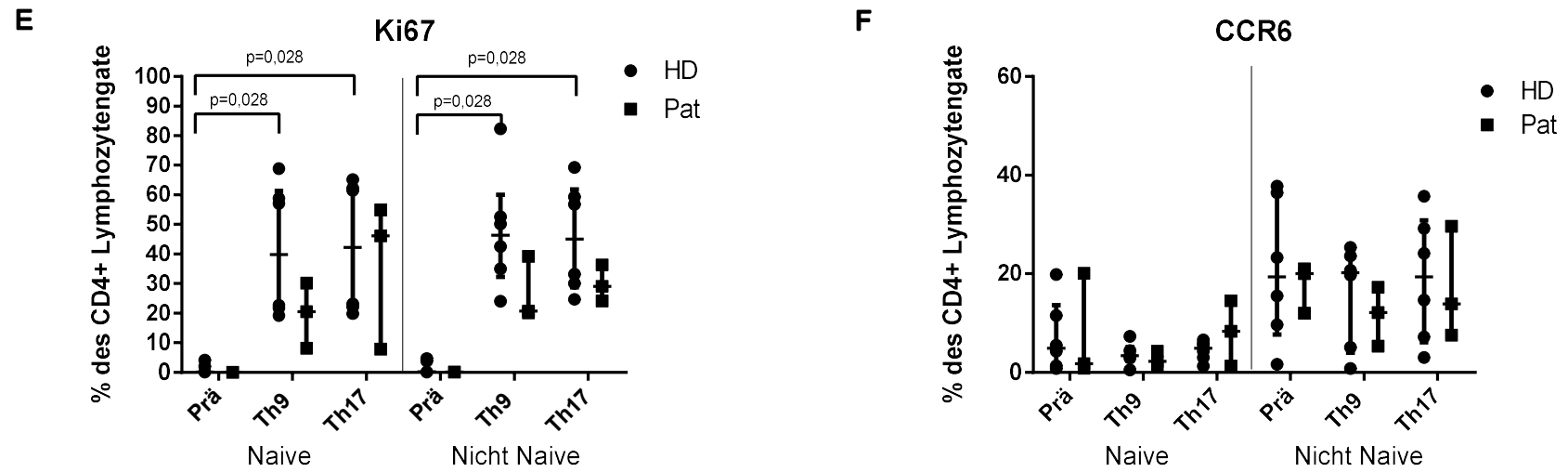
Bei der Untersuchung des IL-9R zeigte sich ein Trend zu einer geringeren Expression nach Th9- und Th17-Stimulation der Nicht Naiven T-Zellfraktion im Vergleich zu den Zellen vor Kultur. Die Expression des IL-9R nach Stimulation der Naiven T-Zellfraktion blieb unverändert, vgl. Abbildung 14D. Unterschiede zwischen HD und Pat ergaben sich nicht.

Beide Stimuli führten bei den HD zu einer gesteigerten Proliferationsrate mit Expression des Ki67 in der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion. Die Proliferationsrate der Pat war zwar nicht signifikant, aber doch deutlich geringer als die der HD, vgl. Abbildung 14E.

Obwohl die Expression des CCR6 in der Nicht Naiven T-Zellfraktion im Vergleich zur Naiven T-Zellfraktion gesteigert war, kam es durch keinen der beiden Stimuli zu einer Induktion der CCR6-Expression, weder in den HD noch in den Pat, vgl. Abbildung 14F.







**Abbildung 14** Intrazelluläre (A) IL-9-, (B) IL-17- und (C) IFN $\gamma$ - Produktion sowie (D) IL-9R-, (E) Ki67- und (F) CCR6-Expression vor Stimulation (Prä) sowie nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion. Dargestellt sind die prozentualen Anteile am CD4+ Lymphozytengate als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Vergleich Prä vs- Th9 bzw. Th17 mittels Wilcoxon-Rank Test und Th9 vs. Th17 mittels Mann-Whitney-U Test. Signifikante p-Werte sind angegeben.

**Tabelle 21 Zytokinproduktion und Expression des Chemokinrezeptors CCR6, des Proliferationsmarkers und des IL-9R nach Th9 bzw. Th17-Stimulation im Vergleich zu den Proben vor Stimulation.**

		Naive		Nicht Naive	
		HD	Pat	HD	Pat
		MW ± SD; (Median; Min – Max)		MW ± SD; (Median; Min – Max)	
<b>Ki67</b>	<b>Prä</b>	1,1 ± 1,7 (0,2; 0,0 - 4,1) <sup>a, b</sup>	0,0 ± 0,1 (0,0; 0,0 - 0,1)	1,5 ± 2,2 (0,20; 0,10 - 4,7) <sup>a, b</sup>	0,1 ± 0,1(0,1; 0,0-0,1)
	<b>Th9</b>	41,4 ± 22,5 (39,9; 19,2 - 68,9) <sup>a</sup>	19,6 ± 11,0 (20,5; 8,2 - 30,2)	47,8 ± 19,9 (46,4; 24,0 - 82,4) <sup>a</sup>	26,7 ± 10,9(20,7; 20,1-39,2)
	<b>Th17</b>	42,4 ± 22,7 (42,3; 19,9 - 65,2) <sup>b</sup>	36,3 ± 25,0 (46,1; 7,9 - 54,9)	45,6 ± 18,5 (45,0; 24,7 -69,3) <sup>b</sup>	29,9 ± 6,2(29,1; 24,1 - 36,4)
<b>CCR6</b>	<b>Prä</b>	7,2 ± 7,3 (4,9; 0,8 - 19,9)	7,6 ± 10,8(1,8; 0,9 - 20,1)	20,7 ± 14,6 (19,4; 1,60 - 37,8)	17,7 ± 4,9(20,2; 12,1 - 20,9)
	<b>Th9</b>	3,7 ± 2,2 (3,4; 0,5 - 7,3)	2,5 ± 1,6(2,2; 1,1 - 4,3)	15,9 ± 10,3 (20,2; 0,8 - 25,4)	11,6 ± 6,0 (12,1; 5,3 - 17,3)
	<b>Th17</b>	4,5 ± 2,0 (5,0; 1,3 - 6,6)	8,0 ± 6,6(8,3; 1,3 - 14,5)	19,0 ± 12,8 (19,4; 3 -35,7)	17,0 ± 11,3 (13,9; 7,6 - 29,6)
<b>IL-9</b>	<b>Prä</b>	0,3 ± 0,2 (0,3; 0,0 - 0,5) <sup>bb</sup>	0,3 ± 0,3 (0,1; 0,1 - 0,6)	0,4 ± 0,2 (0,4; 0,2 - 0,9) <sup>aa, b</sup>	0,2 ± 0,1 (0,2; 0,1 - 0,3)
	<b>Th9</b>	1,2 ± 0,7 (1,4; 0,2 - 1,9)	1,1 ± 0,8 (1,0; 0,4 - 2,0)	4,0 ± 2,9 (4,7; 0,2 - 7,8) <sup>aa</sup>	2,1 ± 2,8 (0,9; 0,1 - 5,3)
	<b>Th17</b>	1,2 ± 0,8 (1,1; 0,3 - 2,4) <sup>bb</sup>	0,9 ± 0,8 (0,8; 0,2 - 1,8)	3,7 ± 2,0 (3,5; 1,2 - 7,2) <sup>b</sup>	2,4 ± 2,4(1,0; 1,0 - 5,1)
<b>IL-17</b>	<b>Prä</b>	0,5 ± 0,2 (0,5; 0,1 - 0,7)	0,5 ± 0,3 (0,6; 0,1 - 0,7)	1,1 ± 0,7 (0,9; 0,4 - 2,4) <sup>b</sup>	1,3 ± 1,3 (0,9; 0,2 - 2,8)
	<b>Th9</b>	0,8 ± 0,8 (0,6; 0,1 - 2,3)	0,3 ± 0,3 (0,2; 0,1 - 0,6)	2,0 ± 1,0 (1,9; 0,8 - 3,8)	0,7 ± 0,6 (0,4; 0,3 - 1,4)
	<b>Th17</b>	2,0 ± 3,1 (0,9; 0,3 - 8,3)	1,3 ± 2,0 (0,3; 0,0 - 3,6)	3,3 ± 1,8 (3,1; 1,1 - 6,5) <sup>b</sup>	1,2 ± 0,6(1,2; 0,6 - 1,8)
<b>IL-9R</b>	<b>Prä</b>	0,9 ± 0,7 (0,8; 0,1 - 2,1)	1,0 ± 0,9 (1,0; 0,2 - 1,9)	1,6 ± 1,3 (1,4; 0,1 - 3,2)	1,5 ± 1,5 (1,2; 0,2 - 3,1)
	<b>Th9</b>	0,6 ± 0,6 (0,3; 0,2 - 1,7)	0,9 ± 0,5 (0,6; 0,6 - 1,4)	0,7 ± 0,9 (0,4; 0,1 - 2,5)	0,4 ± 0,2 (0,3; 0,3 - 0,6)
	<b>Th17</b>	0,8 ± 0,9 (0,4; 0,1 - 2,1)	1,2 ± 0,6 (1,3; 0,6 - 1,7)	0,8 ± 0,7 (0,5; 0,3 - 2,2)	0,8 ± 0,6 (0,4; 0,4 - 1,5)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>Prä</b>	0,4 ± 0,5 (0,3; 0,0 - 1,2)*, <sup>bb</sup>	0,0 ± 0,0*(0,0; 0,0 - 0,0)*	3,0 ± 2,5 (2,8; 0,4 - 5,9) <sup>bbb</sup>	1,3 ± 0,4 (1,2; 1,0 - 1,8)
	<b>Th9</b>	1,2 ± 1,1 (0,9; 0,1 - 2,6)	0,3 ± 0,4 (0,3; 0,0 - 0,7)	2,9 ± 3,3 (1,5; 0,6 - 9,2)	1,1 ± 0,8 (1,2; 0,3 - 1,8)
	<b>Th17</b>	2,6 ± 1,4 (3,4; 0,6 - 3,6)**, <sup>bb</sup>	0,3 ± 0,1(0,3; 0,2 - 0,4)**	4,6 ± 2,7 (5,2; 1,1 - 7,7) <sup>bbb</sup>	1,9 ± 1,0 (1,8; 0,9 - 2,9)

Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der Ki67-, CCR6-, IL-9-, IL-17-, IL-9R- und IFN $\gamma$ -positiven Zellen am CD4+ Lymphozytengate in der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion vor (Prä) und nach spezifischer Stimulation mit Th9- bzw. Th17-Stimulus wieder. Es sind jeweils der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben.

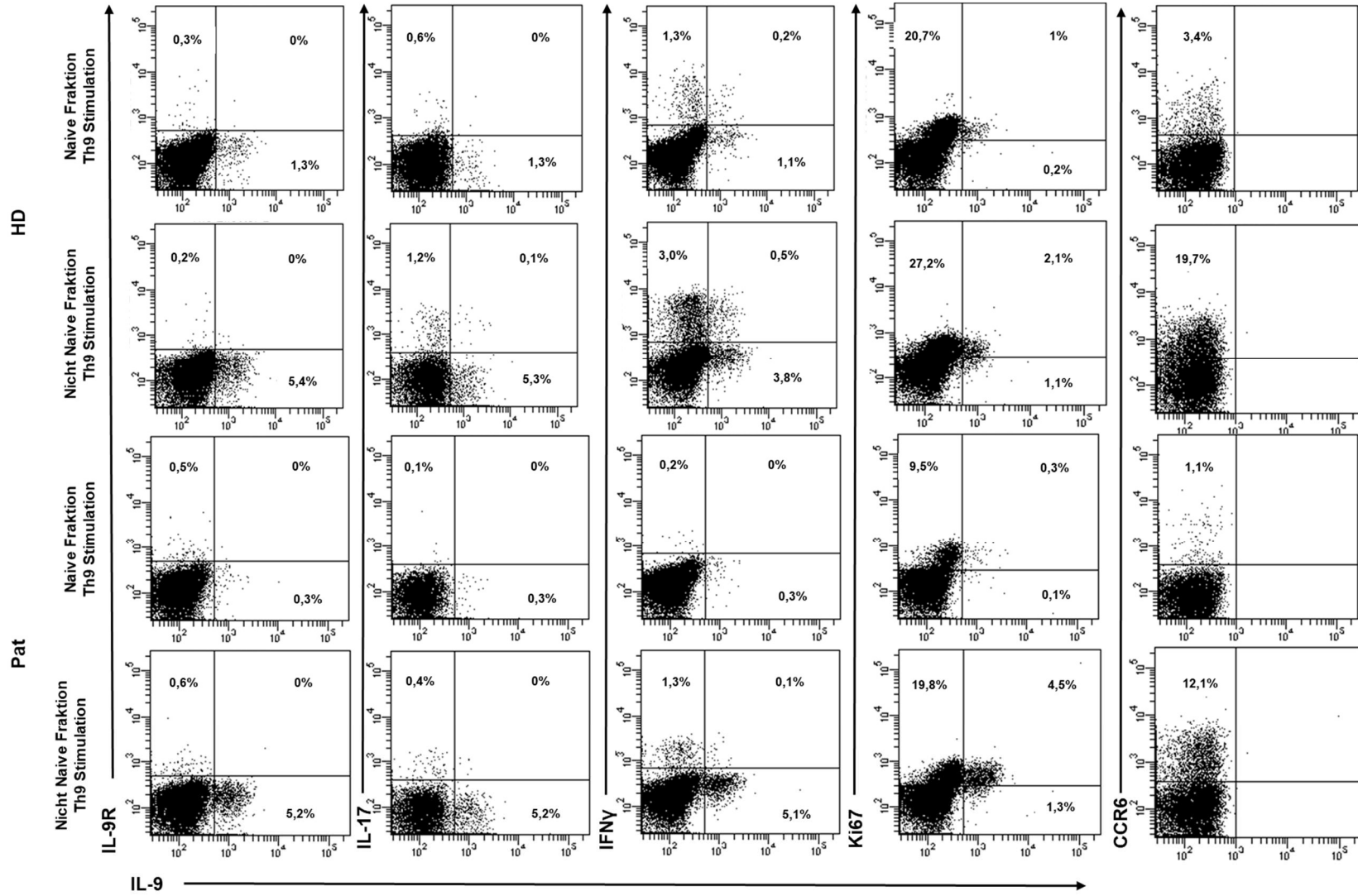
<sup>a</sup> Vergleich Prä vs. Th9-Stimulation: <sup>a</sup>=0,028, <sup>aa</sup>=0,043 (Wilcoxon-Rank Test).

<sup>b</sup> Vergleich Prä vs. Th17-Stimulation: <sup>b</sup>=0,028, <sup>bb</sup>= 0,046, <sup>bbb</sup>=0,027 (Wilcoxon-Rank Test).

Vergleich Th9- vs. Th17-Stimulation: keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U Test).

\*Vergleich HD vs. Pat: \*=0,048, \*\*=0,024 (Mann-Whitney-U Test).

**A**



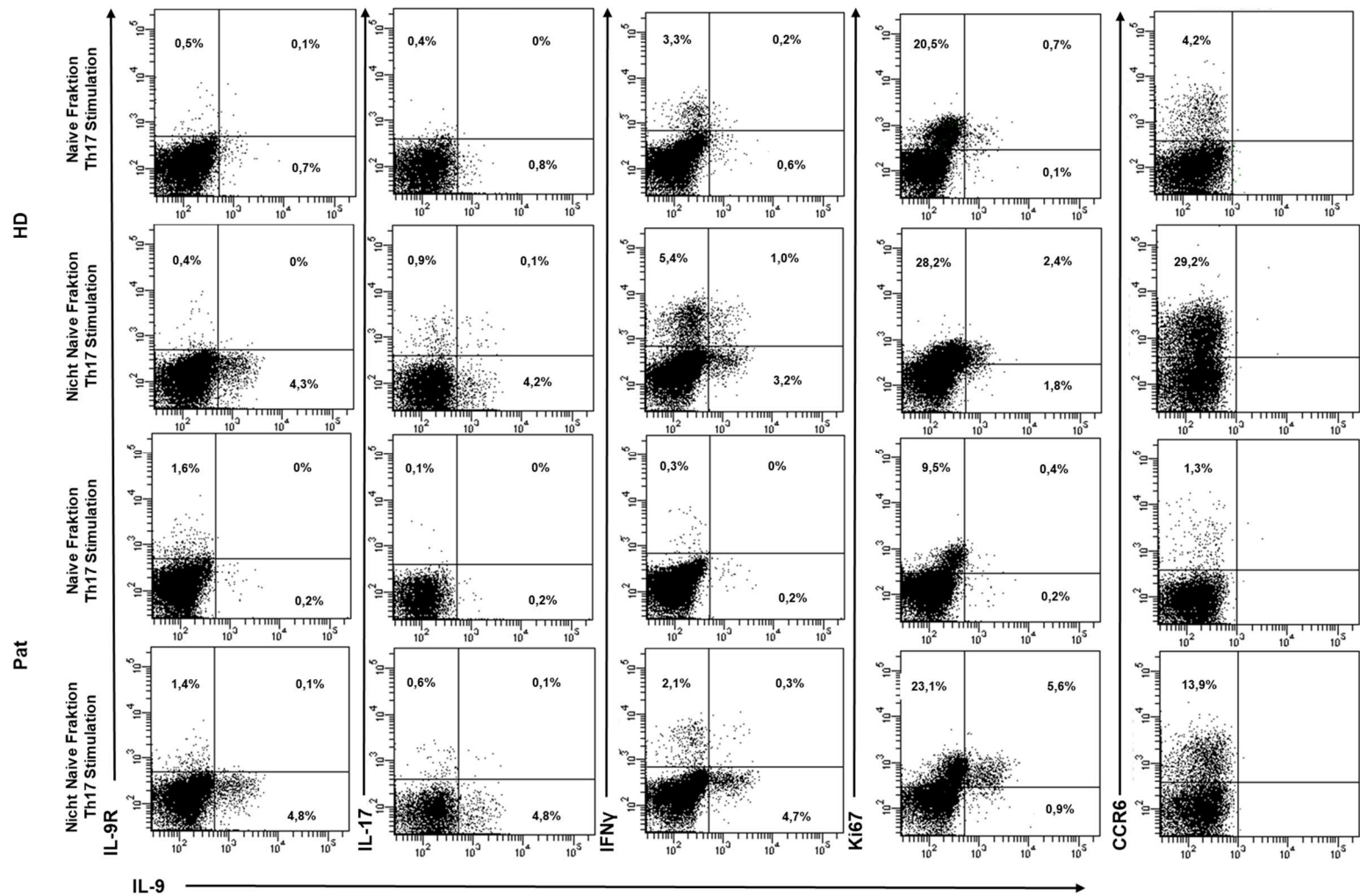
**B**

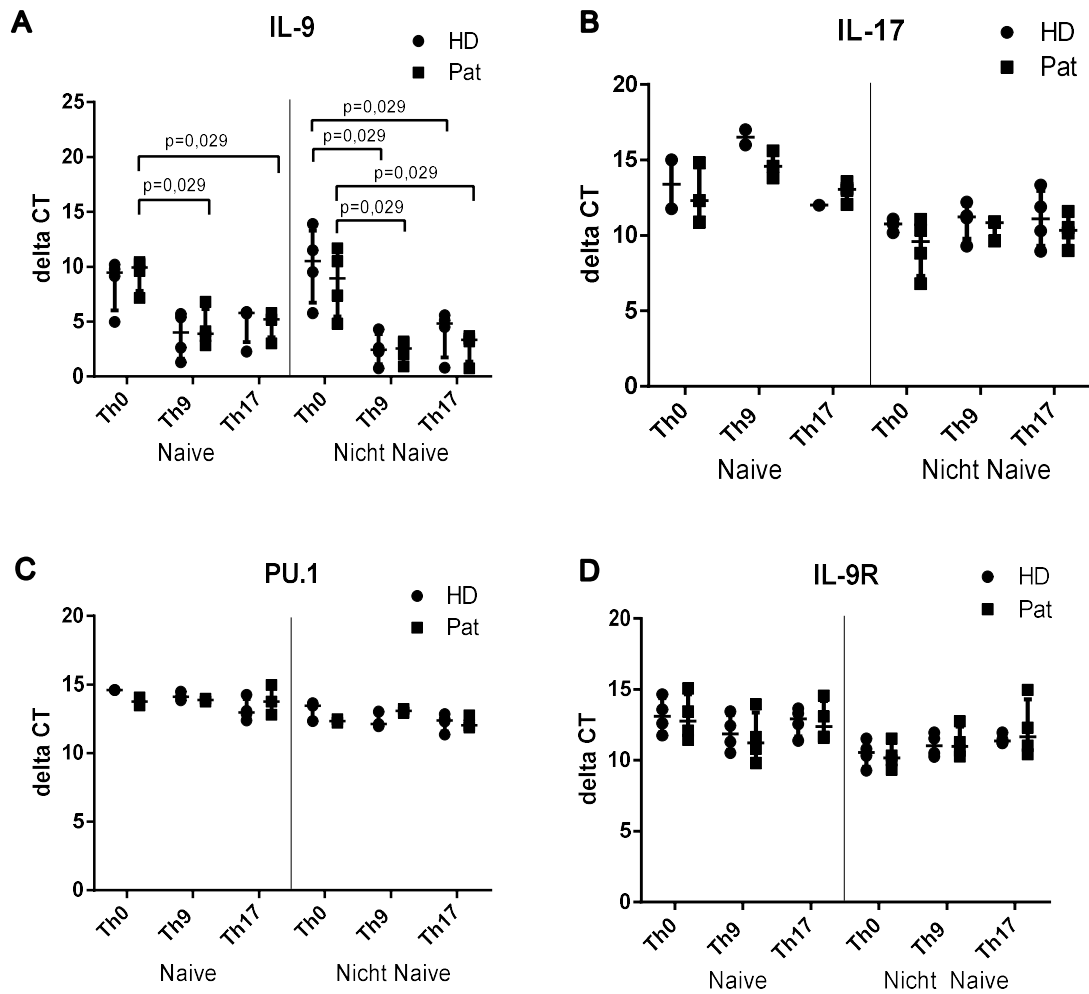
Abbildung 15 Repräsentative Darstellung der Zytokinproduktion, der Ki67-, IL-9R- und der CCR6-Expression in Prozent des CD4+ Lymphozytengates in der Naiven und der Nicht Naiven Fraktion einer HD und einer Pat-Probe nach (A) Th9- bzw. (B) Th17-Stimulation.

### **3.3.1.3 Zytokinproduktion und Expression des IL-9R und des Transkriptionsfaktors PU.1 nach Th9 bzw. Th17-Stimulation (RT-PCR)**

Zur Validierung der durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse erfolgte im Anschluss an die dreitägige Kultur weiterer 4 HD und 4 Pat die Auswertung mittels RT-PCR. Neben der spezifischen Stimulation mit dem Th9- und dem Th17-Stimulus wurde ein Teil der CD4+ Lymphozyten lediglich mit löslichen Antikörpern gegen CD3 und CD28 ohne weitere Zugabe von Zytokinen stimuliert (Th0) und diente als Kontrollgruppe. Gemessen wurden neben den Zytokinen IL-9 und IL-17 und dem IL-9R auch die Expression des Transkriptionsfaktors für Th9-Zellen PU.1. Von allen Proben wurden jeweils Duplikate gemessen. Bei einzelnen Proben konnte, auch nach mehrfacher Wiederholung der Messung, die maximal akzeptierte Differenz der CT-Werte der Duplikate von 0,5 nicht erreicht werden. Diese Proben wurden daraufhin aus der Auswertung genommen. Bei den Messparametern mit fehlenden Werten, PU.1 und IL-17, wurde auf die Berechnung der Signifikanz verzichtet. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Die molekulare Analyse zeigte eine IL-9 Induktion in der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion gleichermaßen durch beide Stimuli im Vergleich zur unspezifischen Stimulation bei den Pat, bei den HD war dies nur signifikant in der Nicht Naiven T-Zellfraktion, vgl. Abbildung 16A.

Die Analyse der PU.1, IL-9R und IL-17 Expression erbrachte vergleichbare Werte zwischen HD und Pat, egal welcher Stimulus verwendet wurde. Insbesondere eine gesteigerte PU.1 mRNA Expression konnte nicht nachgewiesen werden, vgl. Abbildung 16 B,C,D.



**Abbildung 16 IL-9-, IL-17-, PU.1- und IL-9R-Expression nach Th9- und Th17-Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat in der RT-PCR.** Darstellung der  $\Delta cT$ -Werte für (A) IL-9, (B) IL-9R, (C) PU.1 und (D) IL-9R als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Th0 steht für die unspezifische Stimulation. Vergleich Th0- vs. Th9-Stimulus und Th0 vs. Th17-Stimulus mittels Mann-Whitney-U Test, signifikante Werte sind angegeben. Bei den Parametern IL-17 und PU.1 mussten aufgrund einer zu großen Differenz der CT-Werte der Duplikate Messwerte aus der Auswertung genommen werden.

**Tabelle 22 Zytokinproduktion und Expression des PU.1 und IL-9R nach Th9 bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion in der RT-PCR**

		Naive		Nicht Naive	
		HD	Pat	HD	Pat
		MW ± SD; (Median; Min – Max)		MW ± SD; (Median; Min – Max)	
<b>PU.1</b>	<b>Th0</b>	14,6 ± 0,0 (14,6; 14,6-14,6)	13,8 ± 0,4 (13,8; 13,5 – 14,0)	13,1 ± 0,7 (13,5; 12,3-13,6)	12,3 ± 0,2 (12,3; 12,2 – 12,5)
	<b>Th9</b>	14,1 ± 0,3 (14,1; 13,9 - 14,5)	13,9 ± 0,2 (13,9; 13,8 - 14,0)	12,4 ± 0,6 (12,1; 12,0 - 13,0)	13,1 ± 1,1 (13,1; 13,0 - 13,2)
	<b>Th17</b>	13,1 ± 0,8 (13,0; 12,4 - 14,3)	13,8 ± 1,1 (13,7; 12,8 - 15,0)	12,2 ± 0,6 (12,4; 11,4 - 12,8)	12,2 ± 0,5 (12,0; 11,9 - 12,8)
<b>IL-9</b>	<b>Th0</b>	8,5 ± 2,4 (9,5; 5,0 – 10,2)	9,4 ± 1,5 (9,9; 7,2 – 10,4) <sup>a,b</sup>	10,2 ± 3,4 (10,5; 5,8–13,9) <sup>a,b</sup>	8,6 ± 3,1 (9,0; 4,8 – 11,7) <sup>a,b</sup>
	<b>Th9</b>	3,8 ± 2,1 (4,0; 1,3 - 5,7)	4,4 ± 1,7 (3,9; 2,8 - 6,8) <sup>a</sup>	2,5 ± 1,5 (2,4; 0,8 - 4,3) <sup>a</sup>	2,3 ± 1,1 (2,6; 0,9 - 3,2) <sup>a</sup>
	<b>Th17</b>	4,9 ± 1,8 (5,8; 2,3 - 5,9)	4,8 ± 1,2 (5,2; 3,0 - 5,8) <sup>b</sup>	4,0 ± 2,2 (4,8; 0,8 - 5,6) <sup>b</sup>	2,8 ± 1,4 (3,3; 0,8 - 3,7) <sup>b</sup>
<b>IL-17</b>	<b>Th0</b>	13,4 ± 2,3 (13,4; 11,8-15,0)	12,7 ± 2,0 (12,3; 10,9 – 14,8)	10,7 ± 0,5 (10,8; 10,2-11,1)	9,3 ± 1,9 (9,6; 6,8 – 11,0)
	<b>Th9</b>	16,4 ± 1,1 (16,4; 15,6 - 17,2)	14,7 ± 0,9 (14,6; 13,8 - 15,6)	11,0 ± 1,2 (11,2; 9,3 - 12,2)	10,5 ± 0,7 (10,8; 9,7 - 10,9)
	<b>Th17</b>	12,3 ± 0,3 (12,3; 12,1 - 12,5)	12,9 ± 0,6 (13,1; 12,1 - 13,6)	11,1 ± 1,9 (11,1; 9,0 - 13,3)	10,3 ± 1,1 (10,3; 9,0 - 11,6)
<b>IL-9R</b>	<b>Th0</b>	13,2 ± 1,3 (13,1; 11,8-14,7)	13,0 ± 1,6 (12,8; 11,4 – 15,1)	10,5 ± 0,9 (10,6; 9,3–11,5)	10,3 ± 0,9 (10,2; 9,3 – 11,5)
	<b>Th9</b>	11,9 ± 1,3 (11,9; 10,5 - 13,5)	11,6 ± 1,8 (11,2; 9,8 - 14,0)	11,1 ± 0,6 (11,0; 10,3 - 12,0)	11,3 ± 1,1 (11,0; 10,3 - 12,8)
	<b>Th17</b>	12,7 ± 1,0 (12,9; 11,4 - 13,7)	12,7 ± 1,4 (12,4; 11,6 - 14,6)	11,5 ± 0,3 (11,4; 11,2 - 12,0)	12,2 ± 2,0 (11,7; 10,4 - 15,0)

Die Tabelle gibt die  $\Delta$ CT-Werte normalisiert auf die Expression des  $\beta$ 2-Mikroglobulin für IL-9, IL-9R, IL-17 und PU.1 nach unspezifischer Th0- und nach spezifischer Th9- und Th17- Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion in HD (N=4) und Pat (N=4) wieder. Es sind jeweils der Mittelwert (MW)  $\pm$  Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben.

<sup>a</sup> Vergleich Th0- vs. Th9-Stimulation: <sup>a</sup>=0,029 (Mann-Whitney-U-Test).

<sup>b</sup> Vergleich Th0- vs. Th17-Stimulation: <sup>b</sup>=0,029 (Mann-Whitney-U-Test).

Vergleich Th9- vs. Th17-Stimulation: keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U Test).

Vergleich HD vs. Pat: keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U Test).

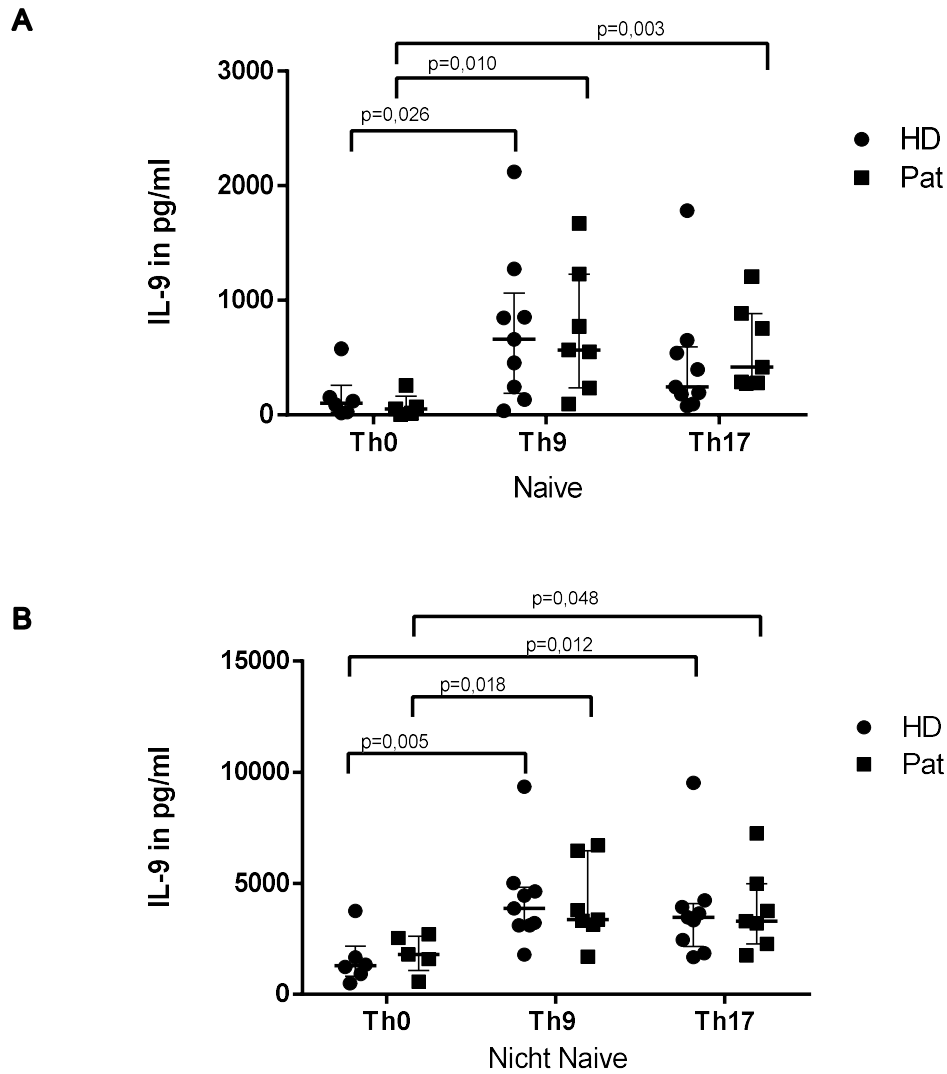
#### **3.3.1.4 IL-9-Konzentration in den Überständen nach Th9- bzw. Th17-Stimulation (ELISA)**

Im Anschluss an die Zellkultur wurden die Überstände geerntet und die IL-9-Konzentration mittels ELISA gemessen. Dies erfolgte bei allen Proben unabhängig davon, ob die Auswertung vorher mittels Durchflusszytometrie oder RT-PCR erfolgt war. Bei einer HD-Probe standen keine Überstände zur Verfügung.

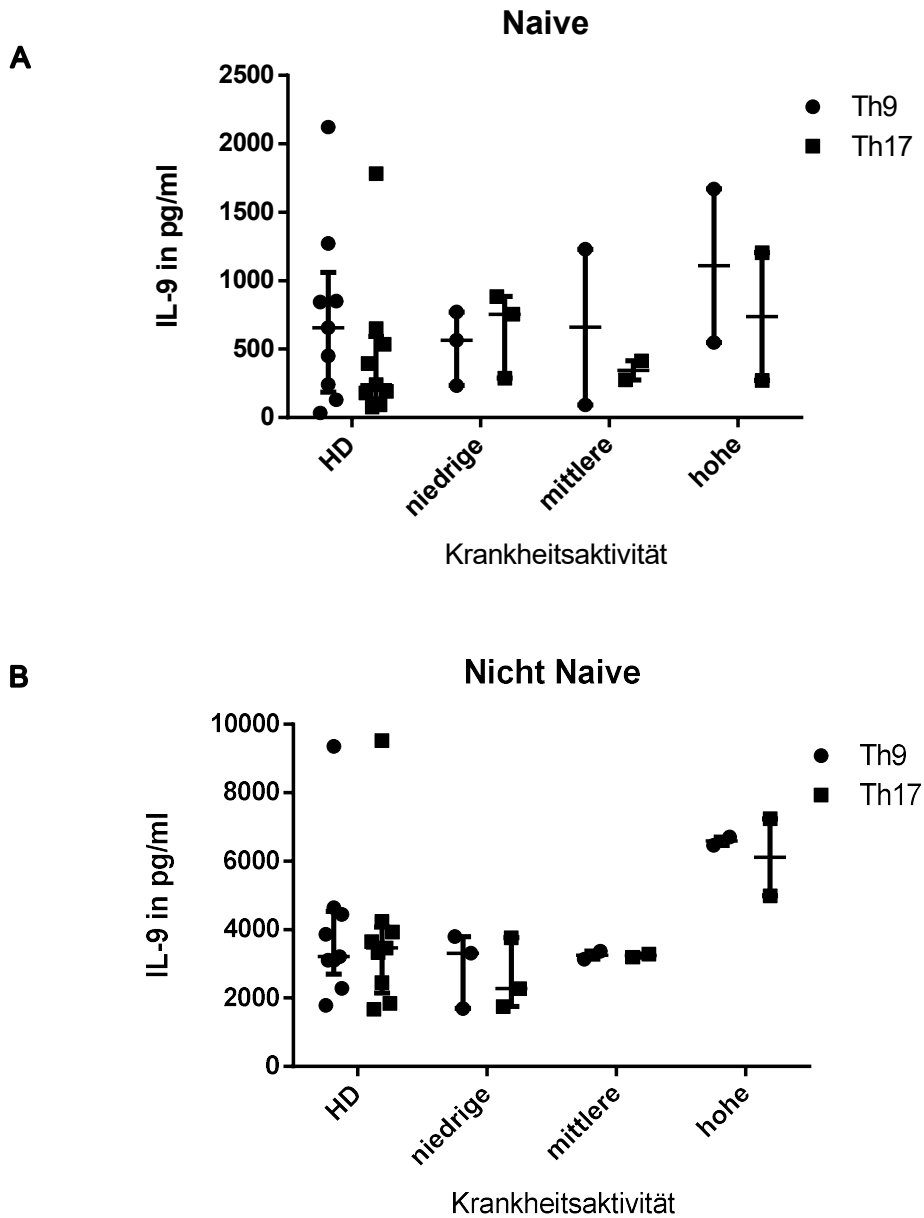
Sowohl die Th9- als auch die Th17-Stimulation führten im Vergleich zu der unspezifischen Th0-Stimulation zu einem Anstieg der IL-9-Konzentration vergleichbar in HD und Pat. Die IL-9-Konzentration war nach Th9-Stimulation tendenziell höher als nach Th17-Stimulation. Im Vergleich zu der Naiven T-Zellfraktion war die IL-9-Konzentration in der Nicht Naiven T-Zellfraktion deutlich gesteigert. Die genauen Zahlenwerte gibt Tabelle 23 wieder, zur Veranschaulichung dienen die Abbildung 17 A und B.

Um den Einfluss der Krankheitsaktivität auf die Induzierbarkeit der IL-9-Produktion durch die Stimulation zu untersuchen, wurden die Pat nach dem DAS28-Score in Gruppen mit niedriger, moderater und hoher Krankheitsaktivität eingeteilt. Es fiel auf, dass die höchsten IL-9-Konzentrationen insbesondere nach Th9-Stimulation bei den beiden Pat mit hoher Krankheitsaktivität gemessen wurden, während die IL-9-Konzentration bei den Pat mit moderater oder niedriger Krankheitsaktivität mit denen der gesunden Kontrollen vergleichbar war. Ein Zusammenhang zwischen der aktuellen Medikation der Pat und der IL-9-Konzentration konnte nicht gefunden werden. Auch unter den HD gab es eine Person mit einer sehr hohen IL-9-Konzentration unklarer Ursache. Die Daten werden in Tabelle 24 und Abbildung 18 A und B wiedergegeben.





**Abbildung 17** IL-9 Konzentration in den Überständen in pg/ml nach Kultur der (A) Naiven- und (B) Nicht Naiven T-Zellfraktion nach unspezifischer Th0- und spezifischer Th9- bzw. Th17- Stimulation von HD und Pat. Darstellung als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Vergleich Th0- vs. Th9-Stimulation und Th0- vs. Th17-Stimulation mittels Mann-Whitney-U Test, signifikante p-Werte sind angegeben.



**Abbildung 18** Unterschiede der IL-9-Konzentration in den Überständen nach Th9- bzw. Th17- Stimulation der (A) Naiven und (B) Nicht Naiven T-Zellfraktion zwischen niedriger, mittlerer und hoher Krankheitsaktivität der Pat anhand des DAS28-Scores und gesunden Kontrollen. Niedrige/ fehlende Krankheitsaktivität = DAS28 0-3,2 (N=3), mittlere Krankheitsaktivität = DAS28 3,2-5,1 (N=2) und hohe Krankheitsaktivität DAS28 >5,1 (N=2).

**Tabelle 23 IL-9-Konzentration in den Überständen nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion im Vergleich zu einer unspezifischen Stimulation**

	Naive				Nicht Naive			
	HD		Pat		HD		Pat	
	MW ± SD; (Median; Min – Max)	p-Wert	MW ± SD; (Median; Min – Max)	p-Wert	MW ± SD; (Median; Min – Max)	p-Wert	MW ± SD; (Median; Min – Max)	p-Wert
<b>Th0</b>	162 ± 210 (102; 16 – 576)		78 ± 103 (52; 0 – 256)		1565 ± 1145 (1283; 491 – 3757)		1838 ± 850 (1806; 572 – 2697)	
<b>Th9</b>	734 ± 654 (658; 34 – 2122)	0,026	730 ± 555 (566; 94 – 1670)	0,010	4280 ± 2143 (3866; 1787 – 9355)	0,005	4069 ± 1839 (3370; 1699 – 6703)	0,018
<b>Th17</b>	461 ± 533 (241; 77 – 1782)	0,088	585 ± 368 (415; 271 – 1206)	0,003	3788 ± 2331 (3464; 1675 – 9523)	0,012	3787 ± 1843 (3291; 1753 – 7241)	0,048

Die Tabelle gibt die IL-9-Konzentration in den Überständen nach Zellkultur in pg/ml nach Th0-, Th9- und Th17-Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat wieder. Es sind jeweils der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. HD in Th0 N=6, HD in Th9 und Th17 N=9, Pat in Th0 N=5, Pat in Th9 und Th17 N=7. Vergleich Th0 vs Th9-Stimulation und Th0 vs. Th17-Stimulation mittels Mann-Whitney-U Test. Die p-Werte sind angegeben, signifikante p-Werte sind grau markiert. Beim Vergleich Th9 vs. Th17 (Mann-Whitney-U Test) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

**Tabelle 24 Unterschiede der IL-9-Konzentration in den Überständen nach Th-9-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion zwischen niedriger, mittlerer und hoher Krankheitsaktivität der Pat**

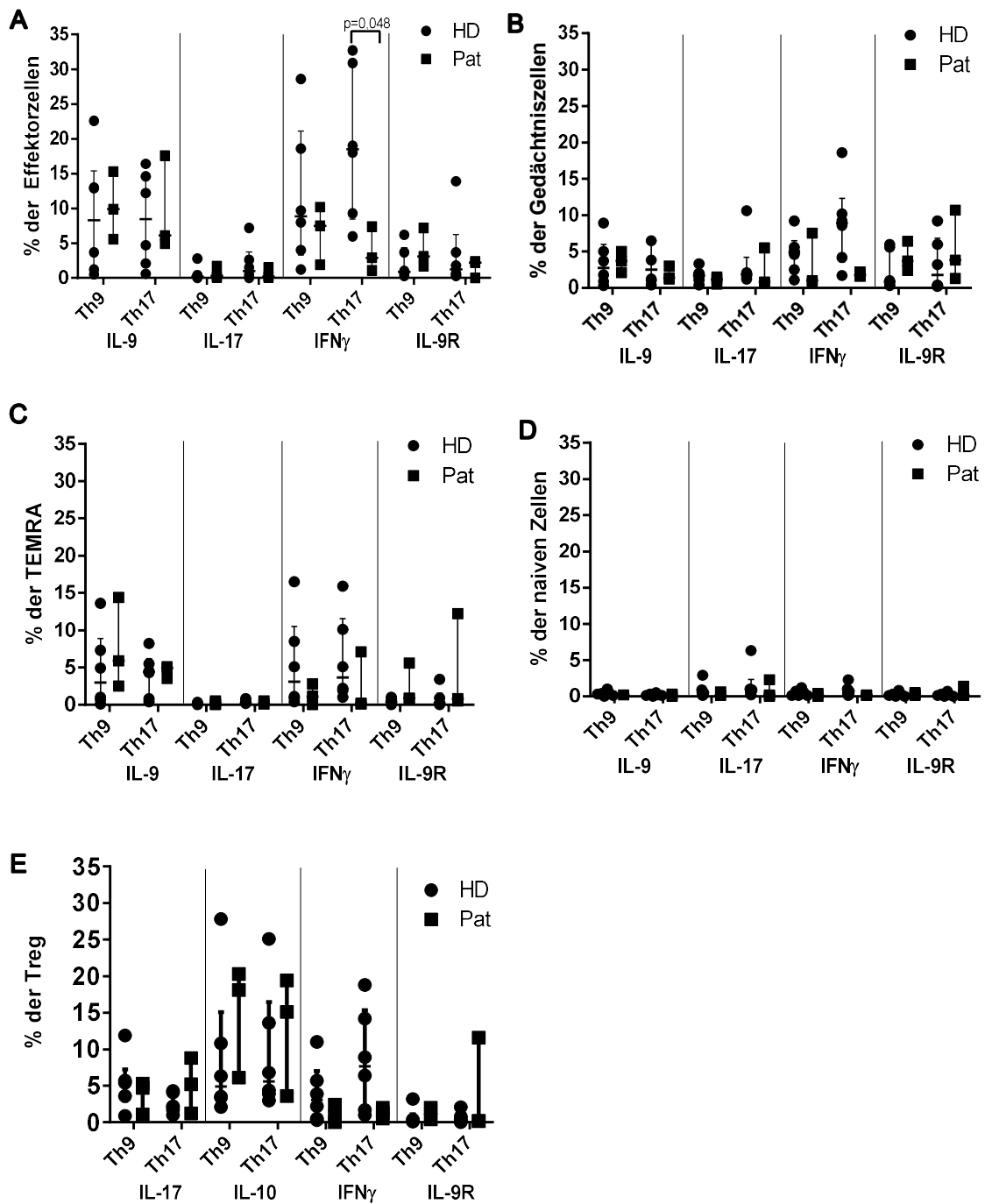
	Naive			Nicht Naive		
	N	MW ± SD; (Median; Min – Max)	p-Wert	N	MW ± SD; (Median; Min – Max)	p-Wert
<b>Th9 - HD</b>	9	734 ± 654 (658; 34 – 2122)		9	4280 ± 2143 (3866; 1787 - 9355)	
<b>Th9 - Niedrige KA</b>	3	524 ± 271 (566; 234 – 772)	0,727	3	2936 ± 1098 (3315; 1699 – 3795)	0,373
<b>Th9 - Mittlere KA</b>	2	661 ± 803 (661; 94 – 1229)	0,909	2	3255 ± 162 (3255; 3140 – 3370)	0,727
<b>Th9 - Hohe KA</b>	2	1109 ± 793 (1109; 548 – 1670)	0,582	2	6583 ± 169 (6583; 6464 – 6703)	0,145
<b>Th17 - HD</b>	9	461 ± 533 (241; 77 – 1782)		9	3788 ± 2331 (3464; 1675 – 9523)	
<b>Th17 - Niedrige KA</b>	3	642 ± 313 (754; 288 – 883)	0,209	3	2596 ± 1040 (2277; 1753 – 3758)	0,482
<b>Th17 - Mittlere KA</b>	2	346 ± 98 (346; 276 – 415)	0,727	2	3244 ± 66 (3244; 3197 – 3291)	0,582
<b>Th17 - Hohe KA</b>	2	738 ± 661 (738; 271 – 1206)	0,436	2	6116 ± 1591 (6116; 4991 – 7241)	0,145

Die Tabelle gibt die IL-9-Konzentration in den Überständen in pg/ml nach Th9-bzw. Th17- Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion wieder und zeigt die Unterschiede zwischen niedriger, mittlerer und hoher Krankheitsaktivität. Es sind jeweils der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. Vergleich HD vs. niedrige, mittlere und hohe Krankheitsaktivität (KA) mittels Mann-Whitney-U Test. Die p-Werte sind angegeben. Beim Vergleich niedrige vs. hohe Krankheitsaktivität (Mann-Whitney-U Test) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Niedrige/ fehlende Krankheitsaktivität = DAS28 0-3,2 (N=3), mittlere Krankheitsaktivität = DAS28 3,2-5,1 (N=2) und hohe Krankheitsaktivität DAS28 >5,1 (N=2).

### **3.3.1.5 Zytokinproduktion und IL-9R-Expression in den einzelnen Subpopulationen nach Th9- bzw. Th17- Stimulation**

In einem weiteren Schritt erfolgte eine Analyse der Subpopulationen auf deren Zytokinproduktion und IL-9R-Expression. Unterschiede zwischen Th9 und Th17-Stimulation waren nicht signifikant, vgl. Tabelle 25, Tabelle 26, Tabelle 27 und Abbildung 19.

- Die Zytokinproduktion in den naiven Zellen (CD45R0- CD27+) blieb nach Th9 und Th17-Stimulation konstant niedrig und es zeigte sich kaum eine Expression des IL-9R auf den naiven Zellen, vgl. Abbildung 19D.
- Die intrazelluläre IL-9-Expression war am höchsten in den Effektorzellen (CD45R0+ CD27-), welche sich durch Th9- und Th17-Stimulation aus der ursprünglich Naiven T-Zellfraktion differenziert hatten. Diese Subpopulation zeigte auch die höchste IFN $\gamma$ -Produktion. Die IFN $\gamma$ - und IL-17-Produktion war nach Th17-Stimulation im Vergleich zur Th9-Stimulation höher, dies war nicht signifikant. Signifikant war eine höhere IFN $\gamma$ -Produktion der HD im Vergleich zu den Pat nach Th17-Stimulation. Der IL-9R wurde nach Th9- und Th17-Stimulation in den Effektorzellen mäßig exprimiert. Weitere signifikante Unterschiede zwischen HD und Pat ergaben sich nicht, vgl. Abbildung 19A.
- Die Zytokinproduktion der Gedächtniszellen (CD45R0+ CD27+) glich derjenigen der Effektorzellen auf niedrigerem Niveau. Es zeigte sich ebenfalls eine IL-9-Produktion durch die Th9- und die Th17-Stimulation und eine höhere Produktion von IFN $\gamma$  und IL-17 durch die Th17-Stimulation im Vergleich zur Th9-Stimulation. Der IL-9R wurde nach Th9- und Th17-Stimulation ebenfalls mäßig exprimiert. Bis auf den wiederholten Trend zur geringeren IFN $\gamma$ -Produktion nach Th17-Stimulation der Pat im Vergleich zu den HD ergaben sich keine Unterschiede zwischen Pat und HD, vgl. Abbildung 19B.
- Die TEMRA produzierten nach Th9- und Th17-Stimulation IL-9 und IFN $\gamma$ , aber kein IL-17. Wiederum zeigte sich der Trend zur geringeren IFN $\gamma$ -Produktion nach Th17-Stimulation der Pat im Vergleich zu den HD, vgl. Abbildung 19C.
- In den regulatorischen T-Zellen wurde nach Th9- und Th17-Stimulation eine IL-10-Produktion aber auch eine Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-17 und IFN $\gamma$  beobachtet. Erneut bestätigte sich der Trend zu einer reduzierten IFN $\gamma$ -Produktion der Pat im Vergleich zu den HD. Signifikante Unterschiede zwischen HD und Pat wurden nicht beobachtet, vgl. Abbildung 19E.



**Abbildung 19** Intrazelluläre Zytokinproduktion und IL-9R-Expression in (A) Effektor-, (B) Gedächtniszellen, (C) TEMRA (D) naiven Zellen und (E) Tregs nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat. Darstellung in Prozent der jeweiligen Subpopulation als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Vergleich Th9-Stimulus vs. Th17-Stimulus mittels Mann-Whitney-U Test, Unterschiede waren nicht signifikant. Signifikante Unterschiede zwischen HD und Pat sind angegeben.

**Tabelle 25 Zytokinproduktion und IL-9R-Expression in Subpopulationen nach Th9 bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion**

			Naive		Nicht Naive	
			HD (N=6)	Pat (N=3)	HD (N=6)	Pat (N=3)
			MW ± SD; (Median; Min – Max)		MW ± SD; (Median; Min – Max)	
IL-9	Naive	Th9	0,4 ± 0,4 (0,4; 0,0 - 1,0)	0,2 ± 0 (0,2; 0,2 - 0,2)	0,5 ± 0,7 (0,3; 0,0 - 1,8)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0 - 0,2)
		Th17	0,2 ± 0,2 (0,2; 0,0 - 0,5)	0,1 ± 0,2 (0,1; 0,0 - 0,3)	0,2 ± 0,3 (0,1; 0,0 - 0,6)	0,1 ± 0,2 (0,0; 0,0 - 0,4)
	Gedächtnis	Th9	3,4 ± 3,2 (2,8; 0,3 - 8,9)	3,6 ± 1,5 (3,7; 2,1 - 5,0)	2,3 ± 1,6 (2,0; 0,2 - 4,9)	1,4 ± 1,7 (0,6; 0,2 - 3,3)
		Th17	3,3 ± 2,8 (2,5; 0,4 - 6,6)	1,9 ± 1,0 (1,4; 1,2 - 3,0)	2,9 ± 1,6 (3,4; 0,9 - 4,5)	1,6 ± 1,6 (1,0; 0,5 - 3,4)
	Effektor	Th9	9,0 ± 8,7 (8,3; 0,5 - 22,6)	10,3 ± 4,9 (9,9; 5,6 - 15,3)	7,9 ± 7,6 (6,3; 0,6 - 20,8)	7,8 ± 12,5 (1,2; 0,1 - 22,2)
		Th17	8,4 ± 6,8 (8,5; 0,6 - 16,4)	9,5 ± 7,0 (6,1; 4,9 - 17,6)	7,8 ± 6,6 (5,4; 3,0 - 20,6)	8,3 ± 11,2 (2,0; 1,7 - 21,3)
	TEMRA	Th9	4,6 ± 5,2 (3,0; 0,1 - 13,6)	7,6 ± 6,1 (5,9; 2,5 - 14,4)	2,6 ± 2,6 (1,9; 0,0 - 6,1)	4,9 ± 7,9 (0,5; 0,2 - 14,1)
		Th17	4,0 ± 2,9 (4,4; 0,4 - 8,2)	4,5 ± 0,9 (4,9; 3,5 - 5,1)	2,6 ± 2,0 (2,1; 0,8 - 5,7)	4,8 ± 7,0 (0,8; 0,6 - 12,9)
IL-17	Naive	Th9	0,9 ± 1,0 (0,5; 0,1 - 2,9)	0,3 ± 0,3 (0,1; 0,1 - 0,6)	0,5 ± 0,4 (0,4; 0,1 - 1,1)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,1 - 0,2)
		Th17	1,5 ± 2,4 (0,7; 0,2 - 6,3)	0,8 ± 1,3 (0,2; 0,0 - 2,3)	0,6 ± 0,9 (0,3; 0,0 - 2,3)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0 - 0,2)
	Gedächtnis	Th9	1,7 ± 1,0 (1,7; 0,4 - 3,3)	1,1 ± 0,5 (1,2; 0,5 - 1,5)	1,4 ± 0,6 (1,2; 0,8 - 2,2)	0,7 ± 0,4 (0,9; 0,2 - 1,0)
		Th17	3,1 ± 3,7 (1,9; 1,1 - 10,6)	2,3 ± 2,7 (0,8; 0,7 - 5,5)	2,3 ± 1,0 (2,4; 0,7 - 3,7)	0,8 ± 0,2 (0,8; 0,7 - 1,0)
	Effektor	Th9	0,6 ± 1,1 (0,2; 0,0 - 2,8)	0,7 ± 0,9 (0,3; 0,1 - 1,7)	3,6 ± 2,5 (3,3; 0,6 - 8,3)	1,6 ± 1,4 (1,1; 0,5 - 3,2)
		Th17	2,0 ± 2,7 (1,0; 0,0 - 7,2)	0,6 ± 0,8 (0,2; 0,1 - 1,5)	6,3 ± 1,3 (5,5; 2,2 - 10,3)	2,6 ± 1,1 (2,5; 1,6 - 3,8)
	TEMRA	Th9	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0 - 0,3)	0,2 ± 0,3 (0,2; 0,0 - 0,5)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0 - 0,2)	0,0 ± 0,0 (0,0; 0,0 - 0,0)
		Th17	0,3 ± 0,2 (0,2; 0,2 - 0,8)	0,2 ± 0,3 (0,1; 0,0 - 0,5)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0 - 0,2)	0,4 ± 0,5 (0,3; 0,0 - 1,0)
IFN $\gamma$	Naive	Th9	0,5 ± 0,5 (0,4; 0,1 - 1,2)	0,2 ± 0,2 (0,1; 0 - 0,4)	0,3 ± 0,3 (0,3; 0,0 - 0,9)	0,2 ± 0,2 (0,1; 0,0 - 0,4)
		Th17	0,8 ± 0,8 (0,6; 0,1 - 2,3)	0,2 ± 0,1 (0,2; 0,1 - 0,2)	0,4 ± 0,2 (0,3; 0,2 - 0,6)	0,2 ± 0,3 (0,1; 0,0 - 0,5)
	Gedächtnis	Th9	4,7 ± 2,8 (4,9; 1,1 - 9,2)	3,1 ± 3,8 (1,0; 0,7 - 7,5)	5,5 ± 3,2 (7,2; 1,0 - 8,1)	2,7 ± 1,4 (3,4; 1,1 - 3,6)
		Th17	8,8 ± 5,8 (8,9; 1,7 - 18,6)	1,9 ± 0,3 (1,8; 1,6 - 2,2)	8,6 ± 2,5 (8,8; 5,3 - 12,6)	3,2 ± 1,8 (2,3; 2,0 - 5,3)
	Effektor	Th9	11,7 ± 10,2 (8,9; 1,2-28,6)	6,5 ± 4,2 (7,5; 1,9 - 10,2)	12,5 ± 9,9 (12,2; 1,5-24,6)	6,1 ± 4,7 (4,0; 2,8 - 11,5)
		Th17	19,3 ± 10,9 (18,5; 6,0-2,7) *	3,8 ± 3,2 (2,9; 1,1 - 7,4) *	16,9 ± 6,7 (17,8; 7,1-27,0)	6,0 ± 2,2 (5,4; 4,2 - 8,5)
	TEMRA	Th9	5,4 ± 6,3 (3,1; 0,4 - 16,5)	1,3 ± 1,4 (1,1; 0,0 - 2,8)	4,4 ± 6,2 (1,7; 0,0 - 16,3)	1,0 ± 1,1 (0,4; 0,3 - 2,3)
		Th17	6,0 ± 5,9 (3,7; 1,0 - 15,9)	2,5 ± 4,0 (0,2; 0,1 - 7,1)	4,2 ± 4,2 (2,7; 0,3 - 10,9)	1,4 ± 2,1 (0,3; 0,1 - 3,8)

Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der IL-9-, IL-17-, IFN $\gamma$ - und IL-9R-positiven Zellen an den Subpopulationen (Naive, Gedächtnis-, Effektor-, und TEMRA-Zellen) nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven- und der Nicht Naiven T-Zellfraktion wieder. Es sind jeweils der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. Vergleich Th9- vs. Th17-Stimulation mittels Mann-Whitney-U Test, die Unterschiede waren nicht signifikant. Vergleich HD vs. Pat mittels Mann-Whitney-U Test \*=0,048.

**Tabelle 26 Fortsetzung von Tabelle 25**

<b>IL-9R</b>	<b>Naive</b>	<b>Th9</b>	0,3 ± 0,3 (0,2; 0,0 - 0,8)	0,3 ± 0,2 (0,3; 0,1 - 0,5)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0 - 0,2)	0,2 ± 0,3 (0,1; 0,0 - 0,5)
		<b>Th17</b>	0,2 ± 0,3 (0,2; 0,0 - 0,7)	0,6 ± 0,7 (0,2; 0,1 - 1,4)	0,2 ± 0,2 (0,1; 0,0 - 0,4)	0,4 ± 0,8 (0,0; 0,0 - 1,3)
	<b>Gedächtnis</b>	<b>Th9</b>	2,3 ± 2,7 (0,9; 0,3 - 6,0)	4,2 ± 2,0 (3,7; 2,4 - 6,4)	1,1 ± 1,0 (0,7; 0,2 - 2,8)	0,6 ± 0,3 (0,4; 0,4 - 0,9)
		<b>Th17</b>	3,2 ± 3,7 (1,8; 0,2 - 9,2)	5,3 ± 4,9 (3,8; 1,3 - 10,7)	0,9 ± 0,5 (0,7; 0,4 - 1,7)	1,0 ± 1,0 (0,5; 0,4 - 2,2)
	<b>Effektor</b>	<b>Th9</b>	2,1 ± 2,3 (0,9; 0,3 - 6,2)	4,0 ± 2,9 (3,1; 1,7 - 7,2)	0,9 ± 0,7 (0,9; 0,1 - 2,0)	0,4 ± 0,2 (0,3; 0,2 - 0,6)
		<b>Th17</b>	3,5 ± 5,3 (1,3; 0,3 - 13,9)	1,5 ± 1,3 (2,2; 0,0 - 2,4)	0,8 ± 0,4 (0,8; 0,4 - 1,3)	0,7 ± 0,1 (0,6; 0,6 - 0,8)
	<b>TEMRA</b>	<b>Th9</b>	0,5 ± 0,4 (0,4; 0,0 - 1,0)	2,4 ± 2,7 (0,9; 0,8 - 5,6)	0,3 ± 0,2 (0,2; 0,1 - 0,7)	0,3 ± 0,2 (0,2; 0,2 - 0,5)
		<b>Th17</b>	0,8 ± 1,3 (0,2; 0,0 - 3,4)	4,5 ± 6,7 (0,8; 0,5 - 12,2)	0,6 ± 0,4 (0,6; 0,0 - 1,1)	0,9 ± 1,3 (0,3; 0,0 - 2,4)

Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der IL-9-, IL-17-, IFN $\gamma$ - und IL-9R-positiven Zellen an den Subpopulationen (Naive, Gedächtnis-, Effektor-, und TEMRA-Zellen) nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven- und der Nicht Naiven T-Zellfraktion wieder. Es sind jeweils der Mittelwert (MW)  $\pm$  Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. Vergleich Th9- vs. Th17-Stimulation mittels Mann-Whitney-U Test, die Unterschiede waren nicht signifikant. Vergleich HD vs. Pat mittels Mann-Whitney-U Test  $\ast=0,048$ .

**Tabelle 27 Zytokinproduktion und IL-9R-Expression in regulatorischen T-Zellen nach Th9 oder Th17- Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat**

		Naive		Nicht Naive	
		HD (N=6)	Pat (N=3)	HD (N=6)	Pat (N=3)
		MW $\pm$ SD; (Median; Min - Max)		MW $\pm$ SD; (Median; Min - Max)	
<b>IL-17</b>	<b>Th9</b>	5,5 $\pm$ 3,6 (5,4; 0,9 - 11,9)	3,7 $\pm$ 2,3 (4,7; 1,1 - 5,3)	6,7 $\pm$ 3,3 (5,7; 3,6 - 12,2)	4,6 $\pm$ 0,4 (4,6; 4,2 - 4,9)
	<b>Th17</b>	2,6 $\pm$ 1,3 (2,2; 1,0 - 4,3)	5,1 $\pm$ 5,2 (3,8; 1,2 - 8,8)	8,0 $\pm$ 2,9 (8,4; 4,1 - 10,7)	5,8 $\pm$ 2,8 (6,5; 2,8 - 8,2)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>Th9</b>	3,9 $\pm$ 4,0 (3,1; 0,3 - 11,0)	1,1 $\pm$ 1,2 (0,8; 0,0 - 2,4)	6,7 $\pm$ 7,0 (4,2; 1,9 - 20,5)	3,3 $\pm$ 1,9 (3,4; 1,4 - 5,1)
	<b>Th17</b>	8,5 $\pm$ 7,0 (7,7; 1,0 - 18,8)	1,3 $\pm$ 1,3 (0,8; 0,5 - 2,0)	12,6 $\pm$ 7,7 (12,5; 2,5 - 24,2)	6,0 $\pm$ 4,4 (4,7; 2,3 - 10,9)
<b>IL-9R</b>	<b>Th9</b>	0,7 $\pm$ 1,2 (0,3; 0,1 - 3,2)	0,9 $\pm$ 0,9 (0,4; 0,4 - 2,0)	0,3 $\pm$ 0,2 (0,3; 0,1 - 0,7)	3,3 $\pm$ 4,6 (1,1; 0,1 - 8,6)
	<b>Th17</b>	0,6 $\pm$ 0,8 (0,4; 0,0 - 2,1)	4,0 $\pm$ 0,2 (6,6; 0,2 - 11,6)	0,4 $\pm$ 0,4 (0,4; 0,0 - 0,9)	4,7 $\pm$ 6,7 (0,8; 0,8 - 12,4)
<b>IL-10</b>	<b>Th9</b>	9,0 $\pm$ 9,7 (4,9; 2,1 - 27,8)	14,8 $\pm$ 7,6 (18,1; 6,1 - 20,3)	8,0 $\pm$ 4,1 (8,0; 3,4 - 13,8)	7,1 $\pm$ 4,5 (6,2; 3,2 - 12,0)
	<b>Th17</b>	9,5 $\pm$ 8,6 (5,6; 3,0 - 25,1)	12,7 $\pm$ 15,1 (8,2; 3,6 - 19,4)	9,4 $\pm$ 6,3 (7,9; 2,5 - 17,5)	7,9 $\pm$ 4,0 (8,5; 3,7 - 11,6)

Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der IL-17-, IFN $\gamma$ -, IL-9R und IL-10-positiven Zellen an den regulatorischen T-Zellen nach Th9- bzw. Th17 Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat wieder. Es sind jeweils der Mittelwert (MW)  $\pm$  Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. Vergleich Th9 vs. Th17 mittels Mann-Whitney-U Test, die Unterschiede waren nicht signifikant. Vergleich HD vs. Pat mittels Mann-Whitney-U-Test, die Unterschiede waren nicht signifikant.

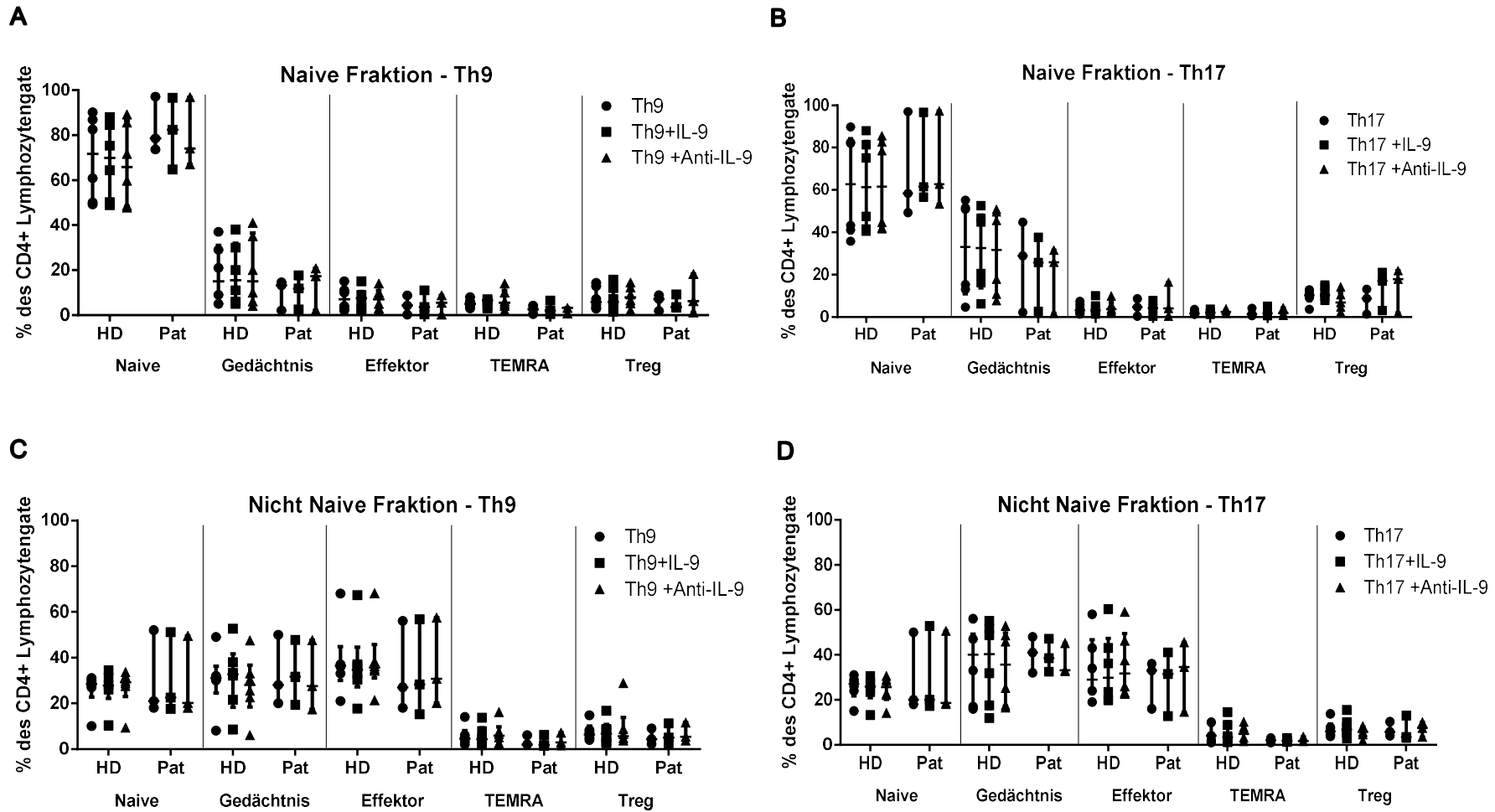
### **3.3.2 Einfluss von IL-9**

In Kapitel 1.2.5 wurde die Wirkung von IL-9 auf die T-Zelldifferenzierung erläutert. Um einen möglichen autokrinen Feedbackmechanismus des IL-9 zu verstehen wurde dies experimentell durch die Zugabe von rekombinantem IL-9 zu den Zellkulturen mit Th17 bzw. Th9-Stimulation und durch eine spezifische Blockade von IL-9 mit einem IL-9-Antikörper untersucht.

#### **3.3.2.1 Einfluss von IL-9 auf die T-Zelldifferenzierung**

Rekombinantes IL-9 und die spezifische IL-9-Blockade hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen, weder nach Stimulation der Naiven noch der Nicht Naiven T-Zellfraktion der HD und der Pat-Proben. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 28 wiedergegeben, in Abbildung 20 werden die Daten für die Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion unter IL-9- Exzess und IL-9-Blockade von HD und Pat veranschaulicht.





**Abbildung 20 Einfluss von rekombinantem IL-9 und einer IL-9-Blockade zusätzlich zu der (A,C) Th9- und (B,D) Th17-Stimulation auf die T-Zelldifferenzierung nach Stimulation der (A,B) Naiven und (C,D) Nicht Naiven T-Zellfraktion in HD und Pat. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Subpopulationen am CD4+ Lymphozytengate als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Unterschiede waren nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).**

**Tabelle 28 Einfluss von IL-9 auf die Polarisierung der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion durch Th9- und Th17-Stimulation**

		Naive		Nicht Naive	
		HD (N=6)	Pat (N=3)	HD (N=6)	Pat (N=3)
		MW ± SD; (Median; Min – Max)	MW ± SD; (Median; Min – Max)	MW ± SD; (Median; Min – Max)	MW ± SD; (Median; Min – Max)
<b>Naive</b>	Th9	70,0 ± 18,7 (71,7; 49,2 - 90,1)	83,1 ± 12,4 (78,5; 73,6- 97,1)	25,6 ± 7,8 (28,2; 10,1 - 30,8)	30,1 ± 18,8 (21,0; 17,6 - 51,8)
	+IL-9	68,6 ± 16,8 (69,9; 48,9 - 88,0)	81,3 ± 15,9 (82,4; 64,8- 96,6)	26,3 ± 8,4 (27,8; 10,4 - 34,5)	30,4 ± 18,2 (22,5; 17,5 - 51,2)
	+Anti-IL-9	67,1 ± 18,0 (65,8; 47,8 - 89,2)	79,3 ± 15,6 (74,0; 67,0- 96,9)	26,8 ± 8,8 (29,2; 9,4 - 33,7)	29,2 ± 17,6 (20,1; 18,0 - 49,5)
<b>Gedächtnis</b>	Th9	17,6 ± 13,5 (15,0; 4,5 - 36,5)	10,0 ± 6,9 (13,3; 2,1 - 14,6)	30,1 ± 13,2 (30,7; 7,8 - 49,2)	32,7 ± 15,5 (27,9; 20,1 - 50,0)
	+IL-9	18,4 ± 13,4 (15,6; 5,4 - 37,9)	10,7 ± 7,6 (11,9; 2,6 - 17,7)	31,0 ± 15,0 (32,8; 8,5 - 52,7)	32,9 ± 14,2 (31,6; 19,4 - 47,8)
	+Anti-IL-9	19,1 ± 15,5 (15,0; 3,6 - 40,5)	13,4 ± 9,9 (17,3; 2,2 - 20,8)	27,6 ± 13,6 (28,0; 6,1 - 47,5)	30,8 ± 15,4 (27,5; 17,4 - 47,6)
<b>Effektor</b>	Th9	7,3 ± 5,3 (6,6; 2,0 - 15,0)	4,5 ± 4,3 (4,3; 0,3 - 8,8)	38,7 ± 15,8 (36,2; 20,6- 68,2)	33,9 ± 20,1 (27,4; 17,9 - 56,4)
	+IL-9	7,3 ± 4,6 (7,5; 2,4 - 14,7)	5,0 ± 5,4 (3,6; 0,4 - 11,0)	37,0 ± 16,5 (34,6; 17,7 - 67,4)	33,5 ± 21,2 (28,3; 15,3 - 56,8)
	+Anti-IL-9	7,1 ± 4,7 (6,8; 1,9 - 14,0)	4,8 ± 4,3 (5,5; 0,2 - 8,8)	38,9 ± 15,6 (35,7; 21,4 - 68,2)	36,1 ± 19,3 (30,8; 20,1 - 57,5)
<b>TEMRA</b>	Th9	5,1 ± 1,8 (5,1; 3,3 - 8,3)	2,5 ± 1,9 (2,6; 0,5 - 4,3)	5,6 ± 4,3 (4,2; 2,3 - 13,9)	3,4 ± 2,3 (2,4; 1,7 - 6,0)
	+IL-9	5,8 ± 1,9 (6,7; 2,9 - 7,4)	3,0 ± 3,1 (2,1; 0,5 - 6,5)	5,7 ± 4,5 (4,3; 1,8 - 13,7)	3,1 ± 2,7 (1,8; 1,4 - 6,2)
	+Anti-IL-9	6,7 ± 4,3 (5,6; 2,1 - 13,9)	2,4 ± 1,5 (3,2; 0,7 - 3,4)	6,7 ± 5,1 (5,9; 2,4 - 16,2)	3,9 ± 2,8 (2,9; 1,6 - 7,1)
<b>Treg</b>	Th9	7,6 ± 5,0 (5,9; 2,9 - 14,4)	6,0 ± 3,7 (7,2; 1,9 - 8,9)	7,5 ± 3,9 (6,3; 4,0 - 14,8)	5,2 ± 3,5 (4,4; 2,2 - 9,0)
	+IL-9	7,4 ± 5,5 (5,9; 1,5 - 15,8)	5,4 ± 3,3 (3,6; 3,4 - 9,2)	7,5 ± 5,2 (6,7; 2,5 - 16,8)	6,2 ± 4,6 (5,0; 2,3 - 11,2)
	+Anti-IL-9	8,3 ± 4,6 (7,9; 2,1 - 14,5)	8,6 ± 8,8 (6,2; 1,2 - 18,3)	9,4 ± 9,7 (5,7; 3,8 - 28,9)	6,9 ± 4,2 (5,4; 3,7 - 11,6)
<b>Naive</b>	Th17	62,4 ± 24,8 (62,7; 35,8 - 89,8)	68,2 ± 25,3 (58,4; 49,3- 97,0)	25,4 ± 5,5 (26,7; 15,1 - 30,8)	30,1 ± 18,8 (21,0; 17,6 - 51,8)
	+IL-9	62,3 ± 21,5 (61,3; 40,5 - 88,0)	71,6 ± 21,9 (61,5; 56,6- 96,7)	24,5 ± 6,0 (25,9; 13,3 - 30,6)	30,1 ± 19,8 (20,0; 17,3 - 52,9)
	+Anti-IL-9	62,5 ± 21,7 (61,6; 41,7 - 85,6)	71,2 ± 23,2 (62,7; 53,4- 97,4)	24,6 ± 6,1 (25,6; 14,2 - 30,6)	29,1 ± 18,6 (18,6; 18,1 - 50,6)
<b>Gedächtnis</b>	Th17	31,8 ± 23,1 (33,1; 4,6 - 55,2)	25,3 ± 21,6 (28,9; 2,1 - 44,8)	35,9 ± 16,7 (40,1; 16,3- 55,5)	40,2 ± 8,2 (41,0; 31,7 - 48,0)
	+IL-9	31,2 ± 19,2 (32,7; 6,2 - 52,6)	22,0 ± 17,8 (25,7; 2,6 - 37,6)	36,1 ± 18,5 (40,3; 11,9 - 55,1)	39,4 ± 7,4 (38,5; 32,5 - 47,2)
	+Anti-IL-9	30,4 ± 20,4 (31,7; 7,7 - 50,8)	19,7 ± 15,8 (25,9; 1,7 - 31,5)	34,5 ± 16,5 (35,6; 16,5 - 52,9)	37,1 ± 7,0 (33,2; 32,8 - 45,2)
<b>Effektor</b>	Th17	3,8 ± 2,4 (3,2; 1,4 - 7,4)	4,5 ± 4,1 (4,6; 0,4 - 8,6)	33,6 ± 14,7 (28,9; 19,0- 58,2)	28,3 ± 10,5 (32,6; 16,4 - 36,0)
	+IL-9	4,2 ± 3,2 (3,2; 1,3 - 10,0)	4,0 ± 3,7 (4,1; 0,3 - 7,7)	33,8 ± 16,0 (29,9; 19,8 - 60,4)	28,5 ± 14,4 (31,5; 12,8 - 41,1)
	+Anti-IL-9	4,6 ± 2,9 (3,7; 1,9 - 9,9)	6,9 ± 8,4 (4,0; 0,3 - 16,4)	35,8 ± 14,7 (31,8; 22,7 - 59,1)	31,6 ± 15,7 (34,6; 14,6 - 45,5)
<b>TEMRA</b>	Th17	2,0 ± 0,9 (1,6; 1,2 - 3,5)	2,0 ± 1,8 (1,4; 0,6 - 4,1)	5,2 ± 4,1 (3,9; 1,2 - 10,3)	1,9 ± 0,9 (1,7; 1,1 - 2,9)
	+IL-9	2,3 ± 1,0 (2,0; 1,2 - 3,7)	2,5 ± 2,4 (1,8; 0,5 - 5,1)	5,5 ± 5,2 (3,5; 1,2 - 14,5)	2,0 ± 0,9 (1,8; 1,3 - 3,0)
	+Anti-IL-9	2,5 ± 1,0 (2,4; 1,5 - 3,8)	2,2 ± 1,9 (1,7; 0,7 - 4,3)	5,2 ± 3,6 (4,9; 1,6 - 10,2)	2,3 ± 1,2 (1,7; 1,5 - 3,6)
<b>Treg</b>	Th17	9,7 ± 3,3 (10,3; 3,6 - 12,9)	7,7 ± 6,0 (8,7; 1,3 - 13,1)	7,0 ± 3,7 (6,0; 3,8 - 13,8)	6,7 ± 3,2 (5,8; 4,1 - 10,3)
	+IL-9	10,9 ± 3,1 (10,4; 7,9 - 15,0)	13,7 ± 9,5 (17,1; 3,0 - 21,0)	7,9 ± 4,4 (6,8; 2,9 - 15,5)	6,5 ± 5,6 (3,5; 3,1 - 13,0)
	+Anti-IL-9	7,5 ± 4,3 (6,8; 2,3 - 14,2)	13,9 ± 10,6 (17,9; 1,9 - 21,9)	5,7 ± 2,6 (5,8; 1,8 - 8,3)	7,0 ± 3,3 (7,5; 3,5 - 10,0)

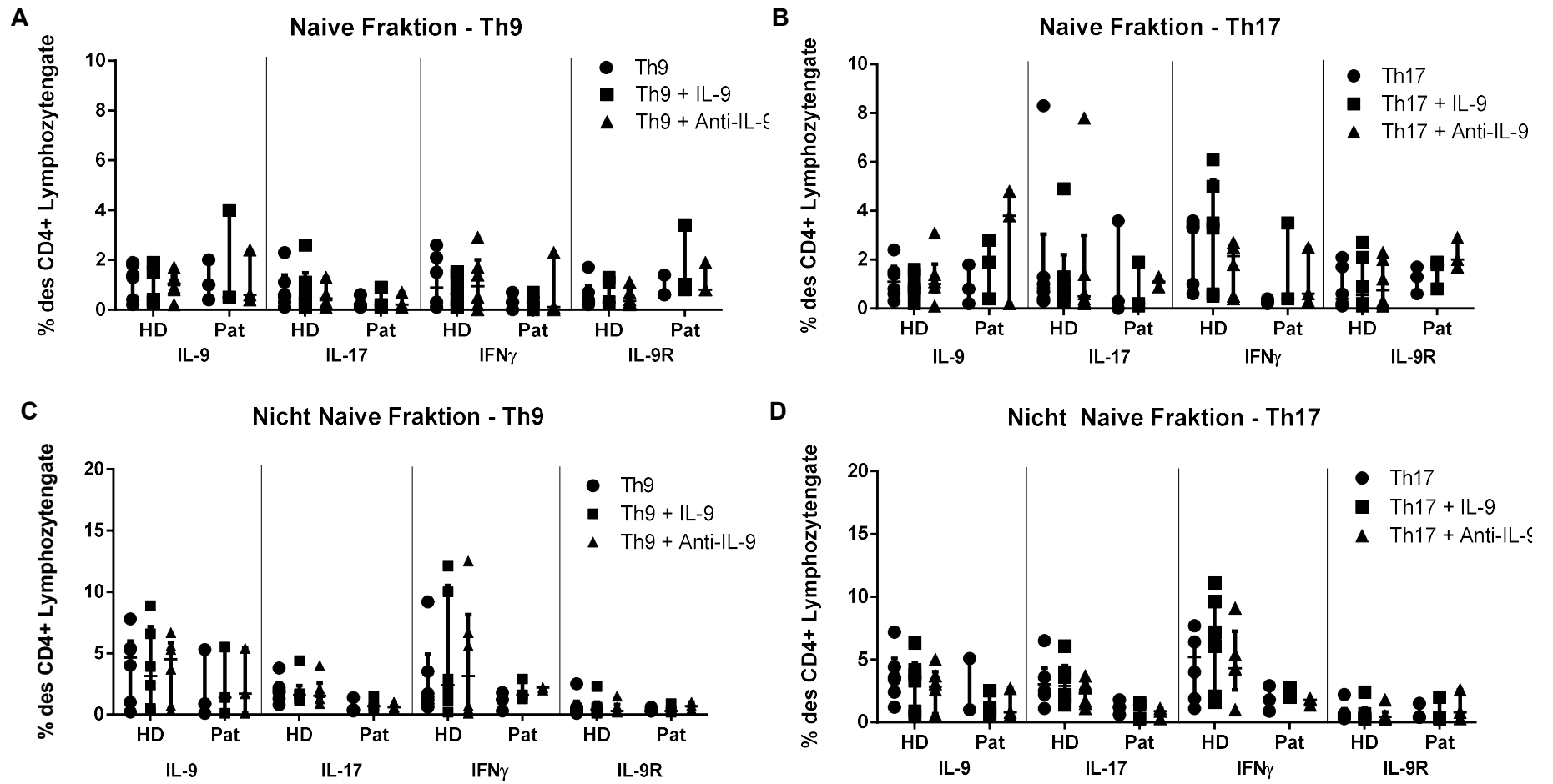
Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der Subpopulationen (Naive, Gedächtnis, Effektor, TEMRA und Treg) am CD4+ Lymphozytengate nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion ohne und mit Zugabe von IL-9 (+IL-9) oder Anti-IL-9 (+Anti-IL-9) in HD und Pat wieder. Es sind der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. Vergleich des Th9- bzw. Th17-Stimulus vs. zusätzlicher Gabe von IL-9 bzw. zusätzlicher Gabe von Anti-IL-9 mittels Mann-Whitney-U-Test. Unterschiede waren nicht signifikant. Vergleich HD vs. Pat mittels Mann-Whitney-U-Test, Unterschiede waren nicht signifikant.

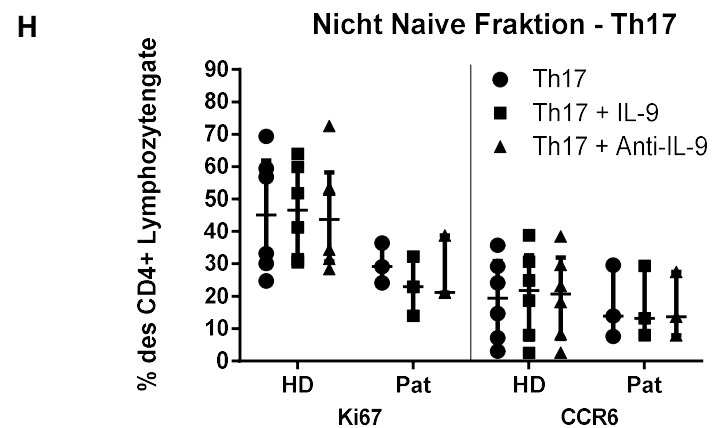
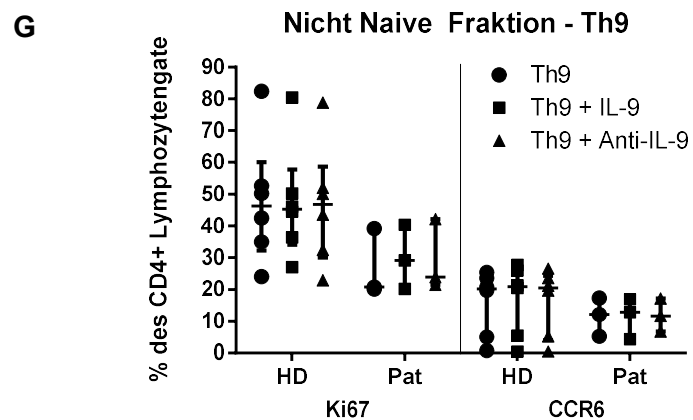
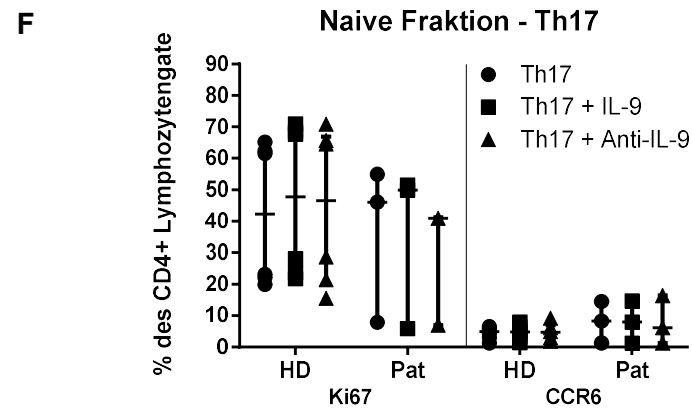
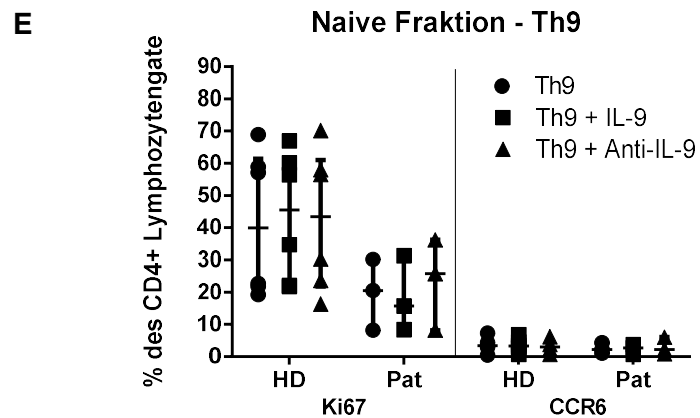
### **3.3.2.2 Einfluss von IL-9 auf die Zytokinproduktion, die Proliferation und die Expression von CCR6 und PU.1**

Insgesamt konnten durch Zugabe von rekombinantem IL-9 und die spezifische Blockade von IL-9 während der Th9- oder Th17-Stimulation keine signifikanten Effekte auf die Zytokinproduktion, die IL-9R-Expression und die Proliferation nachgewiesen werden. Insbesondere wurde durch den IL-9-Exzess keine vermehrte Zytokinproduktion induziert. Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl durchflusszytometrisch (vgl. Tabelle 29 und Abbildung 21) als auch in der PCR (vgl. Tabelle 31 und Abbildung 22). Auch auf die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 hatte der IL-9-Exzess und die IL-9-Blockade keinen Einfluss.

### **3.3.2.3 Einfluss von IL-9 auf die Zytokinproduktion und die IL-9R-Expression in Tregs**

Auch die IL-10-, IL-17- und IFN $\gamma$ -Produktion und die IL-9R-Expression in den Tregs wurde durch das zusätzliche rekombinante IL-9 und die IL-9-Blockade während der Th9- und Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion nicht beeinflusst, vgl. Tabelle 32 und Abbildung 23.





**Abbildung 21** Einfluss von rekombinantem IL-9 und einer IL-9-Blockade zusätzlich zu der (A, C, E, G) Th9- und (B, D, F, H) Th17-Stimulation der Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat auf die (A, B, C, D) IL-9-, IL-17-, IFN $\gamma$ - und IL-9R-Produktion sowie die (E, F, G, H) Ki67- und CCR6-Expression. Dargestellt sind die prozentualen Anteile am CD4+ Lymphozytengate als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Unterschiede mit und ohne IL-9-Blockade waren nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).

**Tabelle 29 Einfluss von IL-9 auf die Zytokinproduktion und die Expression von IL-9R, Ki67 und CCR6 (Durchflusszytometrie) unter Th9- Stimulation**

		Naive		Nicht Naive	
		HD (N=6)	Pat (N=3)	HD (N=6)	Pat (N=3)
		MW $\pm$ SD; (Median; Min – Max)	MW $\pm$ SD; (Median; Min – Max)	MW $\pm$ SD; (Median; Min – Max)	MW $\pm$ SD; (Median; Min – Max)
<b>IL-9</b>	<b>Th9</b>	1,2 $\pm$ 0,7 (1,4; 0,2 - 1,9)	1,1 $\pm$ 0,8 (1,0; 0,4 - 2,0)	4,0 $\pm$ 2,9 (4,7; 0,2 - 7,8)	2,1 $\pm$ 2,8 (0,9; 0,1 - 5,3)
	<b>+IL-9</b>	1,3 $\pm$ 0,7 (1,5; 0,3 - 1,9)	1,7 $\pm$ 2,0 (0,5; 0,5 - 4,0)	3,7 $\pm$ 3,4 (1,4; 0,3 - 8,9)	2,3 $\pm$ 2,8 (1,4; 0,1 - 5,5)
	<b>+Anti-IL-9</b>	1,0 $\pm$ 0,5 (1,1; 0,2 - 1,7)	1,1 $\pm$ 1,1 (0,6; 0,4 - 2,4)	3,7 $\pm$ 2,7 (4,5; 0,3 - 6,7)	2,4 $\pm$ 2,7 (1,7; 0,1 - 5,4)
<b>IL-17</b>	<b>Th9</b>	0,8 $\pm$ 0,8 (0,6; 0,1 - 2,3)	0,3 $\pm$ 0,3 (0,2; 0,1 - 0,6)	2,0 $\pm$ 1,0 (1,9; 0,8 - 3,8)	0,7 $\pm$ 0,6 (0,4; 0,3 - 1,4)
	<b>+IL-9</b>	0,8 $\pm$ 0,9 (0,5; 0,1 - 2,6)	0,4 $\pm$ 0,4 (0,2; 0,1 - 0,9)	2,0 $\pm$ 1,2 (1,6; 1,1 - 4,4)	0,9 $\pm$ 0,5 (0,7; 0,5 - 1,5)
	<b>+Anti-IL-9</b>	0,6 $\pm$ 0,6 (0,5; 0,1 - 1,3)	0,3 $\pm$ 0,3 (0,2; 0,1 - 0,7)	1,9 $\pm$ 1,1 (1,6; 0,9 - 4,0)	0,7 $\pm$ 0,3 (0,6; 0,5 - 1,0)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>Th9</b>	1,2 $\pm$ 1,1 (0,9; 0,1 - 2,6)	0,3 $\pm$ 0,4 (0,3; 0,0 - 0,7)	2,9 $\pm$ 3,3 (1,5; 0,6 - 9,2)	1,1 $\pm$ 0,8 (1,2; 0,3 - 1,8)
	<b>+IL-9</b>	0,8 $\pm$ 0,6 (0,7; 0,1 - 1,5)	0,3 $\pm$ 0,4 (0,3; 0,0 - 0,7)	4,7 $\pm$ 5,0 (2,4; 0,2 - 12,1)	1,9 $\pm$ 0,9 (1,6; 1,3 - 2,9)
	<b>+Anti-IL-9</b>	1,1 $\pm$ 1,1 (1,0; 0,0 - 2,9)	0,8 $\pm$ 1,3 (0,1; 0,0 - 2,3)	4,3 $\pm$ 4,9 (3,2; 0,1 - 12,5)	2,1 $\pm$ 0,1 (2,2; 2,0 - 2,2)
<b>IL-9R</b>	<b>Th9</b>	0,6 $\pm$ 0,6 (0,3; 0,2 - 1,7)	0,9 $\pm$ 0,5 (0,6; 0,6 - 1,4)	0,7 $\pm$ 0,9 (0,4; 0,1 - 2,5)	0,4 $\pm$ 0,2 (0,3; 0,3 - 0,6)
	<b>+IL-9</b>	0,6 $\pm$ 0,5 (0,3; 0,3 - 1,3)	1,7 $\pm$ 1,4 (1,0; 0,8 - 3,4)	0,7 $\pm$ 0,8 (0,4; 0,1 - 2,3)	0,5 $\pm$ 0,4 (0,3; 0,2 - 0,9)
	<b>+Anti-IL-9</b>	0,5 $\pm$ 0,3 (0,4; 0,2 - 1,1)	1,2 $\pm$ 0,6 (0,8; 0,8 - 1,9)	0,5 $\pm$ 0,5 (0,3; 0,2 - 1,5)	0,7 $\pm$ 0,3 (0,7; 0,4 - 1,0)
<b>Ki67</b>	<b>Th9</b>	41,4 $\pm$ 22,5 (39,9; 19,2 - 68,9)	19,6 $\pm$ 11,0 (20,5; 8,2 - 30,2)	47,8 $\pm$ 19,9 (46,4; 24 - 82,4)	26,7 $\pm$ 10,9 (20,7; 20,1 - 39,2)
	<b>+IL-9</b>	43,7 $\pm$ 20,0 (45,6; 21,7 - 66,9)	18,5 $\pm$ 11,7 (15,7; 8,4 - 31,3)	47,4 $\pm$ 18,1 (45,3; 27,0 - 80,4)	29,9 $\pm$ 10,1 (29,1; 20,2 - 40,4)
	<b>+Anti-IL-9</b>	42,5 $\pm$ 21,9 (43,4; 16,3 - 70,2)	23,4 $\pm$ 14,2 (25,8; 8,2 - 36,3)	46,6 $\pm$ 19,2 (46,8; 22,9 - 78,8)	29,2 $\pm$ 11,3 (23,9; 21,5 - 42,1)
<b>CCR6</b>	<b>Th9</b>	3,7 $\pm$ 2,2 (3,4; 0,5 - 7,3)	2,5 $\pm$ 1,6 (2,2; 1,1 - 4,3)	15,9 $\pm$ 10,3 (20,2; 0,8 - 25,4)	11,6 $\pm$ 6,0 (12,1; 5,3 - 17,3)
	<b>+IL-9</b>	3,5 $\pm$ 2,1 (3,3; 0,6 - 6,8)	2,4 $\pm$ 1,5 (2,7; 0,7 - 3,7)	16,9 $\pm$ 11,3 (20,9; 0,5 - 27,7)	11,4 $\pm$ 6,4 (12,9; 4,4 - 16,9)
	<b>+Anti-IL-9</b>	3,2 $\pm$ 1,9 (3,1; 0,7 - 6,2)	3,0 $\pm$ 2,7 (2,2; 0,9 - 6,0)	16,2 $\pm$ 10,6 (20,5; 0,5 - 26,6)	11,9 $\pm$ 5,2 (11,7; 6,8 - 17,1)

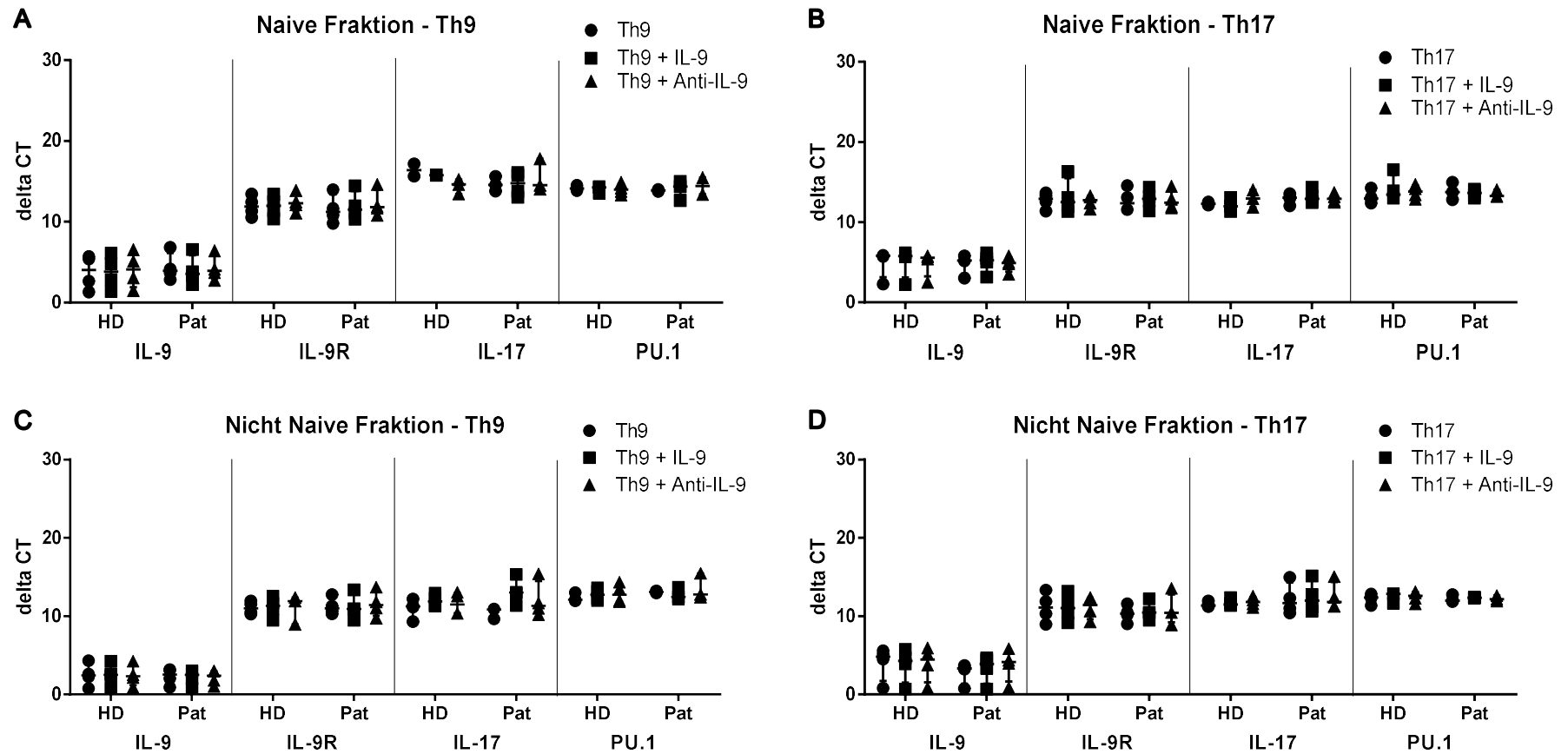
Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der IL-9-, IL-17-, IFN $\gamma$ -, IL-9R-, Ki67- und der CCR6-positiven Zellen am CD4+ Lymphozytengate nach Th9- bzw. Th17- Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion mit und ohne Zugabe von IL-9 (+IL-9) oder Anti-IL-9 (+Anti-IL-9) in HD und Pat wieder. Es sind der Mittelwert (MW)  $\pm$  Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. Vergleich Th9 bzw. Th17 vs. +IL-9 und vs. +Anti-IL-9 mittels Mann-Whitney-U Test, Unterschiede waren nicht signifikant. Vergleich HD vs. Pat mittels Mann-Whitney-U-Test, Unterschiede waren nicht signifikant.

**Tabelle 30 Fortsetzung von Tabelle 29. Einfluss von IL-9 auf die Zytokinproduktion und die Expression von IL-9R, Ki67 und CCR6 (Durchflusszytometrie) unter Th17- Stimulation**

		Naive		Nicht Naive	
		HD (N=6)	Pat (N=3)	HD (N=6)	Pat (N=3)
		MW ± SD; (Median; Min – Max)	MW ± SD; (Median; Min – Max)	MW ± SD; (Median; Min – Max)	MW ± SD; (Median; Min – Max)
<b>IL-9</b>	<b>Th17</b>	1,2 ± 0,8 (1,1; 0,3 - 2,4)	0,9 ± 0,8 (0,8; 0,2 - 1,8)	3,7 ± 2,0 (3,5; 1,2 - 7,2)	2,4 ± 2,4 (1,0; 1,0 - 5,1)
	<b>+IL-9</b>	0,9 ± 0,5 (0,9; 0,2 - 1,6)	1,7 ± 1,2 (1,9; 0,4 - 2,8)	3,2 ± 2,2 (3,6; 0,5 - 6,3)	1,4 ± 1,0 (1,1; 0,6 - 2,5)
	<b>+Anti-IL-9</b>	1,3 ± 1,0 (1,0; 0,1 - 3,1)	2,9 ± 2,4 (3,8; 0,2 - 4,8)	2,6 ± 1,7 (2,9; 0,6 - 5,0)	1,4 ± 1,2 (0,8; 0,6 - 2,7)
<b>IL-17</b>	<b>Th17</b>	2,0 ± 3,1 (0,9; 0,3 - 8,3)	1,3 ± 2,0 (0,3; 0,0 - 3,6)	3,3 ± 1,8 (3,1; 1,1 - 6,5)	1,2 ± 0,6 (1,2; 0,6 - 1,8)
	<b>+IL-9</b>	1,5 ± 1,7 (0,9; 0,3 - 4,9)	0,7 ± 1,0 (0,2; 0,1 - 1,9)	3,2 ± 1,7 (2,9; 1,4 - 6,1)	1,1 ± 0,7 (1,4; 0,3 - 1,6)
	<b>+Anti-IL-9</b>	1,8 ± 3,0 (0,5; 0,2 - 7,8)	0,7 ± 0,7 (0,9; 0,0 - 1,3)	2,3 ± 1,0 (2,3; 1,1 - 3,7)	0,8 ± 0,4 (0,9; 0,3 - 1,1)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>Th17</b>	2,6 ± 1,4* (3,4; 0,6 - 3,6)	0,3 ± 0,1* (0,3; 0,2 - 0,4)	4,6 ± 2,7 (5,2; 1,1 - 7,7)	1,9 ± 1,0 (1,8; 0,9 - 2,9)
	<b>+IL-9</b>	3,2 ± 2,3 (3,4; 0,5 - 6,1)	1,4 ± 1,8 (0,4; 0,4 - 3,5)	6,3 ± 3,9 (6,7; 1,6 - 11,1)	2,3 ± 0,5 (2,0; 2,0 - 2,8)
	<b>+Anti-IL-9</b>	1,7 ± 1,0 (2,2; 0,4 - 2,7)	1,1 ± 1,2 (0,6; 0,3 - 2,5)	4,8 ± 2,9 (4,3; 1,0 - 9,1)	1,7 ± 0,3 (1,8; 1,4 - 1,9)
<b>IL-9R</b>	<b>Th17</b>	0,8 ± 0,9 (0,4; 0,1 - 2,1)	1,2 ± 0,6 (1,3; 0,6 - 1,7)	0,8 ± 0,7 (0,5; 0,3 - 2,2)	0,8 ± 0,6 (0,4; 0,4 - 1,5)
	<b>+IL-9</b>	1,0 ± 1,1 (0,6; 0,1 - 2,7)	1,5 ± 0,6 (1,8; 0,8 - 1,9)	0,7 ± 0,9 (0,4; 0,2 - 2,4)	0,9 ± 1,0 (0,4; 0,3 - 2,0)
	<b>+Anti-IL-9</b>	1,0 ± 1,0 (0,8; 0,1 - 2,3)	2,2 ± 0,6 (2,0; 1,7 - 2,9)	0,6 ± 0,6 (0,5; 0,2 - 1,8)	1,2 ± 1,2 (0,8; 0,3 - 2,6)
<b>Ki67</b>	<b>Th17</b>	42,4 ± 22,7 (42,3; 19,9 - 65,2)	36,3 ± 25,0 (46,1; 7,9 - 54,9)	45,6 ± 18,5 (45; 24,7 - 69,3)	29,9 ± 6,2 (29,1; 24,1 - 36,4)
	<b>+IL-9</b>	46,7 ± 24,5 (47,9; 21,7 - 70,9)	35,8 ± 26,0 (49,9; 5,8 - 51,6)	46,5 ± 14,3 (46,5; 30,5 - 63,9)	23,0 ± 9,1 (22,9; 14,0 - 32,2)
	<b>+Anti-IL-9</b>	44,4 ± 25,2 (46,6; 15,5 - 70,8)	29,7 ± 19,7 (41,0; 7,0 - 41,2)	45,6 ± 17,1 (43,7; 28,4 - 72,6)	27,0 ± 10,1 (21,2; 21,1 - 38,7)
<b>CCR6</b>	<b>Th17</b>	4,5 ± 2,0 (5,0; 1,3 - 6,6)	8,0 ± 6,6 (8,3; 1,3 - 14,5)	19,0 ± 12,8 (19,4; 3 - 35,7)	17,0 ± 11,3 (13,9; 7,6 - 29,6)
	<b>+IL-9</b>	4,8 ± 2,3 (4,9; 1,4 - 8,0)	8,0 ± 6,8 (8,0; 1,2 - 14,7)	20,6 ± 13,7 (21,8; 2,5 - 38,8)	16,9 ± 11,2 (13,2; 8,0 - 29,4)
	<b>+Anti-IL-9</b>	5,0 ± 2,6 (4,8; 1,9 - 9,2)	7,9 ± 7,7 (6,2; 1,2 - 16,4)	20,1 ± 13,3 (20,7; 2,6 - 38,4)	16,4 ± 10,1 (13,7; 7,9 - 27,5)

Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der IL-9-, IL-17-, IFN $\gamma$ -, IL-9R-, Ki67- und der CCR6-positiven Zellen am CD4+ Lymphozytengate nach Th9- bzw. Th17- Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion mit und ohne Zugabe von IL-9 (+IL-9) oder Anti-IL-9 (+Anti-IL-9) in HD und Pat wieder. Es sind der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. Vergleich Th9 bzw. Th17 vs. +IL-9 und vs. +Anti-IL-9 mittels Mann-Whitney-U Test, Unterschiede waren nicht signifikant. Vergleich HD vs. Pat mittels Mann-Whitney-U-Test, Unterschiede waren nicht signifikant.

\*Vergleich HD vs. Pat: \*=0,048, \*\*=0,024 (Mann-Whitney-U Test).



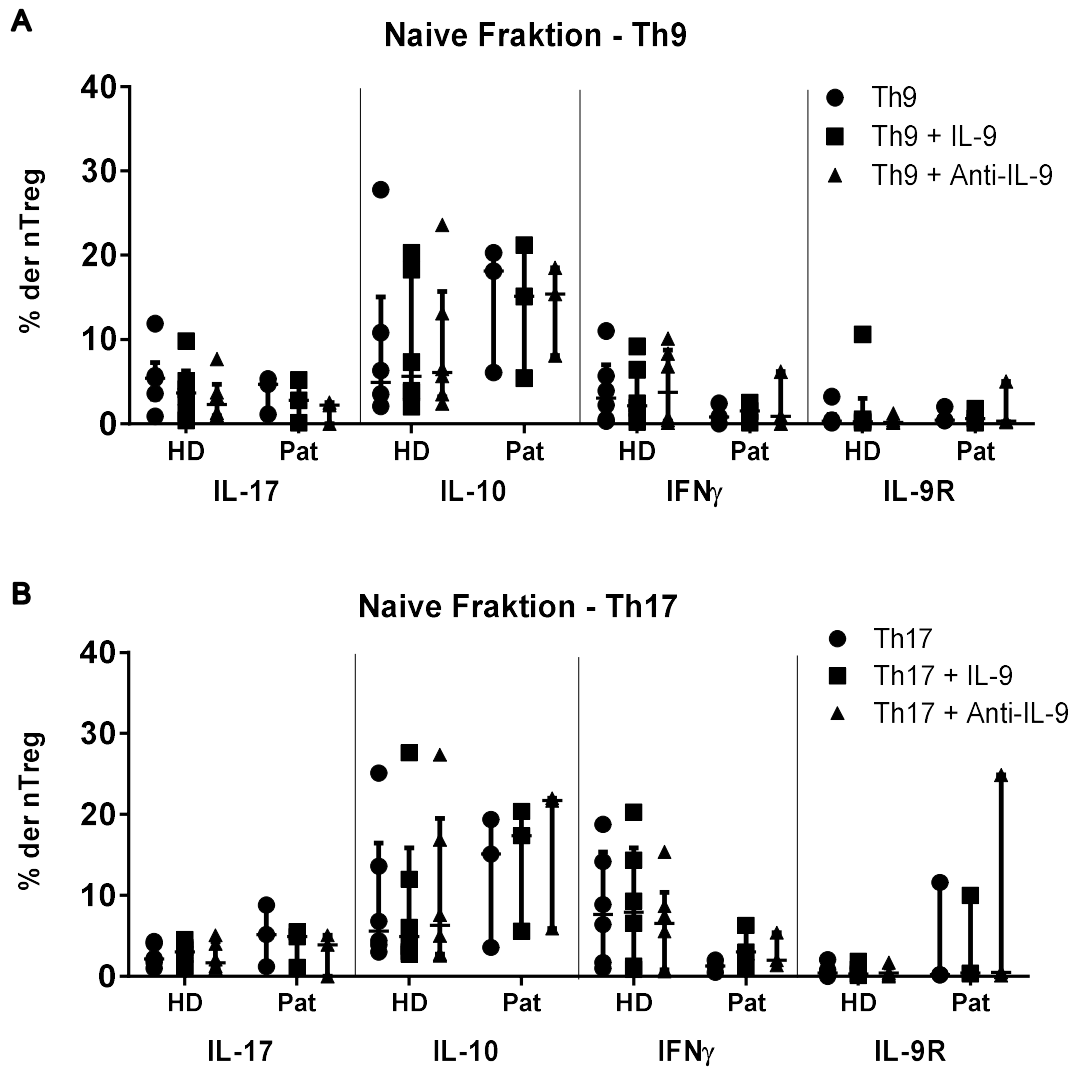
**Abbildung 22 Einfluss von rekombinantem IL-9 und einer IL-9-Blockade zusätzlich zur (A,C) Th9- und (B,D) Th17-Stimulation der (A,B) Naiven und (C,D) Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat auf die IL-9-, IL-9R-, IL-17- und die PU.1- mRNA-Expression. Darstellung der  $\Delta$ CT-Werte als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Aufgrund der zu großen Differenz der  $\Delta$ CT-Werte einiger Duplikate wurden Proben für IL-17 und PU.1 aus der Auswertung genommen. Unterschiede waren nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).**



**Tabelle 31 Einfluss von IL-9 und einer IL-9-Blockade auf die Zytokinproduktion und die Expression von IL-9R und PU.1 (PCR)**

		Naive		Nicht Naive	
		HD (N=4)	Pat (N=4)	HD (N=4)	Pat (N=4)
		MW $\pm$ SD; (Median; Min – Max)	MW $\pm$ SD; (Median; Min – Max)	MW $\pm$ SD; (Median; Min – Max)	MW $\pm$ SD; (Median; Min – Max)
<b>IL-9</b>	<b>Th9</b>	3,8 $\pm$ 2,1 (4,0; 1,3 - 5,7)	4,4 $\pm$ 1,7 (3,9; 2,8 - 6,8)	2,5 $\pm$ 1,5 (2,4; 0,8 - 4,3)	2,3 $\pm$ 1,1 (2,6; 0,9 - 3,2)
	<b>+IL-9</b>	3,8 $\pm$ 2,1 (3,8; 1,4 - 6,1)	4,0 $\pm$ 1,8 (3,6; 2,2 - 6,6)	2,5 $\pm$ 1,4 (2,5; 0,8 - 4,3)	2,2 $\pm$ 1,1 (2,5; 0,8 - 3,1)
	<b>+Anti-IL-9</b>	4,1 $\pm$ 2,2 (4,1; 1,5 - 6,5)	4,3 $\pm$ 1,6 (3,9; 2,8 - 6,4)	2,5 $\pm$ 1,4 (2,3; 0,9 - 4,3)	2,2 $\pm$ 1,0 (2,4; 1,0 - 3,0)
<b>IL-17</b>	<b>Th9</b>	16,4 $\pm$ 1,1 (16,4; 15,6 - 17,2)	14,7 $\pm$ 0,9 (14,6; 13,8 - 15,6)	11,0 $\pm$ 1,2 (11,2; 9,3 - 12,2)	10,5 $\pm$ 0,7 (10,8; 9,7 - 10,9)
	<b>+IL-9</b>	15,8	14,7 $\pm$ 1,5 (14,8; 13,0 - 16,1)	11,2 $\pm$ 1,3 (11,3; 9,5 - 12,6)	11,2 $\pm$ 1,6 (10,9; 9,5 - 13,3)
	<b>+Anti-IL-9</b>	14,4 $\pm$ 0,9 (14,6; 13,4 - 15,2)	15,4 $\pm$ 2,0 (14,5; 14,0 - 17,8)	11,1 $\pm$ 1,9 (11,9; 9,0 - 12,4)	11,6 $\pm$ 1,7 (11,4; 9,7 - 13,7)
<b>IL-9R</b>	<b>Th9</b>	11,9 $\pm$ 1,3 (11,9; 10,5 - 13,5)	11,6 $\pm$ 1,8 (11,2; 9,8 - 14,0)	11,1 $\pm$ 0,6 (11,0; 10,3 - 12,0)	11,3 $\pm$ 1,1 (11,0; 10,3 - 12,8)
	<b>+IL-9</b>	11,9 $\pm$ 1,3 (12,0; 10,4 - 13,4)	11,9 $\pm$ 1,8 (11,5; 10,3 - 14,4)	12,0 $\pm$ 0,8 (11,3 - 12,9)	13,2 $\pm$ 1,6 (13,0; 11,4 - 15,3)
	<b>+Anti-IL-9</b>	12,4 $\pm$ 1,1 (12,3; 11,1 - 13,9)	12,3 $\pm$ 1,6 (11,8; 10,8 - 14,6)	11,6 $\pm$ 1,4 (11,5; 10,4 - 13,1)	12,1 $\pm$ 2,3 (11,3; 10,2 - 15,4)
<b>PU.1</b>	<b>Th9</b>	14,1 $\pm$ 0,3 (14,1; 13,9 - 14,5)	13,9 $\pm$ 0,2 (13,9; 13,8 - 14,0)	12,4 $\pm$ 0,6 (12,1; 12,0 - 13,0)	13,1 $\pm$ 1,1 (13,1; 13,0 - 13,2)
	<b>+IL-9</b>	14,0 $\pm$ 0,4 (14,2; 13,6 - 14,3)	14,0 $\pm$ 1,2 (14,4; 12,7 - 15,0)	12,8 $\pm$ 0,7 (12,7; 12,0 - 13,6)	12,8 $\pm$ 0,8 (12,5; 12,2 - 13,7)
	<b>+Anti-IL-9</b>	14,0 $\pm$ 0,7 (14,0; 13,3 - 14,9)	14,4 $\pm$ 1,5 (14,4; 13,4 - 15,5)	12,9 $\pm$ 1,2 (12,7; 11,9 - 14,3)	13,6 $\pm$ 1,7 (12,8; 12,4 - 15,5)
<b>IL-9</b>	<b>Th17</b>	4,9 $\pm$ 1,8 (5,8; 2,3 - 5,9)	4,8 $\pm$ 1,2 (5,2; 3,0 - 5,8)	4,0 $\pm$ 2,2 (4,8; 0,8 - 5,6)	2,8 $\pm$ 1,4 (3,3; 0,8 - 3,7)
	<b>+IL-9</b>	5,0 $\pm$ 1,8 (5,8; 2,2 - 6,1)	5,0 $\pm$ 1,3 (5,3; 3,2 - 6,2)	3,8 $\pm$ 2,2 (4,3; 0,7 - 5,8)	3,3 $\pm$ 1,8 (3,9; 0,7 - 4,7)
	<b>+Anti-IL-9</b>	4,9 $\pm$ 1,6 (5,6; 2,5 - 5,8)	4,8 $\pm$ 1,0 (4,9; 3,5 - 5,8)	3,9 $\pm$ 2,3 (4,5; 0,8 - 5,9)	3,8 $\pm$ 2,2 (4,2; 0,9 - 5,9)
<b>IL-17</b>	<b>Th17</b>	12,3 $\pm$ 0,3 (12,3; 12,1 - 12,5)	12,9 $\pm$ 0,6 (13,1; 12,1 - 13,6)	11,1 $\pm$ 1,9 (11,1; 9,0 - 13,3)	10,3 $\pm$ 1,1 (10,3; 9,0 - 11,6)
	<b>+IL-9</b>	12,1 $\pm$ 0,9 (12,0; 11,3 - 13,0)	13,2 $\pm$ 0,9 (12,9; 12,5 - 14,4)	11,1 $\pm$ 1,7 (11,0; 9,2 - 13,2)	10,7 $\pm$ 1,1 (10,5; 9,5 - 12,2)
	<b>+Anti-IL-9</b>	13,0 $\pm$ 1,1 (13,0; 11,9 - 14,0)	13,0 $\pm$ 0,5 (12,9; 12,5 - 13,7)	11,1 $\pm$ 1,5 (11,4; 9,3 - 12,4)	10,8 $\pm$ 2,0 (10,4; 8,9 - 13,6)
<b>IL-9R</b>	<b>Th17</b>	12,7 $\pm$ 1,0 (12,9; 11,4 - 13,7)	12,7 $\pm$ 1,4 (12,4; 11,6 - 14,6)	11,5 $\pm$ 0,3 (11,4; 11,2 - 12,0)	12,2 $\pm$ 2,0 (11,7; 10,4 - 15,0)
	<b>+IL-9</b>	13,2 $\pm$ 2,2 (12,5; 11,3 - 16,3)	12,9 $\pm$ 1,2 (12,9; 11,4 - 14,4)	11,7 $\pm$ 0,5 (11,5; 11,3 - 12,4)	12,4 $\pm$ 2,0 (12,0; 10,7 - 15,1)
	<b>+Anti-IL-9</b>	12,6 $\pm$ 0,8 (12,8; 11,6 - 13,3)	12,8 $\pm$ 1,2 (12,4; 11,8 - 14,5)	11,8 $\pm$ 0,6 (11,8; 11,1 - 12,6)	12,4 $\pm$ 1,8 (11,8; 11,1 - 15,1)
<b>PU.1</b>	<b>Th17</b>	13,1 $\pm$ 0,8 (13,0; 12,4 - 14,3)	13,8 $\pm$ 1,1 (13,7; 12,8 - 15,0)	12,2 $\pm$ 0,6 (12,4; 11,4 - 12,8)	12,2 $\pm$ 0,5 (12,0; 11,9 - 12,8)
	<b>+IL-9</b>	14,1 $\pm$ 1,7 (13,5; 13,0 - 16,5)	13,6 $\pm$ 0,5 (13,6; 13,0 - 14,1)	12,5 $\pm$ 0,7 (12,9; 11,6 - 12,9)	12,4 $\pm$ 0,1 (12,3; 12,3 - 12,5)
	<b>+Anti-IL-9</b>	13,8 $\pm$ 0,8 (13,8; 12,9 - 14,7)	13,5 $\pm$ 0,5 (13,3; 13,2 - 14,0)	12,5 $\pm$ 0,7 (12,6; 11,6 - 13,2)	12,3 $\pm$ 0,4 (12,2; 11,9 - 12,7)

Die Tabelle gibt die  $\Delta$ CT-Werte normalisiert auf die Expression des  $\beta$ 2-Mikroglobulin für IL-9, IL-9R, IL-17 und PU.1 nach Th9- und Th17- Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion mit und ohne Zugabe von IL-9 (+IL-9) oder Anti-IL-9 (+Anti-IL-9) in HD und Pat wieder. Es sind der Mittelwert (MW)  $\pm$  Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. Vergleich Th9 bzw. Th17 vs. +IL-9 und vs. +Anti-IL-9 mittels Mann-Whitney-U Test, Unterschiede waren nicht signifikant. Vergleich HD vs. Pat mittels Mann-Whitney-U-Test, Unterschiede waren nicht signifikant.



**Abbildung 23 Einfluss von rekombinantem IL-9 und einer IL-9-Blockade zusätzlich zur (A) Th9 und (B) Th17-Stimulation der Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat auf die IL-17-, IL-10- und IFN $\gamma$ -Produktion sowie die IL-9R-Expression in regulatorischen T-Zellen. Darstellung in Prozent der Tregs als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Unterschiede waren nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).**

**Tabelle 32 Einfluss von IL-9 und einer IL-9-Blockade auf die Zytokinproduktion und die Expression von IL-9R in regulatorischen T-Zellen (Durchflusszytometrie)**

		Naive		Nicht Naive	
		HD	Pat	HD	Pat
		MW $\pm$ SD; (Median; Min – Max)		MW $\pm$ SD; (Median; Min – Max)	
<b>IL-17</b>	<b>Th9</b>	5,5 $\pm$ 3,6 (5,4; 0,9 - 11,9)	3,7 $\pm$ 2,3 (4,7; 1,1 - 5,3)	6,7 $\pm$ 3,3 (5,7; 3,6 - 12,2)	4,6 $\pm$ 0,4 (4,6; 4,2 - 4,9)
	<b>Th9 + IL-9</b>	4,0 $\pm$ 3,3 (3,7; 0,4 - 9,8)	2,7 $\pm$ 2,6 (2,8; 0,1 - 5,2)	6,2 $\pm$ 3,4 (5,1; 3,4 - 12,2)	4,0 $\pm$ 1,4 (4,7; 2,3 - 4,9)
	<b>Th9 + Anti-IL-9</b>	3,0 $\pm$ 2,6 (2,3; 0,8 - 7,7)	1,6 $\pm$ 1,4 (2,2; 0,0 - 2,5)	5,9 $\pm$ 3,2 (4,9; 3,3 - 11,8)	3,6 $\pm$ 0,9 (3,9; 2,5 - 4,3)
<b>IL-10</b>	<b>Th9</b>	9,0 $\pm$ 9,7 (4,9; 2,1 - 27,8)	14,8 $\pm$ 7,6 (18,1; 6,1 - 20,3)	8,0 $\pm$ 4,1 (8,0; 3,4 - 13,8)	7,1 $\pm$ 4,5 (6,2; 3,2 - 12,0)
	<b>Th9 + IL-9</b>	9,3 $\pm$ 8,0 (5,6; 2,0 - 20,3)	13,9 $\pm$ 8,0 (15,1; 5,4 - 21,2)	7,1 $\pm$ 3,1 (7,1; 3,4 - 10,6)	6,3 $\pm$ 1,5 (6,2; 4,9 - 7,9)
	<b>Th9 + Anti-IL-9</b>	9,1 $\pm$ 8,0 (6,1; 2,4 - 23,6)	14,0 $\pm$ 5,3 (15,4; 8,1 - 18,5)	8,7 $\pm$ 5,6 (7,2; 3,7 - 17,2)	6,5 $\pm$ 2,5 (6,0; 4,2 - 9,2)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>Th9</b>	3,9 $\pm$ 4,0 (3,1; 0,3 - 11,0)	1,1 $\pm$ 1,2 (0,8; 0,0 - 2,4)	6,7 $\pm$ 7,0 (4,2; 1,9 - 20,5)	3,3 $\pm$ 1,9 (3,4; 1,4 - 5,1)
	<b>Th9 + IL-9</b>	3,5 $\pm$ 3,5 (2,2; 0,2 - 9,2)	1,4 $\pm$ 1,2 (1,5; 0,1 - 2,5)	9,4 $\pm$ 8,7 (5,9; 0,3 - 23,0)	5,9 $\pm$ 2,8 (4,6; 3,9 - 9,1)
	<b>Th9 + Anti-IL-9</b>	4,4 $\pm$ 4,5 (3,8; 0,1 - 10,1)	2,4 $\pm$ 3,4 (0,9; 0,0 - 6,2)	8,7 $\pm$ 8,9 (6,4; 0,8 - 24,2)	5,6 $\pm$ 1,3 (6,2; 4,1 - 6,4)
<b>IL-9R</b>	<b>Th9</b>	0,7 $\pm$ 1,2 (0,3; 0,1 - 3,2)	0,9 $\pm$ 0,9 (0,4; 0,4 - 2,0)	0,3 $\pm$ 0,2 (0,3; 0,1 - 0,7)	3,3 $\pm$ 4,6 (1,1; 0,1 - 8,6)
	<b>Th9 + IL-9</b>	2,0 $\pm$ 4,2 (0,2; 0,1 - 10,6)	0,8 $\pm$ 0,9 (0,6; 0,1 - 1,8)	0,6 $\pm$ 0,4 (0,5; 0,2 - 1,1)	4,4 $\pm$ 7,1 (0,5; 0,2 - 12,6)
	<b>Th9 + Anti-IL-9</b>	0,3 $\pm$ 0,4 (0,2; 0,0 - 1,2)	1,8 $\pm$ 2,7 (0,3; 0,2 - 5,0)	0,4 $\pm$ 0,3 (0,3; 0,1 - 0,8)	2,7 $\pm$ 3,6 (1,0; 0,3 - 6,9)
<b>IL-17</b>	<b>Th17</b>	2,6 $\pm$ 1,3 (2,2; 1,0 - 4,3)	5,1 $\pm$ 3,8 (5,2; 1,2 - 8,8)	8,0 $\pm$ 2,9 (8,4; 4,1 - 10,7)	5,8 $\pm$ 2,8 (6,5; 2,8 - 8,2)
	<b>Th17 + IL-9</b>	2,8 $\pm$ 1,4 (3,0; 1,0 - 4,6)	3,8 $\pm$ 2,4 (4,9; 1,1 - 5,5)	7,9 $\pm$ 2,4 (7,8; 5,0 - 10,9)	4,6 $\pm$ 2,1 (4,8; 2,5 - 6,6)
	<b>Th17 + Anti- IL-9</b>	2,4 $\pm$ 1,7 (1,7; 1,0 - 5,1)	3,0 $\pm$ 2,7 (3,9; 0,0 - 5,1)	6,7 $\pm$ 2,9 (5,6; 3,4 - 10,3)	3,7 $\pm$ 2,8 (3,9; 0,8 - 6,3)
<b>IL-10</b>	<b>Th17</b>	9,5 $\pm$ 8,6 (5,6; 3,0 - 25,1)	12,7 $\pm$ 8,2 (15,1; 3,6 - 19,4)	9,4 $\pm$ 6,3 (7,9; 2,5 - 17,5)	7,9 $\pm$ 4,0 (8,5; 3,7 - 11,6)
	<b>Th17 + IL-9</b>	9,2 $\pm$ 9,6 (4,9; 2,8 - 27,6)	14,5 $\pm$ 7,8 (17,4; 5,6 - 20,4)	8,0 $\pm$ 5,6 (6,6; 2,9 - 17,1)	5,7 $\pm$ 2,9 (5,3; 3,0 - 8,8)
	<b>Th17 + Anti- IL-9</b>	10,4 $\pm$ 9,9 (6,3; 2,6 - 27,4)	16,5 $\pm$ 9,2 (21,7; 5,9 - 22,0)	6,1 $\pm$ 4,1 (3,6; 3,0 - 12,7)	7,5 $\pm$ 3,3 (7,8; 4,1 - 10,6)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>Th17</b>	8,5 $\pm$ 7,0 (7,7; 1,0 - 18,8)	1,3 $\pm$ 0,8 (1,3; 0,5 - 2,0)	12,6 $\pm$ 7,7 (12,5; 2,5 - 24,2)	6,0 $\pm$ 4,4 (4,7; 2,3 - 10,9)
	<b>Th17 + IL-9</b>	8,8 $\pm$ 7,6 (8,0; 0,9 - 20,3)	3,5 $\pm$ 2,6 (3,0; 1,1 - 6,3)	15,2 $\pm$ 8,6 (15,5; 5,0 - 24,9)	7,4 $\pm$ 2,1 (6,7; 5,8 - 9,8)
	<b>Th17 + Anti- IL-9</b>	6,5 $\pm$ 5,5 (6,6; 0,6 - 15,4)	2,9 $\pm$ 2,2 (2,0; 1,4 - 5,4)	12,1 $\pm$ 7,1 (12,9; 2,5 - 20,9)	4,7 $\pm$ 1,2 (4,2; 3,8 - 6,1)
<b>IL-9R</b>	<b>Th17</b>	0,6 $\pm$ 0,8 (0,4; 0,0 - 2,1)	4,0 $\pm$ 6,6 (0,2; 0,2 - 11,6)	0,4 $\pm$ 0,4 (0,4; 0,0 - 0,9)	4,7 $\pm$ 6,7 (0,8; 0,8 - 12,4)
	<b>Th17 + IL-9</b>	0,6 $\pm$ 0,7 (0,2; 0,0 - 1,9)	3,6 $\pm$ 5,6 (0,4; 0,3 - 10,0)	0,5 $\pm$ 0,5 (0,3; 0,0 - 1,2)	3,9 $\pm$ 5,4 (1,1; 0,4 - 10,1)
	<b>Th17 + Anti- IL-9</b>	0,5 $\pm$ 0,6 (0,3; 0,0 - 1,7)	8,5 $\pm$ 14,2 (0,5; 0,1 - 24,9)	0,4 $\pm$ 0,3 (0,4; 0,0 - 0,8)	5,9 $\pm$ 9,2 (1,1; 0,0 - 16,5)

Die Tabelle gibt die prozentualen Anteile der IL-17-, IFN $\gamma$ -, IL-9R- und IL-10 positiven Zellen unter der Tregs nach Th9- bzw. Th17- Stimulation und Zugabe von IL-9 (+IL-9) oder Anti-IL-9 (+Anti-IL-9) in HD und Pat wieder. Es sind der Mittelwert (MW)  $\pm$  Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. Vergleich Th9 bzw- Th17 vs. +IL-9 und vs. +Anti-IL-9 mittels Mann-Whitney-U Test. Die p-Werte sind angegeben.

### 3.3.2.4 Nachweis der IL-9-Blockade mittels ELISA

In den Überständen der Kulturen wurde die IL-9-Konzentration mittels ELISA bestimmt. In den Proben mit Zugabe von rekombinantem IL-9 wurde ein IL-9-Exzess gemessen. Eine Differenzierung zwischen endogenem und rekombinantem IL-9 war nicht möglich, eine exakte Bestimmung der Werte war daher nicht sinnvoll. Die Daten werden nicht gezeigt. In den Proben mit Zugabe von Anti-IL-9 wurde die erfolgreiche Blockade mittels ELISA nachgewiesen, siehe Tabelle 33 und Abbildung 24.

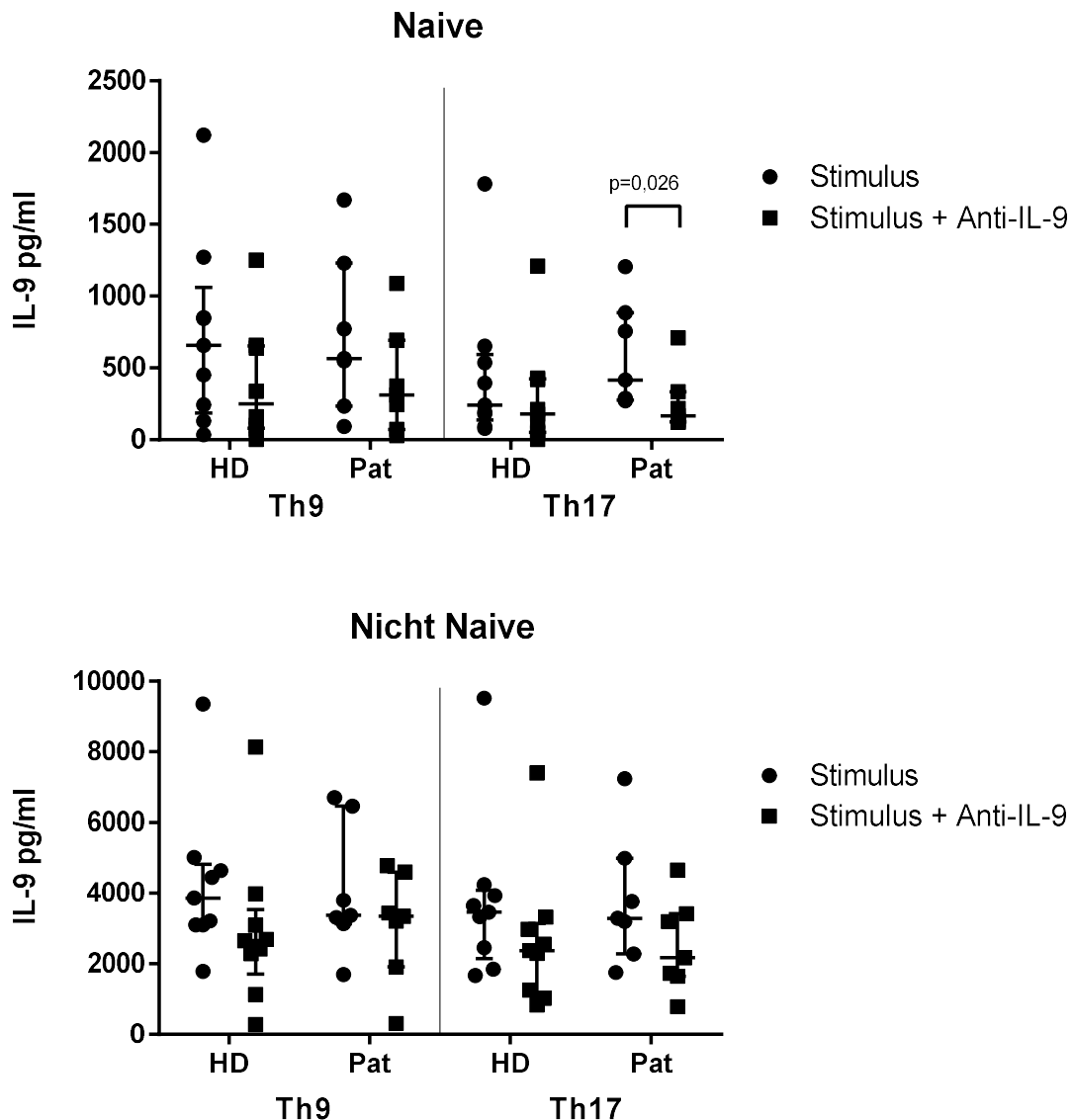


Abbildung 24 IL-9-Konzentration in Überständen der Kulturen nach Stimulation mit Th9- bzw. Th17-Stimulus mit und ohne IL-9-Blockade mittels eines spezifischen Antikörpers. Darstellung der IL-9-Konzentration in pg/ml als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Signifikante Unterschiede sind angegeben (Mann-Whitney-U-Test).

**Tabelle 33 Nachweis der IL-9 Blockade in den Überständen**

	Naive		Nicht Naive	
	HD	Pat	HD	Pat
	MW ± SD; (Median; Min – Max)		MW ± SD; (Median; Min – Max)	
<b>Th9</b>	734 ± 654 (658; 34 – 2122)	730 ± 555 (566; 94 – 1670)	4280 ± 2143 (3866; 1787–9355)	4069 ± 1839 (3370;1699– 6703)
<b>Th9 +Anti-IL-9</b>	444 ± 417 (336; 0 – 1251)	402 ± 374 (312; 28 – 1089)	2964 ± 2216 (2655; 281 – 8138)	3084 ± 1549 (3349; 315 – 4779)
<b>Th17</b>	461 ± 533 (241; 77 – 1782)*	585 ± 368 (415; 271 – 1206)	3788 ± 2331 (3464; 1675–9523)	3787 ± 1843 (3291; 1753–7241)
<b>Th17+Anti-IL-17</b>	297 ± 375 (178; 0 – 1210)*	258 ± 212 (166; 122 – 709)	2670 ± 1977 (2370; 835 – 7404)	2516 ± 1313 (2167; 787 – 4654)

Die Tabelle gibt die IL-9-Konzentrationen in den Überständen in pg/ml nach Kultur mit und ohne IL-9-Blockade wieder. Es sind der Mittelwert (MW) ± Standarddeviation (SD), der Median, der minimale Wert (Min) und der maximale Wert (Max) angegeben. HD N=9, Pat N=7.

Vergleich der Stimuli Th9 und Th17 mit IL-9-Blockade: \*=0,026 (Mann-Whitney-U-Test).

### 3.3.3 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

In den folgenden Tabellen (Tabelle 34, Tabelle 35, Tabelle 36 und Tabelle 37) sollen alle Ergebnisse zur besseren Übersicht nochmals zusammengefasst werden.

**Tabelle 34 Zusammenfassung der Ergebnisse der Phänotypisierung der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion**

<b>Phänotypisierung</b>				
	<b>Naive</b>		<b>Nicht Naive</b>	
	<b>HD</b>	<b>Pat</b>	<b>HD</b>	<b>Pat</b>
<b>Reinheit Tregs</b>	gut keine	= =	ungenügend keine	= =
<b>Zytokinproduktion</b>				
<b>IL-9</b>	niedrig	=	=	=
<b>IL-17</b>	niedrig	=	= (↑)	=
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	niedrig	↓	↑	= (↓)
<b>Oberflächenmoleküle</b>				
<b>IL-9R</b>	niedrig	=	= (↑)	=
<b>CCR6</b>	mäßig	=	= (↑)	=
<b>Proliferation</b>				
<b>Ki67</b>	niedrig	= (↓)	= (↑)	= (↓)

Die Tabelle fasst die Ergebnisse der Phänotypisierung der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat zusammen. In der Spalte HD der Nicht Naiven sind Unterschiede zu den HD der Naiven Fraktion aufgeführt, in den Spalten Pat sind jeweils Unterschiede der Pat zu den HD aufgeführt. = bedeutet kein relevanter Unterschied, ↑ bedeutet höhere Expression, ↓ bedeutet niedrigere Expression, die Symbole in Klammern ( ) zeigen einen nicht signifikanten Trend.

**Tabelle 35 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat**

Stimulationsabhängige Effekte									
		Th9				Th17			
		Naive		Nicht Naive		Naive		Nicht Naive	
		HD	Pat	HD	Pat	HD	Pat	HD	Pat
<b>T-Zelldifferenzierung</b>									
Naive		↓	=	↓	=	↓	=	↓	=
Gedächtnis		↑	=	=	=	↑	=	=	=
Effektor		↑	=	↑	=	↑	=	↑	=
TEMRA		↑	=	=	=	=	=	=	=
Treg		↑	=	↑	=	↑	=	↑	=
<b>Zytokinproduktion</b>									
IL-9		= (↑)	=	↑	=	↑	=	↑	= (↓)
IL-9 (PCR)		= (↑)	=	↑	=	↑	=	↑	=
IL-9 (ELISA)		↑	=	↑	=	= (↑)	= (↑)	↑	=
IL-17		= (↑)	= (↓)	= (↑)	= (↓)	= (↑)	= (↓)	↑	= (↓)
IL-17 (PCR)		=	=	=	=	=	=	=	=
IFN $\gamma$		= (↑)	= (↓)	=	= (↓)	↑	↓	↑	= (↓)
<b>Proliferation</b>									
Ki67		↑	= (↓)	↑	= (↓)	↑	= (↓)	↑	= (↓)
<b>Oberflächenmoleküle</b>									
CCR6		= (↓)	=	= (↓)	=	= (↓)	= (↑)	=	=
IL-9R		=	=	= (↓)	=	=	=	= (↓)	=
IL-9R (PCR)		=	=	=	=	=	=	=	=
<b>Transkriptionsfaktor</b>									
PU.1 (PCR)		=	=	=	=	=	=	=	=

Die Tabelle fasst die Ergebnisse nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat zusammen. Die Symbole in den HD-Spalten geben jeweils die Veränderung zu den nicht stimulierten Zellen vor Kultur wieder bzw. bei ELISA und PCR den Unterschied im Vergleich zur Th0-Stimulation. Die Spalte Pat gibt die Unterschiede zwischen Pat und HD wieder. = bedeutet kein relevanter Unterschied, ↑ bedeutet höhere Expression, ↓ bedeutet niedrigere Expression, die Symbole in Klammern ( ) zeigen einen nicht signifikanten Trend.

**Tabelle 36 Zusammenfassung der IL-9-Konzentrationen in den Überständen nach Krankheitsaktivität in der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion**

		Naive				Nicht Naive			
		HD	Niedrige	Mittlere	Hohe	HD	Niedrige	Mittlere	Hohe
IL-9	Th9	↑	=	=	= (↑)	↑	=	=	= (↑)
	Th17	= (↑)	=	=	= (↑)	↑	=	=	= (↑)

Die Tabelle fasst die IL-9-Konzentrationen in den Überständen nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion nach Krankheitsaktivität aufgeteilt zusammen. Niedrige/ fehlende Krankheitsaktivität = DAS28 0-3,2 (N=3), mittlere Krankheitsaktivität = DAS28 3,2-5,1 (N=2) und hohe Krankheitsaktivität DAS28 >5,1 (N=2). Die Symbole in den HD-Spalten geben den Unterschied zu der unspezifischen Th0-Stimulation wieder, die Symbole in den Spalten niedrige, mittlere und hohe (Krankheitsaktivität) geben Unterschiede zu den HD wieder. = bedeutet kein relevanter Unterschied, ↑ bedeutet höhere Expression, ↓ bedeutet niedrigere Expression, die Symbole in Klammern ( ) zeigen einen nicht signifikanten Trend.

**Tabelle 37 Zusammenfassung der Ergebnisse in der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion nach Th9- und Th17-Stimulation mit Zugabe von IL-9 oder Anti-IL-9**

	Th9							
	Naive				Nicht Naive			
	HD		Pat		HD		Pat	
	+IL-9	+Anti-IL-9	+IL-9	+Anti-IL-9	+IL-9	+Anti-IL-9	+IL-9	+Anti-IL-9
T-Zelldifferenzierung	=	=	=	=	=	=	=	=
Zytokinproduktion	=	=	=	=	=	=	=	=
Proliferation	=	=	=	=	=	=	=	=
CCR6	=	=	=	=	=	=	=	=
IL-9R	=	=	=	=	=	=	=	=
PU.1	=	=	=	=	=	=	=	=
	Th17							
	Naive				Nicht Naive			
	HD		Pat		HD		Pat	
	+IL-9	+Anti-IL-9	+IL-9	+Anti-IL-9	+IL-9	+Anti-IL-9	+IL-9	+Anti-IL-9
T-Zelldifferenzierung	=	=	=	=	=	=	=	=
Zytokinproduktion	=	=	=	=	=	=	=	=
Proliferation	=	=	=	=	=	=	=	=
CCR6	=	=	=	=	=	=	=	=
IL-9R	=	=	=	=	=	=	=	=
PU.1	=	=	=	=	=	=	=	=

Die Tabelle fasst die Ergebnisse nach Zugabe von IL-9 oder Anti-IL-9 zusätzlich zur Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat zusammen. Die Symbole beziehen sich jeweils auf die Th9- bzw. die Th17-Stimulation ohne Supplement. = bedeutet kein relevanter Unterschied, ↑ bedeutet höhere Expression, ↓ bedeutet niedrigere Expression, die Symbole in Klammern ( ) zeigen einen nicht signifikanten Trend.



## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pat und HD unter Verwendung Th9-induzierender aber auch Th17-induzierender Zytokine IL-9-produzierende Zellen zu induzieren. Dabei zeigte sich, dass bei den Pat unter gleichen inflammatorischen Kulturbedingungen keine erhöhte Bereitschaft besteht aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen proinflammatorische T-Helferzellen zu differenzieren oder vermehrt IL-9 zu produzieren. Außerdem wurde ein nahezu identischer Effekt der Th9-induzierenden und der Th17-induzierenden Zytokine auf die naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pat und HD mit einer ähnlichen Anzahl IL-9 exprimierender T-Zellen beobachtet, was einen ähnlichen Differenzierungsweg von Th9- und Th17-Zellen vermuten lässt.

### 4.1 Phänotypisierung

Nach Isolation der CD4<sup>+</sup> naiven T-Zellen erfolgte zunächst eine Untersuchung der Pat und HD auf bestehende Unterschiede in der T-Zelldifferenzierung und Zytokinexpression. Die Reinheit in der Naiven T-Zellfraktion war in Pat und HD gut. Dies ging zu Lasten einer schlechteren Reinheit in der Nicht Naiven T-Zellfraktion. Die Zusammensetzung der Nicht Naiven T-Zellfraktion von Pat und HD aus Naiven, Effektor-, Gedächtniszellen und TEMRA war annähernd gleich. Es bleibt zu beachten, dass CD45R0 bereits für die Zellseparation mit einem Antikörper markiert, später aber auch für die Definition der Subpopulationen als Marker und somit Ziel eines zweiten Antikörpers verwendet wurde. Die Angriffspunkte der beiden Antikörper gegen CD45R0 befinden sich an unterschiedlichen Epitopen des Oberflächenmoleküls. Es ist jedoch möglich, dass dadurch insbesondere Zellen welche CD45R0 nur schwach exprimieren als CD45R0<sup>-</sup> gewertet und somit den Naiven oder TEMRA zugeschrieben wurden. Gleiches gilt für das Oberflächenmolekül CD25, welches der Definition der Tregs diene. In der Naiven T-Zellfraktion waren keine Tregs zu erwarten. Dass auch in der Nicht Naiven T-Zellfraktion keine Tregs nachweisbar waren, könnte an der doppelten Antikörpermarkierung des CD25 liegen. Stellvertretend wurde die intrazelluläre Foxp3-Expression als Merkmal der Tregs betrachtet. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Pat und HD. Auch die Untersuchung der intrazellulären IL-9- und IL-17-Produktion sowie der CCR6- und IL-9R-Expression erbrachte keine signifikanten Unterschiede in der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion zwischen Pat und HD. Die IFN $\gamma$ -Produktion war in der Naiven T-Zellfraktion der HD signifikant höher.

Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Untersuchung der T-Zellen erfolgte eine Messung der IL-9-Konzentration in den Seren der Pat und HD mittels ELISA. Die IL-9-Konzentration war in beiden Gruppen negativ. Die vorher beschriebene erhöhte IL-9-Konzentration im Serum von Pat konnten wir somit nicht bestätigen [54].

## **4.2 Ähnliche Wirkung durch Th9- und Th17-Stimulation**

### **4.2.1 T-Zelldifferenzierung**

Durch die Stimulation mit Th9- und Th17-induzierenden Zytokinen wurde in der Naiven T-Zellfraktion sowohl die Differenzierung der naiven CD4+ Zellen zu Effektor- und Gedächtniszellen als auch zu Tregs induziert. Durch die Th9-Stimulation kam es zusätzlich zu einer signifikanten Differenzierung zu TEMRA, was im Falle der Th17-Stimulation ausblieb. Nach Stimulation der Nicht Naiven T-Zellfraktion blieb der proportionale Anteil der Gedächtniszellen und TEMRA durch beide Stimuli unverändert, während Effektorzellen und Tregs induziert wurden. Ein Unterschied zwischen Pat und HD ergab sich nicht.

#### **4.2.1.1 Regulatorische T-Zellen**

Untersuchungen zur Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut von Pat im Vergleich zu gesunden Kontrollen variieren in der Literatur stark in ihren Ergebnissen. Während einerseits eine negative Korrelation der Anzahl der Tregs mit der Krankheitsaktivität beschrieben und dies sogar als Indikator für die Krankheitsaktivität vorgeschlagen wird [80], zeigt eine andere Studie keinen Unterschied zwischen RA- und Osteoarthritis-Patientinnen und -Patienten [81]. Einigkeit herrscht darüber, dass die relative Anzahl der Tregs in der Synovialflüssigkeit von RA-Patientinnen und -Patienten im Vergleich zum peripheren Blut derselben Patientinnen und Patienten deutlich gesteigert ist, also eine Akkumulation am Ort des pathologischen Geschehens stattfindet. Außerdem wurde gezeigt, dass die Anzahl der Tregs in der Synovialmembran von RA-Patientinnen und -Patienten im Vergleich zu Osteoarthritis-Patientinnen und -Patienten signifikant höher ist [81]. Da trotz der Akkumulation der Tregs die Inflammation im Gelenk anhält, geht man davon aus, dass nicht die zahlenmäßige Dysbalance zwischen inflammatorischen und regulatorischen Zellen die Inflammation unterhält, sondern eine Dysfunktion der Tregs.

Nach unseren Experimenten kann festgehalten werden, dass durch proinflammatorische Stimulation naive CD4+ T-Zellen zum Teil zu Tregs differenzieren. Der Einfluss der Th9- und Th17-induzierenden Zytokine war hierbei vergleichbar. Die naiven CD4+ T-Zellen der Pat zeigten kein erhöhtes Potential zur Differenzierung zu Tregs. Bei der Betrachtung der Zytokinproduktion der Tregs ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Pat und HD. Bemerkenswert ist, dass durch beide Stimuli in HD und Pat neben IL-10-produzierenden auch IL-17-produzierende Tregs induziert wurden. Diese Th17-ähnlichen Treg-Zellen bilden dabei einen überlappenden Phänotyp zwischen Th17-Zellen und Tregs und spiegeln die Plastizität der T-Helferzellen wider. Sie scheinen auch in ihrer Funktion einen Schnittpunkt zwischen pro- und antiinflammatorischen T-Helferzellen darzustellen. Einerseits behalten sie gewisse immunsuppressive Fähigkeiten, nehmen aber über die Sekretion von IL-17 Effektorfähigkeiten an und haben somit einen negativen Einfluss auf autoimmune Erkrankungen [82]. Das Vorkommen IL-17+Foxp3+ T-Zellen wurde bei der Rheumatoiden Arthritis beschrieben [83]. Die Funktion bzw. pathogene Rolle dieser Zellen bei der RA und weiteren Autoimmunerkrankungen ist Bestandteil der aktuellen Forschung.

#### **4.2.2 Zytokinproduktion und Expression von IL-9R, CCR6 und Ki67**

Nach der 3-tägigen Kultur wurden die Zellen auf ihre intrazelluläre IL-9-, IL-17-, IFN $\gamma$ -Produktion, die Expression von CCR6 und IL-9R und die Proliferationsrate untersucht. Sowohl durch die Th9- als auch die Th17-induzierenden Zytokine konnten in ähnlichem Ausmaß in beiden Fraktionen IL-9-produzierende Zellen induziert werden. Die intrazelluläre IL-9-Produktion war in den aus vormals naiven CD4+ Zellen differenzierten Effektorzellen am höchsten.

Nur durch die Th17-induzierenden Zytokine kam es bei den HD zu einer signifikanten Zunahme der IL-17-produzierenden (in der Nicht Naiven T-Zellfraktion) und IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen (in beiden Fraktionen). Der Effekt der höheren IFN $\gamma$ -Produktion in den HD war Ausdruck einer stark erhöhten IFN $\gamma$ -Produktion der Effektorzellen durch die Th17-induzierenden Zytokine.

Die IL-9R-Expression wurde durch beide Stimuli in der Nicht Naiven T-Zellfraktion tendenziell herunterreguliert. In der Naiven T-Zellfraktion ergab sich keine Veränderung, insbesondere keine Induktion der IL-9R-Expression. Auch CCR6, ein typischer Chemokinrezeptor von Th17-Zellen, wurde durch keinen der beiden Stimuli vermehrt exprimiert. Die Proliferationsrate wurde durch beide Stimuli gleichermaßen gesteigert. Zwar zeigte sich kein signifikanter Unterschied, jedoch war die Proliferationsrate bei den HD im Vergleich zu den Pat tendenziell gesteigert. Dies galt auch für die Zytokine IL-9, IL-17 und IFN $\gamma$ . Zwar zeigte sich zumeist kein signifikanter Unterschied, die Induktion der zytokinproduzierenden Zellen war aber in den HD im Vergleich zu den Pat betont.

Insgesamt zeigte sich ein sehr ähnlicher Effekt durch die Th9- und Th17-Stimulation und somit erste Hinweise, dass die Th9 und Th17 Polarisierungswege zu ähnlichen T-Helferzellen, nämlich einem überlappenden Phänotyp zwischen Th9- und Th17-Zellen führen können. Auf die einzelnen Aspekte soll im Weiteren eingegangen werden.

#### **4.2.2.1 Möglicher Einfluss der immunsuppressiven Therapie**

Der geringe Unterschied der Induzierbarkeit der Zytokine IL-9, IL-17 und IFN $\gamma$  und der Proliferationsrate zwischen den Pat im Vergleich zu den HD könnte auf unspezifische Effekte der immunsuppressiven Therapie mit MTX und Prednisolon zurückzuführen sein. Diese hat Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung und die Zytokinproduktion. Guggino et al. konnten durch Zugabe von MTX und Methylprednisolon zu frühen RA-Proben eine Normalisierung des Ungleichgewichts zwischen Th17-Zellen und Tregs zeigen [84]. MTX wirkt nicht ausschließlich über die Hemmung der Purin- und Pyrimidinsynthese antiproliferativ, sondern hat über den Einfluss auf verschiedene Checkpoints bei der Zellteilung einen modulierenden Einfluss auf den T-Zell-Metabolismus [85]. Über die Ausschüttung von Adenosin und die konsekutive Inhibition von NF- $\kappa$ B hat MTX antiinflammatorische und antiproliferative Effekte bei der RA [86]. Auch für Glucocorticoide wurden über die Aktivierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , einem zytoplasmatischen Inhibitorprotein von NF- $\kappa$ B, eine Reduktion der Zytokinproduktion beschrieben [87]. Speziell für IL-9 wurde nachgewiesen, dass Glucocorticoide, in diesem Fall Dexamethason, die IL-9-Produktion in menschlichen T-Zellen hemmt [88].

#### **4.2.2.2 CCR6**

Im Gegensatz zu anderen T-Helferzellen besitzen Th9-Zellen, soweit bisher bekannt, keinen charakteristischen Chemokinrezeptor für Migrationsvorgänge. Sie exprimieren Chemokinrezeptoren, welche auch auf anderen T-Helferzellen zu finden sind, darunter CCR6 (Th17- Zellen/Treg), CCR3, CCR4 (Th2-Zellen) und CXCR3 (Th1-Zellen). Dabei nutzen Th9-Zellen bei autoimmunem Inflammationsgeschehen die Chemokinrezeptoren CCR6 und CXCR3, um an den Ort des pathologischen Geschehens zu migrieren [89, 90]. Diese Besonderheit der Th9-Zellen wirft wiederum die Frage auf, ob es sich bei Th9-Zellen tatsächlich um einen eigenständigen T-Helferzell-Subtyp oder um Subtypen differenzierter Th2- oder Th17-Zellen handelt. In unseren Experimenten konnte weder durch Th9- noch durch Th17-Stimulation eine CCR6-Expression in naiven CD4+ Zellen induziert werden. Die CCR6-Expression war in der Nicht Naiven T-Zellfraktion höher als in der Naiven T-Zellfraktion, zwischen Pat und HD bestand vor und nach Zellkultur kein Unterschied. Dies bestätigt die Ergebnisse von Sustal et al., die zeigen, dass CCR6 nur auf T-Zellen von Patientinnen und Patienten mit Juveniler Idiopathischer Arthritis (JIA) mit hoher Krankheitsaktivität hoch exprimiert wird, bei Patientinnen und Patienten in Remission jedoch in ähnlicher Ausprägung wie bei HD [91].

#### **4.2.2.3 IL-9R – Expression**

Um die Bedeutung des IL-9 in der Pathophysiologie der RA zu verstehen, muss die IL-9R-Expression untersucht werden. Auf peripheren Blutzellen wurde bisher keine vermehrte Expression des IL-9R bei RA-Patientinnen und -Patienten beschrieben. Die Überexpression des IL-9R findet laut mehreren Studien in der Synovia statt. Chowdhury et al. beschrieben eine Hochregulation des IL-9R auf CD4+ T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von RA-Patientinnen und -Patienten, die Daten wurden allerdings nicht veröffentlicht [39]. Ciccia et al. zeigten eine signifikant höhere IL-9R-Expression in Synovialgewebe von RA-Patientinnen und -Patienten im Vergleich zu Osteoarthrose-Patientinnen und -Patienten, ohne diese einer bestimmten Zellart zuzuordnen [56]. Unsere Ergebnisse zeigen keinen Unterschied in der IL-9R-Expression zwischen Pat und HD auf Naiven und Nicht Naiven T-Zellen des peripheren Blutes. Durch die Stimulation der CD4+ Zellen von gesunden Kontrollen mit Th9- oder Th17-Stimulus konnte die IL-9R-Expression nicht signifikant gesteigert werden. Auch bei den Pat konnte unter Th9- und Th17-Stimulation keine Überexpression des IL-9R beobachtet werden.

#### **4.2.2.4 IL-9 in den Überständen**

Die Messung der IL-9-Konzentration in den Überständen der Zellkulturen bestätigte die durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse. Die Th9-induzierenden Zytokine führten zu einer signifikant höheren IL-9-Konzentration in der Naiven T-Zellfraktion von Pat und HD im Vergleich zu einer unspezifischen Stimulation nur mit AntiCD3 und AntiCD28, während in der Nicht Naiven T-Zellfraktion durch beide Stimuli eine signifikant höhere IL-9-Konzentration nachgewiesen werden konnte. Die Th17-induzierenden Zytokine konnten in der Naiven T-Zellfraktion der Pat eine signifikant höhere IL-9-Produktion induzieren, während der Unterschied bei den HD nicht signifikant war. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Stimuli. Die IL-9-Konzentrationen waren durch die Th9-Stimulation im Vergleich zur Th17-Stimulation tendenziell erhöht. Bei den beiden Pat mit hoher Krankheitsaktivität im DAS28 wurden hohe IL-9-Konzentrationen gefunden. Dies könnte darauf hinweisen, dass Th9-Zellen und IL-9 bei hochaktiver Arthritis oder auch in entzündeten Gelenken eine bedeutsamere Rolle spielen und diese Studie durch Untersuchungen ausschließlich des peripheren Blutes den wahren Effekt von IL-9 und der Th9-induzierenden Stimuli bei der RA unterschätzt. Andererseits bestand auch bei einer gesunden Kontrolle ohne ersichtlichen Grund eine hohe IL-9-Konzentration. Zwischen der aktuellen Medikation und der IL-9-Konzentration wurde kein Zusammenhang gefunden.

#### **4.2.3 Transkriptionsfaktor PU.1**

Die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 blieb sowohl bei Pat als auch bei HD durch Th9- und Th17-Stimulation unverändert, während die IL-9-Produktion signifikant induziert werden konnte. Wieder stellt sich die Frage, ob mit unserer Methodik tatsächlich Th9-Zellen oder aber lediglich IL-9-produzierende Zellen polarisiert werden konnten.

#### **4.2.3.1 Th9-Zellen – ein eigenständiger T-Helferzellsubtyp?**

T-Helferzell-Subtypen werden definiert durch ihre spezifische Zytokinproduktion sowie durch spezifische Transkriptionsfaktoren und Chemokinrezeptoren. Ob es sich bei Th9-Zellen anhand dieser Kriterien um einen eigenständigen T-Helferzellsubtyp handelt, ist umstritten. Die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren beruht auf epigenetischen Veränderungen der entsprechenden Gene während der Differenzierung der T-Helferzellen. Erst wenn diese epigenetischen Veränderungen irreversibel sind, spricht man von einem eigenständigen Phänotyp [20]. Der Transkriptionsfaktor PU.1 kommt der Rolle eines spezifischen Transkriptionsfaktors für Th9-Zellen nach aktuellem Stand am nächsten. PU.1 besitzt die Fähigkeit Th2-Zellen in Th9-Zellen umzuwandeln, seine Fähigkeit in anderen T-Helferzellkulturen eine IL-9-Produktion herbeizuführen ist jedoch sehr beschränkt. PU.1 wird auch auf anderen T-Helferzellsubtypen exprimiert und hat dort Effekte auf die T-Zellaktivierung (Th17,- Tfh-Zellen). Zuletzt wurde ein komplexes Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren beschrieben, welches für die Th9-Differenzierung notwendig ist, dazu gehören insbesondere BATF (B cell, activating transcription factor-like) und IRF4. Beide Transkriptionsfaktoren werden aber auch für die Th2- und Th17-Zelldifferenzierung benötigt [90, 92]. Auch die Chemokinrezeptorexpression der Th9-Zellen bilden, wie bereits beschrieben, kein Alleinstellungsmerkmal [89]. Ein weiterer Aspekt ist, dass verschiedene T-Helferzellsubpopulationen (Th2, Th17, Treg) unter Stimulation der IL-9-Produktion befähigt werden können [20]. Die Ergebnisse dieser Studie, welche eine Induktion der IL-9-Produktion sowohl durch Th9- als auch durch Th17-Stimulation zeigen, lassen vermuten, dass IL-9-produzierende Zellen als Nebenprodukt während der Differenzierung von naiven und nicht naiven T-Zellen entstehen. Sie unterstützen die These, dass Th9-Zellen keinen eigenständigen T-Helferzellsubtyp bilden, sondern Th2- oder Th17-Zellen unterzuordnen sind. Andererseits wurde ein Höhepunkt der IL-9-Produktion nach 3 Tagen Kulturzeit auch in der Literatur beschrieben und es ist wahrscheinlich, dass es sich um eine vorübergehende, akute Aktivierung des IL-9-Gens handelt. Möglicherweise benötigen irreversible epigenetische Veränderungen deutlich längere Kulturzeiten, so dass unter bestimmten Umständen stabile Th9-Zellen entstehen könnten [20].



### **4.3 Einfluss von IL-9 in proinflammatorischem Milieu**

#### **4.3.1 Keine autokrine Regulation durch IL-9**

Um eine mögliche autokrine Regulation des IL-9 zu untersuchen wurden zu den Th9- und Th17-induzierenden Zytokinen zu Beginn der Zellkulturen ein IL-9-Überschuss und eine IL-9-Blockade durch einen spezifischen Antikörper zugefügt. Zunächst wurde die inhibitorische Funktion des IL-9-Antikörpers durch Nachweis reduzierter IL-9-Konzentrationen mittels ELISA in den Überständen bestätigt. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Einfluss des IL-9 auf die T-Zelldifferenzierung in den Th9- oder Th17-stimulierten Kulturen. Auch die Zytokinproduktion, die CCR6-Expression sowie die Proliferationsrate blieben durch diesen experimentellen Ansatz unbeeinflusst. Die Ergebnisse wurden durch die PCR bestätigt. Auch die PU.1-Expression blieb unverändert.

#### **4.3.2 Einfluss von IL-9 auf die IL-9R-Expression**

IL-9 hatte in diesem Versuchsansatz ebenfalls keinen Einfluss auf die IL-9R-Expression auf den CD4+ T-Zellen. Laut unseren Ergebnissen scheint es also keinen Rückkopplungsmechanismus von IL-9 produzierenden CD4+ Zellen auf die IL-9R-Expression auf diesen Zellen zu geben. Die in Kapitel 4.2.2 beschriebene Überexpression des IL-9R auf T-Zellen in der Synovialflüssigkeit entzündeter Gelenke dürfte also nicht auf die erhöhte IL-9-Konzentration in der Synovia zurückzuführen sein. In der Literatur findet man Daten, dass IL-9 auf anderen Zellen sehr wohl die Expression des IL-9R induziert, beispielsweise auf neutrophilen Granulozyten [39], welche in der Pathogenese der RA involviert sind. Durch die hohe IL-9-Konzentration am Ort des pathologischen Geschehens wird über den IL-9/IL-9R-Signalweg das Überleben der neutrophilen Granulozyten verlängert, es kommt zu einer höheren Expression von pathogenen Matrix-Metalloproteasen (MMP9) und somit zu einem größeren Gewebeschaden. Raychaudhuri et al. [93] zeigten, dass der IL-9R auch auf Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (FLS) exprimiert wird. Dies sind Zellen, welche mit für die Zerstörung des Gelenks und für die Pannusbildung verantwortlich sind. Die IL-9R Expression war bei RA- und Osteoarthrose-Patientinnen und -Patienten gleich hoch, nicht spezifisch bei der RA gesteigert. Durch die hohe IL-9-Konzentration im Gelenk bei der RA kommt es über den IL-9/IL-9R-Signalweg zu einer gesteigerten Proliferation, einer Zunahme der proinflammatorischen Zytokinproduktion (IL-6) und einer

gesteigerten Proteasenexpression (MMP3) in den FLS und somit zu einer zunehmenden Zerstörung des Gelenks.

### **4.3.3 Einfluss von IL-9 auf die Zytokinexpression in Tregs**

Der Einfluss von IL-9 auf regulatorische T-Zellen ist ein weiteres umstrittenes Thema. Zunächst demonstrierten Elyaman et al. [37] in vitro einen positiven Effekt von IL-9 auf die suppressive Funktion von Tregs von Mäusen. CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> T-Zellen verloren durch die IL-9-Blockade mittels eines neutralisierenden IL-9-Antikörpers ihre suppressive Funktion und es kam zu einer gesteigerten Proliferation von T-Effektorzellen und einer gesteigerten proinflammatorischen Zytokinproduktion. Durch die Zugabe von rekombinantem IL-9 wurde die proinflammatorische Zytokinproduktion reduziert (u.a. IL-17, IFN $\gamma$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) und die Proliferation der T-Effektorzellen gehemmt. In vivo zeigten sie diesen Effekt ebenfalls: IL-9R<sup>-/-</sup> negative Mäuse zeigten einen schwereren Verlauf der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis und einen Defekt in der suppressiven Aktivität der Tregs. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von Mitra et al. [94] wiederum legen nahe, dass IL-9 bei der RA einen negativen Einfluss auf die Funktion der Tregs hat. Die zahlenmäßig in der Synovialflüssigkeit von RA-Patientinnen und -Patienten stark vertretenen Tregs seien funktionell eingeschränkt, weshalb die lokale Inflammation nicht supprimiert werden könne. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass durch Stimulation von T-Zellen aus Synovialflüssigkeit unter IL-9-Rezeptorblockade die Anzahl IL-10- und TGF $\beta$ -exprimierender Tregs steigt. Die Stimulation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Kontrollen unter Zugabe von rekombinantem IL-9 resultierte in einer geringeren Anzahl IL-10- oder TGF $\beta$ -exprimierender Tregs. Mit o.g. Versuchsansatz sollte der Einfluss von IL-9 auf die Differenzierung und die Zytokinproduktion von Tregs in proinflammatorischem Milieu untersucht werden. Die Hypothese, dass IL-9 einen negativen Einfluss auf die Funktion der Tregs hat, konnten wir nicht zeigen, da wir nur eine phänotypische Charakterisierung der Tregs vorgenommen haben und keinen funktionellen Assay. Auf die Anzahl der Tregs und deren Zytokinproduktion hatte der IL-9-Exzess und die IL-9-Blockade unter Th9- bzw. Th17-Stimulation jedenfalls keinen signifikanten Einfluss.

#### **4.3.4 IL-9-Blockade**

Durch die spezifische Blockade von IL-9 mittels IL-9-Antikörper konnte zwar das freie IL-9 in den Überständen reduziert werden, unklar bleibt jedoch ob die IL-9-Antikörper tatsächlich neutralisierend wirken. Der IL-9-Antikörper wurde möglicherweise zu niedrig dosiert, um den Sättigungsbereich der Kurve zu erreichen, oder die labortechnischen IL-9-Antikörper besitzen durch Bindung an unterschiedliche Bindungsstellen möglicherweise nicht die Funktionalität um die Signalinduktion des IL-9 komplett zu blockieren. Höhere Dosierungen des Antikörpers oder die Verwendung eines IL-9R-Antikörpers könnten ergänzende Ergebnisse liefern.

## **4.4 Methodische Einschränkungen**

### **4.4.1 Heterogenität der Pat-Kohorte**

Die Pat stellen eine heterogene Probandengruppe dar. Die Krankheitsaktivität und Medikation der einzelnen Patientinnen und Patienten variieren. Bedauerlicherweise konnten wir für unsere Studie nur Pat unter immunsuppressiver Therapie und nicht Therapie-naive Pat bei der Erstdiagnose rekrutieren. Welche Beobachtungen daher auf die Therapie und welche auf die RA zurückzuführen sind, ist schwer auseinander zu halten. Insbesondere die deutlich geringere Proliferationsfähigkeit der peripheren Lymphozyten der Pat könnte durch die Behandlung mit konventionellen DMARDs oder Glukokortikoiden bedingt sein.

### **4.4.2 Geringe Zahl der Proben**

Ein weiterer Kritikpunkt ist die geringe Anzahl an Proben. Dies liegt begründet in dem explorativen sowie hypothesengenerierenden Charakter der vorliegenden Arbeit.

### **4.4.3 Kurze Kulturzeit**

Die Wahl der Kulturzeit fiel auf 3 Tage, weil in Vorversuchen nach diesem Zeitraum durchflusszytometrisch der höchste prozentuale Anteil zytokinexprimierender Zellen gemessen werden konnte. Durchflusszytometrisch kann jedoch nur eine Momentaufnahme der aktuellen intrazellulären Zytokinproduktion untersucht werden, welche im Laufe der Kultur deutlichen Schwankungen unterlegen sein kann. Für die Differenzierung von IL-9+ Zellen war der Kulturzeitraum ausreichend. Ob tatsächlich Th9-Zellen differenziert werden konnten, ist unter anderem aufgrund der fehlenden PU.1-Expression fraglich. Möglicherweise hätten sich über einen längeren Kulturzeitraum mehr naive Zellen zu reifen Zellen differenziert und etwaige Unterschiede wären deutlicher hervorgetreten.

### **4.4.4 Dosierung des Antikörpers gegen IL-9**

Wie bereits in Kapitel 4.3.4 diskutiert, müssen unterschiedliche Dosierungen des IL-9-Antikörpers getestet werden, um die maximale neutralisierende Wirkung zu erreichen.

## 4.5 Konklusion

Mit dieser experimentellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen als auch nicht naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Th17-induzierende Zytokine (TGF $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-23) genauso wie durch Th9-induzierende Zytokine (IL4, TGF $\beta$  und IL2) zur IL-9-Produktion angeregt werden können. Eine Expression des für Th9 bisher als am spezifischsten beschriebenen Transkriptionsfaktors PU.1 wurde dabei nicht induziert. Wir konnten daher zeigen, dass eine bisher noch nicht beschriebene Kombination an Zytokinen ebenfalls IL-9-produzierende Zellen induziert. IL-9 scheint kein spezifisches Zytokin der Th9-Zellen zu sein, sondern wird nach unseren Ergebnissen sozusagen als „Nebenprodukt“ bei der Differenzierung zu reifen Zellen, eventuell auch nur vorübergehend, aktiviert. Ob Th9-Zellen in vivo tatsächlich eine eigenständige und stabile T-Helferzellsubpopulation darstellen, bleibt kontrovers und wird durch die Ergebnisse dieser Studie nicht unterstützt. Andererseits scheint das Konzept von stabilen T-Helferzellsubpopulationen und spezifischen Transkriptionsfaktoren in Angesicht des neueren Konzepts der enormen T-Zellplastizität insgesamt veraltet. Tendenziell konnten wir zeigen, dass naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Pat mit höherer Krankheitsaktivität durch o.g. Stimulationen zu einer höheren IL-9-Produktion angeregt werden können. Diese Hypothese bleibt durch eine größere Kohorte zu verifizieren. Durch IL-9-Exzess und eine IL-9-Blockade konnte kein signifikanter Einfluss von IL-9 in inflammatorischem Milieu auf die T-Zelldifferenzierung nachgewiesen werden. Die Rolle des IL-9 in der Pathogenese der RA und weiteren Autoimmunerkrankungen bleibt weiter unvollständig verstanden, so dass IL-9 zum jetzigen Zeitpunkt nicht als therapeutisches Ziel in Betracht kommt.

## 5 Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronische Autoimmunerkrankung, deren Pathogenese noch unvollständig verstanden ist. Eine Dysbalance von pro- und antiinflammatorischen T-Helferzellen ist an der Entzündungsreaktion wesentlich beteiligt. Die Rolle von proinflammatorischen Th17-Zellen und regulatorischen Tregs ist bereits recht gut erforscht und bietet bereits erfolgreiche Therapieansätze. Umstritten bleibt die Rolle der sogenannten Th9-Zellen, welche pro- und antiinflammatorische Wirkungen zu vereinen scheinen. Die vorliegende Untersuchung umfasst die Daten von 7 RA-Patientinnen und -Patienten und 10 gesunden Kontrollen. Nach Isolation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte eine durchflusszytometrische Phänotypisierung der T-Zellen. Diese Phänotypisierung zeigte keinen relevanten Unterschied zwischen Pat und HD. Im Anschluss an eine 3-tägige Zellkultur von naiven und nicht naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter Th9- und Th17-Stimulation erfolgte eine Auswertung mittels Durchflusszytometrie, RT-PCR und ELISA. Hierbei wurde eine sehr ähnliche Wirkung beider Stimuli auf die T-Zelldifferenzierung, die Zytokinproduktion und die Expression von Oberflächenmarkern beobachtet. Insbesondere die IL-9-Produktion wurde durch beide Stimuli signifikant induziert. Es scheint, dass IL-9-produzierende Zellen durch unterschiedliche Differenzierungswege induziert werden. Dies unterstützt die kontroverse Hypothese, dass Th9-Zellen keinen eigenständigen T-Helferzellsubtyp darstellen. Im Vergleich zu den Pat in Remission war die induzierte Zytokinproduktion (IL-9, IL-17, IFN $\gamma$ ) bei den HD betont. Dies liegt vermutlich an unspezifischen Effekten durch die immunsuppressive Therapie. Bei den beiden Patientinnen und Patienten mit der höchsten Krankheitsaktivität jedoch wurde die höchste IL-9-Konzentration in den Überständen nach Stimulation festgestellt. Ein IL-9-Exzess bzw. eine IL-9-Blockade hatte keinen signifikanten Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung, die Zytokinproduktion und die Expression der Oberflächenmarker und des Transkriptionsfaktors. Das Vorliegen eines relevanten IL-9-regulierenden, autokrinen Mechanismus ist daher unwahrscheinlich. Zusammenfassend ergeben sich Hinweise, dass es sich bei IL-9-produzierenden Zellen aufgrund der diversen Differenzierungswege nicht um einen eigenständige T-Helferzellsubtyp handelt. Es benötigt einen sehr gut ausbalancierten Zytokincocktail und vermutlich eine längere Kulturzeit, um tatsächlich Th9-Zellen zu polarisieren. Ob diese in vivo vorkommen und eine Rolle in der Pathogenese der RA spielen ist zum jetzigen Zeitpunkt ebenso unklar wie die Rolle des IL-9 in der Pathogenese der RA. Daher kommt IL-9 als therapeutisches Ziel nach jetziger Kenntnis nicht in Betracht.

## 5.1 Abstract

Rheumatoid arthritis is a chronic autoimmune disease whose pathogenesis is not yet fully understood. An imbalance of proinflammatory and anti-inflammatory T helper cells is essential to the inflammatory response. The role of proinflammatory Th17 cells and regulatory T cells has already been researched well and offers successful therapeutic approaches. The role of Th9 cells, which seem to combine proinflammatory and anti-inflammatory effects, remains controversial. The present study includes data from 7 RA patients and 10 healthy controls. T cells were phenotyped by flow cytometry after isolation of naive CD4<sup>+</sup> T cells from PBMC. This phenotyping showed no relevant difference between RA patients and HD. Following a 3-day cell culture of naive and non-naive CD4<sup>+</sup> T cells under Th9- and Th17-inducing conditions, the evaluation was carried out using flow cytometry, RT-PCR and ELISA. A very similar effect of the Th9- and Th17-stimulus on T-cell differentiation, cytokine production and the expression of surface markers was observed. IL-9 production was significantly induced by both stimuli. It appears that IL-9 producing cells are induced by different pathways of differentiation. This supports the controversial hypothesis that Th9 cells are not an independent Th cell subset. In comparison to RA patients in remission, the induced cytokine production (IL-9, IL-17, IFN $\gamma$ ) was higher in HD. This is probably due to unspecific effects of immunosuppressive therapy. Two patients with the highest disease activity, however, also showed the highest IL-9 concentration in the supernatants after stimulation. Neither an IL-9 excess nor an IL-9 blockade had a significant influence on T-cell differentiation, cytokine production, the expression of surface markers and of the transcription factor PU.1. The existence of a relevant IL-9-regulating autocrine mechanism seems unlikely. In summary, there is evidence that IL-9-producing cells are not an independent Th cell subset. It takes a very well-balanced cytokine cocktail and probably a longer cell culture to polarize actual Th9 cells. Whether Th9 cells occur *in vivo* and play a role in the pathogenesis of RA remains unclear as well as the role of IL-9 in the pathogenesis of RA. Therefore, according to present knowledge, IL-9 is not an option as a therapeutical target.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] D. P. Symmons. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2002;16:707-22.
- [2] Y. Alamanos, A. A. Drosos. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 2005;4:130-6.
- [3] D. M. Lee, M. E. Weinblatt. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2001;358:903-11.
- [4] I. B. McInnes, G. Schett. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 2011;365:2205-19.
- [5] F. Angelotti, A. Parma, G. Cafaro, R. Capecchi, A. Alunno, I. Puxeddu. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 2017;35:368-78.
- [6] A. A. Jilani, C. G. Mackworth-Young. The role of citrullinated protein antibodies in predicting erosive disease in rheumatoid arthritis: a systematic literature review and meta-analysis. *Int J Rheumatol*, 2015;2015:728610.
- [7] R. J. Noelle, E. C. Nowak. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol*, 2010;10:683-7.
- [8] M. Stassen, E. Schmitt, T. Bopp. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2012;1247:56-68.
- [9] M. H. Kaplan. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev*, 2013;252:104-15.
- [10] M. H. Kaplan, M. M. Hufford, M. R. Olson. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol*, 2015;15:295-307.
- [11] W. G. Rojas-Zuleta, E. Sanchez. IL-9: Function, Sources, and Detection. *Methods Mol Biol*, 2017;1585:21-35.
- [12] C. Uyttenhove, R. J. Simpson, J. Van Snick. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988;85:6934-8.
- [13] E. Schmitt, R. Van Brandwijk, J. Van Snick, B. Siebold, E. Rude. TCGF III/P40 is produced by naive murine CD4+ T cells but is not a general T cell growth factor. *Eur J Immunol*, 1989;19:2167-70.
- [14] J. Van Snick, A. Goethals, J. C. Renauld, E. Van Roost, C. Uyttenhove, M. R. Rubira *et al.* Cloning and characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor (P40). *J Exp Med*, 1989;169:363-8.
- [15] J. C. Renauld, A. Goethals, F. Houssiau, E. Van Roost, J. Van Snick. Cloning and expression of a cDNA for the human homolog of mouse T cell and mast cell growth factor P40. *Cytokine*, 1990;2:9-12.
- [16] B. A. Mock, M. Krall, C. A. Kozak, M. N. Nesbitt, O. W. McBride, J. C. Renauld *et al.* IL9 maps to mouse chromosome 13 and human chromosome 5. *Immunogenetics*, 1990;31:265-70.
- [17] A. Jash, A. Sahoo, G. C. Kim, C. S. Chae, J. S. Hwang, J. E. Kim *et al.* Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation. *J Biol Chem*, 2012;287:15445-57.
- [18] H. C. Chang, S. Sehra, R. Goswami, W. Yao, Q. Yu, G. L. Stritesky *et al.* The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*, 2010;11:527-34.
- [19] V. Staudt, E. Bothur, M. Klein, K. Lingnau, S. Reuter, N. Grebe *et al.* Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*, 2010;33:192-202.
- [20] M. H. Kaplan. The transcription factor network in Th9 cells. *Semin Immunopathol*, 2017;39:11-20.



- [21] K. M. Murphy, P. Travers, M. Walport. Janeway Immunologie, 7 ed; 2009.
- [22] J. Zhu, H. Yamane, W. E. Paul. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*, 2010;28:445-89.
- [23] R. Q. Hintzen, R. de Jong, S. M. Lens, M. Brouwer, P. Baars, R. A. van Lier. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J Immunol*, 1993;151:2426-35.
- [24] L. T. Clement. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *J Clin Immunol*, 1992;12:1-10.
- [25] A. Larbi, T. Fulop. From "truly naive" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A*, 2014;85:25-35.
- [26] T. R. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, R. L. Coffman. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 1986;136:2348-57.
- [27] S. P. Singh, H. H. Zhang, J. F. Foley, M. N. Hedrick, J. M. Farber. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol*, 2008;180:214-21.
- [28] J. Yang, M. S. Sundrud, J. Skepner, T. Yamagata. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 2014;35:493-500.
- [29] S. Sarkar, D. A. Fox. Targeting IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 2010;36:345-66.
- [30] S. Sakaguchi. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 2005;6:345-52.
- [31] M. Veldhoen, C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmbj, A. Westendorf, J. Buer *et al*. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 2008;9:1341-6.
- [32] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka *et al*. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006;441:235-8.
- [33] V. Dardalhon, A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel *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;9:1347-55.
- [34] L. Knoops, J. C. Renaud. IL-9 and its receptor: from signal transduction to tumorigenesis. *Growth Factors*, 2004;22:207-15.
- [35] J. B. Demoulin, J. C. Renaud. Signalling by cytokines interacting with the interleukin-2 receptor gamma chain. *Cytokines Cell Mol Ther*, 1998;4:243-56.
- [36] F. A. Houssiau, J. C. Renaud, M. Stevens, F. Lehmann, B. Lethe, P. G. Coulie *et al*. Human T cell lines and clones respond to IL-9. *J Immunol*, 1993;150:2634-40.
- [37] W. Elyaman, E. M. Bradshaw, C. Uyttenhove, V. Dardalhon, A. Awasthi, J. Imitola *et al*. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009;106:12885-90.
- [38] L. M. Fawaz, E. Sharif-Askari, O. Hajoui, A. Soussi-Gounni, Q. Hamid, B. D. Mazer. Expression of IL-9 receptor alpha chain on human germinal center B cells modulates IgE secretion. *J Allergy Clin Immunol*, 2007;120:1208-15.
- [39] K. Chowdhury, U. Kumar, S. Das, J. Chaudhuri, P. Kumar, M. Kanjilal *et al*. Synovial IL-9 facilitates neutrophil survival, function and differentiation of Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2018;20:18.
- [40] C. Druez, P. Coulie, C. Uyttenhove, J. Van Snick. Functional and biochemical characterization of mouse P40/IL-9 receptors. *J Immunol*, 1990;145:2494-9.
- [41] H. F. Pan, R. X. Leng, X. P. Li, S. G. Zheng, D. Q. Ye. Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013;24:515-22.

- [42] H. H. Faulkner, N. Renauld JC, Van Snick J, Grecis R. Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection. *European journal of immunology*, 1997.
- [43] Z. Wiener, A. Falus, S. Toth. IL-9 increases the expression of several cytokines in activated mast cells, while the IL-9-induced IL-9 production is inhibited in mast cells of histamine-free transgenic mice. *Cytokine*, 2004;26:122-30.
- [44] U. A. Temann, Y. Laouar, E. E. Eynon, R. Homer, R. A. Flavell. IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *Int Immunol*, 2007;19:1-10.
- [45] V. Steenwinckel, J. Louahed, C. Orabona, F. Huaux, G. Warnier, A. McKenzie *et al.* IL-13 mediates in vivo IL-9 activities on lung epithelial cells but not on hematopoietic cells. *J Immunol*, 2007;178:3244-51.
- [46] U. A. Temann, P. Ray, R. A. Flavell. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest*, 2002;109:29-39.
- [47] R. Purwar, C. Schlapbach, S. Xiao, H. S. Kang, W. Elyaman, X. Jiang *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med*, 2012;18:1248-53.
- [48] <https://www.rndsystems.com/pathways/il-9-signaling-pathways-their-primary-biological-effects-in-different-immune-cell-types>. IL-9 Signaling Pathways. Stand: 08.02.2021.
- [49] Y. Deng, Z. Wang, C. Chang, L. Lu, C. S. Lau, Q. Lu. Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials. *Hum Immunol*, 2017;78:120-8.
- [50] E. C. Nowak, C. T. Weaver, H. Turner, S. Begum-Haque, B. Becher, B. Schreiner *et al.* IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med*, 2009;206:1653-60.
- [51] W. G. Rojas-Zuleta, G. Vasquez. Th9 lymphocytes: A recent history from IL-9 to its potential role in rheumatic diseases. *Autoimmun Rev*, 2016;15:649-55.
- [52] F. Ciccia, G. Guggino, A. Ferrante, P. Cipriani, R. Giacomelli, G. Triolo. Interleukin-9 and T helper type 9 cells in rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol*, 2016;185:125-32.
- [53] I. H. Khan, V. V. Krishnan, M. Ziman, K. Janatpour, T. Wun, P. A. Luciw *et al.* A comparison of multiplex suspension array large-panel kits for profiling cytokines and chemokines in rheumatoid arthritis patients. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009;76:159-68.
- [54] A. T. Dantas, C. D. Marques, L. F. da Rocha Junior, M. B. Cavalcanti, S. M. Goncalves, P. R. Cardoso *et al.* Increased Serum Interleukin-9 Levels in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenic Role or Just an Epiphenomenon? *Dis Markers*, 2015;2015:519638.
- [55] J. M. Hughes-Austin, K. D. Deane, L. A. Derber, J. R. Kolfenbach, G. O. Zerbe, J. Sokolove *et al.* Multiple cytokines and chemokines are associated with rheumatoid arthritis-related autoimmunity in first-degree relatives without rheumatoid arthritis: Studies of the Aetiology of Rheumatoid Arthritis (SERA). *Ann Rheum Dis*, 2013;72:901-7.
- [56] F. Ciccia, G. Guggino, A. Rizzo, A. Manzo, B. Vitolo, M. P. La Manna *et al.* Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2015.
- [57] P. L. van Riel, L. Renskers. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 2016;34:S40-S4.
- [58] M. Riekert. Der Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf T-Zellsubpopulationen bei gesunden Probanden und Patienten mit rheumatischen Erkrankungen. 2017.

- [59] D. Aletaha, T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, 3rd *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 2010;62:2569-81.
- [60] Z. Lin, N. Y. Chiang, N. Chai, D. Seshasayee, W. P. Lee, M. Balazs *et al.* In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells. *Nat Protocols*, 2014;9:1563-77.
- [61] D. E. Pegg. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*, 2015;1257:3-19.
- [62] M. Biotec. CD4+ T Cell Isolation Kit.
- [63] M. Biotec. Naive CD4+ T Cell Isolation Kit.
- [64] S. Llames, E. Garcia-Perez, A. Meana, F. Larcher, M. del Rio. Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Eng Part B Rev*, 2015;21:345-53.
- [65] F. C. Garbrecht, C. Russo, M. E. Weksler. Long-term growth of human T cell lines and clones on anti-CD3 antibody-treated tissue culture plates. *J Immunol Methods*, 1988;107:137-42.
- [66] P. S. Linsley, J. A. Ledbetter. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol*, 1993;11:191-212.
- [67] A. Jager, V. Dardalhon, R. A. Sobel, E. Bettelli, V. K. Kuchroo. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol*, 2009;183:7169-77.
- [68] R. Goswami, R. Jabeen, R. Yagi, D. Pham, J. Zhu, S. Goenka *et al.* STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J Immunol*, 2012;188:968-75.
- [69] T. P. Singh, M. P. Schon, K. Wallbrecht, A. Gruber-Wackernagel, X. J. Wang, P. Wolf. Involvement of IL-9 in Th17-associated inflammation and angiogenesis of psoriasis. *PLoS One*, 2013;8:e51752.
- [70] [http://www.biologend.com/live\\_dead](http://www.biologend.com/live_dead). Stand: 08.02.2021.
- [71] V. Appay, R. A. van Lier, F. Sallusto, M. Roederer. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*, 2008;73:975-83.
- [72] T. Chatila, L. Silverman, R. Miller, R. Geha. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol*, 1989;143:1283-9.
- [73] S. Nylander, I. Kalies. Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1999;224:69-76.
- [74] E. Engvall, P. Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971;8:871-4.
- [75] <https://sciencev2.orf.at/stories/1707141/index.html>. Prinzip des Sandwich-ELISA. Stand: 08.02.2021.
- [76] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 1993;11:1026-30.
- [77] R. Higuchi, G. Dollinger, P. S. Walsh, R. Griffith. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 1992;10:413-7.
- [78] M. W. Pfaffl. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 2004;1/04 10. Jahrgang.
- [79] Machery-Nagel. RNA Isolation User Manual 2015.
- [80] S. Y. Kawashiri, A. Kawakami, A. Okada, T. Koga, M. Tamai, S. Yamasaki *et al.* CD4+CD25(high)CD127(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2011;38:2517-21.
- [81] B. Moradi, P. Schnatzer, S. Hagmann, N. Rosshirt, T. Gotterbarm, J. P. Kretzer *et al.* CD4(+)CD25(+)/highCD127low/(-) regulatory T cells are enriched in

- rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints--analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. *Arthritis Res Ther*, 2014;16:R97.
- [82] R. Du, H. Zhao, F. Yan, H. Li. IL-17+Foxp3+ T cells: an intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 2014;96:39-48.
- [83] N. Komatsu, K. Okamoto, S. Sawa, T. Nakashima, M. Oh-hora, T. Kodama *et al.* Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med*, 2014;20:62-8.
- [84] G. Guggino, A. Giardina, A. Ferrante, G. Giardina, C. Schinocca, G. Sireci *et al.* The in vitro addition of methotrexate and/or methylprednisolone determines peripheral reduction in Th17 and expansion of conventional Treg and of IL-10 producing Th17 lymphocytes in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 2015;35:171-5.
- [85] A. A. Fernandez-Ramos, V. Poindessous, C. Marchetti-Laurent, N. Pallet, M. A. Lorient. The effect of immunosuppressive molecules on T-cell metabolic reprogramming. *Biochimie*, 2016;127:23-36.
- [86] S. Majumdar, B. B. Aggarwal. Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of I kappa B alpha phosphorylation and degradation. *J Immunol*, 2001;167:2911-20.
- [87] R. I. Scheinman, P. C. Cogswell, A. K. Lofquist, A. S. Baldwin, Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, 1995;270:283-6.
- [88] L. E. Holz, K. P. Jakobsen, J. Van Snick, F. Cormont, W. A. Sewell. Dexamethasone inhibits IL-9 production by human T cells. *J Inflamm (Lond)*, 2005;2:3.
- [89] E. E. Kara, I. Comerford, C. R. Bastow, K. A. Fenix, W. Litchfield, T. M. Handel *et al.* Distinct chemokine receptor axes regulate Th9 cell trafficking to allergic and autoimmune inflammatory sites. *J Immunol*, 2013;191:1110-7.
- [90] C. Micosse, L. von Meyenn, O. Steck, E. Kipfer, C. Adam, C. Simillion *et al.* Human "TH9" cells are a subpopulation of PPAR-gamma(+) TH2 cells. *Sci Immunol*, 2019;4.
- [91] G. A. K.N. Sustal, R. Trippen, K. Höfner, M. Prelog. CCR6+ T-Cells in children with juvenile idiopathic arthritis.
- [92] R. Jabeen, R. Goswami, O. Awe, A. Kulkarni, E. T. Nguyen, A. Attenasio *et al.* Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J Clin Invest*, 2013;123:4641-53.
- [93] S. K. Raychaudhuri, C. Abria, E. M. Maverakis, S. P. Raychaudhuri. IL-9 receptor: Regulatory role on FLS and pannus formation. *Cytokine*, 2018;111:58-62.
- [94] G. R. Chakraborty S, Kumari R, Mitra D. . Impact of Interleukin-9 on the Immune Suppressive Functions of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis [abstract]. *Arthritis Rheumatol*, 2019;71 (suppl 10). .
- [95] J. Heim, G. Almanzar, M. Schmalzing, M. Gernert, H. P. Tony, M. Prelog. Induction of IL-9 in Peripheral Lymphocytes of Rheumatoid Arthritis Patients and Healthy Donors by Th17-Inducing Cytokine Conditions. *Front Immunol*, 2021;12:668095.

# Appendix

## I Abkürzungsverzeichnis

ACR	engl. American College of Rheumatology
ANA	Antikörper gegen nukleäre Antigene
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cy7
BFA	Brefeldin A
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
BV	Brilliant Violet
bzw.	beziehungsweise
CCP-AK	Antikörper gegen citrullinierte Proteine
CCR	Chemokinrezeptorexpression
CD	engl. Cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DAS28	engl. Disease Activity Score 28
DMARDs	Disease-modifying anti-rheumatic drugs
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EULAR	engl. European League Against Rheumatism
FACS	engl. Fluorescence-activated cell scanning
FCS	Fetales Kälber Serum
FoxP3	engl. Forkhead-Box-Protein P3
FSC	engl. Forward-Scatter
Gy	engl. Gray
HD	engl. Healthy donors
HRP	horseradish peroxidase
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin
JIA	Juvenile Idiopathische Arthritis
JAK	Januskinase
LCA	engl. leukocyte common antigen
MACS	engl. Magnetic Activated Cell Sorting
Max	Maximum
MHC	engl. major Histocompatibility Complex
Min	Minimum
mRNA	messengerRNA
MSC	engl. Mesenchymal stem cells
NaCl	Natriumchlorid
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
nTregs	Natürliche regulatorische T-Zellen
OA	Osteoarthrose
Pat	RA-Patientinnen und -Patienten
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS engl.	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
pg	Pikogramm
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RA	Rheumatoide Arthritis

RORC	engl. RAR-related orphan receptor C
RORYt	engl. RAR-related orphan receptor $\gamma$ t
RPMI	engl. Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung
SF	Synovialflüssigkeit
SMAD	engl. Small mother against decapentaplegic
SSC	engl. Sideways-Scatter
STAT	engl. Signal Transducers and Activators of Transcription
T-bet	engl. T-box protein expressed in T cells
TCGF III	engl. T lymphocyte growth factor
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMRA	engl. Terminally differentiated effector memory CD45RA+ T cells
Tfh	Follikuläre T-Helferzelle
Th	T-Helferzellen
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Treg	Regulatorische T-Zelle
VAS	Visuelle Analogskala
vgl.	vergleiche
vs.	versus

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Einfluss des Zytokinmilieus auf die T-Zelldifferenzierung. Nachdem die naive CD4 <sup>+</sup> T-Zelle über ihren T-Zellrezeptor ein Antigen erkennt, welches von Antigenpräsentierenden Zellen über ihr MHC-Klasse-II-Molekül präsentiert wird, differenziert sie abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu zu einer reifen T-Helferzelle (Th2, Th9, Treg, Th17, Th1). Für die jeweilige Helferzelle sind neben den jeweiligen Transkriptionsfaktoren (GATA3, PU.1, Foxp3, ROR $\gamma$ t, T-bet) auch die Signalwege über STAT und SMAD Moleküle dargestellt. Abbildung modifiziert nach [10].....	4
Abbildung 2 IL-9R. IL-9R besteht aus einer $\alpha$ -Kette und der gemeinsamen $\gamma$ -Kette. Nach Bindung von IL-9 wird der Signalweg über konstitutiv gebundene JAK in Gang gesetzt. Durch gegenseitige Phosphorylierung der JAKs werden STAT-Proteine aktiviert. Abbildung modifiziert nach [7].....	6
Abbildung 3 IL-9 Funktion. IL-9 hat diverse Effekte auf unterschiedliche Zellen, in dieser Abbildung sind einige schematisch dargestellt. Abbildung modifiziert nach [48].....	8
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation. Abbildung modifiziert nach [60].....	20
Abbildung 5 Repräsentative Darstellung der prozentuale Zytokinproduktion nach 3 und nach 5 Tagen bei HD.....	24
Abbildung 6 Prinzip der Zombiefärbung modifiziert nach [70].....	25
Abbildung 7 Prinzip des Sandwich ELISA. Abbildung modifiziert nach [75].....	29
Abbildung 8 Reinheit. Repräsentatives Beispiel für die Bestimmung der Reinheit durch die Oberflächenmarker CD3, CD4, CD45R0 und CD27 anhand einer gesunden Kontrolle. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf das Lymphozytengate nach Aussortieren der toten Zellen durch die Zombiefärbung. Da durch die Isolation eine Reinheit von >95% CD4 <sup>+</sup> Zellen in allen Proben bestand wird *dieses Fenster im Folgenden CD4 <sup>+</sup> Lymphozytengate genannt.....	40
Abbildung 9 Repräsentatives Beispiel des Gatings von Tregs bzw. Foxp3 <sup>+</sup> Zellen anhand einer gesunden Kontrolle in der Naiven T-Zellfraktion. Es wurden keine Tregs nachgewiesen.....	41
Abbildung 10 Unterschiede in der Produktion von (A) IL-9, IL-17, IFN $\gamma$ und IL-9R und (B) CCR6 und Ki67 zwischen Pat und HD in der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion. Darstellung in Prozent des CD4 <sup>+</sup> -Lymphozytengate als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Naive T-Zellen der HD zeigen eine signifikant höhere Produktion von IFN $\gamma$ als die der Pat. Vergleich HD vs. Pat mittels Mann-Whitney-U Test. Signifikante p-Werte sind angegeben.....	43
Abbildung 11 Repräsentative Beispiele der Zytokin-, IL-9R-, Ki67- und Chemokinexpression in HD und Pat in der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion. Die Prozentangaben beziehen sich auf das CD4 <sup>+</sup> Lymphozytengate.....	44
Abbildung 12 Differenzierung der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen von HD und Pat zu reifen T-Zellen durch Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Subpopulationen (A) Naive, (B) Gedächtniszellen, (C) Effektorzellen, (D) TEMRA und (E) Treg am CD4 <sup>+</sup> Lymphozytengate als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand vor	

Stimulation (Prä) und nach Kultur mit Th9-Stimulus (Th9) oder Th17-Stimulus (Th17). .....	47
Abbildung 13 Repräsentative Darstellung der Verteilung der Subpopulationen in Prozent des CD4+ Lymphozytengates anhand der Oberflächenmarker CD27 und CD45R0 vor Stimulation (Prä) und nach Th9- bzw. Th17-Stimulation in einer HD- und einer Pat-Probe. .....	49
Abbildung 14 Intrazelluläre (A) IL-9-, (B) IL-17- und (C) IFN $\gamma$ - Produktion sowie (D) IL-9R-, (E) Ki67- und (F) CCR6-Expression vor Stimulation (Prä) sowie nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion. Dargestellt sind die prozentualen Anteile am CD4+ Lymphozytengate als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Vergleich Prä vs- Th9 bzw. Th17 mittels Wilcoxon-Rank Test und Th9 vs. Th17 mittels Mann-Whitney-U Test. Signifikante p-Werte sind angegeben. ...	52
Abbildung 15 Repräsentative Darstellung der Zytokinproduktion, der Ki67-, IL-9R- und der CCR6-Expression in Prozent des CD4+ Lymphozytengates in der Naiven und der Nicht Naiven Fraktion einer HD und einer Pat-Probe nach (A) Th9- bzw. (B) Th17-Stimulation.....	55
Abbildung 16 IL-9-, IL-17-, PU.1- und IL-9R-Expression nach Th9- und Th17-Stimulation der Naiven und der Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat in der RT-PCR. Darstellung der $\Delta$ cT-Werte für (A) IL-9, (B) IL-9R, (C) PU.1 und (D) IL-9R als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Th0 steht für die unspezifische Stimulation. Vergleich Th0- vs. Th9-Stimulus und Th0 vs. Th17-Stimulus mittels Mann-Whitney-U Test, signifikante Werte sind angegeben. Bei den Parametern IL-17 und PU.1 mussten aufgrund einer zu großen Differenz der CT-Werte der Duplikate Messwerte aus der Auswertung genommen werden. ....	57
Abbildung 17 IL-9 Konzentration in den Überständen in pg/ml nach Kultur der (A) Naiven- und (B) Nicht Naiven T-Zellfraktion nach unspezifischer Th0- und spezifischer Th9- bzw. Th17- Stimulation von HD und Pat. Darstellung als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Vergleich Th0- vs. Th9-Stimulation und Th0- vs. Th17-Stimulation mittels Mann-Whitney-U Test, signifikante p-Werte sind angegeben.....	60
Abbildung 18 Unterschiede der IL-9-Konzentration in den Überständen nach Th9- bzw. Th17- Stimulation der (A) Naiven und (B) Nicht Naiven T-Zellfraktion zwischen niedriger, mittlerer und hoher Krankheitsaktivität der Pat anhand des DAS28-Scores und gesunden Kontrollen. Niedrige/ fehlende Krankheitsaktivität = DAS28 0-3,2 (N=3), mittlere Krankheitsaktivität = DAS28 3,2-5,1 (N=2) und hohe Krankheitsaktivität DAS28 >5,1 (N=2). ....	61
Abbildung 19 Intrazelluläre Zytokinproduktion und IL-9R-Expression in (A) Effektor-, (B) Gedächtniszellen, (C) TEMRA (D) naiven Zellen und (E) Tregs nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat. Darstellung in Prozent der jeweiligen Subpopulation als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Vergleich Th9-Stimulus vs. Th17-Stimulus mittels Mann-Whitney-U Test, Unterschiede waren nicht signifikant. Signifikante Unterschiede zwischen HD und Pat sind angegeben. .....	64
Abbildung 20 Einfluss von rekombinantem IL-9 und einer IL-9-Blockade zusätzlich zu der (A,C) Th9- und (B,D) Th17-Stimulation auf die T-Zelldifferenzierung nach Stimulation der (A,B) Naiven und (C,D) Nicht Naiven T-Zellfraktion in HD und Pat. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Subpopulationen am CD4+ Lymphozytengate als	



Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Unterschiede waren nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test). ..... 68

Abbildung 21 Einfluss von rekombinantem IL-9 und einer IL-9-Blockade zusätzlich zu der (A, C, E, G) Th9- und (B, D, F, H) Th17-Stimulation der Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat auf die (A, B, C, D) IL-9-, IL-17-, IFN $\gamma$ - und IL-9R-Produktion sowie die (E, F, G, H) Ki67- und CCR6-Expression. Dargestellt sind die prozentualen Anteile am CD4+ Lymphozytengate als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Unterschiede mit und ohne IL-9-Blockade waren nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test). ..... 72

Abbildung 22 Einfluss von rekombinantem IL-9 und einer IL-9-Blockade zusätzlich zur (A,C) Th9- und (B,D) Th17-Stimulation der (A,B) Naiven und (C,D) Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat auf die IL-9-, IL-9R-, IL-17- und die PU.1- mRNA-Expression. Darstellung der  $\Delta$ CT-Werte als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Aufgrund der zu großen Differenz der  $\Delta$ CT-Werte einiger Duplikate wurden Proben für IL-17 und PU.1 aus der Auswertung genommen. Unterschiede waren nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test). ..... 75

Abbildung 23 Einfluss von rekombinantem IL-9 und einer IL-9-Blockade zusätzlich zur (A) Th9 und (B) Th17-Stimulation der Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat auf die IL-17-, IL-10- und IFN $\gamma$ -Produktion sowie die IL-9R-Expression in regulatorischen T-Zellen. Darstellung in Prozent der Tregs als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Unterschiede waren nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test). .... 77

Abbildung 24 IL-9-Konzentration in Überständen der Kulturen nach Stimulation mit Th9- bzw. Th17-Stimulus mit und ohne IL-9-Blockade mittels eines spezifischen Antikörpers. Darstellung der IL-9-Konzentration in pg/ml als Streudiagramm mit Median und Interquartilsabstand. Signifikante Unterschiede sind angegeben (Mann-Whitney-U-Test). ..... 79

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte .....	13
Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien .....	14
Tabelle 3 Reagenzien .....	15
Tabelle 4 Lösungen .....	16
Tabelle 5 Gebrauchsfertige Kits .....	16
Tabelle 6 Zytokine und Stimulantien .....	17
Tabelle 7 Fluoreszenzmarkierte Antikörper .....	18
Tabelle 8 Primer .....	18
Tabelle 9 Verwendete Stimuli .....	23
Tabelle 10 Th9-Stimuli in der Literatur .....	24
Tabelle 11 Charakterisierung der T-Zellsubpopulationen .....	26
Tabelle 12 Extra- und intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung zur Phänotypisierung .....	28
Tabelle 13 Extra- und intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung für Stimulationsexperimente .....	28
Tabelle 14 RT-PCR Zyklen .....	34
Tabelle 15 Charakteristika der Pat und HD .....	36
Tabelle 16 Charakteristika der HD .....	36
Tabelle 17 Charakteristika, Laborparameter, medikamentöse Therapie und Krankheitsaktivität der Pat .....	37
Tabelle 18: Nachweis von Foxp3 in der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion .....	41
Tabelle 19 Zytokinproduktion und Expression des Chemokinrezeptors CCR6, des Proliferationsmarkers und des IL-9R der Naiven- und der Nicht Naiven-T-Zellfraktion von HD und Pat .....	45
Tabelle 20 Zusammensetzung der CD4+ Lymphozyten nach Th9- bzw. Th17 Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion .....	48
Tabelle 21 Zytokinproduktion und Expression des Chemokinrezeptors CCR6, des Proliferationsmarkers und des IL-9R nach Th9 bzw. Th17-Stimulation im Vergleich zu den Proben vor Stimulation .....	53
Tabelle 22 Zytokinproduktion und Expression des PU.1 und IL-9R nach Th9 bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion in der RT-PCR .....	58

Tabelle 23 IL-9-Konzentration in den Überständen nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion im Vergleich zu einer unspezifischen Stimulation .....	62
Tabelle 24 Unterschiede der IL-9-Konzentration in den Überständen nach Th-9-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion zwischen niedriger, mittlerer und hoher Krankheitsaktivität der Pat .....	62
Tabelle 25 Zytokinproduktion und IL-9R-Expression in Subpopulationen nach Th9 bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion .....	65
Tabelle 26 Fortsetzung von Tabelle 25 .....	66
Tabelle 27 Zytokinproduktion und IL-9R-Expression in regulatorischen T-Zellen nach Th9 oder Th17- Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat .....	66
Tabelle 28 Einfluss von IL-9 auf die Polarisierung der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion durch Th9- und Th17-Stimulation .....	69
Tabelle 29 Einfluss von IL-9 auf die Zytokinproduktion und die Expression von IL-9R, Ki67 und CCR6 (Durchflusszytometrie) unter Th9- Stimulation.....	73
Tabelle 30 Fortsetzung von Tabelle 29. Einfluss von IL-9 auf die Zytokinproduktion und die Expression von IL-9R, Ki67 und CCR6 (Durchflusszytometrie) unter Th17-Stimulation.....	74
Tabelle 31 Einfluss von IL-9 und einer IL-9-Blockade auf die Zytokinproduktion und die Expression von IL-9R und PU.1 (PCR) .....	76
Tabelle 32 Einfluss von IL-9 und einer IL-9-Blockade auf die Zytokinproduktion und die Expression von IL-9R in regulatorischen T-Zellen (Durchflusszytometrie).....	78
Tabelle 33 Nachweis der IL-9 Blockade in den Überständen .....	80
Tabelle 34 Zusammenfassung der Ergebnisse der Phänotypisierung der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion.....	81
Tabelle 35 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Th9- bzw. Th17-Stimulation der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion von HD und Pat .....	82
Tabelle 36 Zusammenfassung der IL-9-Konzentrationen in den Überständen nach Krankheitsaktivität in der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion.....	82
Tabelle 37 Zusammenfassung der Ergebnisse in der Naiven und Nicht Naiven T-Zellfraktion nach Th9- und Th17-Stimulation mit Zugabe von IL-9 oder Anti-IL-9.....	83

#### **IV Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Prof. Dr. Martina Prelog, die mir mit ihrer Begeisterung für die Forschung Freude an der Labortätigkeit und der Wissenschaft vermittelt hat. Ihre Ideen und Verbesserungsvorschläge haben mich stets motiviert und diese Arbeit enorm bereichert.

Außerdem gilt mein Dank PD Dr. Giovanni Almanzar, der mir mit viel Geduld und Humor die Grundlagen der Laborarbeit beigebracht hat. Für die familiäre Stimmung möchte ich mich herzlich bei Frau Angelika Will und bei allen MitdoktorandInnen bedanken. Danke an Sebastian Völkl für die Unterstützung beim Sammeln der Proben. Unvergessen bleiben die vielen Kaffeepausen mit Kristina, die uns leider viel zu früh verlassen musste.

Danke auch an alle ProbandInnen für die Teilnahme an dieser Studie.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, welche mich während des gesamten Studiums unterstützt und motiviert hat.

## V Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Jana Severine Elisabeth Heim
Geburtsdatum/ -ort	13.06.1990 in Ravensburg
Familienstand	verheiratet

### Schulbesuch

1996 - 2009	Grundschule Schreienesch, Friedrichshafen Graf-Zeppelin-Gymnasium, Friedrichshafen
-------------	---

### Sonstiges

08/2009 – 08/2010	Freiwilliges Soziales Jahr in „Prosoya“, Perú
-------------------	--

### Studium

10/2010	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Würzburg
08/2012	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
09/2013 - 02/2014	Studium an der Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona im Rahmen des ERASMUS-Programmes
04/2016	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
05/2017	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

### Promotion

Seit 2014	bei Prof. Dr. Martina Prelog, Universitätskinderklinik Würzburg
-----------	--

### Weiterbildung

Seit 01.09.2017	Assistenzärztin in Weiterbildung zum Facharzt Pädiatrie am Universitätsklinikum Würzburg, Kinderklinik und Poliklinik
-----------------	--

Würzburg, 20.08.2021

## **VI Eigene Veröffentlichungen**

Teile dieser Dissertation wurden in dem Fachartikel „Induction of IL-9 in peripheral lymphocytes of rheumatoid arthritis patients and healthy donors by Th17-inducing cytokine conditions“ in der Fachzeitschrift *frontiers in immunology* veröffentlicht [95].

## **VII Eigenleistung**

Die Eigenleistung bei dieser Dissertation bestand in der Anfertigung der Lymphozytenisolierung, der Isolierung der naiven CD4+ T-Zellen, der Phänotypisierung der CD4+ T-Zellen von RA-Patientinnen und Patienten und der Kontrollpersonen mittels Durchflusszytometrie, der Etablierung eines Protokolls zur Polarisierung von IL-9 produzierenden T-Zellen, der Durchführung der Stimulationsversuche und der Auswertung mittels Durchflusszytometrie, ELISA und RT-PCR sowie die statistische Auswertung und Diskussion der Daten.